

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* تیمار شده با اشعه UV در

فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم

ملوس شیدایی^۱، رضا حاج حسینی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

چکیده

باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* از مهمترین باکتری‌های شرکت کننده در فرآیند فروشویی میکروبی اورانیوم بوده که در آن، آهن فریک به عنوان یک پذیرنده الکترون عمل کرده و U^{+4} نامحلول را به U^{+6} محلول، تبدیل می‌کند. در مطالعه حاضر، باکتری دخیل در فرآیند فروشویی میکروبی اورانیوم با استفاده از اشعه UV در سه دوز ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه جهش داده شد. باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف سنگ اورانیوم قرار داده شده و بازده فروشویی میکروبی آنها بررسی گردید. سپس، در توالی‌های ۲۴ ساعته میزان استخراج اورانیوم، تغییرات pH و Eh آنها اندازه‌گیری شد. نهایتاً، بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف با استفاده از روش *Real time PCR* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان می‌دهد تغییرات Eh، pH و استخراج اورانیوم در فرآیند فروشویی میکروبی توسط باکتری‌های جهش یافته و وحشی با چگالی پالپ بالای سنگ نسبت به باکتری‌های کشت یافته با چگالی پالپ پائین‌تر به تأخیر افتاده است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی در غلظت‌های مختلف کانسنگ نشان داد که جهش و غلظت سنگ بر روی بیان ژن مذکور موثر بوده است. به عبارتی دیگر می‌توان اذعان داشت که تغییرات بیان ژن *rus* عامل تاثیر گذاری بر فعالیت باکتری در استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، می‌باشد. در تحقیق حاضر، باکتری بومی تا ۵۰٪ کانسنگ معدن سازگار شده که مقدار بسیار قابل توجهی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فروشویی میکروبی اورانیوم، *Acidithiobacillus ferrooxidans* ژن *rus* *Real time*

PCR

مقدمه

نیاز روزافزون به مواد اولیه، کاهش ذخایر معدنی با عیار بالا، ضرورت مصرف بهینه انرژی و رعایت دقیق معیارهای زیست محیطی، بروز تحولاتی در عرضه فرآوری مواد معدنی و استخراج فلزات را به دنبال داشته است (Smith, 2009).

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق

۲- دانشگاه پیام نور گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه تهران

* نویسنده مسئول: hosseini@pnu.ac.ir

در این راستا، یکی از راه حل هایی که در طی دهه های گذشته در دنیا مطرح شده فروشویی میکروبی (Bioleaching) است. فروشویی میکروبی شامل فنونی است که از میکروارگانیسم ها و یا بخشی از سلول برای دسترسی به برخی از اهداف صنعتی، معدنی و زیست محیطی بهره برداری می شود. در این روش غالباً از میکروارگانیسم های اسیددوست اکسید کننده آهن و گوگرد استفاده می شود. این فرآیند از کاربردهای بیو هیدرومتالوژی است که برای استخراج فلزاتی مانند مس، روی، آرسنیک، نیکل، مولیبدن، طلا، نقره، کبالت و اورانیوم استفاده می گردد (Kinnunen and Puhakka, 2005). اگر غلظت فلز در کانسنگ از نظر اقتصادی به قدری پائین باشد که نتوان با روش های معمول شیمیایی آن را استخراج کرد، بیولیچینگ مناسب ترین گزینه است (Dong et al., 2010). فرآیندهای میکروبی مزیت های اقتصادی آشکاری در بازیافت فلزات از رسوبات معدنی با عیار پائین داشته اند. فرآیندهای استخراج میکروبی فلزات نسبت به فرآیندهای فیزیکی- شیمیایی، علاوه بر ایجاد آلودگی های کمتر در محیط زیست، نسبت به فرآیندهای برشته کردن و ذوب کردن به انرژی کمتری نیاز دارند. به علاوه، باقیمانده های معدنی و فاضلاب های تولید شده از فرآیندهای فیزیکی- شیمیایی در معرض باران و هوا، به صورت بیولوژیکی استخراج شده و تولید اسید ناخواسته و آلودگی فلزی می کنند (Rawlings, 2005).

میکروارگانیسم های مختلفی قادر به انجام این فرایند هستند که *Acidithiobacillus ferrooxidans* از مهمترین باکتری های دخیل در این فرایند است (Rawlings, 2005). اکسایش یون آهن (II) توسط اسیدیتیبیواسیلوس فروکسیدانس در دو مسیر downhill و uphill صورت می گیرد، اما هر دو مسیر در طبیعت با یکدیگر رابطه دارند. در مسیر downhill، الکترون ها به صورت بیولوژیکی از آهن (II) به کمک یک سری از ناقل های الکترونی از غشای خارجی به سیتوپلاسم منتقل می شوند، جایی که از آنها برای احیای اکسیژن به آب استفاده می شود. این مسیر انتقال الکترون به شرح زیر می باشد (Appia-Ayme et al., 1999):

$$\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Cyc2} \rightarrow \text{rusticyanin} \rightarrow \text{Cyc1} \rightarrow \text{cytochrome oxidase aa3 (Cox BACD)} \rightarrow \text{O}_2 \text{ cytoplasmic}$$

راستی سیانین، یک پروتئین مس-آبی محلول ۱۶/۵ کیلودالتونی با پتانسیل ردوکس بالا (۶۸۰ میلی ولت) و پایداری اسیدی، یکی از پروتئین هایی است که کامل ترین مطالعات روی آن انجام شده است. این پروتئین در مسیر انتقال الکترون از طریق اکسیداسیون آهن غشای پلاسمایی نقش ایفا می کند (Appia-Ayme et al., 1999).

بهبود عملکرد باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* به منظور افزایش راندمان فروشویی میکروبی کانسنگ اورانیوم شماره ۲ ساغند یزد یکی از اهداف اصلی تحقیق حاضر می باشد. به منظور تحقق بخشیدن به این هدف، در مطالعه حاضر تاثیر جهش با اشعه UV در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

از آنجایی که غلظت کانسنگ مورد استفاده در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم بسیار موثر بوده، بر آن شدیم تا در حضور غلظت های مختلف کانسنگ اورانیوم، میزان عملکرد و بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی را مورد بررسی قرار

مواد و روش‌ها

کشت باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans*

به منظور رشد بهینه و تهیه مایه تلقیح، ابتدا محیط کشت اختصاصی 9K باکتری *Jahani Acidithiobacillus* sp. FJ2 (Jahani *et al.*, 2015) تهیه شد. این محیط شامل: ۳ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم KCl ، ۰/۱۰ گرم $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ و ۲۰ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ در یک لیتر آب مقطر می باشد. پس از آماده سازی، pH محیط کشت با استفاده از اسید سولفوریک (H_2SO_4) ۱۰ نرمال، سود (NaOH) ۱۰ نرمال، به روی ۲ تنظیم و ۱۰٪ باکتری/اسیدیتوباسیلوس اضافه گردید (Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). سپس، نمونه آماده شده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکردار با دور همزن ۱۸۰ rpm به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید (Shahroz *et al.*, 2012).

القای جهش در باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans*

به منظور ایجاد جهش در باکتری مورد نظر، باکتری در فاز لگاریتمی برداشته و با استفاده از سانتریفیوژ با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جمع آوری شد. سپس، رسوب باکتری سه بار با استفاده از آب اسیدی شسته شده و در نهایت در محیط کشت فاقد منبع آهن حل گردید. در ادامه، ۱۰ میلی لیتر از باکتری های آماده سازی شده در ۴ پلیت ریخته شد. فاصله بین پلیت ها و منبع نور UV به اندازه ۳۰ سانتی متر تنظیم گردیده و نمونه ها به مدت ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه در معرض نور UV با قدرت ۳۰ وات و طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار داده شدند. پس از جهش، به منظور حفظ تغییر ایجاد شده و عدم بازسازی ژنوم باکتری، نمونه ها به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Yuan *et al.*, 2013). در نهایت، نمونه ها در محیط کشت 9k در شرایط بهینه رشد کشت داده شده و برای آزمایشات فروشویی میکروبی اورانیوم مورد استفاده قرار گرفتند.

