بررسی پارامترهای تاثیرگذار بر رشد و فعالیت گونه تیوباسیلوس فروکسیدانس در بازیابی حلال مورد استفاده در فرآیند شیرین‌سازی گاز طبیعی

سهیلا یغمایی*، فهیمه سلیمی و مسعود حسنی

دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۳۰

چکیده

امروزه فرآیندهای فیزیکی- شیمیایی متنوع و شناخته شده‌ای برای تصفیه گازهای ترش وجود دارند. صنعت پالایش گاز در جستجوی فناوری‌های جدید، به صرفه، زیست سازگار و ساده‌ای است که برای حجم کم گاز تولید شده به کار رود. لذا در آینده نزدیک، مخازن گازی کوچکتر با غلظت‌های نسبتاً بالای سولفید هیدروژن مورد بهره‌برداری قرار خواهند گرفت. تحقیقات گسترده به منظور یافتن روش‌های اقتصادی‌تر، محققان را به‌سوی استفاده از روش‌های بیولوژیکی هدایت کرده است. فرآیند بیولوژیکی مورد بررسی در این تحقیق فرآیند Bio-SR است. فرآیند Bio-SR از باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس برای بازیابی محلول مورد استفاده در شیرین‌سازی گاز طبیعی استفاده می‌کند. در این مطالعه گونه بومی باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس از خاک معدن مس سرچشمه جداسازی شده و تاثیر پارامترهای مختلف بر رشد و فعالیت این گونه در مقیاس ارلن بررسی شده است. سپس آزمایش‌هایی در بیوراکتورهای ستونی حباب‌دار و بستر ثابت به ترتیب با استفاده از باکتری‌های معلق و تثبیت شده انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد که باکتری بومی جدا شده از توانایی بسیار مناسبی جهت اکسیداسیون یون‌های آهن (II) و بازیابی حلال مورد استفاده در فرآیند شیرین‌سازی گاز برخوردار است. در این پژوهش، بیشینه سرعت اکسیداسیون بیولوژیکی در ارلن و بیوراکتور ستونی حباب‌دار به‌ترتیب ۱/۲ gr/lit.hr و ۰/۹ gr/lit.hr به دست آمد که در مقایسه با پژوهش قبلی، افزایش ۳ و ۲ برابری را به‌ترتیب در ارلن و بیوراکتور ستونی نشان داد.

کلمات کلیدی: بازیابی بیولوژیکی حلال، اکسایش، شیرین‌سازی، باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس، شیرین‌سازی گاز

مقدمه

حذف هیدروژن سولفید از جریان گاز به منظور رعایت ایمنی، جلوگیری از خوردگی خطوط لوله و تجهیزات حین انتقال گاز و جلوگیری از تولید گاز آلاینده سولفوردی اکسید پس از سوختن گاز، بسیار ضروری است [۱]. فرآیندهای فیزیکی-شیمیایی مختلفی نظیر جذب و اکسایش- کاهش در فاز مایع با هدف گوگردزدایی از جریان‌های گاز حاوی هیدروژن سولفید به کار برده می‌شوند. لیکن میزان سرمایه‌گذاری بالا، مصرف بالای انرژی و تولید

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی yaghmaei@sharif.edu

ضایعات خطرناک از مشکلات عمده این فرآیندها است که استفاده فراگیر از آنها را محدود می‌کند [۲]. تحقیقات گسترده برای پیدا کردن روش‌های اقتصادی‌تر به منظور تصفیه گازها و گوگرد زدایی از ذغال سنگ و نفت محققان را به سمت استفاده از روش‌های بیولوژیکی سوق داده است. اکثر فرآیندهای میکروبی در دما و فشار محیط اتفاق می‌افتند و مصرف انرژی را به حداقل ممکن می‌رسانند [۳ و ۱]. فرآیند بیولوژیکی مورد بررسی در این تحقیق، از دو مرحله تشکیل شده است. در مرحله اول، گاز اسیدی جذب شده با محلول آهن (III) واکنش می‌دهد و در طی این واکنش یون‌های آهن (III) به آهن (II) تبدیل می‌شوند.

