https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
15rd Year, Vol. 15, No. 58, 2026 pp. 90-108
Received: 14/01/2026 Accepted: 27/04/2026

(Research Paper)

Investigation of effective factors in the biooxidation of iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Fatemeh Nazari
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
f.nazari761115@gmail.com

Parisa Mohammadi
Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
Research Center for Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Alzahra University, Tehran, Iran
p.mohammadi@alzahra.ac.ir

Parisa Tajer-Mohammad-Ghazvini[1]
Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
Ptajer@aeoi.org.ir

Hassan Zare-Tavakoli
Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran
hzare@aeoi.org.ir

Abstract
As industrial activities grow, concerns regarding the gradual depletion of easily processable metal reserves and the exploitation of these resources have increased. Consequently, the development of environmentally friendly technologies capable of extracting metals from complex and refractory sources has gained significant attention. Biohydrometallurgy is a green and sustainable technology that relies on iron-oxidizing microorganisms to facilitate metal dissolution. These microorganisms contribute to the leaching process through the production of ferric iron, which acts as an effective and low-cost oxidizing agent. In this study, the individual and interactive effects of the operational parameters, pulp density, time, and bacterial inoculum on ferric iron production in copper bioleaching from Kal-e-Kafi ore using uranium-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 were investigated. The experiments were designed using a central composite design within the framework of the response surface methodology. The results indicated that increasing the time from 2 to 21 days led to a decrease in ferric concentration from 1695.86 mg/L to 135.36 mg/L. Similarly, an increase in pulp density from 5% to 15% resulted in a reduction in ferric production from 1590.86 mg/L to 838.34 mg/L. However, when the bacterial inoculum was increased from 5% to 14.7%, there was an increase in ferric production from 520.89 mg/L to 1269 mg/L. The proposed statistical model demonstrated satisfactory predictive performance, with a p-value of 0.0022 and R^2 of 0.93. The key innovation of this study is the combination of efficient bacterial strains with a central composite design to model and simultaneously analyze the influences of the most important operational factors for ferric iron production. The statistically efficient method used in this study has been effective in reducing trial and error to a considerable extent for optimizing operational factors to move forward with innovations in the aspect of native bacterial strains for bioleaching on a larger scale.

Keywords: Bioleaching, Biooxidation, Chemolithotrophic bacteria, Experimental design, Iron

[1]Corresponding Author
3060-7647/ © 2026 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) .
Nazari, F., Mohammadi, P., Tajer-Mohammad-Ghazvini, P., Zare-Tavakoli, H. Investigation of effective factors in the biooxidation of iron by Acidithiobacillus ferrooxidans. *Journal of Microbial Biology*, 2026; 15(58):91-89. doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

Introduction

Iron is one of the most abundant elements in the earth'scrust and plays a vital role in many biological activities. Although various oxidation states have been proposed for iron, ferrous and ferric states are the most common. The iron cycle is one of the most important biogeochemical cycles, and microorganisms play a key role in the transition between various iron oxidation states. Iron-oxidizing microorganisms are not only key players in the biogeochemical cycles of iron but also play important roles in the cycles of other metals and in bioindustrial mining activities (1). The biologically catalyzed oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} is of particular significance in hydrometallurgical processes, as under low pH conditions (below 2), this reaction proceeds through the activity of iron-oxidizing bacteria at rates several orders of magnitude higher than abiotic oxidation under ambient temperature and pressure conditions (2). Sulfide ores are the most abundant source of copper, with chalcopyrite accounting for approximately 70% of the global copper reserves. Due to the high emissions of polluting gases, especially sulfur dioxide, as well as the high investment costs, efforts have intensified to develop alternative hydrometallurgical processes to conventional methods. Chalcopyrite bioleaching is a new technology for the economic extraction of copper from low-grade and complex ores, with low investment and operating costs, and environmental benefits. Bioleaching relies on the activity of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms to regenerate reactive agents, such as ferric iron and acid, during the leaching process (3, 4). The ability of acidophiles to grow at low pH and tolerate high acid concentrations is of industrial importance. One reason is their involvement in the iron cycle, which relies on the interconversion of iron ions between two oxidation states (Fe^{2+} and Fe^{3+}). The iron cycle primarily occurs in acidic environments, where ferrous iron acts as an electron donor under aerobic conditions, allowing acidophilic bacteria to generate energy. Ferric iron is relatively insoluble at neutral pH, whereas its solubility increases in acidic solutions, facilitating continuous cycling and metal solubilisation (5). *Acidithiobacillus ferrooxidans*, an acidophilic and chemolithotrophic bacterium, is one of the most important microorganisms used in biohydrometallurgy, capable of oxidizing ferrous iron. This bacterium plays a pivotal role in bioleaching refractory metal sulfides like chalcopyrite by producing ferric ions as a strong oxidant and regenerating them, turning the process into a green and economical method for extracting copper, gold, and other metals from low-grade ores (6, 7). Results by researchers indicate that resistance to uranium in leaching microorganisms is often very low, and uranium-containing leach solutions slow down or inhibit iron biooxidation in these microorganisms. Therefore, selecting the appropriate type of microbes in microbial leaching operations is of utmost importance (8, 9). The Kal-e-Kafi copper mine is located in the Anarak mining area in Isfahan province. Three types of mineralizations are identifiable in this mine: 1- Copper mineralization, 2- Copper-nickel-cobalt-uranium mineralization, 3- Copper-nickel-cobalt-arsenic mineralization (10). Accordingly, the aim of the present study is to optimize ferric iron production as a key oxidizing agent in the bioleaching of copper from the Kal-e-Kafi mine ore using uranium-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3. The present study, emphasizing the importance of iron ions in bioleaching, was conducted by optimizing the effective parameters (leaching duration, initial bacterial inoculum, and pulp density).

Materials and methods

A mesophilic chemolithotroph, uranium-resistant bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3, was used in this study that belongs to the biological resource of the Nuclear Science and Technology Research Institute of Iran (in press). The liquid APH medium was used for the growth of the target bacterium and for the bioleaching environment. The ore sample, with a grade of Cu = 4786 ppm, was obtained from the Kal-e-Kafi mine and was prepared for use by crushing to a particle size of d80 = 100 µm (10, 11, 12,13).

Three parameters, pulp density, duration of the bioleaching process, and bacterial inoculation, were evaluated for their individual and interactive effects on ferric iron production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 using response surface methodology (RSM) based on a central composite design (CCD). In the CCD, the variables were set at five levels: -α, -1, 0, +1, and +α. Using this design, 17 experiments were planned. All experiments were conducted in 150 mL of APH medium at 30°C in a shaking incubator at 150 rpm under aerobic conditions. Ferric and total iron concentrations were determined by sampling from the flasks at the end of each experiment (14, 15).

To determine ferric iron (Fe^{3+}) in the culture medium, 100 µL of the samples was added to 3 mL of 10% sulfosalicylic acid. Sulfosalicylic acid forms a purple complex with ferric ions present in the medium. The absorbance of the solution was then measured at 500 nm using a spectrophotometer, based on a standard calibration curve. For the measurement of total iron in the culture medium, 3 mL of 10% sulfosalicylic acid and 3 mL of 25% ammonia were added to 100 µL of the samples. Sulfosalicylic acid initially reacts with ferric ions to form a purple complex. Upon increasing the pH by adding ammonia, sulfosalicylic acid reacts with all iron ions present in the

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

medium, forming a yellow complex. The absorbance of the solution was measured at 425 nm using a spectrophotometer according to the standard calibration curve (16).

Discussion of Results & Conclusions

The results showed that the ferric iron produced by the bacterium decreased from 1695.86 mg/L to 135.36 mg/L as the bioleaching duration increased from 2 to 21 days. The prolonged bioleaching time also decreased ferric iron concentration because of microbial growth dynamics and inhibitory effects (17). The decrease in concentration of ferric iron during prolonged bioleaching time is not solely related to microbial growth dynamics but also to the consumption of ferric iron as an oxidant in leaching reactions and its removal from solution through precipitation as secondary minerals such as jarosite (3). With an increase in the initial bacterial inoculum from 5% to 14.7%, the ferric iron concentration increased from 520.89 mg/L to 1269 mg/L and then decreased to 1122.33 mg/L with further increases in inoculum size. Ferric iron production increased with initial inoculation up to an optimal level and declined after that time, likely due to competition for limited nutrients and oxygen. Furthermore, the results indicated that increasing the pulp density from %5 to %15 led to a decrease in ferric iron production from 1590.86 mg/L to 838.34 mg/L. Increasing pulp density reduced ferric iron generation due to mass transfer limitations and microbial inhibition, consistent with previous bioleaching experiments (17). The use of a central composite design enabled efficient identification of key and interaction effects, highlighting the importance of balanced process optimization. The p- and F-values of the proposed model were 0.0022 and 11.08, respectively, confirming the model's validity. Moreover, the R^2 value was 0.93, indicating that the proposed model can reliably predict the experimental data. Finally, the results show that ferric iron production by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3 is strongly influenced by operational conditions. The application of central composite design within the response surface methodology framework enabled the simultaneous identification and quantification of main and interactive effects of operational variables while substantially reducing the number of experiments and associated costs. These findings underscore that effective ferric iron production requires achieving an optimal balance between operational and biological conditions of the system. Overall, the results of this study not only provide valuable scientific insights into the behavior of the native uranium-resistant bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3, but also serve as a robust foundation for designing and optimizing large-scale bioleaching processes, thereby enhancing the efficiency of industrial applications reliant on biological iron oxidation by indigenous strains.