سازگاری باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* با غلظت های متفاوت پودر سنگ معدن اورانیوم

به منظور بررسی اثر غلظت اورانیوم (به عنوان یک ماده سمی و تنش زا) بر بیان ژن *rus* و همچنین عملکرد باکتری های جهش یافته در استخراج اورانیوم، باکتری های *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی با درصدهای مختلف پودر سنگ معدن اورانیوم کشت داده شدند. بدین منظور، از غلظت های متفاوت کانسنگ اورانیوم برابر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰٪ برای بررسی تاثیر بر روی بیان ژن *rus* باکتری ها استفاده گردید.

در نمونه کنترل منفی موجود در این مطالعه، به جای مایه تلقیح، از مخلوط متانول- فرمالدهید به نسبت ۱:۹ استفاده شد. در این مطالعه، از پودر کانسنگ اورانیوم آنومالی (II) ساغند یزد استفاده گردید که خصوصیات شیمیایی کانسنگ مورد استفاده در جدول ۱ قابل مشاهده می باشد.

جدول ۱: ترکیبات موجود در پودر کانسنگ اورانیوم با استفاده از آنالیز XRF

MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	U
19.03 wt %	1.49 wt %	24.83 wt %	49.67wt%	465 ppm

برای انجام این مرحله، ۱۰٪ از مایه تلقیح تغلیظ شده شامل باکتری های جهش یافته و وحشی با تعداد مشخصی از سلول در حدود 10^8 ، به میزان معینی از محیط کشت 9K اضافه شد (۱۰۰ ml باکتری به ۹۰۰ ml محیط کشت اضافه شد). سپس، به این محلول میزان ۵٪ کانسنگ آنومالی دو ساغند یزد با ابعاد $106 \mu\text{m}$ اضافه گردیده و با استفاده از اسید سولفوریک ۱۰ نرمال، سود ۱۰ نرمال، pH محیط کشت بر روی ۲ تنظیم گردید. سپس، تمام ارلن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکردار با دور همزن ۱۵۰ rpm انکوبه شدند. در مرحله بعدی، در توالی های ۲۴ ساعته میزان ۱۰ cc از لیچ‌لیکور (Leach liquor) به منظور بررسی میزان اورانیوم (با استفاده از آنالیز ICP) محلول برداشته شد و این میزان با آب مقطر pH=2 جبران گردید. همچنین، میزان تغییرات pH و Eh محیط در توالی های ۲۴ ساعته اندازه گیری و pH بر روی ۲ تنظیم گردید. زمانی که میزان استخراج اورانیوم به ۱۰۰٪ رسید، باکتری از محیط دارای چگالی پالپ کمتر به محیط حاوی چگالی پالپ بیشتر منتقل شد. در این مرحله، محیط کشت 9K در حجم مشخصی تهیه و با ۱۰٪ از باکتری‌های جمع آوری شده از چگالی پالپ ۵٪ توسط سانتریفیوژ با دور $2422 \times \text{rpm} = 4500 \text{ rpm}$ در زمان ۳۰ دقیقه، تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با دور همزن ۱۵۰ rpm انکوبه شد. همچنین، همانند دفعات پیشین در توالی های ۲۴ ساعته میزان اورانیوم محلول موجود در نمونه، اندازه‌گیری شد. به علاوه، میزان تغییرات pH و Eh محیط در توالی های ۲۴ ساعته اندازه گیری و pH بر روی ۲ تنظیم گردید (Abhilash et al., 2009).

در ادامه، ۱۰٪ از لیچ لیکور مرحله قبل به محیط کشت جدید حاوی چگالی پالپ بیشتر که به ترتیب ۱۵، ۲۵ و ۵۰٪ سنگ اورانیوم می‌باشد، اضافه گردید (Abhilash et al., 2009).

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی

در این مطالعه، به منظور بررسی بیان ژنهای مورد نظر از qPCR استفاده شد. بررسی‌های ملکولی که در پی سازگارسازی باکتری‌ها وجود دارند، نیازمند غلظت بالای باکتری می‌باشد که بدین منظور، زمانی که در هر چگالی پالپ، استخراج اورانیوم به بالاترین میزان خود رسید (۱۰۰٪)، باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور $2400 \times \text{rpm} = 4500 \text{ rpm}$ در زمان ۳۰ دقیقه، جمع آوری شدند.

در این مطالعه، به منظور استخراج RNA از کیت تجاری استخراج RNA شرکت Thermo Scientific، آمریکا استفاده شد. به منظور حذف DNA از RNA استخراج شده، میزان ۶ میکرولیتر RNA با ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم DNase (شرکت

از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. (ThermoScientific, #EN0521) و ۱ میکرولیتر بافر 10X آن که حاوی $MgCl_2$ می‌باشد، مخلوط شده و سپس با آب مقطر عاری از نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد.

به دنبال مرحله بالا، محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و محلول حاصل برای مرحله بعد که ساخت cDNA است، مورد استفاده قرار گرفت (Vera et al., 2009). قبل از انجام مرحله بعد، به منظور یکسان بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با Dnase، توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) خوانده شد. در نهایت، میزان معینی از RNA برای ساخت تمامی cDNAها استفاده شد.

در ادامه، به منظور ساخت cDNA از RNA استخراج شده، از کیت تجاری شرکت Thermo Scientific، آمریکا (#K1622) استفاده شد. به منظور تأیید ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (Polymerase Chain Reaction) برای ژنهای مورد نظر انجام شد که چرخه حرارتی آن به شرح زیر می‌باشد:

دناوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. چرخه تکثیر شامل ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای دناوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. تکمیل نهایی ساختار DNAهای تکثیر یافته، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. برای انجام واکنش PCR و Real time PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظرمان یعنی ژن *rus* و قسمتی از ژن 16S rRNA باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* استفاده گردید. ژن 16S rRNA در این مطالعه به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است، زیرا این ژن به عنوان یک ژن خانه دار (Housekeeping Gene) می‌باشد که میزان بیان آن در شرایط مختلف یکسان می‌باشد و به عنوان یک ژن استاندارد برای مقایسه با بیان سایر ژن‌ها استفاده می‌گردد (Yarzabal et al., 2004). جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی (5'-3')
<i>rus</i> (F)	GGCATAACCGCATAAGGAGGT
<i>rus</i> (R)	GAACCCGACCTTGGAGATTCC
16S rRNA (F)	CCTACGGGAGGCAGCAG
16S rRNA (R)	CGGTGCTTCTTCTTGGATTCACG

Real-Time PCR

واکنش Real time PCR، پس از ساخت cDNA و اطمینان حاصل کردن از صحت انجام آن، با استفاده از پرایمر اختصاصی و کیت تجاری شرکت TaKaRa، ژاپن انجام پذیرفت.

انجام این واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتری صورت پذیرفت. هر واکنش حاوی اجزایی به شرح جدول ۳ می‌باشد

جدول ۳: اجزای تشکیل دهنده یک واکنش Real-Time PCR

مقدار مصرفی	مواد مورد استفاده
5 μ l	Master Mix
0.2 μ l (10mM)	Forward primer
0.2 μ l (10mM)	Reverse primer
0.5 μ l (50 ng)	cDNA
0.2 μ l	ROX
3.9 μ l	Water (Nuclease free)

پس از مخلوط کردن مواد بالا، به منظور اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن مورد آزمایش (*rus*) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (*16s rRNA*) در پلیت‌ها به صورت سه تایی ریخته شد. همچنین، برای اطمینان حاصل کردن از عدم آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن، سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین گردید. به علاوه، برای اطمینان از جواب‌های حاصل و محاسبه میزان خطای کار، این آزمایش برای هر نمونه سه بار انجام شد. همچنین، بررسی بیان ژنهای مورد نظر در دیگر چگالی پالپ‌ها نیز با همین آرایش، در چندین پلیت ۴۸ خانه‌ای دیگر نیز صورت گرفت. برای انجام واکنش Real time PCR از دستگاه Applied Biosystems (StepOne) استفاده شد.