در مرحله دوم، یون‌های آهن (II) تولید شده در مرحله قبل، طی فرآیند اکسیداسیون بیولوژیکی در حضور باکتری‌های تیوباسیلوس فروکسیدانس[1] به‌عنوان بیوکاتالیست، به یون‌های آهن (III) تبدیل می‌شوند و حلال مورد استفاده در مرحله جذب بازیافت می‌گردد [۴]. واکنش‌های عمده این فرآیند عبارتند از [۵]:

$$H_2S + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow S^{\downarrow} + 2FeSO_4 + H_2SO_4 \quad (۱)$$

$$2FeSO_4 + H_2SO_4 + 0.5O_2 \xrightarrow{T.F} Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \quad (۲)$$

واکنش کلی فرآیند به‌صورت زیر است:

$$H_2S + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow S^0 + H_2O \quad (۳)$$

کارایی مرحله اول فرآیند به پیشرفت مرحله اکسیداسیون بیولوژیکی یون‌های آهن (II) به یون‌های آهن (III)، که اکسیدانت مورد نیاز در مرحله اول را تامین می‌کند، بستگی دارد [۲]. فرآیند اکسیداسیون بیولوژیکی آهن تاکنون در سیستم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است [۶]. اهمیت سینتیک اکسیداسیون، موجب انجام مطالعات بیشتر در زمینه استفاده از طرح های مختلف بیوراکتور با حضور باکتری‌های شناور و تثبیت شده به منظور افزایش سرعت اکسیداسیون، شده است [۷]. در این تحقیق در ابتدا مطالعاتی در مقیاس ارلن به منظور تعیین شرایط بهینه رشد و فعالیت باکتری بومی تیوباسیلوس فروکسیدانس انجام شده است. سپس عملکرد باکتری در بیوراکتورهای ستونی حباب‌دار با استفاده از میکروب‌های معلق و باکتری‌های تثبیت شده در بستر ثابت بررسی شده است.

روش تحقیق

میکروارگانیسم و محیط کشت

میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس بوده که از خاک معدن مس سرچشمه کرمان جداسازی شده است [۸]. باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس در محیط کشت با ترکیب زیر کشت داده شده است [۹].

$gr/lit:FeSO_4.7H_2O:33.4gr/lit؛MgSO_4.7H_2O:0.4gr/lit$
$؛(NH_4)SO_4:0.4gr/lit$

pH اولیه محیط کشت با استفاده از اسیدسولفوریک ۱ نرمال برابر ۲/۳ تنظیم شده است.

روش انجام آزمایشات در فلاسک

به منظور بررسی تاثیر پارامترهای مختلف موثر بر رشد باکتری و نرخ اکسیداسیون آهن (II)، آزمایش‌ها به‌صورت ناپیوسته[2] در ارلن‌های ۵۰۰ cc حاوی ۱۰۰ cc محیط کشت انجام می‌شود. لازم به ذکر است که در این فرآیند بیولوژیکی، آهن (II) نقش سوبسترا را بازی می‌کند. حجم تلقیح[3] ۱۰٪ حجمی حجمی و از محیط کشت تازه حاوی تیوباسیلوس فروکسیدانس با غلظت تقریبی 2×10^8 cell/ml، در فاز رشد لگاریتمی[4] گرفته شده است. آزمایش‌ها در دور همزن ۱۵۰ rpm صورت گرفته‌اند. در مجموعه این آزمایش‌ها پارامترهای pH، دما، غلظت آهن (II)، غلظت منیزیم کشت، غلظت گوگرد عنصری و سایر اجزای محیط مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای بررسی اثر pH، قبل از انجام آزمایش، باکتری در همان pH اولیه یک مرتبه کشت داده شده است.

