

## Evaluation the effect of uranium ore concentrations on the *cyc2* gene expression in the mutated *Acidithiobacillus* sp. FJ2

**Faezeh Fatemi**\*

Assistant professor Clinical Biochemistry, Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran, ffatemi@aeoi.org.ir

**Malus Sheydaie**

PhD. Student of Biochemistry, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran, sheydaie@hotmail.com

**Reza Haji Hosseini**

Professor of Biochemistry, Biology Departments, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran, hosseini@pnu.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** The uranium bioleaching process is performed using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. This bacterium is capable of iron oxidation by an electron transport chain. One of the most important components of this chain is the *cyc2* gene product that involved in the oxidation process of iron.

**Materials and methods:** Evaluation of UV mutated (60, 120 and 180s) *Acidithiobacillus* sp. FJ2 *cyc2* gene in the presence of uranium ore concentrations, has been implemented in this project. For this purpose, the original and mutated bacteria were cultivated in the presence of uranium ore concentrations (5, 10, 15, 25 and 50%). Uranium extraction, variation of pH and Eh values were measured at 24 h intervals. Then, when the uranium extraction yield reached to 100%, gene expressions of *cyc2* original and mutated *Acidithiobacillus* sp. FJ2 were analyzed using Real-time PCR method.

**Results:** The results of the experiments showed that, with increasing pulp density, the uranium extraction rate and oxidation activity of bacteria were reduced. In addition, the result of *cyc2* gene expression showed that the target gene expression increases in the presence of uranium ore compared to sample with absence of uranium ore, and with further increase of pulp density, due to the toxicity of uranium, shows a decreasing trend.

**Discussion and conclusion:** The results of this study indicated that the mutation in the bacterium has a positive effect on the uranium bioleaching process, which can play an important role in the process of uranium bioleaching at high concentrations. In addition, with increasing pulp density due to uranium toxicity, there is a decreasing trend in the process of uranium extraction, which indicates the important role of this factor in the uranium bioleaching process.

**Key words:** *Acidithiobacillus* sp. FJ2, *cyc2*, Pulp density, Uranium bioleaching

---

\* Corresponding author

**Received:** May 5, 2017 / **Accepted:** September 17, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۴۱-۲۹  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶

## بررسی اثر غلظت‌های مختلف سنگ اورانیوم روی بیان ژن *cyc2* در باکتری جهش یافته *Acidithiobacillus* sp. FJ2

**فائزه فاطمی\*:** استادیار بیوشیمی بالینی، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران، ffatemi@aeoi.org.ir  
**ملوس شیدایی:** دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشگاه پیام‌نور، واحد تهران شرق، ایران، m.sheydaie@hotmail.com  
**رضا حاجی حسینی:** استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران، hosseini@pnu.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** فرآیند بیولیچینگ اورانیوم با استفاده از باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2 انجام می‌شود. این باکتری، آهن را از طریق زنجیره انتقال الکترون اکسید می‌کند و محصولات ژن *cyc2*، از مهم‌ترین اجزای این زنجیره و دخیل در فرایند اکسیداسیون آهن هستند.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش حاضر، بیان ژن *cyc2* در باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2 جهش یافته با اشعه UV (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ نانیه) در حضور غلظت‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم بررسی شد. به این منظور، باکتری‌های جهش یافته و وحشی در محیط کشت اختصاصی و در حضور غلظت‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم کشت شدند. میزان استخراج اورانیوم، تغییرات اسیدیته (pH) و فعالیت اکسیداسیون و احیای (Eh) آنها در توالی‌های ۲۴ ساعته اندازه‌گیری شد. زمانی که بازده استخراج اورانیوم به ۱۰۰ درصد رسید، بیان ژن *cyc2* باکتری جهش یافته و وحشی با روش Real-time PCR بررسی شد.

**نتایج:** نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که با افزایش میزان غلظت سنگ، سرعت استخراج اورانیوم و فعالیت اکسیداسیونی باکتری کاهش می‌یابد. همچنین، بیان ژن *cyc2* در حضور سنگ معدن اورانیوم نسبت به نمونه عاری از سنگ معدن افزایش می‌یابد و با افزایش بیشتر غلظت سنگ، به علت سمیت فلز سنگین اورانیوم، روند کاهشی نشان می‌دهد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند که ایجاد جهش در باکتری مدنظر، تأثیر مثبتی بر فرآیند بیولیچینگ اورانیوم و نقش مهمی در فرآیند بیولیچینگ غلظت‌های زیاد سنگ معدن اورانیوم دارد. به علاوه، با افزایش چگالی پالپ به علت سمیت اورانیوم، روند کاهشی در فرآیند استخراج اورانیوم مشاهده می‌شود که نقش مهم این عامل بر فرآیند بیولیچینگ اورانیوم را نشان می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2، *cyc2*، چگالی پالپ، بیولیچینگ اورانیوم