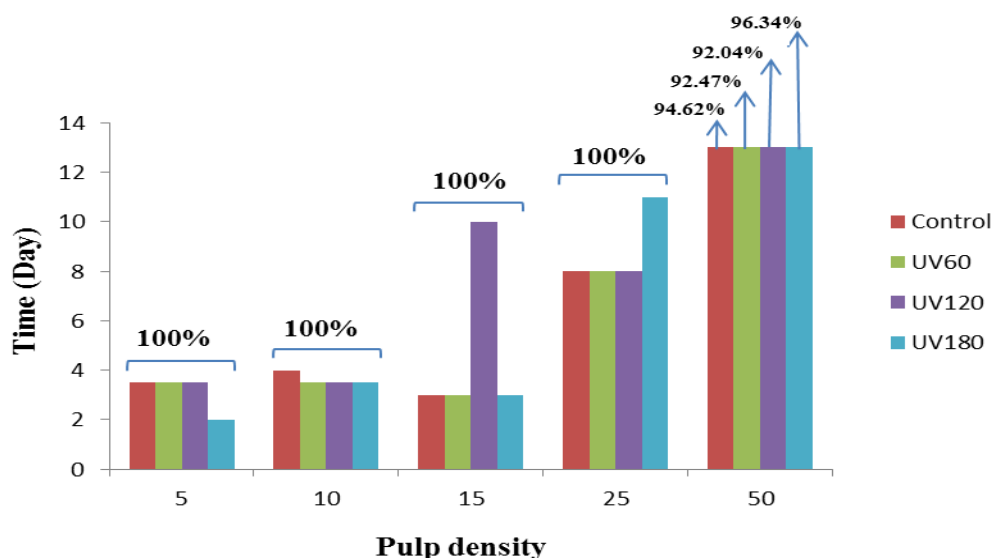
آنالیز آماری

قابل ذکر است که در این مطالعه تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام و آنالیز آماری صورت گرفت و تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم افزار P-value داده‌ها، محاسبه گردید و $P < 0.05$ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم در پنج گروه مورد آزمایش: باکتری جهش یافته با سه دوز مختلف UV (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه)، کنترل (باکتری فاقد جهش) و کنترل منفی (نمونه بدون باکتری) به شرح زیر می‌باشد:

شکل ۱ تاثیر چگالی پالپ بر روی باکتری های جهش یافته و وحشی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم را نشان می دهد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که با افزایش چگالی پالپ، میزان استخراج اورانیوم کاهش یافته و مدت زمان لازم برای استخراج کامل فلز بیشتر شده است. در چگالی پالپ های ۵، ۱۰ و ۵۰٪، سرعت استخراج اورانیوم بوسیله باکتری های جهش یافته بیشتر از باکتری وحشی بوده است. در چگالی پالپ ۵٪، کل اورانیوم، پس از دو روز توسط باکتری جهش یافته با دوز ۱۸۰ ثانیه استخراج گردیده، در حالی که در سایر باکتری ها این مدت به سه روز افزایش یافته است. به علاوه، نتایج نشان دادند که در چگالی پالپ ۱۰٪ تمامی باکتری های جهش یافته دارای عملکرد بهتری نسبت به باکتری وحشی بوده اند. همچنین، در چگالی پالپ ۵۰٪ باکتری جهش یافته با دوز ۱۸۰ ثانیه دارای بهترین عملکرد در استخراج اورانیوم بوده است. به طور کلی می توان ادعان داشت که جهش دارای تاثیری مثبت بر روی عملکرد باکتری است.



شکل ۱: میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* (جهش یافته و نمونه وحشی) در حضور غلظت های مختلف از سنگ معدن اورانیوم.

نتایج آزمایش سازگارسازی حاکی از آن است که کاهش نرخ استخراج اورانیوم با افزایش دانسیته پالپ رخ می دهد. عوامل متعددی بر فرآیند فروشویی فلزات تاثیر می گذارند. این موارد شامل pH، دما، آمینواسیدها، فلزات سنگین، یون فریک، چگالی پالپ، مواد معدنی و ترکیبات آلی، نوع سنگ، نور و اشعه های مختلف، محیط کشت، سویه باکتری، دی اکسید کربن، اکسیژن، ORP (پتانسیل اکسیداسیون و احیا) می باشند (Chen and Lin, 2001). برخی از آن ها نظیر هومئوستازی، pH، ترکیبات معدنی و منبع انرژی، متعلق به محیط و شرایط اکولوژیکی فرآیند هستند. برخی دیگر نظیر غشای سلولی، پتانسیل ذخیره آن و فعالیت باکتری مربوط به خود میکروارگانیسم بوده و مواردی نظیر چگالی پالپ و اندازه ذرات، متعلق به فلز درگیر در فرآیند می باشند. برخی از این عوامل با توجه به محدوده عملکرد بهینه خود، باعث مهار یا بهبود فروشویی میکروبی می

شوند (Brandl, 2008). عناصر سنگین به شدت اثر مهاری روی رشد میکروارگانیسم ها دارند و می توانند برای میکروارگانیسم ها مرگ آور باشند. این فلزات شامل تورיום (Th)، اورانیوم (U)، جیوه (Hg) و نقره (Ag) می باشند که متابولیت های سلول را مهار می کنند و اثر سمی برای باکتریها دارند (Brandl, 2008). میزان مقاومت به فلزات سنگین در هر گونه، به سویه بستگی دارد. احتمالاً سازگار شدن با سطوح بالای فلز، دلیل عمده ی تغییر سویه ای باشد. تجربه پیشنهاد می کند که با اعمال فشار انتخابی بر جمعیت میکروارگانیسم ها برای رشد در حضور یون فلزی، میزان مقاومت آنها به میزان قابل توجهی نسبت به اغلب فلزات افزایش می یابد؛ هر چند که ممکن است این فرآیند در برخی موارد زمان زیادی طول بکشد. افزایش مقاومت به یون های فلزی می تواند از دو منبع اصلی ناشی شود: ایجاد جهش ژنتیکی در ژن های موجود در سلول یا اکتساب ژن های جدید از دیگر ارگانیسم های مقاوم به فلز از طریق فرآیندی موسوم به اشتراک ژنی افقی (Horizontal gene pool) دلیل این امر که تماس میکروب ها با فلزات موجب افزایش مقاومت آنها می شود را می توان در نتیجه تغییرات داخلی سلول دانست که به صورت جامع آزموده نشده است (Sand et al., 1995). یکی از دلایل دیگر که در چگالی پالپ های کمتر میزان استخراج اورانیوم نرخ بالایی دارد این است که O_2 یکی از اساسی ترین مواد مغذی برای رشد باکتری ها محسوب می شود و با افزایش چگالی پالپ میزان O_2 کاهش می یابد. در نتیجه افزایش چگالی پالپ را می توان با تعداد باکتری ها، کاهش میزان استخراج یون های فلزی در محلول، محدودیت دسترسی باکتری ها به O_2 و CO_2 و تخریب سلول های باکتری ها با ذرات کانسنگ مرتبط دانست. در چگالی پالپ های کمتر میزان انتقال جرمی اکسیژن بین تولید و مصرف آن متعادل است در حالی که برای چگالی پالپ های بالا نرخ اکسیژن مورد نیاز با میزان اکسیژن تولید شده طی انتقال آن بین گاز و مایع کمتر می باشد (Boon et al., 1998; Moon-Sung et al.,).