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

زیست‌شناسی میکروبی
سال پانزدهم، شماره ۵۸، ۱۴۰۵، صفحه ۹۱-۱۰۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۷

مقاله پژوهشی

بررسی فاکتورهای مؤثر در اکسیداسیون زیستی آهن توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس*

فاطمه نظری
میکروبیولوژی محیطی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران.
f.nazari761115@gmail.com

پریسا محمدی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران.
مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
p.mohammadi@alzahra.ac.ir

پریسا تاجرمحمدقزوینی *
پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران.
Ptajer@aeoi.org.ir

حسن زارع توکلی
پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم وفنون هسته‌ای، تهران، ایران.
hzare@aeoi.org.ir

چکیده

هم‌زمان با رشد فعالیت‌های صنعتی، نگرانی‌ها دربارهٔ کاهش تدریجی ذخایر فلزی با قابلیت فرآوری آسان و بهره‌برداری از این منابع افزایش یافته است؛ ازاین‌رو، توسعه فناوری‌های زیست‌سازگار که قادر به استخراج فلزات از منابع پیچیده و مقاوم هستند، اهمیت چشمگیری پیدا کرده است. هیدرومتالورژی زیستی به‌عنوان یک فناوری سبز و پایدار شناخته می‌شود که برای تسهیل انحلال فلزات بر میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده آهن متکی است. این میکروارگانیسم‌ها از طریق تولید یون‌های آهن فریک که به‌عنوان یک عامل اکسیدکننده مؤثر و کم‌هزینه عمل می‌کنند، در فرایند فروشویی نقش دارند. در پژوهش حاضر، اثرات منفرد و برهم‌کنشی پارامترهای عملیاتی شامل پالپ دانسیته، زمان فرایند و میزان تلقیح اولیه باکتری بر تولید آهن فریک در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ کال کافی، توسط باکتری مقاوم به اورانیوم *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3 بررسی شد. طراحی آزمایش‌ها با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ انجام شد. نتایج نشان دادند افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز موجب کاهش غلظت آهن فریک از ۱۶۹۵/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۳۵/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر می‌شود. به‌طور مشابه، افزایش پالپ دانسیته از ۵ درصد به ۱۵ درصد باعث کاهش میزان تولید آهن فریک از ۱۵۹۰/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر به ۸۳۸/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر شد. از سوی دیگر، با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری از ۵ درصد به ۱۴/۷ درصد، مقدار تولید آهن فریک از ۵۲۰/۸۹ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۲۶۹ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت. مدل آماری پیشنهادی عملکرد پیش‌بینی‌کننده رضایت‌بخشی از خود نشان داد؛ به‌طوری‌که مقدار $P=0/0022$ و $R^2=0/93$ به دست آمد. نوآوری اصلی این پژوهش در ترکیب به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی کارآمد با روش طراحی مرکب مرکزی به‌منظور مدل‌سازی و تحلیل هم‌زمان اثر مهم‌ترین عوامل عملیاتی مؤثر بر تولید آهن فریک نهفته است. روش آماری کارآمد به‌کاررفته در این تحقیق، با کاهش قابل توجه وابستگی به آزمون و خطا در بهینه‌سازی پارامترهای عملیاتی، زمینه را برای توسعه و پیشبرد فرایندهای فروشویی زیستی مبتنی بر سویه‌های بومی در مقیاس‌های بزرگ‌تر فراهم کرده است.

واژگان کلیدی: اکسیداسیون زیستی، آهن، باکتری کمولیتروف، فروشویی زیستی، طراحی آزمایش

---

* **نویسندهٔ مسئول مکاتبات**

نظری، فاطمه؛ محمدی، پریسا؛ تاجرمحمدقزوینی، پریسا؛ زارع توکلی، حسن. بررسی فاکتورهای موثر در اکسیداسیون زیستی آهن توسط اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس. *زیست شناسی میکروبی*، ۱۴۰۵؛ ۱۵(۵۸): ۹۱-۱۰۸. doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

3060-7647/ © 2026 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

مقدمه

آهن یکی از فراوان‌ترین عناصر موجود در پوسته زمین است و نقش حیاتی در بسیاری از فعالیت‌های زیستی دارد. اگرچه حالت‌های اکسیداسیونی مختلفی برای آهن پیشنهاد شده‌اند، دو حالت فرو[۲] و فریک[۳] شایع‌ترین آنها محسوب می‌شوند. تغییر در عدد اکسایش آهن تأثیرگرفته از شرایط محیطی از قبیل، pH، میزان اکسیژن و پتانسیل اکسید-احیاء است. چرخه آهن یکی از مهم‌ترین چرخه‌های بیوژئوشیمیایی است و میکروارگانیسم‌ها نقش بسیار کلیدی در جابه‌جایی بین حالت‌های اکسیداسیون مختلف آهن دارند. در میان انواع اکسیدکنندگان، بیشترین مطالعه را باکتری‌های اکسیدکننده آهن به خود اختصاص دادند. اکثر این باکتری‌ها به شاخهٔ پروتئوباکتریا، بزرگ‌ترین شاخه باکتریایی تعلق دارند. اکسیدکنندگان آهن نه‌تنها بازیکنان کلیدی و مهم در چرخه‌های بیوژئوشیمیایی آهن محسوب می‌شوند، بلکه در چرخه سایر عناصر و فعالیت‌های زیست صنعتی مرتبط با معدن نیز از اهمیت زیادی برخوردارند (۱). اکسیداسیون زیست‌کاتالیزشدهٔ فرو به فریک در فرایندهای بیوهیدرومتالورژی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا در pH پایین (کمتر از ۲)، این فرایند با استفاده از باکتری‌های اکسیدکنندهٔ آهن با سرعتی چندین مرتبه بیشتر از اکسیداسیون غیرزیستی در دما و فشار معمولی انجام می‌شود (۲). آهن فریک نقش بسیار مهمی در فرایندهای فروشویی زیستی کانسنگ‌های سولفیدی دارد. کانسنگ‌های سولفیدی فراوان‌ترین منبع تأمین مس به شمار می‌روند که در این میان، کالکوپیریت حدود ۷۰ درصد از ذخایر جهانی مس را تشکیل می‌دهد. به‌طور معمول، کانسارهای پرعیار از طریق فلوتاسیون و به‌دنبال آن ذوب کنسانتره فرآوری می‌شوند؛ با این حال به‌دلیل انتشار زیاد گازهای آلاینده، به‌ویژه دی اکسید گوگرد[۴] و همچنین هزینه‌های بالای سرمایه‌گذاری، تلاش‌ها در زمینهٔ توسعه جایگزینی فرایندهای بیوهیدرومتالورژیکی به‌جای روش‌های مرسوم شدت یافته‌اند. کالکوپیریت فراوان‌ترین و مقاوم‌ترین کانی سولفیدی مس در جهان به شمار می‌رود. فروشویی زیستی کالکوپیریت یک فناوری نوین برای استحصال اقتصادی مس از کانسارهای کم‌عیار و پیچیده، با هزینه‌های سرمایه‌گذاری و عملیاتی کم و مزایای زیست‌محیطی به شمار می‌رود. فروشویی زیستی وابسته به عملکرد میکروارگانیسم‌های اکسیدکنندهٔ آهن و گوگرد برای تولید عوامل واکنش‌گر مانند آهن فریک و اسید در طول فروشویی است (۳, ۴).