1. Thiobacillus ferrooxidans (T. F)
2. Batch
3. Inoculum size
4. Logarithmic phase

روش تثبیت میکروارگانیسم

پوکه‌های معدنی به‌عنوان بستر طبیعی و گرانول‌های پلی اتیلن سبک[1] به‌عنوان بستر مصنوعی برای تثبیت میکروب‌های تیوباسیلوس فروکسیدانس مورد بررسی قرار گرفتند. پوکه‌های معدنی در pH اسیدی و تحت تاثیر تنش ناشی از هوادهی درون بیوراکتور، خرد شده و استحکام لازم را دارا نبودند. به همین دلیل عمل تثبیت میکروارگانیسم بر روی گرانول‌های پلی اتیلن سبک انجام شده و در بیوراکتور بستر ثابت مورد استفاده قرار گرفته است. میکروب‌های تیوباسیلوس فروکسیدانس طی دو مرحله بر روی گرانول‌های پلی اتیلن سبک با قطر متوسط ۳/۷ mm تثبیت شده‌اند. این روش توسط آقایان نعمتی و وب[2] توسعه یافته است [۱۱ و ۱۰]. گرانول‌های پلی اتیلن سبک قبل از عمل تثبیت با اسید سولفوریک شسته و آب‌کشی شده‌اند.

مرحله اول تثبیت به‌صورت ناپیوسته در ارلن‌های ۲ لیتری حاوی ۱ لیتر محیط کشت و ۲۵٪ وزنی حجمی گرانول و ۱۰٪ تلقیح از کشت تازه در محیط کشت با pH برابر ۲/۳، دمای ۳۳ °C و دور همزن ۱۵۰ rpm صورت گرفته است. پس از رشد میکروب و تغییر رنگ محیط کشت از بی‌رنگ به قرمز، گرانول‌ها از محیط کشت جدا شده و پس از دو بار آب کشی به محیط تازه منتقل می‌شوند. تلقیح باکتری فقط در اولین نوبت انجام می‌شود.

عمل تجدید کشت ۵ مرتبه تکرار می‌شود. در مرحله دوم گرانول‌ها در بیوراکتور قرار داده می‌شوند. فرآیند اکسیداسیون بیولوژیکی در بیوراکتور و به‌صورت ناپیوسته همراه با جریان برگشتی نیز ۵ مرتبه تکرار می‌شود. سپس برای انجام آزمایشات به‌صورت پیوسته مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بیوراکتور ستونی حباب‌دار و بیوراکتور بستر ثابت

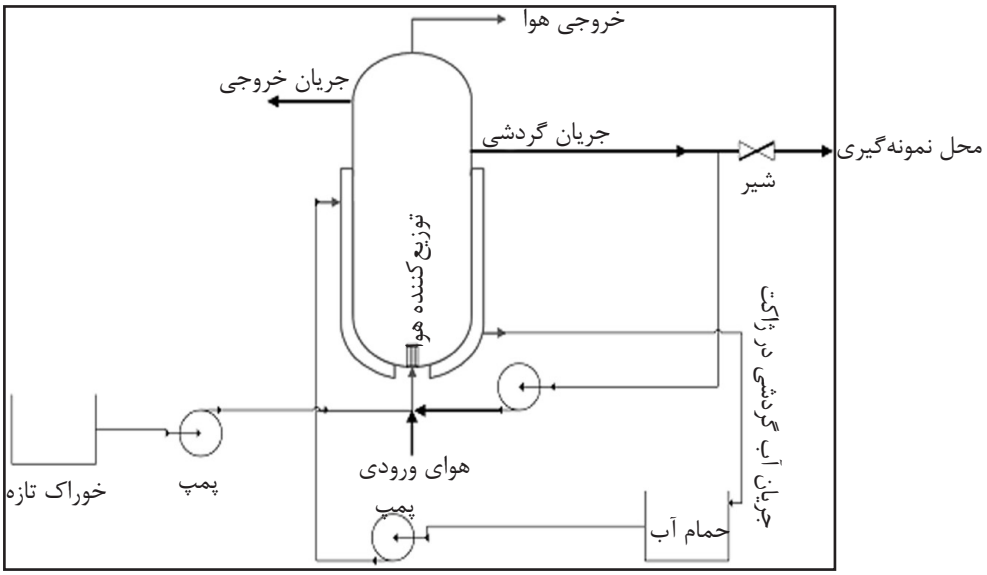
فرآیند اکسیداسیون بیولوژیکی سولفات آهن (II) با استفاده از باکتری‌های تیوباسیلوس فروکسیدانس آزاد، در یک بیوراکتور ستونی حبابدار به حجم ۴ lit و سرعت هوادهی ۲ lit/min بررسی شده است. دمای سیستم با استفاده از ژاکت آب گرم در دمای ۳۳ °C تنظیم شده است. جریان هوا توسط یک پمپ هوا تامین و در کف بیوراکتور توزیع شده است. خوراک تازه از پایین بیوراکتور توسط پمپ پریستالتیک[3] وارد شده، جریان خروجی از بالای بیوراکتور به‌صورت سرریز خارج می‌گردد و جریان گردشی با استفاده از پمپ در پایین بیوراکتور وارد می‌گردد. نمونه‌گیری در انتهای مسیر خروجی انجام شده و میزان آهن (II) و غلظت توده میکرب در نمونه‌ها اندازه‌گیری شده است.