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

بخش عمده‌ای از معادن فلز جهان از سنگ‌های متفاوتی تشکیل شده و یافتن روشی مقرون‌به‌صرفه و دارای کمترین آثار مخرب بر محیط‌زیست برای استخراج سنگ‌ها همواره مدنظر پژوهشگران و سیاستمداران کشورهای مختلف بوده است. بیولیچینگ (Bioleaching)، روش زیستی استفاده از ریزموجودات برای استخراج فلزها از سنگ معدن آنهاست (۱). اگرچه تاکنون سویه‌های مختلف باکتریایی فرآیند بیولیچینگ و به‌ویژه بیولیچینگ اورانیوم را به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان انجام داده‌اند، در ایران کمتر بررسی شده است.

یکی از دغدغه‌های اساسی درباره بیولیچینگ اورانیوم، انجام اقداماتی مانند فراهم کردن شرایط محیطی و زیستی مطلوب برای باکتری و نیز بررسی سازوکار باکتری مربوطه برای بهبود، تسریع و افزایش استخراج اورانیوم است. تاکنون، اقدامات وسیعی در سراسر جهان در زمینه تغییرات ژنومی باکتری‌ها و دستکاری و مهندسی ژنتیک آنها انجام و نتایج خوبی حاصل شده است. همچنین، پژوهش‌های درخور توجهی درباره این دسته باکتری‌ها از جمله *Acidithiobacillus* و شرایط بهینه فعالیت آنها انجام و ویژگی‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی آنها در حد مطلوبی تعیین شده است. این اقدامات روی سویه‌های مختلف و از جنبه‌های گوناگونی نظیر تغییر در بیان ژن، ایجاد جهش‌جهدش، بیوانفورماتیک و شناسایی ژن‌های مؤثر انجام شده‌اند (۲) و موضوع جالب توجه، بهینه‌سازی استخراج اورانیوم با استفاده از این روش‌هاست.

ژن *cyc2* در باکتری *Acidithiobacillus* مسئول اکسیداسیون آهن در غشای خارجی است و پتانسیل

احیای این سیتوکروم بیشتر از سایر اعضای خانواده سیتوکروم‌های C است. این پروتئین، اکسیداسیون آهن و احیای اکسیژن را هم‌زمان انجام می‌دهد و نوعی متالوپروتئین با عناصر فلزی در ساختار خود است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که پروتئین Cyc2 جداسازی شده از باکتری، الکترون‌ها را از Fe(II) به مولکول O<sub>2</sub> موجود در نمونه انتقال می‌دهد و هنگامی که Fe(II) به‌عنوان دهنده الکترون استفاده شود، هر میلی‌گرم از کمپلکس پروتئینی Cyc2 حدود ۲۱۲ واحد اکسیژن را احیا می‌کند (۳).

با توجه به اهمیت پروتئین Cyc2 در فرآیند بیولیچینگ، بررسی این پروتئین در باکتری *Acidithiobacillus* در غلظت‌های مختلف سنگ معدن از اهداف اصلی افزایش بازده بیولیچینگ است (۲). تأثیر غلظت‌های مختلف بر بیان ژن *cyc2* ضروری است زیرا کاهش اکسیداسیون آهن توسط باکتری یکی از علت‌های کاهش فعالیت باکتری در غلظت‌های زیاد سنگ است. از آنجا که پروتئین Cyc2 نقش مؤثری در اکسیداسیون آهن دارد، احتمالاً افزایش غلظت سنگ بر بیان ژن این پروتئین تأثیر نامطلوبی می‌گذارد و در نتیجه، بررسی عملکرد این پروتئین در غلظت‌های مختلف سنگ معدن ضرورت ویژه‌ای دارد. با توجه به مطالب یادشده، تاکنون اقدام عملی درباره یافتن روش‌هایی انجام نشده است که موجب تسریع و افزایش بازده استخراج اورانیوم در غلظت‌های زیاد سنگ معدن می‌شوند. در مطالعه حاضر برای رسیدن به این هدف، بیان ژن یادشده در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم در شرایط جهش با استفاده از اشعه UV در غلظت‌های مختلف سنگ معدن بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

**کشت باکتری *Acidithiobacillus sp. FJ2*:** برای تهیه مایه تلقیح، ابتدا محیط کشت اختصاصی *Acidithiobacillus sp. FJ2* (محیط کشت 9K) تهیه شد که شامل ۳ گرم بر لیتر  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۵ گرم بر لیتر  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ، ۰/۵ گرم بر لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱ گرم بر لیتر  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۱ گرم بر لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  بود. پس از آماده‌سازی محیط کشت، اسیدیته آن با سولفوریک اسید ۱۰ نرمال و سود ۱۰ نرمال و دستگاه pH متر (Metrohm 827) روی ۲ تنظیم شد. سپس، به میزان ۱۰ درصد از باکتری به‌عنوان مایه تلقیح اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور همزن ۱۸۰ rpm انکوبه شد (۴ و ۵).