آهن فریک نقش بسیار مهمی در بیولیچینگ کالکوپیریت دارد. بیولیچینگ کالکوپیریت شامل چندین مرحله است که با انحلال سولفیدهای معدنی توسط پروتون‌ها و آهن فریک موجود در محیط بیولیچینگ آغاز می‌شود. سپس فلزات به‌صورت یونی آزاد می‌شوند و گاز هیدروژن سولفید تولید می‌شود. هیدروژن سولفید تولیدشده با اکسایش توسط یون آهن فریک اکسید می‌شود و متعاقباً به پلی‌سولفیدها تجزیه و دایمریزه می‌شود. نتیجه فعالیت‌های ترکیبی پروتون‌ها و آهن فریک، تشکیل گوگرد عنصری به عنوان واسطه اصلی است. واکنش‌های این مکانیسم به‌صورت زیر بیان می‌شوند (۴):

$$CuFeS_2 + Fe^{3+} + H^+ \rightarrow Cu^{2+} + Fe^{2+} + H_2S_n \ (n \geq 2) \quad (1)$$

$$0.5\ H_2S_n + Fe^{3+} \rightarrow 0.125\ S_8 + Fe^{2+} + H^+ \quad (2)$$

گوگرد عنصری تولیدشده در واکنش ۲ نسبتاً پایدار است؛ اما ممکن است توسط میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده گوگرد (مانند *اسیدی تیوباسیلوس*

[۲] Fe^{2+}
[۳] Fe^{3+}
[۴] SO_2

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

تیواکسیدانس[5] یا *اسیدی تیوباسیلوس کالدوس*[6]) به اسید سولفوریک اکسید شود و همچنین آهن فرو تولیدشده در واکنش‌های ۱ و ۲ نیز ممکن است مجدداً توسط میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده آهن مانند *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* یا باکتری‌های جنس *لپتوسپیریلوم*[7] یا *سولفوباسیلوس*[8] به آهن فریک اکسید شود؛ در نتیجه نقش میکروارگانیسم‌ها در فرایند انحلال سولفیدهای فلزی، تأمین اسید سولفوریک برای حمله پروتونی و حفظ آهن در حالت اکسیدشده فریک برای حمله اکسیداتیو (اکسایشی) به کانی است. این نکته که اسیدوفیل‌ها توانایی رشد در pH پایین و تحمل غلظت بالای اسید را داشته باشند، از دیدگاه صنعتی حائز اهمیت است. یکی از دلایل آن، مشارکت آنها در چرخه آهن است که به تبدیل متقابل یون‌های آهن بین دو حالت اکسیداسیون فرو و فریک متکی است. چرخه آهن در درجه اول در محیط‌های اسیدی رخ می‌دهد؛ جایی که آهن دو ظرفیتی به‌عنوان دهنده الکترون در شرایط هوازی عمل می‌کند و به باکتری‌های اسیددوست اجازه می‌دهد انرژی کسب کنند. آهن سه ظرفیتی در pH خنثی نسبتاً نامحلول است؛ درحالی‌که حلالیت آن در محلول‌های اسیدی افزایش می‌یابد و چرخه مداوم و انحلال فلز را تسهیل می‌کند (۴, ۵).

باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس*، باکتری اسیددوست و کمولیتوتروف، یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در هیدرومتالورژی زیستی است که قادر به اکسیداسیون آهن دو ظرفیتی ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) و چندین ترکیب گوگردی از قبیل، گوگرد عنصری در محیط‌های اسیدی (pH بهینه ی ۲/۵) است. این باکتری از طریق تولید یون‌های فریک به عنوان اکسیدکننده قوی و بازتولیدکننده آن، نقش محوری در بیولیچینگ سولفیدهای فلزی مقاوم مانند کالکوپیریت ($CuFeS_2$) دارد که این فرایند را به روشی سبز و اقتصادی برای استخراج مس، طلا و سایر فلزات از کانسارهای کم‌عیار تبدیل کرده است. این باکتری، گسترده‌ترین میکروارگانیسم مطالعه‌شده و پراستفاده ترین میکروارگانیسم در صنعت فروشویی زیستی است (۶, ۷). امروزه ثابت شده است دانسیته جمعیت میکروبی و مقاومت آنها به فلزات در فرایندهای فروشویی زیستی از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات نشان داده است استراتژی مقاومت باکتری‌ها به اسید و فلزات سنگین برای پروسه‌های فروشویی میکروبی بسیار با اهمیت است؛ جایی که فلزات محلول به‌طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کنند (۸). نتایج توسط محققان نشان داده‌اند اغلب مقاومت در میکروارگانیسم‌های فروشویی نسبت به اورانیوم بسیار کم است و محلول‌های فروشویی دارای اورانیوم، اکسیداسیون زیستی آهن فرو را در این میکروارگانیسم‌ها کند یا مهار می‌کنند (۹)؛ بنابراین، انتخاب نوع مناسب میکروب‌ها در عملیات فروشویی میکروبی بیش‌ازحد اهمیت دارد.

معدن مس کال‌کافی در منطقه معدنی انارک در استان اصفهان واقع شده است. منطقه‌بندی مشخصی از کانسارها در ناحیه انارک وجود دارد و از غرب به شرق سه نوع کانه‌زایی مرتبط با ولکانیک ائوسن قابل تشخیص هستند: ۱- کانه‌زایی مس، ۲- کانه‌زایی مس-نیکل-کبالت-اورانیوم، ۳- مس-نیکل-کبالت-آرسنیک (۱۰). براساس این، هدف از پژوهش حاضر، بهینه‌سازی تولید یون آهن فریک به‌عنوان عامل اکسیدکننده کلیدی در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال‌کافی، توسط باکتری مقاوم به اورانیوم *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3[9] است. در این مطالعه، برای نخستین‌بار اثرات اصلی و برهم‌کنشی پالپ دانسیته، زمان فرایند و میزان تلقیح باکتری به‌صورت کمی با بهره‌گیری از روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ بررسی شد. نوآوری اصلی این پژوهش در تلفیق استفاده از یک سویه مقاوم به اورانیوم در فرایند

[5] *Acidithiobacillus thiooxidans*
[6] *Acidithiobacillus caldus*
[7] *Leptospirillum*
[8] *Sulfobacillus*
[9] *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال‌کافی با رویکرد پیشرفته طراحی آزمایش و تحلیل آماری دقیق نهفته است که امکان شناسایی شرایط بهینه واقعی و کاهش آزمون و خطا را فراهم می‌کند. نتایج این مطالعه می‌تواند مبنای علمی معتبری برای توسعه و مقیاس‌پذیری فرایندهای زیستی استخراج مبتنی بر اکسیداسیون زیستی آهن فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

باکتری و سنگ معدن

باکتری استفاده‌شده در این پژوهش، یک باکتری مقاوم به اورانیوم به نام *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3، جداشده از معدن گچین بندرعباس است که متعلق به ذخایر زیستی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای ایران است (In press). کانسنگ مس حاوی اورانیوم، از معدن کال‌کافی با عیار حدود Cu=۴۷۸۶ میلی‌گرم بر لیتر تهیه و خردایش آن با اندازه ذرات d80= 100 میکرومتر آماده شد. طول و عرض محدوده جغرافیایی محدوده کال کافی ´۱۰ °۵۴ تا ´۲۰ °۵۴ شرقی و ´۲۰ °۳۳ تا ´۳۰ °۳۳ شمالی در منطقه معدنی انارک در استان اصفهان است (۱۱).

محیط‌های کشت باکتری

از محیط کشت مایع APH و محیط کشت جامد SM medium برای کشت باکتری مدنظر استفاده شد (۱۲, ۱۳). محیط کشت مایع APH در یک لیتر حاوی ۲ گرم آمونیوم سولفات، ۰/۵گرم دی‌پتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۰/۱ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۰۱ گرم کلسیم نیترات و ۲۰ گرم نمک سولفات آهن ۷ آبه است و pH نهایی این محیط توسط اسید سولفوریک روی ۱/۸ تنظیم شد (۱۳). باکتری با مقدار تلقیح اولیه ۲۰ درصد به شکل هوازی در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ rpm (شرایط بهینه رشد) در این محیط کشت داده شد.

محیط کشت جامد SM medium استفاده‌شده دارای **محلول ۱:** ۳۵ میلی‌لیتر از محلول 10x Modified 9K (حاوی: ۵۰ گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۱/۶۶ گرم بر لیتر KCl، ۰/۸۴ گرم بر لیتر K_2HPO_4، ۸/۳۴ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲۴ گرم بر لیتر $Ca(NO_3)_2.4H_2O$) که ۲۶۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد (pH محلول برابر با ۲/۵) و **محلول ۲:** ۱۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$ در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر (pH برابر با ۲/۵) و **محلول ۳:** ۲ گرم آگارز در ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر (۱۲) است. پلیت‌های کشت باکتری در محیط SM در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

بررسی پارامترهای مؤثر در اکسیداسیون زیستی آهن برای آزمایش‌های فروشویی زیستی توسط طراحی آزمایش

سه پارامتر میزان دانسیته پالپ (استریل‌شده)، تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی و میزان تلقیح باکتری به روش رویه پاسخ[10] و از طریق طراحی مرکب مرکزی[11]، به‌منظور بررسی اثرات منفرد و تعاملی‌شان بر میزان آهن فریک تولیدشده در فرایند فروشویی زیستی مس از کانسنگ معدن کال‌کافی توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3 ارزیابی و بهینه‌سازی شدند. در طراحی مرکب مرکزی، متغیرهای مستقل در ۵ سطح $+\alpha$، 1، 0، 1-، $-\alpha$ بررسی شدند. سطوح مختلف پارامترهای طراحی آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. در طی این بررسی ۱۷ عدد آزمایش طراحی شد که مشخصات هر آزمایش در جدول ۲ مشاهده می‌شود. تمام آزمایشات در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری با حجم های ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت APH انجام و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکرانکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و تحت شرایط هوازی گرماگذاری شدند. میزان آهن فریک تولیدی و همچنین میزان آهن کُل با نمونه‌برداری از مایع رویی محیط

[10] Response Surface Methodology (RSM)

[11] Central Composite Design (CCD)

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

فروشویی در ارلن‌های مربوط در روز پایانی هر آزمایش اندازه‌گیری شد (۱۴, ۱۵).