عملکرد باکتری‌های تثبیت شده بر روی گرانول‌های پلی اتیلن سبک با استفاده از یک ستون شیشه‌ای به قطر ۷ cm، ارتفاع ۵۵ cm و حجم ۲ lit انجام شده است. هوا و خوراک تازه از پایین وارد شده و جریان خروجی از بالا و به‌صورت سرریز خارج می‌گردد. نمای کلی سیستم در شکل ۱ نشان داده شده است. بیوراکتورها تا اکسیداسیون کامل آهن (II) به‌صورت ناپیوسته همراه با جریان برگشتی عمل می‌کنند، سپس عملیات پیوسته بیوراکتورها آغاز می‌گردد. زمان رسیدن به حالت پایدار بیوراکتور زمانی است که تغییرات غلظت آهن (III) در یک بازه زمانی کمتر از ۵٪ باشد.

اندازه‌گیری

غلظت توده میکروبی از طریق شمارش با استفاده از لام مخصوص شمارش و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ انجام شده است. غلظت یون‌های آهن (III) به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از سولفوسالیسیلیک اسید به‌عنوان معرف اندازه‌گیری شده است [۱۲].

1. Low Density Polyethylene (LDPE)
2. Webb
3. Peristaltic pump



شکل ۱- نمای کلی سیستم مورد استفاده

نتایج و بحث

بررسی‌های انجام شده در فلاسک

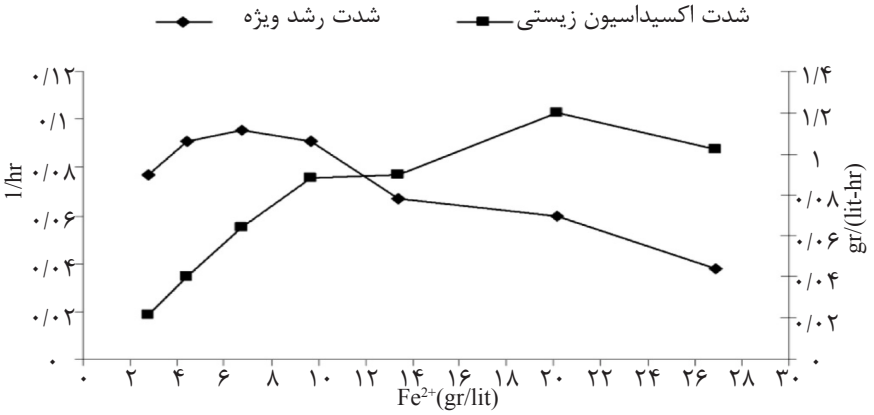
در شکل ۲ سرعت اکسیداسیون بیولوژیکی[1] و سرعت رشد ویژه[2] در غلظت‌های مختلف آهن (II) آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود سرعت رشد مخصوص در غلظت gr/lit ۶/۷ بیشینه است. در حالی که سرعت اکسیداسیون بیشینه در غلظت gr/lit ۲۰ به‌دست می‌آید و با توجه به هدف فرآیند، که افزایش سرعت اکسیداسیون آهن (II) است، غلظت gr/lit ۲۰ مقدار بهینه است. مقدار بیشینه سرعت اکسیداسیون در غلظت gr/lit ۲۰ برابر gr/lit.hr ۱/۲ به‌دست آمده است که با مقدار gr/lit.hr ۰/۴۵ که توسط آقای نعمتی و همکارانش در شرایط دما و محیط کشت مشابه گزارش شده، قابل مقایسه است [۶].

