بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی معدن

کاربرد ژئومیکروبیولوژی در اکتشاف مواد معدنی – مطالعه موردی کانسار سرب و روی ایرانکوه

پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی معدن

ناصر امینی زاد کویج

اساتید راهنما

دکتر احمدرضا مختاری

دکتر مرتضی طبایی

زمستان 1392

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی معدن

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی اکتشاف معدن آقای ناصر امینی زاد کویج تحت عنوان

کاربرد ژئومیکروبیولوژی در اکتشاف مواد معدنی – مطالعه موردی کانسار سرب و روی ایرانکوه

در تاریخ 1392/10/21 توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

1- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر احمدرضا مختاری
2- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر مرتضی طبایی
3- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر محسن سلیمانی
4- استاد داور خارجی	دکتر احمدی
5- استاد داور داخلی	دکتر طباطبایی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر مرتضی طبایی

تشکر و قدردانی

در اینجا از تمامی آنان که مرا در این راه همراهی نموده‌اند تا امروز مرا ببینند و چون شمعی آب گشته‌اند تا راهم گم نشود تشکر می‌نمایم و چیزی جز بندگی در آستان آن‌ها ندارم تا تقدیم کنم.

بر خود لازم می‌دانم از زحمات و حمایت‌های خانواده‌ام که مرا در تمام مراحل زندگی یاری رسانده‌اند و همین طور از زحمات جناب آقای دکتر مختاری و دکتر طبایی استاد راهنما و جناب آقای دکتر سلیمانی استاد مشاور پایان نامه تشکر نمایم. ضمناً از همکاری و مساعدت شرکت بابا بویژه از مهندس اسماعیلی در پیشبرد این پایان نامه قدرانی می‌نمایم.

کلیه‌ی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان‌نامه (رساله) متعلق به دانشگاه صنعتی

اصفهان است.

تقدیم به پدر، سایه‌ی جان‌پناه من

به مادرم فرشته‌ی مقرب دادار

برادرم بازوی من در نبرد زندگی

فهرست مطالب

عناوین **صفحه**

فهرست ..... هشت

چکیده 1

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه 2

۱-2 اهداف تحقیق 2

فصل دوم: سابقه موضوع تحقیق

2-1 مقدمه 4

۲-۲ سابقه موضوع تحقیق 5

فصل سوم: مبانی روش‌های مورد استفاده تحقیق

۳-۱ مقدمه 8

۳-۲ میکرب‌شناسی 9

۳-۳ میکرب‌ها 9

۳-۴ یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها 9

۳-۴-۱ میکرب‌های پروکاریوت 9

۳-۴-۲ میکربهای یوکاریوت 10

۳-۵ فعالیت‌های باکتریها 10

۳-6 بررسی باکتریها 11

۳-۷ روش‌های کشت 11

۳-۸ روش‌های سترون 12

۳-۹ روش‌های تلقیح 12

۳-۹-۱ روش کشت خطی 12

۳-۹-۲ روش کشت آگار مخلوط با نمونه و روش پخش نمونه در سطح آگار 13

۳-۱۰ ویژگی‌های محیط کشت 14

۳-۱۱ ریخت‌شناسی 14

۳-۱۲ شکل و آرایش سلولی 14
۳-۱۳ تکثیر و رشد نمایی 14
۳-۱۴ توانایی تقسیم دوتایی 14
۳-۱۵ رشد باکتری در کشت بسته 15
۳-۱۵-۱ مرحله تأخیر 15
۳-۱۵-۲ مرحله لگاریتمی 16
۳-۱۵-۳ مرحله سکون 16
۳-۱۵-۴ مرحله مرگ 16
۳-۱۶ مواد مورد نیاز برای رشد باکتری 16
۳-۱۷ محیط کشت اختصاصی 17
۳-۱۷ انکوباسیون 18
۳-۱۹ شمارش مستقیم 18
۳-۲۰ شمارش غیرمستقیم 18
۳-۲۱ شناسایی باکتری‌ها 19
۳-۲۲ مراحل آماده سازی و کشت باکتری 20
۳-۲۳ انتقال باکتری‌ها به روش آسپتیک 21
۳-۲۴ جداسازی باکتری‌ها به وسیله روش‌های رقت 21
۳-۲۵ آنالیز مولفه اصلی (PCA) 23
۳-۲۶ روشهای داده‌کاوی، SVD و SDD 23
۳-۲۶-۱ تفسیر فاکتوری 25
۳-۲۶-۲ SDD 26

فصل چهارم: آشنایی با محدوده‌ی مورد مطالعه

۴-۱ مقدمه 28
۴-۲ وضعیت جغرافیایی و زمین‌شناسی استان اصفهان 29
۴-۳ وضعیت جغرافیایی منطقه ایرانکوه 29
۴-۴ وضعیت آب و هوایی 29
۴-۵ راه‌های دسترسی 30