جدول ۱- متغیرهای طراحی مرکب مرکزی و سطوح کدشده مربوط به آنها

Table 1- Variables and the corresponding coded levels in the central composite design

Parameters	-α	-1	0	+1	+α
Pulp density (%)	5	7.03	10	12.97	15
Bacterial inoculum (%)	5	8.04	12.5	16.96	20
time	2	5.85	11.5	17.15	21

سنجش آهن

برای سنجش میزان آهن فریک محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط فروشویی زیستی به ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۱۰ درصد اضافه شد. اسید سولفوسالیسیلیک با یون‌های آهن فریک محیط تشکیل کمپلکس ارغوانی رنگ می‌دهد. سپس جذب محلول با توجه به منحنی استاندارد در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد (شکل ۱-A).

برای اندازه‌گیری میزان آهن کل در نمونه‌ها، ۳ میلی‌لیتر از اسید سولفوسالیسیلیک ۱۰ درصد و سپس ۳ میلی‌لیتر از آمونیاک ۲۵ درصد به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط اضافه شد. اسید سولفوسالیسیلیک با یون‌های آهن فریک ترکیب شد و کمپلکس ارغوانی رنگی ایجاد کرد. با افزایش pH محیط به دلیل افزودن آمونیاک، اسید سولفوسالیسیلیک با تمام یون‌های آهن موجود در محیط، واکنش و کمپلکس زرد رنگی تشکیل می‌دهد؛ درنهایت، جذب محلول با استفاده از منحنی استاندارد در طول موج ۴۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (شکل ۱-B) (۱۶).

جدول ۲- مقادیر متغیرهای آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش رویه پاسخ

Table 2- Experimental levels of central composite design variables in RSM

RUN	A Time (Day)	B Inoculation (%)	C Pulp Density (%)
1	17.15	8.04	12.97
2	5.85	8.04	12.97
3	17.15	16.96	12.97
4	5.85	16.96	12.97
5	11.50	12.50	15.00
6	5.85	8.04	7.03
7	11.50	12.50	5.00
8	11.50	12.50	10.00
9	17.15	16.96	7.03
10	17.15	8.04	7.03
11	11.50	12.50	10.00
12	21.00	12.50	10.00
13	11.50	5.00	10.00
14	11.50	20.00	10.00
15	2.00	12.50	10.00
16	5.85	16.96	7.03
17	11.50	12.50	10.00



doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666



شکل ۱- تصاویر بالن حجمی‌های ۵۰ میلی‌لیتری از آزمایش سنجش آهن براساس تغییرات جذب نوری (A) سنجش آهن فریک (B) سنجش آهن کل

Figure 1- Pictures of volumetric flasks (50ml) in iron determination test based on optical absorbance changes (A) Ferric iron determination (B) Total iron determination

نتایج

در جدول ۳ مشخصات کمی مربوط به هر ۱۷ آزمایش طراحی‌شده براساس سه متغیر مستقل طراحی مرکب مرکزی و همچنین میزان آهن فریک تولیدی مربوط به هر ۱۷ آزمایش مشاهده می‌شود. به‌منظور ارزیابی میزان تطابق مدل پیشنهادی نرم‌افزار با رابطه معنادار آماری موجود بین متغیرهای مستقل و متغیر پاسخ از تحلیل واریانس[12] استفاده شد (جدول ۴). روش رویه پاسخ یک مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی است که ارتباط میان چندین متغیر مستقل و یک یا چندین متغیر وابسته (متغیر پاسخ) را توصیف می‌کند. روش رویه پاسخ، نتایج تجربی به‌دست‌آمده از طراحی آزمایش را توسط مدل‌های ریاضی مناسب‌سازی می کند و اعتبار مدل براساس روش‌های آماری به دست می‌آید. طراحی آزمایش به‌ویژه برای بهبود کارایی فرایندها قابل استفاده است. هدف اصلی طراحی آزمایش، دخالت‌دادن هم زمان تمام پارامترهای مهم در یک مجموعه از آزمایشات طراحی‌شده و ادغام نتایج از طریق یک مدل ریاضی است. پس از آن، از این مدل می‌توان برای بهینه‌سازی، پیش‌بینی یا تفسیر استفاده کرد. این امر منجر به بهبود عملکرد فرایند، کاهش تعداد متغیرها در فرایند با درنظرگرفتن تنها مهم‌ترین آنها و همچنین کاهش هزینه عملیات و زمان آزمایش می‌شود (۱۴). به‌طور کلی، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F بزرگ در جدول تحلیل واریانس نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵ درصد است. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به‌ترتیب برابر با ۰/۰۰۲۲ و ۱۱/۰۸ است که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد. همچنین مقدار R^2 برابر با ۰/۹۳ است که این مقدار نشان می‌دهد مدل پیشنهادی به‌خوبی قادر است مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند. نتایج جدول ۴ نشان می‌دهند هر سه متغیر تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی، میزان تلقیح اولیه باکتری و میزان پالپ دانسیته از لحاظ آماری (p-value < ۰/۰۵) بر میزان آهن فریک تولیدشده توسط باکتری بسیار تأثیرگذار هستند.

مدل پیشنهادشده توسط نرم‌افزار به‌صورت زیر تعریف شده است:

Fe^{3+} =-1691.22699+256.18806 * Time +688.56736 * Inoculation-134.27012 * Pulp Density-44.27908 * Time * Inoculation+1.28396 * Time * Pulp Density+3.54025 * Inoculation * Pulp Density-3.31297* $Time^2$-27.48621* $Inoculation^2$+1.78258 * Time * $Inoculation^2$

[12] Analysis of variance (ANOVA)

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

جدول ۳- مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش رویه پاسخ

Table 3- Experimental variables and responses in the central composite design of RSM

RUN	A Time (Day)	B Inoculation (%)	C Pulp Density (%)	غلظت آهن فریک (ppm)
1	17.15	8.04	12.97	202
2	5.85	8.04	12.97	679
3	17.15	16.96	12.97	650
4	5.85	16.96	12.97	1141.5
5	11.50	12.50	15.00	924.5
6	5.85	8.04	7.03	1285.5
7	11.50	12.50	5.00	1676
8	11.50	12.50	10.00	1213.5
9	17.15	16.96	7.03	982.5
10	17.15	8.04	7.03	679
11	11.50	12.50	10.00	982.5
12	21.00	12.50	10.00	245.5
13	11.50	5.00	10.00	635.5
14	11.50	20.00	10.00	1228
15	2.00	12.50	10.00	1806
16	5.85	16.96	7.03	1517
17	11.50	12.50	10.00	1459