نتایج بررسی اثر pH در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که در محدوده pH ۲ تا ۲/۳، سرعت اکسیداسیون بیولوژیکی بیشینه است. در pH بالاتر از ۲/۳ و pH کمتر از ۲، سرعت اکسیداسیون کاهش می‌یابد و در pH برابر ۱/۳ باکتری رشد نمی‌کند. در pH بالاتر از ۲/۳، تشکیل لایه‌ای از رسوبات آهن (III) بر روی باکتری‌ها نفوذ پروتون‌ها را محدود ساخته و بر فعالیت اکسیداسیون بیولوژیکی اثر بازدارندگی دارد. افزایش فعالیت باکتری‌ها در محدوده pH، ۲/۵ تا ۵ در صورت کاهش غلظت آهن (II) امکان‌پذیر است و در pH بالاتر از ۵ اکسیداسیون شیمیایی بر اکسیداسیون بیولوژیکی غلبه دارد [۱۳]. در pH پایین‌تر از ۲ فعالیت باکتری به دلیل بازدارندگی ناشی از اسیدیته کاهش می‌یابد. در مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف مقادیر pH بهینه در حدود ۲ گزارش شده است [۶].

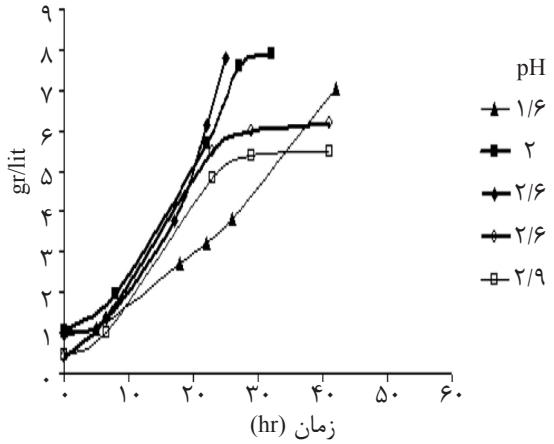
اثر دما بر فعالیت باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیشینه فعالیت باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس در دمای °C ۳۳ است. باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس اتوتروف است و از دی‌اکسیدکربن موجود در هوا به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌کند. فرآیند تثبیت CO_2 تابعی از غلظت یون منیزیم در محیط کشت است [۱۴].

به همین دلیل آزمایشاتی با غلظت‌های مختلف یون منیزیم ۲۰، ۶۰، ۸۰ و mg/lit ۱۲۰ انجام شده است. نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که غلظت یون منیزیم در محدوده ۲۰ تا mg/lit ۱۲۰ تاثیری بر فعالیت باکتری ندارد و نیاز بسیار اندک باکتری به یون‌های منیزیم می‌تواند به‌دلیل رشد کم باکتری باشد [۱۴].

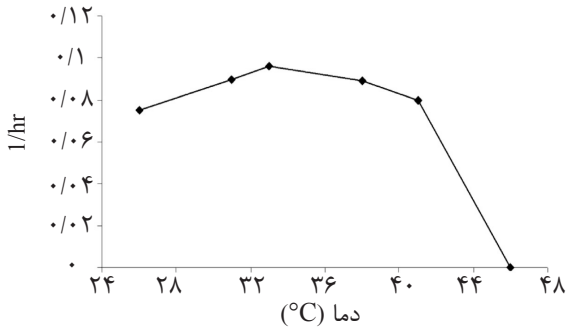
1. Bio-oxidation rate
2. Specific growth rate



شکل ۲- سرعت رشد ویژه و سرعت اکسیداسیون بیولوژیکی در غلظت‌های مختلف سوبسترا



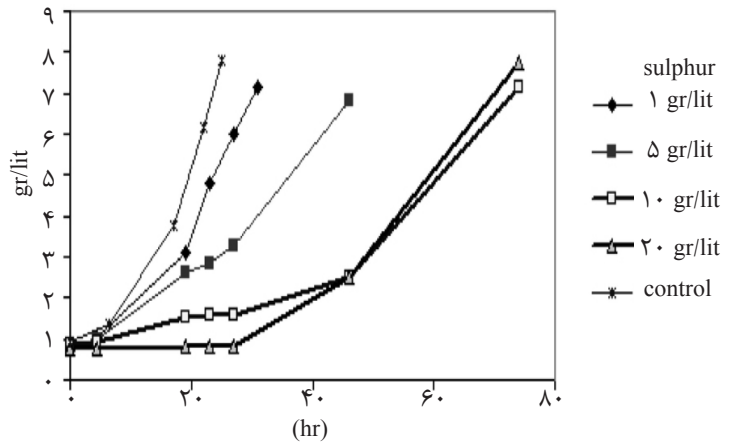
شکل ۳- مقایسهٔ فعالیت باکتری در مقادیر مختلف pH (میزان تولید یون Fe^{3+} در pHهای مختلف)