2005

همانگونه که از نتایج قابل مشاهده می باشد، در چگالی پالپ های پایین تر فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم بهتر و سریعتر بوده است. به بیانی دیگر، کاهش قابلیت فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می تواند به دلیل افزایش مالش بین ذرات سنگ باشد که باعث کم شدن چسبندگی بین ذرات و باکتری خواهد شد (Chong et al., 2002). از طرفی دیگر، سمیت در دوزهای بالای فلزات و یا سختی شرایط زیستی که رشد و فعالیت باکتری ها را درگیر می کند، اغلب از دلایل اصلی کاهش بهره وری فرایند فروشویی میکروبی در چگالی پالپ های بالا است. به علاوه، افزایش چگالی پالپ، باعث افزایش pH محیط می شود که خود باعث کاهش فعالیت باکتری های دخیل در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم خواهد شد (Chen et al., 2016). همچنین، نتایج نشان می دهد که در بالاترین چگالی پالپ استخراج اورانیوم به طور کامل صورت نگرفته و بیشترین میزان استخراج اورانیوم مربوط به باکتری جهش یافته می باشد. به علاوه، نتایج این آزمایشات حاکی از آن است که کاهش نرخ استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ رخ می دهد. تحقیقات بینگبو و همکارانش نشان داده است که پرتو فرابنفش می تواند منجر به یک جهش

مشهود در باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* LD-1 شده و فعالیت زیستی و قابلیت فروشویی میکروبی آن را افزایش دهد که تاییدی بر نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر می باشد (Yingbo et al., 2011).

در مطالعه حاضر، باکتری ها توانستند تا ۵۰٪ کانسنگ اورانیوم سازگار شوند که نتیجه قابل توجهی در فرایند فروشویی میکروبی اورانیوم می باشد. تووینن و کلی (Tuovnen and Kelly) اظهار داشتند سمیت اورانیوم باعث ضعیف شدن پیوند و اتصال بین سطوح و سلولها می شود که در نتیجه باعث کاهش CO₂ و اکسیداسیون یون فرو می گردد. به علاوه، بیان کردند که غلظت های اورانیوم بالای ۱۰-۴-۱۰-۳×۵ mol/dm³ برای اسیدیتوباسیلوس فرواکسیدانس سمی است (Rossi, 1990).

بررسی نتایج حاصل از پتانسیل اکسیداسیون و احیا در حضور غلظت های متفاوت پودر سنگ معدن اورانیوم و باکتری جهش یافته و وحشی

اشکال ۲ تا ۶ نشان دهنده نتایج حاصل از پتانسیل اکسیداسیون احیا در باکتری های جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ های مختلف از سنگ معدن اورانیوم می باشد. همانگونه که مشاهده می شود، در تمامی نمونه ها با گذشت زمان میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا به صورت معنی داری افزایش یافته است ($P < 0.05$). این نتایج نشان دهنده روند فعالیت باکتری و فرایند فروشویی میکروبی می باشد. به علاوه، سرعت فعالیت اکسیداسیونی باکتری در چگالی پالپ های پایین تر سریعتر از چگالی پالپ های بالاتر است. از این رو، با افزایش چگالی پالپ، زمان بیشتری برای اکسیداسیون طبق الگوی به دست آمده از نتایج لازم می باشد. در نمونه ۱۸۰ در حضور چگالی پالپ ۵٪، پس از سه روز، پتانسیل اکسیداسیون و احیا از ۳۶۹ میلی ولت به ۵۹۰ میلی ولت افزایش یافته است ($P < 0.05$). در حالی که، پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری وحشی در همین زمان فقط به ۵۶۷ میلی ولت رسیده است. لازم به ذکر می باشد که در تمامی نمونه ها کمترین میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا در نمونه کنترل منفی فاقد باکتری مشاهده شده است.

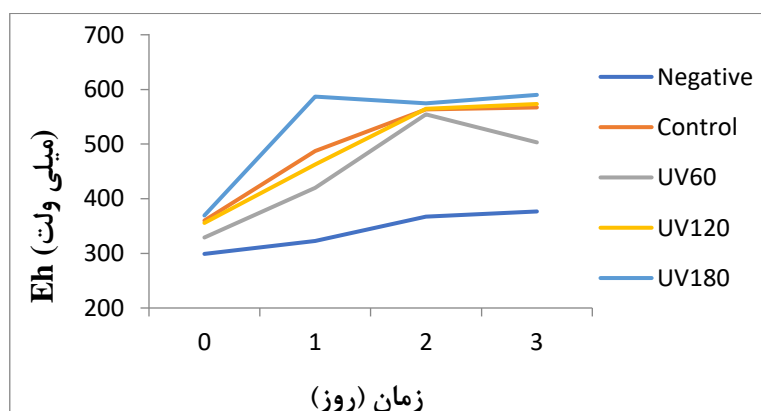
مهمترین عامل استخراج اورانیوم در فروشویی میکروبی، یون فریک تشکیل شده از اکسیداسیون یون فرو توسط باکتری می باشد. بنابراین، افزایش Eh در استخراج اورانیوم که به معنی انجام فرایند اکسیداسیون آهن می باشد دارای نقش تعیین کننده ای می باشد (Akci, 2004). همانطور که در نمودارهای مربوط به تغییرات Eh، قابل مشاهده می باشد در نمونه کنترل منفی به دلیل عدم وجود باکتری در محیط، تغییرات Eh کمتر می باشد و افزایش اندک Eh به دلیل اکسیداسیون یون فرو توسط هوا می باشد (Akci, 2004).

آهن فریک و اسید سولفوریک به منظور استحصال اورانیوم در طی فرایند فروشویی زیستی ضروری هستند (Azizur Rahman, 2016). آهن فریک یک عامل اکسیدکننده مؤثر اورانیوم ۴ ظرفیتی می باشد و اگر در شرایط اسیدی به سنگ معدن های اضافه شود، اورانیوم را به صورت محلول یا ۶ ظرفیتی تبدیل می کند. غلظت آهن فریک در طی اکسیداسیون اورانیوم

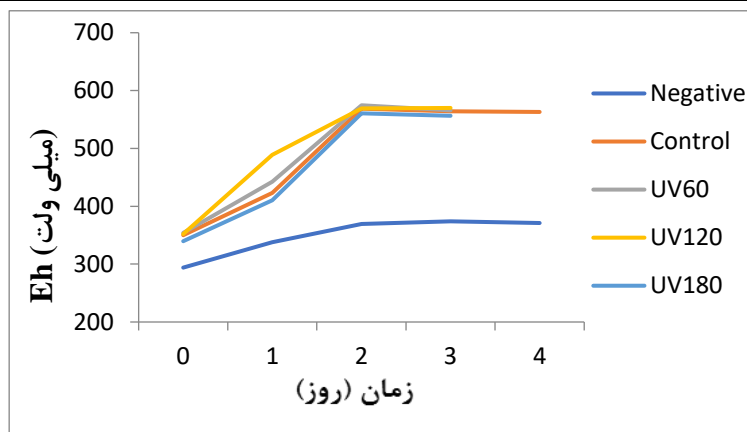
کاهش می‌یابد، اما می‌تواند توسط باکتری‌های اکسیدکننده آهن و اسیددوست، مانند باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* دوباره تولید شود اما به سبب تشکیل رسوب ژاروسیت این بازیابی با سرعت کندی صورت می‌گیرد. لازم به ذکر می‌باشد، که بسیاری از سنگ معدن‌هایی که دارای اورانیوم هستند دارای پیریت نیز می‌باشند (Keith-Roach & Livens, 2002). در فروشویی اورانیوم، باکتری‌ها مستقیماً به سنگ معدن اورانیوم حمله نمی‌کنند، بلکه این میکروارگانیسم‌ها پیریت و آهن فرو را اکسید می‌کنند و باعث تولید آهن فریک (واکنش ۱) می‌شوند. سپس، آهن فریک براحتی به اورانیوم (IV) که به صورت ترکیب با مواد معدنی وجود دارد حمله می‌کند (واکنش ۲) و آنرا به اورانیوم (VI) که محلول در اسید سولفوریک رقیق است تبدیل می‌کند (Sapsford *et al.*, 2012).