۴-۶ زمین‌شناسی 30
۴-۷ واحدهای سنگی در منطقه ایرانکوه 31
۴-۸ مدل‌های کانی‌سازی پیشنهادی جهت ذخایر ایرانکوه 32
۴-۹ پاراژنز کانسارهای سرب و روی منطقه ایرانکوه 33
۴-۱۰ گسل‌ها و عوامل تکتونیکی 34

فصل پنجم: مطالعات ژئومیکروبیولوژی در محدوده‌ی کانسار تپه سرخ

۵-۱ مقدمه 35
۵-۲ تهیه بانک اطلاعاتی چاه‌های اکتشافی محدوده 36
۵-۳ انتخاب پروفیل نمونه‌برداری 36
۵-۴ نمونه‌برداری 37
۵-۵ آماده سازی نمونه 39
۵-۶ نتایج آنالیز شیمیایی 40
۵-۷ تعبیر و تفسیر نتایج 44
۵-۷-۱ تفسیر نتایج پروفیل سنگ 44
۵-۷-۲ تفسیر نتایج پروفیل اول خاک 44
۵-۷-۳ تفسیر نتایج پروفیل دوم خاک 44
۵-۸ تفسیر نتایج آنالیز شیمیایی به روشهای آماری 45
۵-۸-۱ تفسیر نتایج آنالیز شیمیایی به روش PCA 45
۵-۸-۲ ضریب همبستگی بین عناصر 51
۵-۸-۳ تفسیر نتایج آنالیز شیمیایی با استفاده از روش‌های SVD و SDD 51
۵-۹ آنالیزهای میکربی 54
۵-۹-۱ آماده سازی نمونه و محیط کشت 54
۵-۱۰ اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌ها به روش رقیقسازی مرحله‌ای (Serial Dilution) 55
۵-۱۱ اندازه‌گیری pH نمونه‌ها 59
۵-۱۲ اندازه‌گیری EC نمونه‌ها 60
۵-۱۳ اندازه‌گیری تنفس 61
5-14 تفسیر نتایج آنالیز میکربی 66
۵-۱۳-۱ مقایسه نتایج حاصل از آنالیز ژئوشیمی و باکتری 65

فصل ششم: جمع‌بندی نتایج و پیشنهادها

۶-۱ جمع‌بندی نتایج 66

۶-۲ پیشنهادها 67

منابع 69

چکیده

میکروارگانیسم‌ها و به طور ویژه باکتری‌ها به دلیل حضور در اکثر محیط‌ها، تنوع اشکال زندگی در روی زمین، فراوانی در خاک و توانایی‌های متابولیسم فوق‌العاده، می‌توانند اثرات ویژه و اساسی بر روی خاک سطحی داشته باشند. ارتباط و چگونگی فرآیندها و جریان‌های حاکم بین ریزجانداران و زمین در شاخه‌ای از علم به نام ژئومیکروبیولوژی بررسی می‌شود.

کار آیی روش ژئوشیمی اکتشافی، در شناسایی نهشته‌های کم عیار و پوشیده با مواد آبرفتی، ذرات آواری، یخچالی و خاک است. این روش به ویژه برای نهشته‌هایی که شناخت ماکروسکوپی آن‌ها غیرممکن، یا تعیین محل و موقعیت آن‌ها مشکل است – مانند نهشته‌های پنهان – مفید است. در مورد این نواحی، روش‌هایی موفق هستند که با آگاهی از فرآیندهای منتهی به پراکندگی و تمرکز عناصر کمیاب در سطح یا نزدیک سطح، بتوانند ارتباطی را بین این فرآیندها با کانی‌سازی پنهان، بیان کنند. به همین دلیل از جمله روش‌های مورد استفاده در اکتشاف ذخایر پنهان روش‌های وابسته به کشت آزمایشگاهی میکروارگانیسم‌هاست. این فنون همان روش‌های کلاسیک ژئومیکروبیولوژی اکتشافی هستند که با استفاده از محیط‌های متفاوت کشت مصنوعی، سرشار از عناصر غذایی، میکروارگانیسم‌های نمونه خاک را تقویت، خالص‌سازی و جدا می‌کنند.

هدف اولیه این مطالعه این بوده است که با مطالعه جمعیت باکتریایی نمونه‌های خاک بتوان ارتباطی را بین آن‌ها با کانی‌زائی که در عمق انجام‌شده است، پیدا و از آن به عنوان یک معرف بیوژئوشیمیایی در اکتشاف ذخایر استفاده کرد. این تحقیق در محدوده معدن سرب و روی ایرانکوه، در جنوب‌غرب اصفهان انجام‌شده است.