شکل۴- سرعت رشد ویژهٔ باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس برحسب دما

همچنین اثر غلظت منابع آمونیوم و فسفات در محیط کشت باکتری بررسی گردید. غلظت دی پتاسیم هیدروژن فسفات در محدوده ۰/۲ تا gr/lit ۲ و غلظت سولفات آمونیوم در محدوده ۰/۲ تا gr/lit ۱/۲ اثری بر فعالیت باکتری ندارند.

در فرآیند Bio-SR واکنش بین سولفات آهن (III) و سولفید هیدروژن تولید گوگرد عنصری می‌نماید. با وجود جدا کردن گوگرد در خوراک ورودی، ممکن است مقادیری از گوگرد ناشی از ورودی به بیوراکتور وجود داشته باشد. در شکل ۵ اثر غلظت گوگرد عنصری بر فعالیت باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس بررسی شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود حضور مقادیر مختلف گوگرد اثر بازدارنده بر فعالیت باکتری دارد. احتمالاً با افزایش غلظت گوگرد عنصری سرعت انتقال جرم اکسیژن در محلول کاهش یافته و فعالیت باکتری محدود می‌گردد.

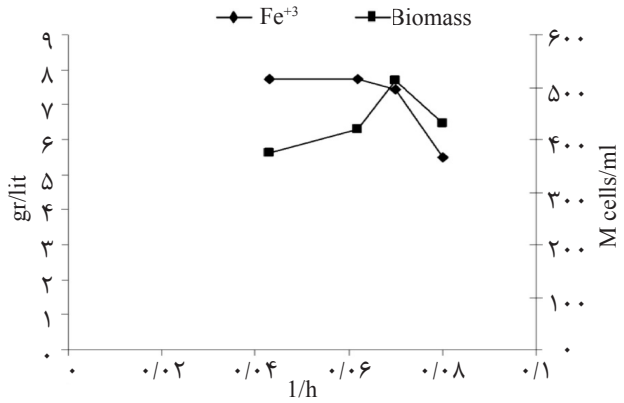


شکل۵ - اثر غلظت گوگرد عنصری بر فعالیت باکتری تیوباسیلوس فروکسیدانس

بررسی عملکرد بیوراکتورهای ستونی و حباب‌دار

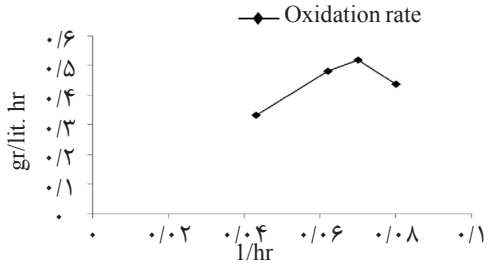
برای تعیین اثر نرخ رقیق سازی و غلظت اولیه آهن (II) در خوراک ورودی، آزمایش‌هایی در بیوراکتور ستونی حباب‌دار انجام گرفته است. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش نرخ رقیق‌سازی تا مقدار ۱/hr ۰/۰۷۵، غلظت توده سلولی افزایش می‌یابد و اکسیداسیون آهن (II) که مستقل از نرخ رقیق‌سازی است به طور کامل انجام می‌شود. در نرخ رقیق‌سازی بالاتر پدیده شسته شدن[1] اتفاق می‌افتد و غلظت آهن (III) کاهش می‌یابد. در شکل ۷ سرعت اکسیداسیون آهن (II) از ابتدای رقیق‌سازی تا میزان ۱/hr ۰/۰۷۵ که متناظر با سرعت اکسیداسیون ۰/۵۲ gr/lit.hr است، افزایش می‌یابد. مقدار سرعت اکسیداسیون بیشینه با مقادیر ارائه شده در مقالات قابل مقایسه است [۱۵ و ۶]. در شکل ۸ اثر بازدارندگی سوبسترا بر رشد باکتری مشاهده می‌شود.