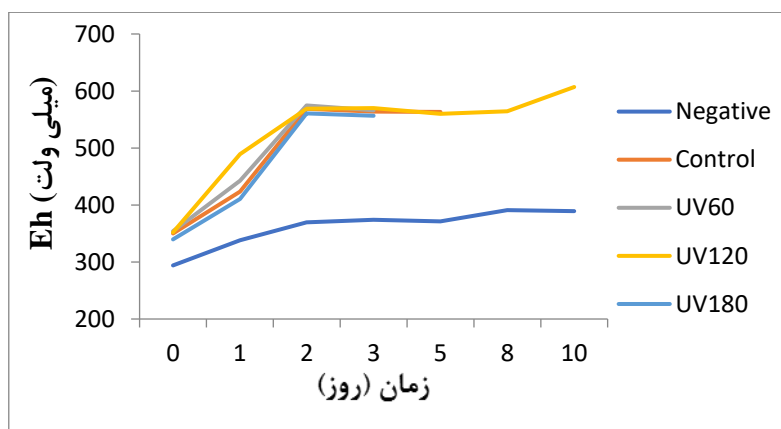
آهن فریک از اکسیداسیون پیریت که اغلب همراه با سنگ معدن اورانیوم است و یا در طی فروشویی زیستی اضافه می‌گردد، تولید می‌شود. *Acidithiobacillus ferrooxidans* با حضور میزان زیادتری از آهن فرو می‌تواند سرعت واکنش‌های اکسیداسیون خود را افزایش دهد (Abhilash *et al.*, 2010) که موجب افزایش میزان Eh در فرایند می‌شود. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که با انجام مرحله اکسیداسیون آهن فرو به آهن فریک میزان Eh در محیط افزایش پیدا می‌کند. در نتیجه افزایش این پارامتر در نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده افزایش فعالیت اکسیداسیونی باکتری می‌باشد.



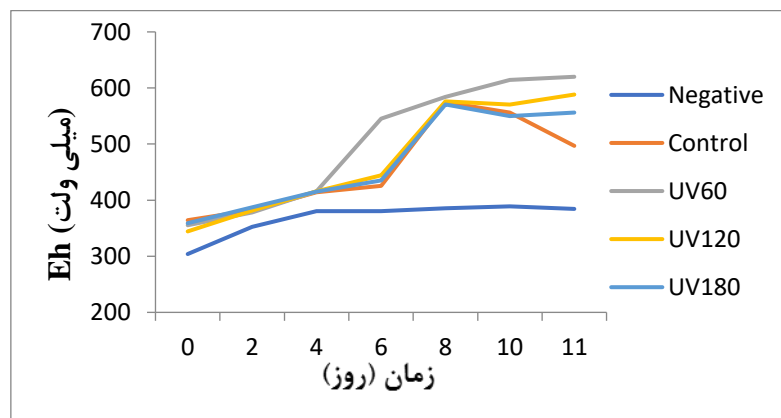
شکل ۲: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵٪



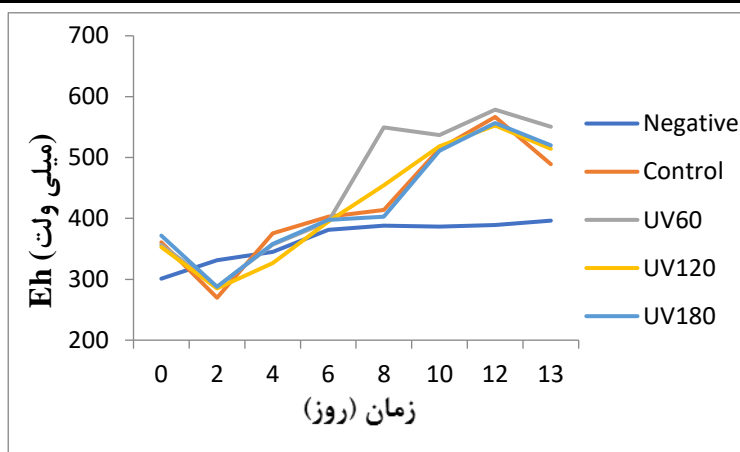
شکل ۳: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۰٪



شکل ۴: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۵٪



شکل ۵: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۲۵٪

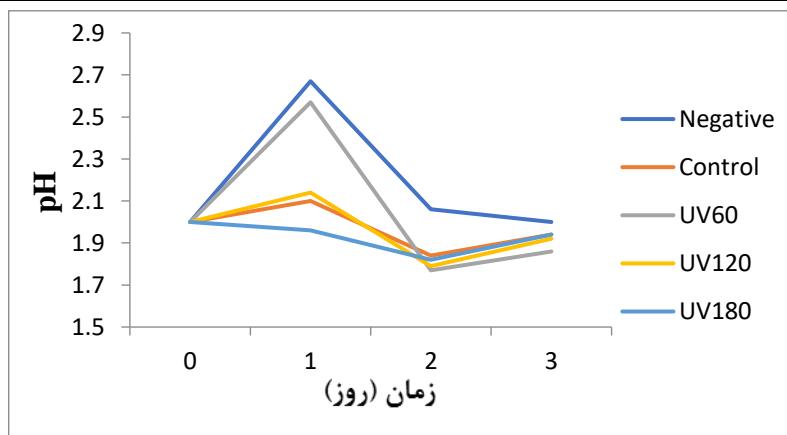


شکل ۶: تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵۰٪

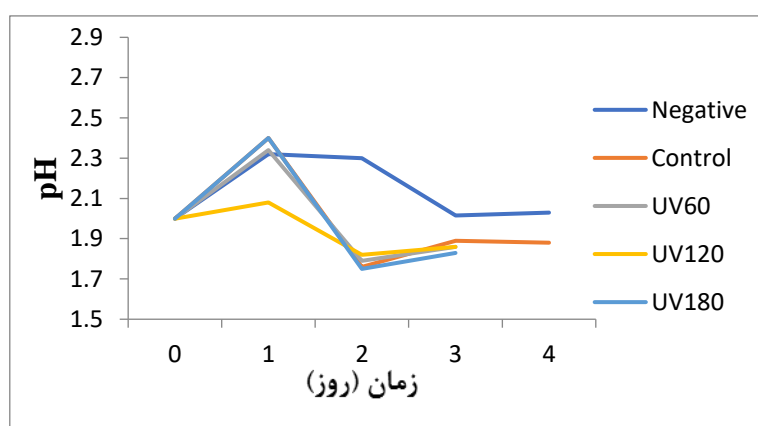
در مطالعه ای مشخص شده است که سرعت اکسیداسیون آهن فرو در باکتری جهش یافته، پس از ۲۴ ساعت کشت می تواند به ۱۰۰٪ برسد (۱۸ ساعت کمتر از زمان متعلق به باکتری اصلی، تحت شرایط فروشویی مشابه). پس از ۳۰ روز مشخص شد که استخراج مس توسط باکتری جهش یافته در مقایسه با باکتری اصلی، ۱۷٪ افزایش داشته است. این در صورتی است که میزان استخراج توسط باکتری اصلی در مقایسه با فروشویی شیمیایی، ۷۰٪ می باشد. نتایج آزمایشات آنها نشان داد که اثرات باکتری جهش یافته پس از پرتوتابی فرابنفش، بهتر از پرتوتابی باکتری های اصلی و بسیار بهتر از فروشویی شیمیایی نیز می باشد که تاییدی بر نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می باشد (Yingbo *et al.*, 2011).