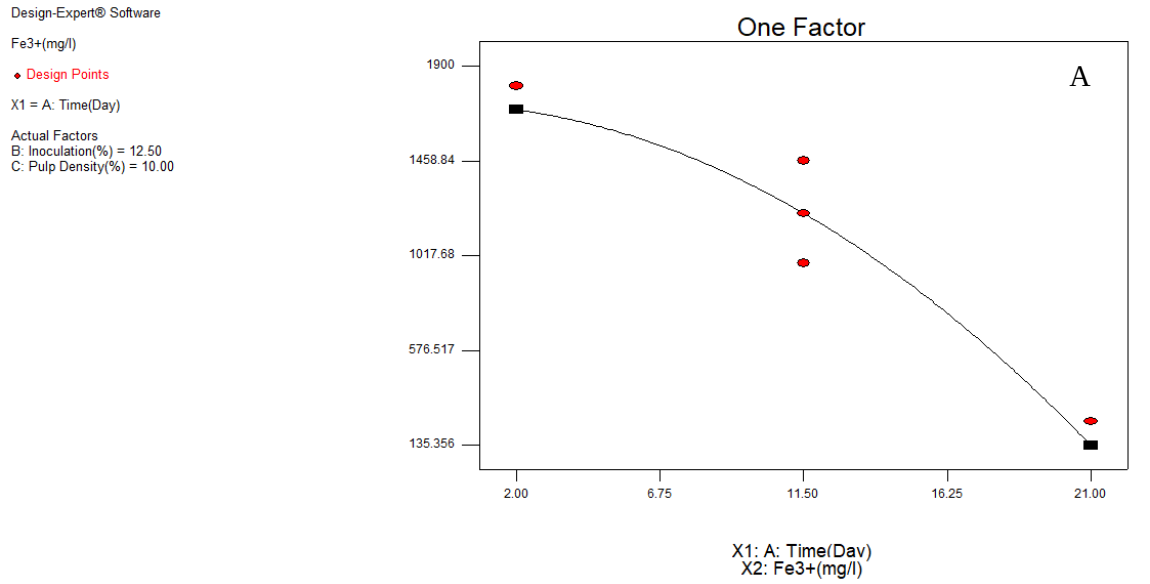
نتایج نشان دادند میزان آهن کل محیط کشت برابر با ۴۰۸۹/۵ میلی‌گرم بر لیتر است که در نقطه مرکزی، میزان آهن فریک تولیدشده توسط باکتری با افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز، از مقدار ۱۶۹۵/ ۸۶ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۳۵/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش می‌یابد (شکل ۲). علت این کاهش را می‌توان به مصرف پیوسته آهن فریک، به‌عنوان اکسیدکننده اصلی برای انحلال مس در طول فروشویی زیستی دانست. با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری در محیط از ۵ تا ۱۴/۷ درصد، میزان آهن فریک تولیدی از ۵۲۰/۸۹ میلی‌گرم بر لیتر به ۱۲۶۹ میلی‌گرم بر لیتر افزایش می‌یابد و سپس با افزایش بیشتر میزان تلقیح اولیه باکتری، میزان آهن فریک تولیدشده به ۱۱۲۲/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر تقلیل می‌یابد. دلایل احتمالی برای این کاهش را می‌توان به یک مجموعه از فاکتورهای فیزیولوژیکی منفی نسبت داد. این فاکتورها شامل رقابت بین‌سلولی، اتمام مواد مغذی ضروری و انباشتگی متابولیت‌های سمی هستند که منجر به مهار احتمالی فعالیت‌های متابولیکی - میکروبی و درنتیجه کاهش کارایی مؤثر تولید زیستی آهن فریک در حین فروشویی زیستی می‌شوند. همچنین نتایج نشان دادند با افزایش میزان پالپ دانسیته استفاده‌شده از ۵ تا ۱۵ درصد، میزان آهن فریک تولیدشده از ۱۵۹۰/۸۶ میلی‌گرم بر لیتر به ۸۳۸/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر کاهش می‌یابد. دانسیته پالپ‌های بالا ممکن است چندین فاکتور مهاری را بر روند فرایند فروشویی زیستی اعمال کنند. این فاکتورهای مهاری شامل محدودیت دسترسی به مواد مغذی، CO_2 و O_2 و همچنین محدودیت انتقال جرمی هستند که می‌توانند بر فعالیت میکروبی و کاهش تولید زیستی آهن فریک تأثیر منفی بگذارند (شکل ۲). در اشکال ۳ تا ۵، رویه‌های سه‌بعدی پاسخ‌ها نشان داده شده‌اند که ناشی از برهمکنش سه متغیر تعداد روزهای انجام فرایند فروشویی زیستی، میزان تلقیح اولیه باکتری و میزان پالپ دانسیته استفاده‌شده هستند.

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

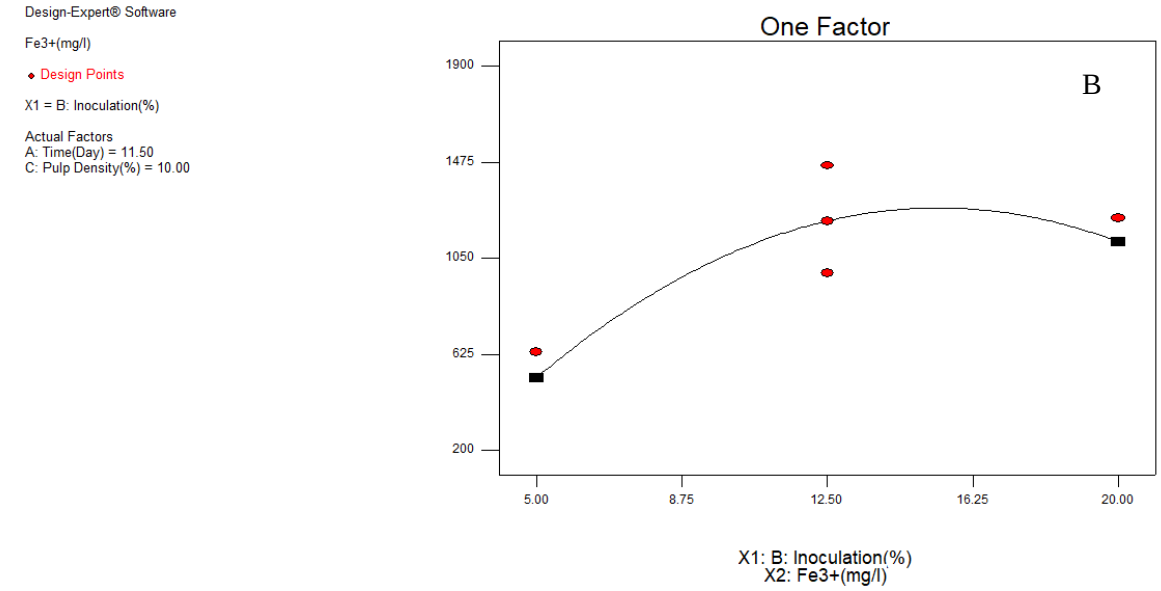
جدول ۴- تحلیل واریانس مدل پیشنهادی

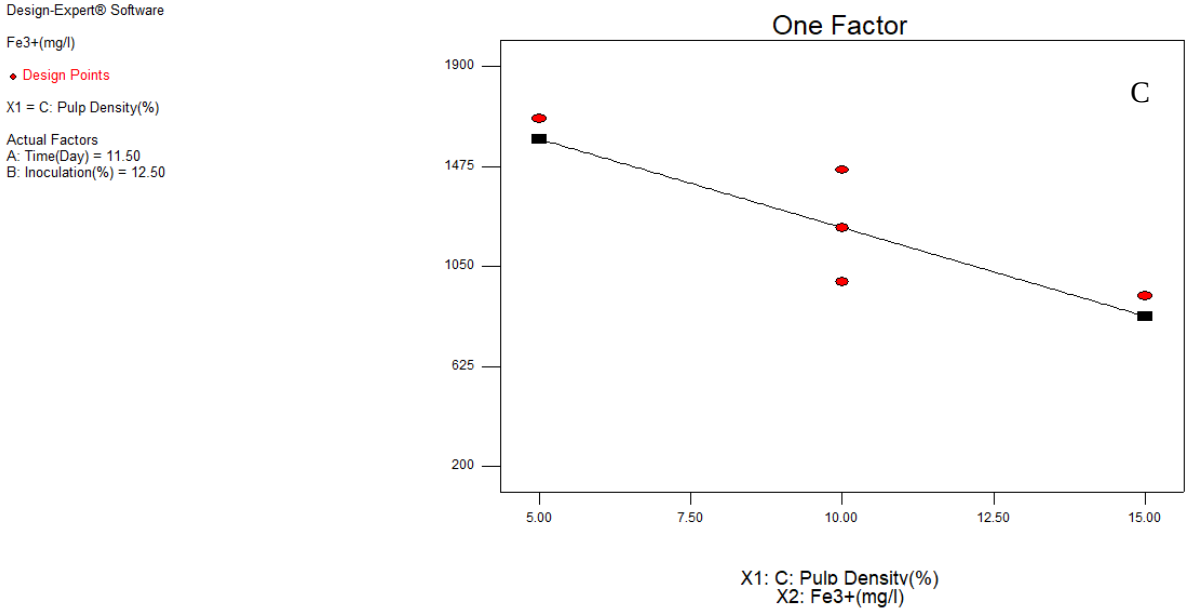
Table 4- ANOVA of the proposed model

References	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	3225634	9	358403.8	11.08	0.0022
A-Time	1217580	1	1217580	37.66	0.0005
B-Inoculation	436643.7	1	436643.7	13.50	0.0079
C-Pulp Density	683559.3	1	683559.3	21.14	0.0025
AB	413.2813	1	413.2813	0.01	0.9132
AC	3719.531	1	3719.531	0.12	0.7444
BC	17625.03	1	17625.03	0.55	0.4843
A^2	138022.9	1	138022.9	4.27	0.0777
B^2	238449.8	1	238449.8	7.37	0.0300
AB^2	132882.5	1	132882.5	4.11	0.0822



doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

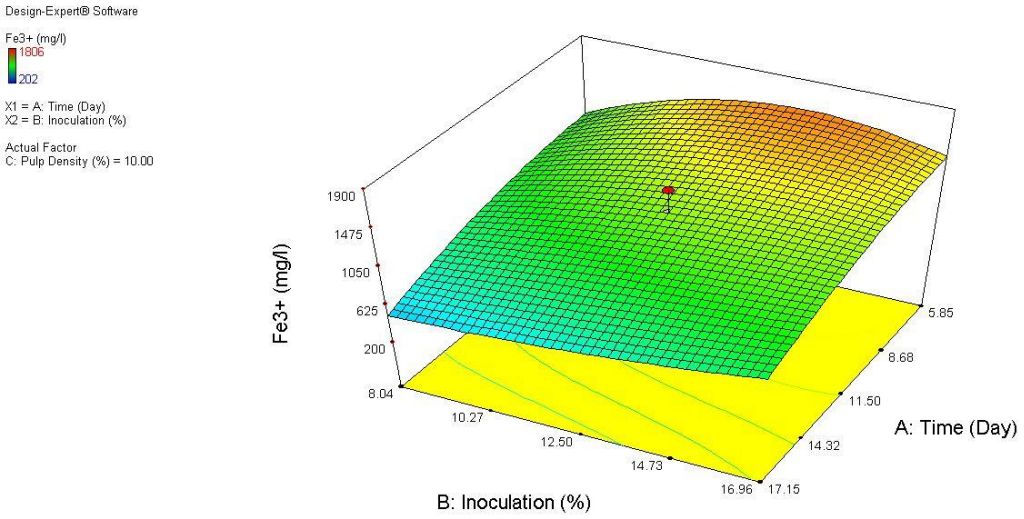




شکل ۲- نمودارهای تأثیر زمان (A)، میزان تلقیح اولیه باکتری (B) و میزان پالپ دانسیته (C) به‌طور جداگانه بر اکسیداسیون زیستی آهن توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3

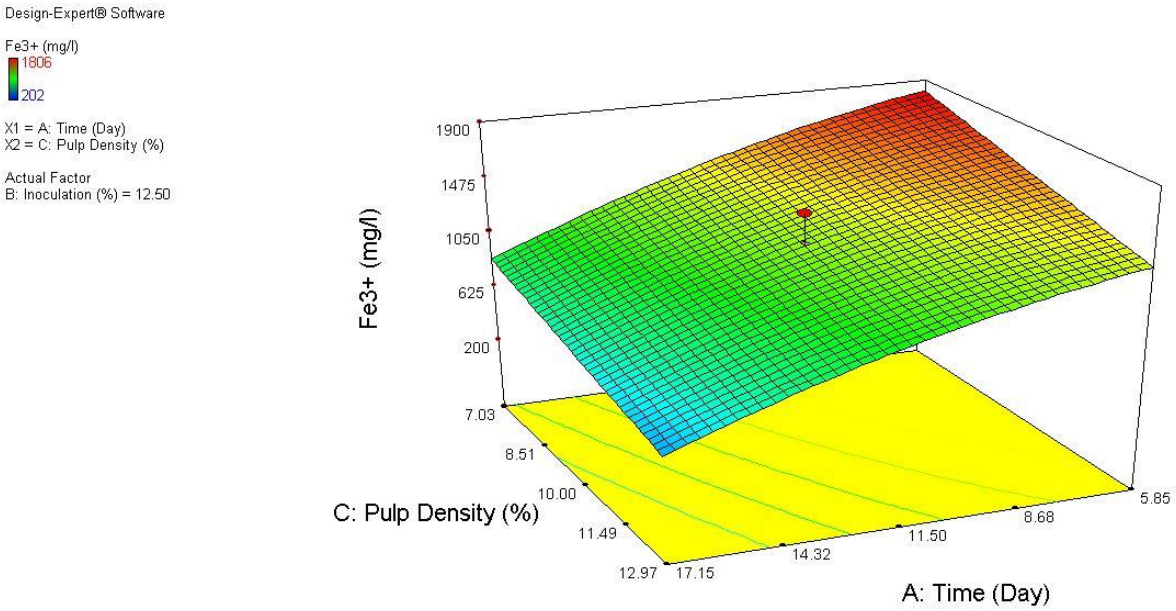
Figure 2- Diagrams of time (A), initial bacterial inoculum (B) and pulp density (C) effect on the iron biooxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666



شکل ۳- رویه سه‌بعدی برهمکنش تعداد روزهای انجام فروشویی زیستی و میزان تلقیح اولیه باکتری بر مقدار آهن فریک تولیدشده توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3.

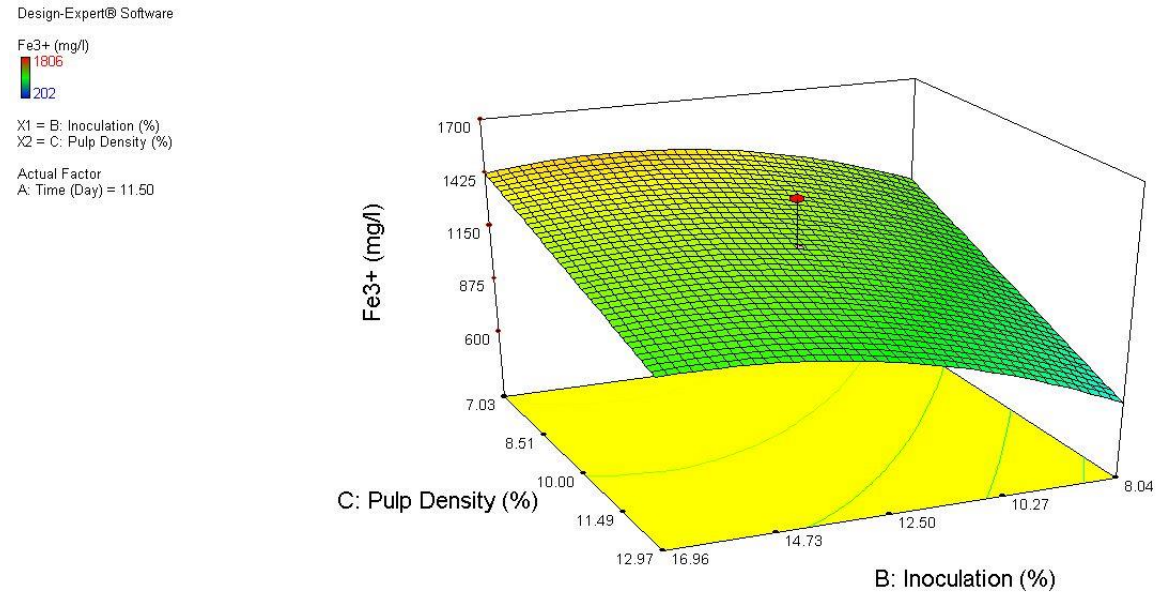
Figure 3- Three-dimensional surface of interaction of bioleaching duration and initial bacterial inoculum on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.



شکل ۴- رویه سه‌بعدی برهمکنش تعداد روزهای انجام فروشویی زیستی و میزان پالپ دانسیته استفاده‌شده بر مقدار آهن فریک تولیدشده توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3.

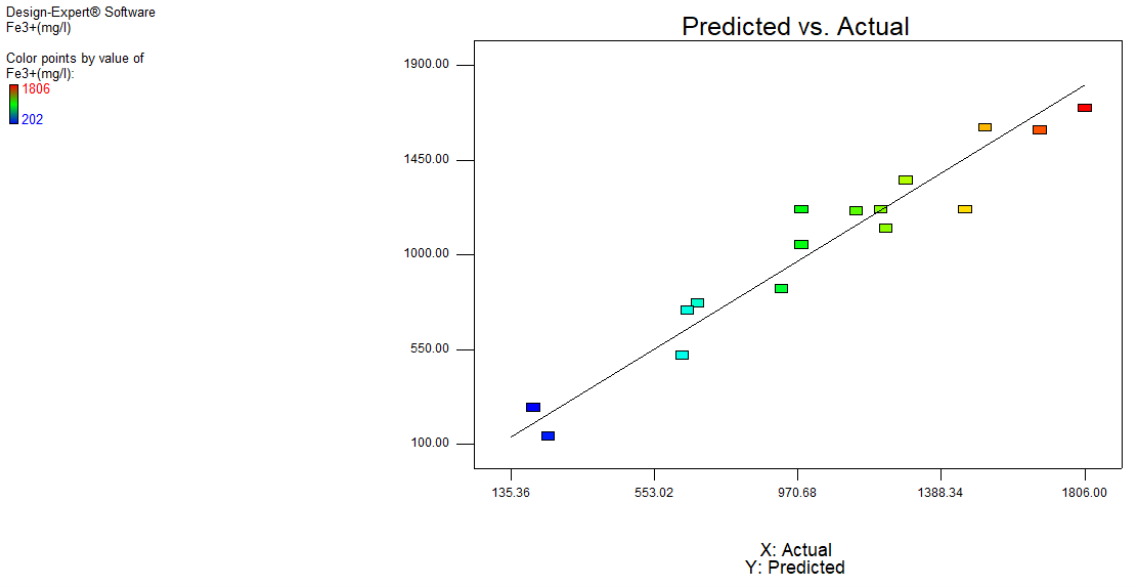
Figure 4- Three-dimensional surface of interaction of bioleaching duration and pulp density on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666



شکل ۵- رویه سه‌بعدی برهمکنش میزان پالپ دانسیته و میزان تلقیح اولیه باکتری بر مقدار آهن فریک تولیدشده توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3.