در این تحقیق با استفاده از داده‌های مغزه‌های حفاری شرکت باما، مدل‌سازی انجام شد و با توجه به نتایج به دست آمده، 3 پروفیل نمونه‌برداری مشخص گردید. سعی بر این شد که پروفیل نمونه‌برداری عمود بر رگه کانی‌زایی قرار گیرد. سپس نمونه‌برداری خاک از دو پروفیل از عمق 10 الی 30 سانتی‌متری و نمونه‌های سنگی از سطح غیر هوازده سنگ جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه جهت انجام مطالعات ژئوشیمیایی و میکروبیولوژی انتقال داده شدند. سپس نمونه‌ها به دو قسمت جهت انجام آنالیزهای شیمیایی و میکروبی تقسیم شدند. نمونه‌های آماده سازی شده ژئوشیمیایی به روش ICP-OES مورد آنالیز قرار گرفتند و نمونه‌های دسته دوم بعد از انجام مراحل آماده سازی تحت آزمایش شمارش جمعیت کل باکتریایی، تنفس میکروبی و برخی خصوصیات شیمیایی خاک مانند pH و هدایت الکتریکی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از شمارش جمعیت باکتری‌های خاک موید انطباق یک دسته از کلونی‌های باکتریایی با رنگ شاخص قرمز رنگ با منطقه‌ی کانی‌زایی بود. نتایج آنالیز شیمیایی، هیچ‌کدام از عناصر آنومالی خاصی را به صورت شاخص بر روی منطقه آنومالی نشان ندادند ولی با استفاده از روش‌های تفسیر PCA، ضریب همبستگی و SDD منطقه‌ی کانی‌زایی مشخص گردید. با مقایسه نتایج به دست آمده از دو روش آنالیز شیمیایی و میکروبی می‌توان نتیجه گرفت که آنالیز میکروبی می‌تواند به عنوان یک روش مکمل در اکتشاف ذخایر پنهان به کار رود. بنابراین پیشنهاد می‌شود به دلیل پتانسیل بالای ژئومیکروبیولوژی در آشکار سازی آنومالی‌های نهفته، در مناطق مستعد به نهشته‌های پنهان از این روش استفاده گردد.

کلمات کلیدی: میکروارگانیسم‌ها، متابولیسم، ژئومیکروبیولوژی، کلونی باکتری، تپه‌سرخ.

فصل اول
مقدمه و اهداف تحقیق

۱-۱ مقدمه

خاک‌های رویی کانسار عمدتاً سرشار از عناصری است که به عنوان ریزمغذی برای ریزجاندار مصرف می‌شود، لذا میکرب‌ها با استفاده از این عناصر قادر به رشد و نمو بوده و اثرهای بیولوژیکی ویژه‌ای را روی خاک می‌گذارند؛ این فرآیندهای میکرب منجر به تشکیل هاله‌های میکرب و نوعی غنی‌شدگی ثانویه در خاک رویی کانسار می‌گردد. ژئومیکروبیولوژی اکتشافی با مطالعه‌ی فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و شناخت کمپلکسهای میکرب خاک رویی کانسار و دیگر فرآیندهای ژئومیکروبیولوژی، مفاهیمی همچون تمرکز، پراکندگی، مهاجرت و حمل‌ونقل را تشریح کرده و با فنون کلاسیک کشت آزمایشگاهی و عناصر فلزی مانند Zn, Au, Cu, Co, Mo, Fe و یا ابزارهای جدید مولکول، منطقه کانی سازی شده را تعیین می‌کند. با استفاده از این روش در کنار سایر روش‌های اکتشافی، می‌توان به نتایج بهتری در زمینه‌ی کم کردن خطای اکتشاف و کوچک کردن منطقه‌ی تحت مطالعه، رسید. [1].

۱-۲ اهداف تحقیق

با توجه به اهمیت روزافزون منابع معدنی در اقتصاد کشور و جهان از یکسو و اتمام نهشته‌های روی سطح زمین، لذا اهمیت منابع معدنی که به صورت پنهان قرار دارند، افزایش یافته است. و بیشتر کشورهای پیشرفته جهان از لحاظ معدن کاری به دنبال روش‌های نوین اکتشاف معدن برای جایگزینی با روش‌های کلاسیک است، روش‌های کلاسیک اکتشاف علاوه بر ناکارآمد و قدیمی بودن، حاوی دو ایراد دیگری هستند که عبارت‌اند از: 1- کند بودن: منظور

طولانی بودن زمـان انجـام فرآینـدها برای بازگو کردن نتایج اســت. 2- پر هزینه بودن: روش‌هایی مانند نمونه‌برداری ژئوشـیمی و یا ژئوفیزیک و سـایر روش‌ها با وجود صـحت و دقت بسـیار دارای هزینه گزافی می‌باشـند که این برای معدن کاران زیاد جالب توجه نیست.