بررسی تغییرات pH در باکتری جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ های مختلف

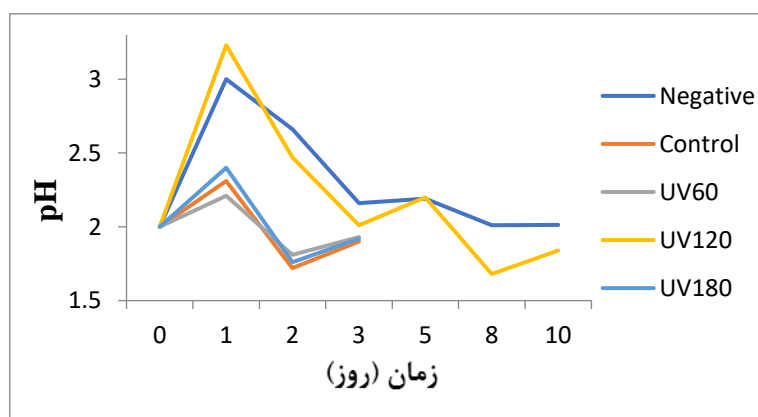
اشکال ۷ تا ۱۱ نشان دهنده تغییرات pH در باکتری های جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ های مختلف از سنگ معدن اورانیوم می باشد. در همه نمونه ها به جز نمونه کنترل منفی، میزان pH در روزهای ابتدایی روند افزایشی داشته و بعد از آن روند به صورت کاهشی مشاهده شده است ($P < 0.05$) که عمدتاً به دلیل فعالیت اکسیداسیونی آهن و سولفور توسط باکتری می باشد. لازم به توضیح می باشد که افزایش اولیه pH به دلیل واکنش های شیمیایی مصرف کننده اسید می باشد (Sandstorm & Petersson, 1997). همانطور که در شکل ۱۱ قابل مشاهده می باشد، میزان pH در روزهای ابتدایی روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است ($P < 0.05$) که کمترین میزان آن در چگالی پالپ ۵۰٪ در نمونه ۱۸۰ در روز دهم با توجه به فعالیت بیشتر باکتری، در نتیجه تولید اسیدسولفوریک بیشتر مشاهده شده است.



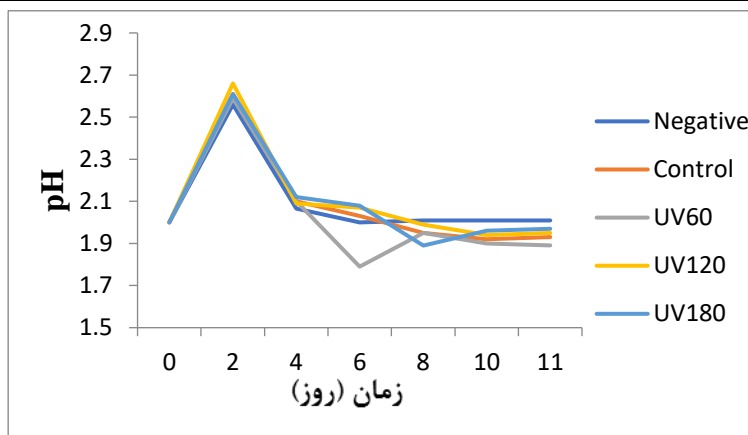
شکل ۷: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵٪



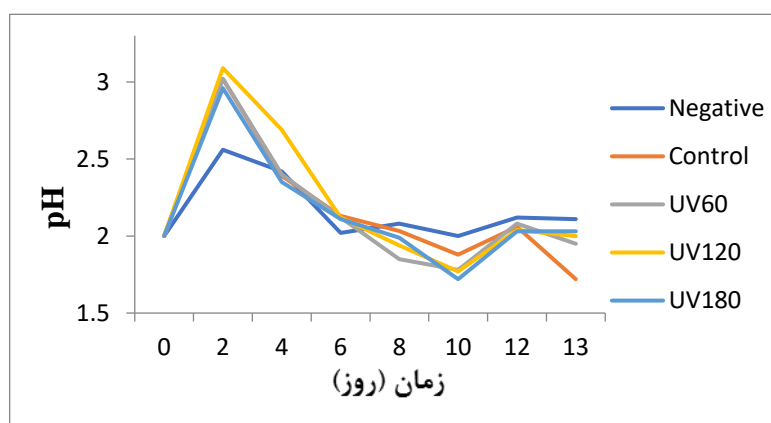
شکل ۸: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۰٪



شکل ۹: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۱۵٪



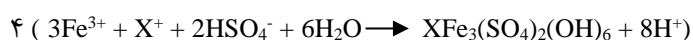
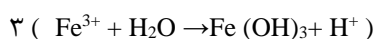
شکل ۱۰: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۲۵٪

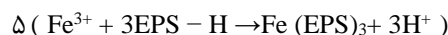


شکل ۱۱: تغییرات pH در حضور باکتری جهش یافته و وحشی در چگالی پالپ ۵۰٪

در طی فرآیند فروشویی زیستی، آهن فریک و اسید سولفوریک به منظور استحصال اورانیوم ضروری هستند. آهن فریک یک عامل اکسیدکننده مؤثر U(IV) می‌باشد و زمانیکه به سنگ معدن‌های اورانیومی که تحت شرایط اسیدی هستند اضافه شود، اورانیوم را به صورت محلول یا U(VI) تبدیل می‌کند.

با پیشرفت زمان، میزان آهن فریک در محیط افزایش می‌یابد و این آهن در واکنش‌های هیدرولیزی که منجر به تولید H^+ می‌شود شرکت می‌کند که این واکنش‌ها می‌توانند باعث کاهش pH محیط در مراحل بعدی فرآیند شوند (Dong *et al.*, 2010). این واکنش‌ها عبارتند از: هیدرولیز آهن فریک (واکنش ۳)، تشکیل رسوب ژاروسیت (واکنش ۴) که این رسوبات، حاصل از اکسید شدن سولفید آهن در سنگ معدن می‌باشد و واکنش‌های مربوط به مربوط به آگزوپلی ساکارید خارجی (EPS) که حاوی $-OH$ و $-COOH$ می‌باشند که باعث آزاد شدن H^+ در محیط می‌شوند.





در کشت باکتری pH یکی از فاکتورهای مهم می‌باشد و همچنین می‌تواند بر روی رشد باکتری و اکسیداسیون آهن فرو تاثیرگذار باشد (Meruane & Vargas, 2003). همانطور که در بخش نتایج، تغییرات pH نشان داده شده است، در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم، pH محیط در روزهای ابتدایی روند افزایشی داشته و با گذشت زمان، این روند به صورت کاهشی مشاهده می‌شود (نمودارهای ۷ تا ۱۱). در مطالعات پیشین نشان داده شده است که در مراحل اولیه فروشویی میکروبی مهمترین واکنشی که باکتری در آن دخیل می‌باشد، اکسیداسیون آهن فرو می‌باشد که این واکنش، مصرف کننده H^+ می‌باشد و همین امر باعث افزایش pH محیط در مراحل اولیه می‌شود. یا به بیان دیگر، افزایش pH در حضور باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* را می‌توان درگیر با واکنش‌هایی دانست که مصرف کننده اسید هستند. با پیشرفت زمان فروشویی باکتریایی، Fe^{2+} به Fe^{3+} اکسیده می‌شود و همانطور که واکنش‌های ۳، ۴ و ۵ نشان می‌دهد، باعث تشکیل شدن H^+ می‌شود، بنابراین، در مراحل بعدی فروشویی میکروبی باعث کاهش تدریجی pH محیط می‌شود (Meruane & Vargas, 2003; Dong et al., 2010).