همچنین به منظور بررسی اثر نرخ رقیق‌سازی بر اکسیداسیون آهن (II) آزمایش‌هایی با استفاده از بیوراکتور بستر ثابت با میزان تخلخل ۴۸٪ انجام گرفته است. همان‌گونه که در شکل ۹ و شکل ۷ مشاهده می‌شود مقدار بیشینه سرعت تولید آهن در دو حالت باکتری‌های تثبیت شده و آزاد یکسانند و گرانول‌های پلی اتیلن سبک باعث افزایش نرخ اکسیداسیون نشده و در نتیجه بستر مناسبی برای تثبیت باکتری نیستند.

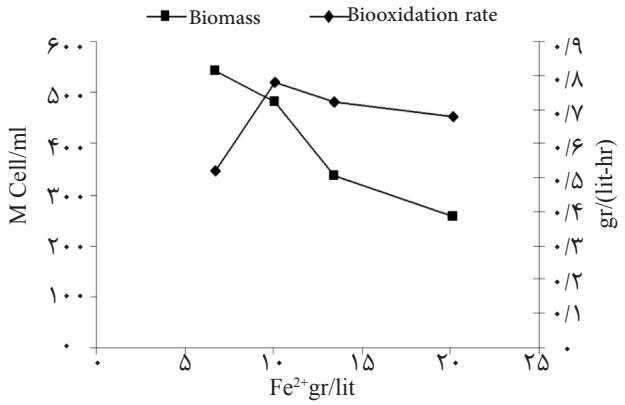


شکل ۶- غلظت تودهٔ سلولی و آهن (III) در شرایط پایا برحسب نرخ رقیق‌سازی، غلظت آهن (II) در خوراک ورودی برابر ۶/۷ gr/lit

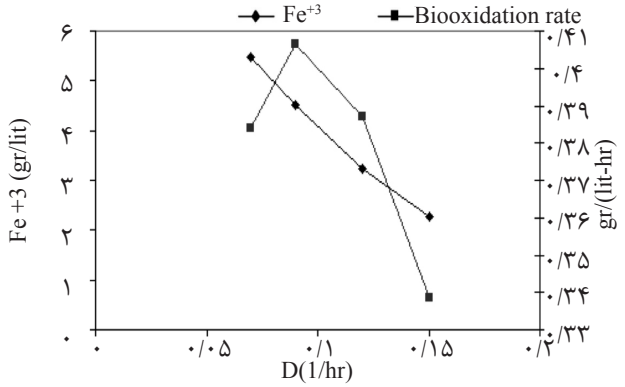
1. Wash Out



شکل ۷- سرعت تولید آهن (III) برحسب نرخ رقیق‌سازی، غلظت آهن (II) در خوراک ورودی برابر gr/lit ۶/۷



شکل ۸- سرعت تولید آهن (III) و غلظت تودهٔ سلولی در حالت پایا بر حسب غلظت آهن (II) در خوراک ورودی، نرخ رقیق‌سازی برابر (۱/hr) ۰/۰۷۵



شکل ۹- میزان تولید آهن (III) بر حسب نرخ رقیق‌سازی در بیوراکتور بستر ثابت، آهن (II) در خوراک ورودی برابر gr/lit ۶/۷

نتیجه‌گیری

در این تحقیق عملکرد بیوراکتور در فرآیند Bio-SR مورد بررسی قرار گرفت. گونه بومی تیوباسیلوس فروکسیدانس از معدن مس سرچشمه جداسازی شد و تاثیر متغیرهای فرآیندی نظیر دما، pH، غلظت آهن (II)، غلظت گوگرد عنصری و ترکیب محیط کشت بر رشد و فعالیت باکتری بررسی گردید. بیشینه سرعت اکسیداسیون بیولوژیکی در ارلن gr/lit.hr ۱/۲ و در بیوراکتور ستونی حباب‌دار gr/lit.hr ۰/۹ بود. بدین‌ترتیب سرعت اکسیداسیون گونه بومی مورد تحقیق در مقایسه با تحقیق انجام شده قبلی در شرایط دما و محیط کشت مشابه، در ارلن به میزان ۳ برابر و در بیوراکتور ستونی به میزان ۲ برابر افزایش یافت.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه صنعتی شریف به‌خاطر حمایت مالی از این پروژه تشکر و قدرانی می‌گردد.