با توجه به موارد فوق و سـایر عوامل، هم اکنون در کشـورهای پیشـرفته از لحاظ معدن کاری روش‌های نوینی در حال بررسـی و سـعی و خطا است. یکی از این روش‌ها که در سالیان اخیر به ذهن صاحب‌نظران اکتشاف جهان رسیده است، ژئومیکروبیولوژی است. البته این روش در حال حاضر بسیار نوپا در جهان بوده و اولین بار در ایران است که در این تحقیق به صـورت مفصل بر روی منابع سرب و روی مطالعه شده است. همان طور که گفته شد، ژئومیکروبیولوژی روشی نوین بوده و در راستای این تحقیق سعی شده نتایج این روش با نتایج حاصل از نمونه‌برداری ژئوشیمیایی مقایسه و اعلام گردد. لازم به ذکر اسـت که در این مطالعه از روش کشـت آزمایشـگاهی باکتری‌ها و شمارش کلونی استفاده شده است.

بنا بر مطالب فوق اهداف این پروژه را می‌توان به صورت زیر بیان داشت:

1- استفاده از روش‌های کلاسیک ژئومیکروبیولوژی در مطالعه موردی کانسار تپه سرخ در ایرانکوه.
2- مقایسه نتایج حاصل از ژئومیکروبیولوژی اکتشافی و ژئوشیمی اکتشافی و ارائه نتایج.

و مهم‌ترین نتایجی که از این تحقیق حاصل خواهد شد عبارت‌اند از:

1- نمایش کارآیی ژئومیکروبیولوژی در اکتشاف نهشته‌های پنهان.
2- مقایسه بین روش‌های کلاسیک اکتشاف (ژئوشیمی) با روش نوین ژئومیکروبیولوژی.

فصل دوم
سابقه موضوع تحقیق

۲-۱ مقدمه

ژئومیکروبیولوژی به عنوان زمینه‌ای برای مطالعه جانداران و نقش آن‌ها در تغییرات شیمیایی محسوب می‌شود . میکرب‌ها با حمل‌ونقل ژئوشیمیایی، باعث کنترل ترکیب شیمیایی زمین، سنگ‌ها، کانی‌ها، اتمسفر و حتی آب و هوای زمین می‌گردد [2].

ژئومیکروبیولوژی با نقش میکرب‌ها در زمین عهد حاضر و اثرات ویژه‌ی آن‌ها بر خاک و فرآیندهای زمین‌شناسی سروکار دارد. از زمانی که حیات آغاز شده است این فرآیندهای میکرب حاکم بوده و هستند. تعدادی از این قوانین توسط سالوانینا[1] در جهت مهم و مفید بودن این روش‌ها در جهت اکتشاف مواد معدنی تشریح شده است که عبارتند از [3]:

1- باکتری‌های خاک می‌توانند برای پی‌جویی کانسار استفاده شوند.
2- گونه‌های مشخصی از ریزجاندارن قادر به ادامه زندگی نزدیک یک کانسار هستند.
3- نوعی سازگاری بین میکروارگانیسم‌ها و منطقه‌ی کانی‌زایی وجود دارد.

در این فصل برخی از منابع مطالعاتی را که مرتبط با موضوع استفاده از روش‌های میکروبیولوژی در زمینه‌های مختلف هستند، ارائه می‌گردد.

[1] Salvanina

۲-۲ سابقه موضوع تحقیق

شـاید نخسـتین بار ایده اسـتفاده از میکرب‌ها برای کشـف کانسـارهای فلزی، توسـط سـالوانینا و همکارانش موگیلفسـکی در سال 1957، در انسـتیتو تحقیقات نفتی شوروی سابق مطرح شده باشد. سالوانینا بیان داشت که ایده‌ی استفاده از باکتری‌ها در اکتشـاف کانسـارها مربوط به مقالات موگیلفسکی درباره اکتشاف منابع نفت و گاز است . او اثر خاک‌های حاوی مولیبدن، منگنز، سرب، روی، مس و تنگستن را به عنوان محرک یا بازدارنده‌ی رشد باکتری‌های اکسـیداسیون، نیتراسیون، آزتوباکتریها و نمونه‌های آسپرژیلوس بررسی کرد [4]. در طول سالهایی که بر روی کارهای ابتدایی سـالوانینا بحث می‌شـد و پیشـنهادهای او در مورد به‌کارگیری میکروارگانیسـم‌ها در اکتشاف کانسارها بررسی می‌شـد، کارمانکو و لیالیکوا همجواری باسـیلوس سـروس را با کانسـارهای سـولفیدی مورد مطالعه قرار دادند [5]. همچنین کارمانکو و پریزرنوا در سـال 1962 طرحهای متعددی، جهت اسـتفاده از گونه‌های خاصـی از باکتری‌ها برای اهداف پی‌جویی و اکتشـاف ارائه دادند؛ اما آن‌ها فکری راجع به روش‌های پی‌جویی میکرب نکردند [6]. در ایالات متحده آمریکا، میلر در سال 1983 وجود نمونه‌های تیوباسیلوس و Desulfovibrio در خاک را به عنوان روشی برای بررسـی کانی سـولفور بررسـی نمود. او اذعان داشـت اگرچه می‌توان از باکتری‌های متابولیسـم کننده سـولفور، جهت تعیین محل سـولفیدها و سـولفور خالص اسـتفاده کرد، ولی استفاده از این باکتری‌های شیمیواتروتروف برای پی‌جویی تیپ‌های دیگر کانسارها مفید نیست [7].