Figure 5- Three-dimensional surface of interaction of pulp density and initial bacterial inoculum on the amount of ferric iron produced by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain THA3.



شکل ۶- مقایسه مقادیر تجربی و مقادیر پیش‌بینی‌شده به‌منظور ارزیابی کفایت مدل

Figure 6-Comparing experimental values and predicted values to assess the adequacy of the model

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

در بحث کفایت مدل، نمودار شکل ۶ انحراف داده‌های تجربی از داده‌های پیش‌بینی‌شده را نشان می‌دهد؛ بنابراین، با توجه به نزدیکی داده‌های تجربی به خط ترسیم‌شده، می‌توان نتیجه گرفت معادله ارائه‌شده، به‌خوبی میزان آهن فریک تولیدشده توسط باکتری *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3 را توصیف می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

اکسیداسیون آهن فرو (Fe^{2+}) به آهن فریک (Fe^{3+}) در حضور اکسیژن، مکانیسم اصلی استفاده‌شده توسط میکروارگانیسم‌های فروشویی زیستی برای انحلال فلزات است. آهن فرو در pH پایین نسبتاً پایدار است و اکسیداسیون غیرزیستی به شدت آهسته است؛ بنابراین، حضور میکروب‌های مسئول فروشویی زیستی در محیط‌های اسیدی، برای فرایند اکسیداسیون آهن ضروری است و ازآنجایی‌که فعالیت میکروب‌ها از میزان اکسیداسیون آهن و گوگرد اندازه‌گیری می‌شود، هر پارامتری که روی باکتری‌ها و فعالیتشان اثر بگذارد، به‌صورت غیرمستقیم بر میزان اکسیداسیون فرو و درنتیجه میزان فریک موجود در محلول فروشویی نیز اثرگذار خواهد بود. یون Fe^{2+} منبع اصلی انرژی برای اغلب میکروارگانیسم‌های فروشویی کمولیتوتروف محسوب می‌شود و جمعیت باکتریایی به مقدار آهن فرو اکسیدشده بستگی دارد. در یک برآورد تقریبی، برای تولید یک گرم زیست‌توده به صد گرم اکسیداسیون آهن فرو نیاز است (۱۷–۱۹).

نتایج این پژوهش نشان دادند پالپ دانسیته یکی از پارامترهای کلیدی است که به‌طور معناداری بر میزان تولید یون آهن فریک توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3 تأثیر دارد؛ به‌طوری‌که افزایش پالپ دانسیته از ۵ به ۱۵ درصد باعث کاهش چشمگیر آهن فریک تولیدی شد. این یافته با نتایج گزارش‌شده در مطالعات پیشین در زمینه بیولیچینگ فلزات هم‌راستا است؛ به‌گونه‌ای که بررسی اثر پالپ دانسیته بر استخراج فلزات نشان داده است با افزایش محتوای جامدات در محیط واکنش، کارایی استخراج کاهش می‌یابد که دلیل آن کاهش در دسترس‌پذیری اکسیژن و محدودیت در انتقال جرم به سطح ذرات است و همچنین صدمات سلول باکتری بر اثر سایش فیزیکی ذرات بر سلول‌های باکتری است (۲۰, ۲۱). همچنین ثابت شده است در فرایند فروشویی زیستی، افزایش چگالی پالپ باعث افزایش مواد سمی در محیط فروشویی و مهار رشد میکروبی می‌شود؛ بنابراین، فرایند استخراج فلز در چگالی پالپ کمتر، اغلب به بهترین شکل انجام می شود (۱۷). به‌طور مشابه، محققین در مطالعه پیرامون بیولیچینگ چندین فلز نشان دادند افزایش پالپ دانسیته از ۲/۵ درصد به مقادیر بالاتر برای آهن و روی منجر به کاهش درصد استخراج می‌شود که این پدیده نیز به اثرات منفی بالارفتن مقاومت هیدرودینامیکی و کاهش فعالیت باکتری در محیط مرتبط است (۲۲). این تقارن در الگوی تأثیر پالپ دانسیته نشان می‌دهد کاهش آهن فریک با افزایش درصد جامدات، نه‌تنها مختص به شرایط این پژوهش، بلکه یک روند عمومی در سیستم‌های بیولوژیکی اکسیداسیون آهن است.

مقدار اکسیداسیون، به‌دلیل چندین عامل، از یک سویه میکروبی به سویه دیگر متفاوت است. تحقیقات نشان داده است چگالی مایع تلقیح میکروارگانیسم، یکی از عوامل کنترل‌کننده در سینتیک فروشویی زیستی است. جمعیت میکروبی انبوه ممکن است راندمان فروشویی زیستی را افزایش دهد؛ اما چندین عامل محدودکننده، مانند کمبود CO_2 و منبع مواد مغذی می‌تواند منجر به محدودشدن جمعیت میکروبی شوند؛ بنابراین، برای دستیابی به حداکثر راندمان فروشویی زیستی، باید یک چگالی مایع تلقیح بهینه تأمین شود (۱۷). درمورد میزان تلقیح باکتری و زمان فرایند نیز نتایج حاضر نشان‌دهنده وجود یک سطح بهینه هستند؛ افزایش تلقیح اولیه تا ۱۴/۷ درصد منجر به افزایش تولید آهن

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

فریک شد؛ اما تلقیح بیشتر از این مقدار موجب افت تولید شد. این الگو با داده‌های منتشرشده در ارتباط با نقش مقدار تلقیح اولیه و فعالیت بیولیچینگ مطابقت دارد؛ جایی که استفاده از تلقیح مناسب باعث افزایش مقدار اکسیداسیون و کاهش فاز تأخیر رشد می‌شود؛ درحالی‌که تلقیح‌های بیش‌ازحد می‌تواند باعث رقابت بیش‌ازحد برای منابع محدود، ازجمله اکسیژن و مواد مغذی شود و افت کارایی را به‌دنبال داشته باشد (۲۳). Huang et al (2023) در مطالعه‌ای تأثیر میزان تلقیح *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* بر سینتیک اکسیداسیون یون‌های آهن را بررسی و گزارش کردند که افزایش میزان تلقیح می‌تواند سرعت اکسیداسیون آهن فرو را تسریع کند؛ اما این اثر به‌صورت غیرخطی بوده و نیازمند بهینه‌سازی است (۲۳).

در پژوهش حاضر نتایج نشان دادند زمان انجام فرایند فروشویی زیستی تأثیر معنی‌داری بر میزان آهن فریک تولیدی دارد؛ به‌گونه‌ای‌که با افزایش زمان از ۲ تا ۲۱ روز، میزان آهن فریک به‌طور چشمگیری کاهش یافت. این الگو همسو با یافته‌های مطالعات قبلی است که در فرایندهای بیولیچینگ مشاهده شده است؛ برای مثال، در بررسی بیولیچینگ فلزات مشاهده شد که غلظت آهن فریک پس از چند روز به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند و به‌تدریج کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تغییرات دینامیک رشد باکتری و انباشته‌شدن ترکیبات سمی (مثلاً تجمع یون‌های فلزی خاص یا مواد آلی) در محیط باشد؛ امری که رفتار *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* را در مراحل پیشرفته بیولیچینگ تحت شرایط محدودکننده نشان می‌دهد (۱۷, ۲۱). علاوه بر این، مصرف آهن فریک به‌عنوان اکسیدکننده در واکنش‌های بیولیچینگ و همچنین رسوب آن به‌صورت فازهای معدنی ثانویه، به‌ویژه جاروسیت[۱۳]، نقش مهمی در این کاهش دارد. یون‌های آهن فریک تولیدشده توسط *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* در واکنش با کانی‌های سولفیدی مصرف می‌شوند و در شرایط محیطی خاص، ممکن است به‌صورت ترکیبات نامحلول آهن مانند جاروسیت رسوب کنند. این پدیده در مطالعات متعدد بیولیچینگ آهن و فلزات پایه گزارش شده است و به‌عنوان یکی از عوامل محدودکننده مهم در مراحل پیشرفته فرایند شناخته می‌شود (۳). این نتایج مشابه مشاهدات قبلی در بیولیچینگ چندین فلز است و نیاز به تعادل دقیق بین مدت عملیات و فاکتورهای محیطی را تأکید می‌کند.