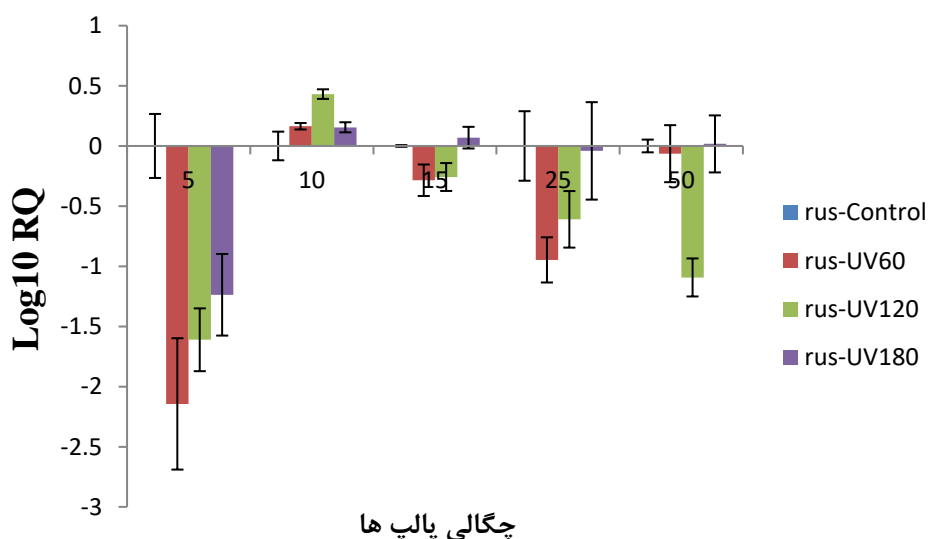
انحلال پذیری آهن فریک و تولید رسوب آهن به خصوص ژاروسیت، تحت تاثیر pH می‌باشد و همچنین انحلال پذیری آهن فریک توسط رسوب ژاروسیت کنترل می‌شود و مانع از بازایی و تولید مجدد یون فریک می‌شود (Grishin et al., 1989). همانطور که اشاره شد، تولید رسوب از امکان اکسیداسیون مجدد آهن فرو ممانعت به عمل می‌آورد پس در نتیجه، این امر از تولید انرژی در داخل سلول جلوگیری می‌نماید و همچنین رسوب حاصل بر روی لایه خارجی غشای سلولی می‌نشیند. لایه خارجی غشای سلولی اشغال شده توسط این رسوب‌ها، مکان‌هایی هستند که آنزیم‌های کلیدی آغازگر فرآیند اکسیداسیون آهن در آنجا وجود دارند و عمل می‌نمایند و وجود این رسوبات باعث کاهش و یا عدم کارایی این آنزیم‌ها می‌گردند (Gomez et al., 1998).

بررسی بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* وحشی و جهش یافته در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم

بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور غلظت‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم، بر طبق پروتکل ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به شرح زیر می‌باشد. پس از انجام هر واکنش Real-Time PCR، جهت اطمینان از عدم تکثیر غیر اختصاصی، منحنی ذوب توسط دستگاه رسم و ثبت می‌شود. منحنی دارای تک قله در T_m اختصاصی مربوط به هر ژن، نشان دهنده تکثیر کاملاً اختصاصی همان ژن می‌باشد. همچنین، قابل ذکر می‌باشد که در تمامی نمونه‌ها پس از انجام هر واکنش از نظر منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن *rus* از روش $\Delta\Delta CT$ استفاده شد. نمودار ۱۲ مربوط به تغییرات بیان ژن *rus* باکتری جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از سنگ معدن اورانیوم آنومالی ۲ ساغند یزد می‌باشد. همانگونه

که از نتایج مشخص می باشد، بیان ژن مورد نظر با افزایش میزان چگالی پالپ در باکتری های جهش یافته تغییر پیدا کرده است ($P < 0.05$). در حضور ۵٪ کانسنگ اورانیوم کاهش چشمگیری در بیان ژن *rus* باکتری های جهش یافته قابل مشاهده می باشد. در صورتی که در حضور غلظت ۱۰٪ کانسنگ، بیان این ژن در باکتری های جهش یافته افزایش داشته که این افزایش در غلظت های بالاتر کانسنگ بجز نمونه ۱۸۰ در غلظت ۱۵٪ مشاهده نشده است.

بسیاری از مطالعات نشان داده اند که بیان ژنهای کدکننده حاملین الکترون ها، در بسیاری از موارد، تحت تاثیر محیط رشد میکروارگانیسم می باشد تا باکتری بتواند در مقابل تغییر شرایط محیطی انعطاف پذیر باشد. در میان این حاملین الکترون ها، سیتوکروم های c در طیف وسیعی از موجودات مانند یوکاریوتها، آرکی ها و یوباکترها در انتقال الکترون ایفای نقش می کنند (Meyer, 1996). اسیدیتئوباسیلوس فرواکسیدانس به طور غیر معمولی دارای غلظت بالایی از سیتوکروم های c می باشد به طوری که حدود ۱۰ درصد از کل پروتئین های ساخته شده در سلولهای رشد یافته در محیط حاوی آهن فرو، سیتوکروم های نوع c می باشند (Vernon et al., 1960).



شکل ۱۲: نمودار بیان ژن *rus* باکتری *Acidithiobacillus ferrooxidans* جهش یافته و وحشی در حضور غلظت های مختلف سنگ معدن اورانیوم.

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان دهنده این مطلب است که در ابتدای فروشویی میکروبی که باکتری با درصد سنگ کمتری مواجه است، سعی در تطبیق خود با محیط دارد و بیان این ژن که برای اکسیداسیون آهن مورد نیاز است افزایش پیدا می کند و با بالا رفتن میزان چگالی پالپ افزایش بیشتری مشاهده می شود. اما با افزایش بیشتر سنگ اورانیوم، بیان ژن دخیل در اکسیداسیون آهن در اثر مواجهه شدن با عوامل تنشی که از حد آستانه تحمل باکتری بیشتر می باشد، دارای روند کاهشی می باشد که این تغییرات کاهشی نیز به طور واضح در نتایج استخراج اورانیوم قابل مشاهده است.

با توجه به تغییر بیان ژن *rus*، این احتمال وجود دارد که باکتری تا حد آستانه خاصی قادر به تحمل شرایط سمی اورانیوم می‌باشد و میزان بالاتر از این آستانه باعث کاهش چشمگیر بیان ژنهای دخیل در اکسیداسیون آهن می‌شود. یارزابال و همکاران، در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که اپرون *rus*، حاوی کلاسترهای ژنی اصلی دخیل در انتقال الکترون از آهن به اکسیژن است (Yarzabal et al., 2004). اپرون *rus* دارای دو سیتوکروم نوع *c* (*cyc1*، *cyc2*)، یک اپرون با عملکرد ناشناخته و یک سیتوکروم اکسیداز *aa3*-type (*coxBACD*) و راستی سیانین است (Appia-Ayme et al., 1999). بر اساس نتایج این مطالعه، پیشنهاد شد که بیان اپرون *rus* به صورت مثبتی تحت تاثیر Fe(II) است. به علاوه، سطح ترجمه این اپرون بعد از اینکه آهن موجود در محیط کاملاً اکسیده شد کاهش می‌یابد (Yarzabal et al., 2004). می‌توان اینگونه استنباط کرد که بیان ژنهای موجود در این اپرون به دلیل نقش کلیدی که در اکسیداسیون آهن دارند، در شرایط تنش تغییر پیدا می‌کنند.

از طرفی دیگر، تکنیک سازگارسازی یکی از روشهایی است که برای افزایش عملکرد باکتریایی استفاده می‌شود (Babiz & Madgwick, 1993). بیشتر یونهای فلزی برای میکروارگانیسم‌ها سمی هستند ولی با روش سازگارسازی می‌توان به زنده ماندن و تحمل این شرایط استرس‌زا کمک کرد. گونه تیوباسیلوس و میکروارگانیسم‌های اسیددوست توانایی رشد در حضور انواع یونهای فلزی دارند. سازگارسازی کمک به کاهش دوره تاخیر (lag period) در رشد و عملکرد می‌کند، در نتیجه باعث افزایش کلی سینتیک لیچینگ می‌شود (Attia et al., 1993). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل کاهش میزان استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، کاهش در بیان ژن *rus* می‌باشد.