بدون شـک بزرگ‌ترین واحد توسـعه‌ی ژئومیکروبیولوژی اکتشـافی، انسـتیتوی ورنادسـکی در مسـکو اسـت. این موسـسـه با انتشـار کتاب لتوانوا در سـال 1978 به زبان روسـی این خدمت را در حق اکتشاف کرد. لتونوا تجربیات 20 سـاله‌ی خود حاصـل از مطالعه و بررسی رفتارهای میکرب در ایالات متالوژنی گوناگون را در کتابش جمع‌آوری کرد [8].

در تحقیقی که توسـط Reith و همکارانش در سـال 2005 انجام گردید از روش اندازه‌گیری مقدار کلونی‌ها به روش رقیق‌سـازی اسـتفاده شـد. این تحقیق در معدن Tomakin Park Gold در منطقه‌ی New South Wales استرالیا انجام گردید. در این تحقیق بر روی پروفیلی که رگه‌ی کانی‌زایی را قطع می‌کرد نمونه‌برداری انجام‌شد. تعداد نمونـه‌هـا 25 عـدد بوده که به مقدار 500 گرم از خاک نمونه‌برداری شـد. بر روی نمونه‌ها آنالیز شـیمیایی هم انجام گردید تا نتایج به دسـت آمده از شـمارش کلونی‌های باسـیلوس سروس[1] و ژئوشیمی مقایسه گردد. با توجه به نتایج به دسـت آمده و مقایسـه این دو روش معلوم شـد که تعداد کلونی‌ها همبسـتگی بهتری با غلظت طلا در مقایسـه با سـایر عناصـر همراه طلا مانند As، Pb، Sbو Bi نشـان می‌دهد.در میان عناصـر ردیاب و همراه طلا ، فقط آرسـنیک غنی شـده‌گی نسـبت به زمینه نشـان داده اسـت. آنالیز فاکتوری انجام‌شـده بر روی داده‌ها نیز همراهی تعداد کلونی‌ها را با فاکتور کانی‌زایی کاملاً مشخص کرد [9].

[1] Bacillus cereus

در تحقیقی که توسط HU Qing و همکارانش در سال 2007 انجام گردید از روش جداسازی ماده وراثتی باکتری و تکثیر به کمک PCR و مشخصه‌یابی با استفاده از ژل الکتروفورز (DGGE)[1] برای اندازه‌گیری تنوع باکتری‌ها و روش شمارش تعداد کلونی‌ها بر روی پلیت در خاک‌های معدن سرب و روی در نزدیکی شهر بیجینگ در شمال چین استفاده گردید. در این تحقیق با نمونه‌برداری از فواصل صفر، 20، 40، 60 متری و خروجی نسبت به کانسار و انجام آنالیز PCR-DGGE بر روی نمونه‌ها مشخص گردید که تنوع باکتری‌ها با دور شدن از معدن به علت کاهش در غلظت مقدار سرب، روی و کادمیم افزایش نشان می‌دهد. کمترین تنوع در مقدار باکتری‌ها در نمونه اول که حاوی بالاترین مقدار غلظت فلزات سنگین و بیش‌ترین مقدار تنوع در دورترین نمونه از معدن دیده شد. همچنین مشخص شد که غلظت عناصر تأثیر زیادی بر تنوع جمعیت باکتری‌ها دارند که می‌توان از این روش به عنوان یک روش در اکتشاف سایر مناطق دارای احتمال کانی‌زایی، استفاده کرد. همچنین با استفاده از روش شمارش تعداد کلونی‌ها مشخص شد که هرچقدر از غلظت فلزات سنگین کاسته می‌شود بر تعداد کلونی‌ها افزوده می‌شود که نتایج حاصل از آزمایش اول را نیز تأیید می‌کند [10].