نتایج برهمکنش‌ها نیز نشان دادند با افزایش میزان تلقیح اولیه باکتری در محیط از ۵ تا ۱۴/۷ درصد، میزان آهن فریک تولیدی در مدت زمان کمتر (۲ روز) افزایش می‌یابد. سپس با افزایش بیشتر میزان تلقیح اولیه باکتری، میزان آهن فریک تولیدشده تقلیل می‌یابد (شکل ۳). همان‌طور که ذکر شد، دلایل احتمالی برای این کاهش را می‌توان به یک مجموعه از فاکتورهای فیزیولوژیکی منفی نسبت داد. این فاکتورها شامل رقابت بین‌سلولی، اتمام مواد مغذی ضروری و انباشتگی متابولیت‌های سمی هستند که منجر به مهار احتمالی فعالیت‌های متابولیکی - میکروبی و درنتیجه کاهش کارایی مؤثر تولید زیستی آهن فریک در حین فروشویی زیستی می‌شوند. این اثر در مدت زمان ۲ روز که آهن فریک، به‌عنوان اکسیدکننده اصلی برای انحلال مس در طول فروشویی زیستی هنوز استفاده نشده است، نسبت به زمان‌های بیشتر واضح‌تر دیده می‌شود. همان‌طور که در شکل ۴ هم دیده می‌شود، میزان آهن فریک تولیدشده با افزایش میزان پالپ دانسیته استفاده‌شده کاهش می‌یابد. نتایج در شکل ۴ نشان می‌دهند، این اثر مهاری در مدت زمان‌های بیشتر، افزایش می‌یابد. همچنین این اثر مهاری دانسیته پالپ بالا در میزان تلقیح اولیه کمتر باکتری نیز بیشتر دیده می‌شود (شکل ۵). همان‌طور که ذکر شد، دانسیته پالپ‌های بالا ممکن است

[13] Jarosite

doi: 10.22108/bjm.2026.148049.1666

چندین فاکتور مهاری را بر روند فرایند فروشویی زیستی اعمال کنند؛ اما با گذشت زمان و افزایش غلظت مواد سمی در محیط فروشویی و مهار رشد میکروبی بیشتر این اثر مهاری بیشتر است. به‌کارگیری روش طراحی مرکب مرکزی در چارچوب روش رویه پاسخ این امکان را فراهم کرد تا ضمن کاهش تعداد آزمایش‌ها و هزینه‌های اجرایی، اثرات اصلی و برهم‌کنشی متغیرها به‌طور هم‌زمان شناسایی و تعیین شوند. این یافته‌ها بیان می‌کنند تولید مؤثر آهن فریک مستلزم ایجاد تعادل مناسب میان شرایط عملیاتی و زیستی سیستم است. درمجموع، نتایج این مطالعه علاوه بر ارائه بینش علمی درخصوص رفتار زیستی جدایه جدید مقاوم به اورانیوم *اسیدی تیوباسیلوس فروکسیدانس* سویه THA3، می‌تواند به‌عنوان مبنایی کارآمد برای طراحی، بهینه‌سازی فرایندهای فروشویی زیستی و بهبود کارایی کاربردهای صنعتی مبتنی بر اکسیداسیون زیستی آهن توسط سویه‌های بومی ایران را فراهم آورد.

References

(1) Singh VK, Singh AL, Singh R, Kumar A. Iron oxidizing bacteria: insights on diversity, mechanism of iron oxidation and role in management of metal pollution. *Environmental Sustainability*. 2018;1(3):221-31. https://doi.org/10.1007/s42398-018-0024-0

(2) Kaksonen AH, Morris C, Rea S, Li J, Wylie J, Usher KM, et al. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: part I—effect of pH on process performance. *Hydrometallurgy*. 2014;147:255-63. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.016

(3) van Hille RP, van Zyl AW, Spurr NRL, Harrison STL. Investigating heap bioleaching: Effect of feed iron concentration on bioleaching performance. *Minerals Engineering*. 2010;23(6):518-25. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2010.01.011

(4) Peng T-j, Zhou D, Liu X-d, Yu R-l, Jiang T, Gu G-h, et al. Enrichment of ferric iron on mineral surface during bioleaching of chalcopyrite. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2016;26(2):544-50, https://doi.org/10.1016/S1003-6326(16)64143-2.

(5) Mishra D, Rhee Y-H. Current research trends of microbiological leaching for metal recovery from industrial wastes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2010;2:1289-92. https://doi.org/10.1007/s12275-014-3532-3.

(6) Olson G, Brierley J, Brierley C. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied microbiology biotechnology*. 2003;63:249-57. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1404-6

(7) Erüst C, Akcil A, Gahan CS, Tuncuk A, Deveci H. Biohydrometallurgy of secondary metal resources: a potential alternative approach for metal recovery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013;88(12):2115-32. https://doi.org/10.1002/jctb.4164

(8) Navarro CA, von Bernath D, Jerez CA. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biological Research*. 2013;46(4):363-71. https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400008

(9) Tuovinen OH, Kelly DP. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. II. Toxicity of uranium to growing cultures and tolerance conferred by mutation, other metal cations and EDTA. *Archives of Microbiology*. 1974;95(2):153-64. https://doi.org/10.1007/BF02451757

(10) Bagheri H, Moore F, Alderton D. Cu–Ni–Co–As (U) mineralization in the Anarak area of central Iran. *Journal of Asian Earth Sciences*. 2007; 29(5-6):651-65. https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2006.03.011

(11) Khoshnoodi Kh, Ziapour S. Mineralogy and Geochemistry of Uranium, Thorium and Rare Earth Elements in Kal-e Kafi Hypogene Copper- Molybdenum Ore Deposit, Anarak District. *New Findings in Applied Geology*.

2025;19(37):209-26. https://doi.org/10.22084/nfag.2024.28935.1603 [In Persian]

(12) Yates JR, Holmes DS. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(5):1861-70. https://doi.org/10.1128/jb.169.5.1861-1870.1987

(13) Bomberg M, Mäkinen J, Salo M, Kinnunen P. High Diversity in Iron Cycling Microbial Communities in Acidic, Iron- Rich Water of the Pyhäsalmi Mine, Finland. *Geofluids*. 2019; Article 7401304. https://doi.org/10.1155/2019/7401304

(14) Witek-Krowiak A, Chojnacka K, Podstawczyk D, Dawiec A, Bubała K. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. *Bioresource Technology*. 2014;160:150-60. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.021

(15) Yolmeh M, Jafari SM. Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology*. 2017;10(3):413-33. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2

(16) Karamanev D, Nikolov L, Mamatarkova V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. *Minerals Engineering*. 2002;15(5):341-6. https://doi.org/10.1016/S0892-6875(02)00026-2

(17) Sajjad W, Zheng G, Din G, Ma X, Rafiq M, Xu W. Metals extraction from sulfide ores with microorganisms: the bioleaching technology and recent developments. *Transactions of the Indian Institute of Metals*. 2019;72:559-79. https://doi.org/10.1007/s12666-018-1516-4

(18) Nkuna R, Ijoma GN, Matambo TS, Chimwani N. Accessing metals from low-grade ores and the environmental impact considerations: A review of the perspectives of conventional versus bioleaching strategies. *Minerals*. 2022;12(5):506. https://doi.org/10.3390/min12050506

(19) Jones S, Santini JM. Mechanisms of bioleaching: Iron and sulfur oxidation by acidophilic microorganisms. *Essays in Biochemistry*. 2023;67(4):685-99. https://doi.org/10.1042/EBC20220257

(20) Shaikh Shafikh M, Ahmed AA, Ahmed SA. Impact of pulp density on extraction of metals, by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Pseudomonas fluorescens* from bauxite ore. *Journal of Pure Applied Microbiology*. 2018;12(3):1647-54. https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.72

(21) Abdollahy M, Shojaosadati SA, Zare Tavakoli H, Valivand A. Bioleaching of low grade uranium ore of saghand mine. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*. 2011;30(4):71-9. https://doi.org/10.30492/ijcce.2011.6092

(22) Rouchalova D, Rouchalova K, Janakova I, Cablik V, Janstova S. Bioleaching of iron, copper, lead, and zinc from the sludge mining sediment at different particle sizes, pH, and pulp density using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals*. 2020;10(11):1013. https://doi.org/10.3390/min10111013

(23) Huang H, Geng K, Wang C, Wu X, Wei CJIJoER, Health P. Impact of fulvic acid and *Acidithiobacillus Ferrooxidan* inoculum amount on the formation of secondary iron minerals. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 2023;20(6):4736. https://doi.org/10.3390/ijerph20064736