نتیجه گیری

از بررسی نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اینگونه استنباط کرد که تغییرات بیان ژن *rus* عامل تاثیر گذاری بر فعالیت باکتری در استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ، می‌باشد. البته این نکته حایز اهمیت می‌باشد که به منظور کسب اطلاعات جامع‌تر در رابطه با عملکرد باکتری جهش یافته و بیان ژنهای کد کننده حاملین الکترون، بررسی سایر حاملین الکترون نیز لازم است.

منابع

- Abhilash, S., Mehta, K.D., Kumar V., Pandey B.D., and Pandey V.M. (2009) Dissolution of uranium from silicateapatite ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 95:70-75.
- Abhilash, S., Mehta, K.D., Kumar, V., Pandey, B.D and Tamrakar, P.K. (2010) Bioleaching - An Alternate Uranium Ore Processing Technology for India. *Energy Procedia*, 7:158-162.
- Akcil, A. (2004) Technical note: potential bioleaching developments towards commercial reality. *Minerals Engineering*, 17:477-480.

- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J. and Bonnefoy, V. (1999) Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa3-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus Ferrooxidans* ATCC 33020. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4781-4787.
- Attia, Y.A., Eleky, M., Ismail, M. (1993) *Int J Min Proc* 37:61.
- Azizur Rahman, M; (2016) Development of bioleaching: proteomics and genomics approach in metals extraction process. *AIMS Microbiology* 2(3):332-339.
- Babij, T and Madgwick, J.C.; (1993) High yeild bacterial leaching of copper Concentrates. *proc. Australas. Instr. Min. Metal*, 287:61-64,
- Boon, M. and Heijnen, J.J. (1998) Gas-liquid mass transfer phenomena in biooxidation experiments of sulphide minerals: a review of literature data. *Hydrometallurgy*, 48:187-204.
- Brandl, H. (2008) *Microbial Leaching of Metals*. Wiley-VCH 8.
- Chen, G., Sun, Z. and Liu, Y. (2016) Continued Multicolumns Bioleaching for Low Grade Uranium Ore at a Certain Uranium Deposit. *Journal of Nanomaterials*, 2016:7.
- Chen, P., Yan, L., Wang, Q., Li, Y. and Li, H. (2012) Surface alteration of realgar (As₄S₄) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International microbiology*, 15:9-15.
- Chen, S. and Lin, J. (2001) Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of PH. *Chemosphere*, 44:1093-1102.
- Chong, N., Karamanev, D.G. and Margaritis, A. (2002) Effect of particle-particle shearing on the bioleaching of sulfide minerals. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3):349-357.
- Dong, X., Li, C. and Liu, J. (2010) A novel approach for soil contamination assessment from heavy metal pollution: A linkage between discharge and adsorption. *J. Hazard. Mater*, 175:1022-1030.
- Dong, X., Li, C. and Liu, J. (2010) A novel approach for soil contamination assessment from heavy metal pollution: A linkage between discharge and adsorption *J. Hazard. Mater*, 175:1022-1030.
- Gomez, C., Blazquez, M.L. and Ballester, A. (1998) Bioleaching of a Spanish complex sulfide ore bulk concentrate. *Minerals Engineering*, 12:93-106.
- Grishin, S.I., Bigam, J.M. and Tuovinen, O.H. (1989) Characterization of jarosite formed upon bacterial. Oxidation of ferrous sulfate in a packed-bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 3101.
- Jahani, S., Fatemi, F., Firoz-e-zare, M.A. and Zolfaghari, M.R. (2015) Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain FJS from Ramsar, Iran. *Electronic Journal of Biology*, 11(4):138-146.
- Keith-Roach, M.J. and Livens, F.R. (2002) *Interactions of microorganisms with radionuclides*. 1st edition. Elsevier.
- Kinnunen, P.H. and Puhakka, J.A. (2005) High-rate iron oxidation at below pH 1 and at elevated iron and copper concentrations by a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm. *Process Biochemistry*, 40(11):3536-3541.
- Meruane, G. and Vargas, T. (2003) Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5-7.0. *Hydrometallurgy*, 71(1-2):149-158.
- Meyer, T.E. (1996) "Evolution and classification of c-type cytochromes In: *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach* (Scott, R.A. and Mauk, A.G., Eds.). University Science Books, Sausalito, CA 33-99.

- Moon-Sung, C., Kyung-Suk, C., Dong-Su, K and Hee-Wook, R; (2005) Bioleaching of uranium from low grade black schists by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:377-380.
- Rawlings, D.E. (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 10:1475-2859.
- Rossi, G. (1990) *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill, Hamburg.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R and Schippers, A. (1995) Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism—critical evaluation of bacterial leaching. *App Microbiol Biotechnol*, 43:961–966.
- Sandstorm, A. and Petersson, S. (1997) Bioleaching of a complex sulphide ore with moderate thermophilic and extreme thermophilic microorganism. *Hydrometallurgy*, 46(1–2):181-190.
- Sapsford, D.J., Bowell, R.J., Geroni, J.N., Penman, K.M. and Dey, M. (2012) Factors influencing the release rate of uranium, thorium, yttrium and rare earth elements from a low grade ore. *Minerals Engineering* 39:165–172.
- Shahroz, K., Faizul, H., Fariha, H., Kausar, S. and Rahat, U. (2012) Growth and biochemical activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* collected from Black Shale. *Journal of Microbiology Research*, 2(4):78-83.
- Smith, J.E; (2009) *Biotechnology*. Cambridge University Press. 5th edition.
- Vera, M., Rohwerder, T., Bellenberg, S., Sand, W., Denis, Y. and Bonnefoy, V. (2009) Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. *Advanced Materials Research* 71: 175-178
- Vernon, L.P., Mangum, J.H., Beck, J.V. and Shafia, F.M. (1960) Studies on a ferrous-ion-oxidizing bacterium. II. Cytochrome composition. *Arch. Biochem. Biophysics*, 88:227-231.
- Yarzabal, A. and Appia-Ayme, C. (2004) Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology*, 150:2113-23.
- Yingbo, D., Hai, L., Han, W., Xiaolan, M., Kaibin, F. and Hongwei, W. (2011) Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. *Minerals engineering*, 24:870–875.
- Yuan, X., Xie, X., Fan, F., Zhu, W., Liu, N. and Liu, J. (2013) Effects of mutation on a new strain *Leptospirillum ferriphilum* YXW and bioleaching of gold ore. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23:2751-2758.
- Zhang, Y., Qin, W., Wang, J., Zhen, S., Yang, C., Zhang, J., Nai, S. and Qiu, G. (2008) Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18:1491-1496.

Evaluation of *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* gene expression treated with UV radiation in uranium bioleaching process

M. Sheydaie¹, R. Haji Hosseini^{2*}

Received:2017.04.02

Accepted:2018.11.11

Abstract

Acidithiobacillus ferrooxidans is the main bacteria involved in the uranium bioleaching in which the ferric ion acts as an electron acceptor and converts insoluble U^{+4} to soluble U^{+6} . The oxidation process involved the electron transport chain which would occur through several periplasmic carriers. In this research, the bacterium involved in uranium bioleaching process was mutated using UV radiation at doses of 60, 120 and 180 seconds. Mutant and wild bacteria were placed in the presence of various concentrations of uranium ore (5, 10, 15, 25 and 50 %) and their bioleaching yields were examined. Then, uranium extraction, variation of pH and Eh were measured in the 24 hour intervals. Finally, *rus* gene expressions of mutant and wild *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of various uranium ore were analyzed using Real time PCR method. The results showed that, the changes of Eh, pH and uranium extractions at bioleaching process by mutant and wild bacteria have been delayed in the presence of high pulp density in compare with lower one. The results of *rus* gene expressions in mutant and wild bacteria in the presence of ore different concentrations showed that mutations and ore concentration has been effective on the expression of this gene. It should be noted that, in the present project, the native bacteria were adapted to 50% uranium ore that is very significant at uranium bioleaching process.

Keywords: Uranium bioleaching, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *rus* gene, Real time PCR

1- PhD. Student of Biochemistry, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

2- Biology Departments, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

* (Corresponding Author: hosseini@pnu.ac.ir)