در تحقیقی که توسط Victor Oluoha و همکارانش در سال 2008 انجام گردید تعداد کل باکتری‌ها و فعالیت آن‌ها در خاک‌های آلوده به سرب و روی اندازه‌گیری شد. در این مطالعه با نمونه‌برداری از فواصل مختلف نسبت به پیت معدن و اندازه‌گیری گونه‌های باکتری‌ها تعداد کل گونه‌های باکتری با دور شدن از پیت معدن روند افزایشی نشان داد که دلالت بر این دارد که هرچقدر غلظت فلزات سنگین سرب و روی در نمونه مورد نظر افزایش می‌یابد به دلیل سمی کردن محیط از رشد و تکثیر باکتری‌ها کاسته و همچنین از فعالیت آنزیم نیز می‌کاهد. همچنین با دور شدن از پیت معدن به دلیل مهیا شدن شرایط تعداد گونه‌های باکتری روند افزایشی نشان می‌دهند. نتیجه‌ی دیگری که از این تحقیق به دست آمد این بود که فقط گونه‌های خاصی در شرایط پیت معدن که دارای مقادیر بالایی از غلظت سرب و روی بودند، مقاوم بوده و زنده می‌مانند. ضمناً در این تحقیق کنترل‌کننده‌های محیطی مقدار باکتری‌ها مانند pH، دما، مقدار مواد آلی و رطوبت نمونه خاک اندازه‌گیری شد تا تأثیرات آن‌ها مشخص گردد [11].

در تحقیقی که توسط Juanjuan Qu و همکارانش در سال 2011 انجام گردید با استفاده از 3 روش اندازه‌گیری مقدار باکتری‌های قابل کشت، استخراج DNA و فعالیت آنزیم‌ها، تأثیر معدن کاری سرب و روی بر روی زمین‌های زراعی نزدیک به معدن مشخص گردید. در این تحقیق مشخص شد که مقدار کل باکتری‌ها در نزدیکی معدن که عیار سرب و روی مقادیر بالایی را نشان می‌دهد، کم است که این مقدار با دور شدن از منطقه کانی‌زایی روند افزایشی را نشان می‌دهد. همچنین تنوع جمعیت باکتری‌ها در مناطق نزدیک به معدن به علت سمی بودن محیط از طریق بالا بودن غلظت سرب و روی، مقادیر کمی را نشان می‌دهد که توسط هر 3 روش به کار گرفته‌شده این نتیجه تأیید می‌شود [12].

در تحقیقی که توسط Mel Lintern و همکارانش در سال 2011 انجام گردید از روش اندازه‌گیری CFU باکتری باسیلوس سروس در جهت پی‌جویی طلا استفاده شد. در این تحقیق با شبکه‌بندی و نمونه‌برداری از منطقه و

[1] Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

سپس اندازه‌گیری مقدار CFU برای باکتری باسیلوس سروس، نتایج به دست آمده با نتایج به دست آمده از طریق حفاری‌های انجام‌شده در منطقه مقایسه شد که انطباق خوبی را باهم نشان نمی‌دادند [13].

در تحقیقی که توسط کمالی و همکارانش در سال 1390 انجام گردید از روش کشت باکتری‌ها و شمارش کلونی‌ها از معدن مس سونگون و 4 معدن دیگر استفاده شد. مقایسه نتایج نمونه‌های حاصل از مناطق کانی‌زایی با نمونه‌های شاهد که هیچ‌گونه کانی‌زایی در آن اتفاق نیفتاده بود، نشان داد که تعداد کل کلونی‌های باسیلوس سروس در منطقه کانی‌زایی به علت مقاوم بودن در شرایط حاوی فلز مس مقادیر بالایی را نشان می‌دهد [1].

در تحقیقی که توسط تخمچی و همکارانش در سال 2012 انجام گردید، از روش اندازه‌گیری CFU باکتری باسیلوس سروس به عنوان شاخص بیولوژیکی برای پی‌جویی طلا استفاده گردید. در این تحقیق از سه معدن طلای مهم ایران یعنی، زرمهر، موته و محلات نمونه‌برداری انجام گردید. سپس نمونه‌ها کشت داده شده و تعداد کلونی‌ها شمارش شدند و با توجه به نتایج به دست آمده، معلوم شد که تعداد کلونی‌ها در هر گرم خاک محلات نسبت به سایر مناطق بیشتر است. لذا در نظر گرفته شد که تحقیقات بعدی بر روی نمونه‌های گرفته شده از محلات انجام شود. سپس 6 نمونه‌ی دیگر از این منطقه جمع‌آوری شد و بعد از کشت دادن نمونه‌ها و مقایسه نتایج حاصل با غلظت طلا در نمونه‌ها معلوم شد که تعداد کلونی‌های باسیلوس سروس همبستگی بالایی را با غلظت طلا نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، معلوم شد که باکتری باسیلوس سروس می‌تواند به عنوان شاخص مناسبی برای پی‌جویی ذخایر پنهان طلا مورد استفاده قرار گیرد [14].