مراجع

[1]. Anders B., and Colin Webb J., *"Treatment of H_2S containing gases: a review of microbiological alternatives,"* Enzyme and Microbial Technology, Vol. 17, pp. 2-10, 1995

[2]. Barch C. L., Elliott F. and Melvin S. W., "*Using odor control technology to support animal agriculture,*" Transactions of the ASAE, Vol. 27, pp. 859-864, 1984.

[۳]. سلیمی ف.، یغمایی س.، "مروری بر فرآیندهای بیولوژیکی تصفیه گاز طبیعی و بازیافت گوگرد"، مجله مهندسی شیمی ایران، سال سوم، شماره ۱۲، صفحات ۳-۱۲، ۱۳۸۳.

[4]. Pagella C. and De Faveri D., M. *"H_2S gas treatment by iron bioprocess,"* Chem. Eng. Sci. Vol. 55, pp. 2185-2194, 2000.

[5]. Satoh H., Yoshizowa J. and Kamentani S., *"Bacteria help desulfurize gas,"* Hydrocarb.Procsess. Int. Ed. Vol. 76, pp. 76D-76F, 1988.

[6]. Nemati, M., S. T. L. Harrison, G. S. Hansford and C. Webb *"Biological oxidation of ferrous sulphate by thiobacillus ferrooxidans, a review on the kinetic aspects,"* Biochemical Engineering Journal. Vol. 1, Issue 3, pp. 171-190, 1998.

[7]. Karamanev D. G. and Nicolov L. N. *"Influence of some physico chemical parameters on bacterial activity of biofilm: ferrous iron oxidation by Thiobacillus ferrooxidans,"* Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31, pp. 295-299, 1988.

[8]. Mousavi S., Yaghmaei S., Vossoughi M. and Jafari A. *"Effciency of copper bioleaching of two mesophilic and thermophilic bacteria isolated from chalcopyrite concentrate of Kerman-Yazd regions in Iran,"* Scientia Iranica, Scientific Information Database, Vol. 14, No. 2, pp.180-184, Mar.-Apr. 2007.

[9]. Ronald M., Atlas, *"Handbook of microbiological media,."* 2nd Edition, Robert Stern Publisher, 1997.

[10]. Nemati M. and Webb. C, *"Effect of ferrous iron concentration on the catalytic activity of immobilized cells of thiobacillus ferrooxidans,"* Applied Microbiology Biotechnology, Vol. 56, pp. 560-565, 1996.

[11]. Wood et al., *"Ferrous sulphate oxidation using thiobacillus ferrooxidans cells immobilized on sand for the purpose of treating acid mine-drainage,"* Applied Microbiology Biotechnology, Vol. 56, pp. 560-565, 2001.

[12]. Karamanev D.G., L. N. Nikolov and V. Mamatarkova, *"Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous drainage waters and similar solutions,"* Journal Minerals Engineering, Vol. 15, Issue 5 pp. 341-346, May 2002.

[13]. Gabriel M. and tomas V., *"Bacterial oxidation of ferrous iron by acidithiobacills ferrooxidans in the pH range 2.5-7,"* Hydrometallurgy, Issuse 1-2, Vol. 71, pp. 149-158, Oct. 2003.

[14]. Malhorta, Iankhiwale A. S., Rajvaidyan A. S. and Pandy R. A., *"Optimal conditions for bio-oxidation of ferrous ions to ferric ions using thiobacillus ferrooxidans,"* Bioresource Technology, Issuse 3, Vol. 85, pp. 225-234, Dec. 2002.

[15]. Gomez J. M. and Cantero D., *"Kinetic study of biological ferrous sulphate oxidation by iron oxidizing bacteria in continuous stirred and packed bed bioreactors,"* Process Biochemistry, Vol. 38, pp. 867-875, 2003.

[16]. Nemati M. and Harrison S. T. L., *"A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron,"* Minerals Engineering, Vol. 13, pp.19-24, 2000.