فصل سوم
مبانی روش‌های مورد استفاده تحقیق

۳-۱ مقدمه

جهان ما پر از موجودات غیرقابل رویتی است که کوچک‌تر از آن هستند که با چشم غیرمسلح دیده شوند. مشاهده‌ی این اشکال زندگی یعنی میکروارگانیسم‌ها یا میکرب‌ها فقط با بزرگ کردن تصویر آن‌ها در زیر میکروسکپ میسر است. علی‌رغم کوچکی اندازه، آثار میکرب‌ها بر زندگی انسان و به طور کلی بر جهان هستی در حفظ حیات بر روی زمین اهمیت حیاتی دارد. بنابراین اجتناب از آن‌ها برای انسان غیرممکن و در واقع نامطلوب است. اما باید از فعالیت‌های میکرب و نیز توانایی بالقوه آن‌ها در افزایش یا کاهش کیفیت زندگی خویش آگاه باشیم. این آگاهی برای کنترل میکروارگانیسم‌ها، به حداقل رساندن آثار زیان‌بخش و افزایش هرچه بیشتر فعالیت‌های سودمند آن‌ها ضروری است . یکی از مهمترین فواید فعالیت‌های میکروارگانیسم‌ها در اکتشاف مواد معدنی می‌باشد. این خصوصیت برخاسته از تغییرات آن‌ها در محیط‌های گوناگون است. به طوری که میکروارگانیسم‌ها در شرایط محیطی مختلف، دارای انواع مختلف و جمعیت متفاوت می‌باشد. لذا بشر با استفاده از این خصوصیت ذاتی میکروارگانیسم‌ها قادر با شناسایی مناطق آلوده به فلزات سنگین و از همه مهم‌تر قادر به شناسایی مناطق مستعد برای کانی‌زایی است [15].

۳-۲ میکرب‌شناسی

در سال 1674آنتونی ون لیون هوک عدسی سازی بسیار ماهر و صبور، با نگاه کردن از طریق میکروسکپ ساده‌ی خود دنیای جدیدی را کشف کرد. فقط معدودی دانشمند بصیر وجود این دنیای میکروسکوپی را حدس زده بودند. هوک این موجودات میکروسکوپی را که در تعدادی از نامه‌هایش به انجمن سلطنتی لندن آن‌ها را "جانوران ذره‌بینی" می‌نامید، در نمونه‌های برگرفته از دهان، آب راکد و غذاها پیدا کرده بود. لاو میکرب‌ها را در نمونه‌هایی که تقریباً از تمام محیط‌های تحت بررسی‌اش گرفته‌شده بودند، مشاهده کرد. ظاهراً این جانوران ذره‌بینی در همه‌جا وجود داشتند [16].

۳-۳ میکرب‌ها

میکرب‌ها به شش دسته اصلی تقسیم می‌شوند (1) تک سلولی‌ها، (2) جلبک‌های میکروسکوپی، (3) قارچها (مخمرها و کپک‌ها)، (4) باکتری‌ها، (5) سیانوباکتری‌ها و (6) ویروس‌ها. با وجود تک سلولی بودن اغلب آن‌ها، بعضی مانند کپک‌ها و بسیاری از جلبک‌ها، پر سلولی هستند؛ باکتری‌ها و سیانوباکتری‌ها نسبت به سایر گروه‌ها ساختار سلولی ساده‌تری دارند. ساختار سلولی تک سلولی‌ها شبیه جانوران است. سلول‌های جلبک‌ها مانند سلول‌های گیاهان است، در حالیکه قارچ‌ها مشابه سلول‌های گیاهی، ولی بدون کلروفیل‌اند و بنابراین قدرت فتوسنتز ندارند. اما، علی‌رغم این شباهت‌ها، میکروارگانیسم‌ها نه گیاه به حساب می‌آیند و نه جانور. ویروس‌ها فاقد ساختار سلولی متداول در میکرب‌های دیگر هستند و به آن‌ها ذرات غیر سلولی اطلاق می‌شود. در میان میکرب‌ها، ویروس‌ها ساده‌ترین نوع به حساب می‌آیند [16].

۳-۴ یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها

زمانی عموماً چنین تصور می‌کردند که ساختار داخلی باکتری‌ها با سلول‌های بزرگ‌تر گیاهان و جانوران یکسان است. ولی در سال‌های 1950، میکروسکپ الکترونی تفاوت‌های مهمی را بین باکتری‌ها و سلول‌های موجودات دیگر آشکار کرد. این تفاوت‌های فیزیکی پایه و اساس تقسیم‌بندی سلول‌ها به دو گروه یوکاریت و پروکاریوت است. گروه یوکاریوت شامل سلول‌های گیاهی، جانوری، تک سلولی‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌هاست. از طرف دیگر پروکاریوتها (پرو به معنی پیش) فاقد هسته محاط در غشا هستند. گروه پریوکاریوت شامل باکتری‌ها و سیانوباکتریهاست [16].

۳-۴-۱ میکرب‌های پروکاریوت

سلول‌های پروکاریوت به دو گروه تقسیم‌شده‌اند: سیانوباکتری‌ها و باکتری‌ها. سیانوباکتری‌ها (سابقاً جلبک‌های آبی سبز نامیده می‌شدند) پروکاریوت‌هایی هستند که واکنش اکسیژن‌زای فتوسنتز را به روش مشابه جلبک‌های

یوکاریوت و گیاهان انجام می‌دهند. بعضی سیانوباکتری‌ها ازت مولکولی N_2 را به ترکیبی که قابل‌استفاده گیاهان است تبدیل و بدین وسیله این ماده غذایی اساسی را به زنجیره غذایی خود وارد می‌کنند. بسیاری از این میکرب‌ها به صورت رشته‌های سلولی رشد می‌کنند.

پروکاریوت‌هایی که سیانوباکتر نیستند، همه تحت عنوان باکتری‌ها طبقه‌بندی شده‌اند. باکتری‌ها از فراوان‌ترین و متنوع‌ترین ارگانیسمهای روی زمین هستند. به علت تنوع متابولیسم موجود در باکتری‌ها، آن‌ها در هر محیطی، حتی محیط‌هایی که زمانی تصور وجود حیات در آن نمی‌رفت، یافت می‌شوند. مثلاً بعضی باکتری‌ها در مناطق حرارتی 250 درجه سلسیوس کف اقیانوس‌ها، بقایای اسیدی معادن و بسیاری از نواحی فاقد اکسیژن رشد می‌کنند. تعداد کمی از باکتری‌ها فتوسنتزی هستند اما بر خلاف سیانوباکتریها در نتیجه عمل اکسیژن آزاد نمی‌کنند. اما اغلب باکتری‌ها قادر به عمل فتوسنتز نیستند. بعضی از باکتری‌ها برای رشد، فقط به مواد شیمیایی غیر آلی ساده نیاز دارند. بیشتر آن‌ها مواد غذایی را از طریق تجزیه مواد آلی به دست می‌آورند. بعضی از باکتری‌ها به قدری از این نظر کارا هستند که غلظت‌های اندک مواد غذایی موجود در آب مقطر می‌تواند رشد آن‌ها را تأمین کند [16].

۳-۴-۲ میکرب‌های یوکاریوت

میکروارگانیسم‌های یوکاریوت بر حسب خصوصیات ویژه‌شان به سه گروه تقسیم می‌شوند: قارچ‌ها، تک سلولی‌ها و جلبک‌ها.

وجود دیواره‌ی سلولی و فقدان حرکت و فتوسنتز، خصوصیات برجسته‌ای هستند که قارچ‌ها را مشخص می‌نماید. چون قارچ‌ها نمی‌توانند از نور خورشید انرژی بگیرند، بنابراین برای تهیه‌ی انرژی لازم برای بقای خود باید به منبعی خارجی از ترکیبات آلی متکی باشند. تک سلولی‌ها، ارگانیسم‌های یوکاریوت تک سلولی غیر فتوسنتیک و فاقد دیواره‌ی سلولی هستند. اغلب تک سلولی‌ها شدیدا متحرک‌اند و به وسیله‌ی پای کاذب، تاژک یا مژه به اطراف حرکت می‌کنند. جلبک‌ها گروه متنوعی از ارگانیسم‌هایی هستند که از تک سلولی‌های منفرد میکروسکوپی گرفته، تا دریایی پر سلولی بزرگ در میان آن‌ها دیده می‌شود. آن‌ها ممکن است متحرک و یا ثابت باشند و اکثرا دارای دیواره‌ی سلولی هستند [16].

۳-۵ فعالیت‌های باکتری‌ها

حیات مستلزم زیست شیمیایی است. تمام موجودات زنده باید مواد شیمیایی محیط خود را به شکلی تغییر دهند که بتوانند در ترکیب سلولی شرکت کنند. مجموعه تغییرات شیمیایی را که توسط موجود انجام می‌شود، متابولیسم می‌گویند. وسعت آثار باکتری‌ها بر محیط بازتاب مستقیم فعالیت‌های متنوع متابولیسم آن‌هاست. با توجه به پراکندگی بسیار گسترده باکتری‌ها، جای خوشبختی است که فرایندهای متابولیسم بیشتر برای انسان بی‌ضرر و یا واقعاً سودمندند

.