**جهش باکتری:** برای ایجاد جهش در باکتری مدنظر، باکتری در فاز لگاریتمی ( $1 \times 10^8$ ) سلول/میلی‌لیتر) برداشته و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شد. سپس، رسوب باکتری سه بار با آب اسیدی شسته و در نهایت، در محیط کشت فاقد منبع آهن حل شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر باکتری‌های آماده‌سازی شده در چهار پلیت ریخته و فاصله بین پلیت‌ها و منبع نور UV، ۳۰ سانتی‌متر تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت صفر، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ ثانیه در معرض نور UV با قدرت ۳۰ وات و طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار داده شدند. پس از جهش، برای حفظ تغییر ایجاد شده و بازسازی نشدن ژنوم باکتری، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۶). سپس نمونه‌ها در محیط کشت 9k و شرایط بهینه رشد، کشت و برای آزمایش‌های بیولیچینگ اورانیوم استفاده شدند.

**سازگار کردن باکتری *Acidithiobacillus sp. FJ2***

## جهش‌یافته و وحشی با غلظت‌های متفاوت پودر سنگ معدن اورانیوم:

برای بررسی اثر غلظت اورانیوم بر بیان ژن مدنظر، باکتری *Acidithiobacillus sp. FJ2* (V) جهش‌یافته و وحشی با درصدهای مختلف پودر سنگ معدن اورانیوم کشت داده شدند. به این منظور، از غلظت‌های متفاوت پودر سنگ اورانیوم برابر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد برای بررسی تأثیر روی بیان ژن باکتری‌ها استفاده شد. چهار ارلن محیط کشت 9K آماده و به آنها ۵ درصد پودر سنگ معدن اورانیوم و ۱۰ درصد از باکتری‌های جهش‌یافته و وحشی اضافه شد. سپس، نمونه‌ها در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و دور همزن ۱۵۰ rpm انکوبه شدند. زمانی که میزان استخراج اورانیوم نمونه‌ها به ۱۰۰ درصد رسید، از باکتری‌های سازگار شده با ۵ درصد پودر سنگ معدن اورانیوم به‌عنوان مایه تلقیح برای غلظت ۱۰ درصد و به همین ترتیب برای غلظت‌های بیشتر استفاده شد. در نمونه شاهد منفی مطالعه حاضر، به‌جای مایه تلقیح از مخلوط متانول-فرمالدهید به نسبت ۹:۱ استفاده شد. در مطالعه حاضر، از پودر سنگ اورانیوم آنومالی (II) ساغند، از توابع استان یزد (جدول ۱) با ابعاد سنگ  $d_{80} = 106 \mu\text{m}$  استفاده شد (۸).

سپس در توالی‌های ۲۴ ساعته، میزان ۱۰ میلی‌لیتر از لیچ‌لیکور (Leach liquor) برای بررسی میزان اسیدیته (pH)، فعالیت اکسیداسیون و احیای باکتری (Eh) و میزان اورانیوم محلول برداشته و این میزان با آب مقطر (pH=2) جبران و اسیدیته محیط روی ۲ تنظیم شد. زمانی که میزان استخراج اورانیوم در هر غلظت سنگ به ۱۰۰ درصد رسید، باکتری از محیط دارای غلظت سنگ کمتر به محیط حاوی غلظت سنگ بیشتر منتقل شد.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی سنگ آنومالی (II) با استفاده از آنالیز XRF

MgO (اکسید منیزیم)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (اکسید آلومینیوم)	SiO <sub>2</sub> (دی‌اکسید سیلیکون)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (اکسید آهن فریک)	U (اورانیوم)
19.03 wt %	1.49 wt %	24.83 wt %	49.67 wt %	465 ppm

برای یکسان‌بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با Dnase توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) خوانده و میزان معینی از RNA برای ساخت تمام cDNAها استفاده شد.

**سنتز cDNA:** در این مرحله از کیت تجاری شرکت Thermo Scientific (آمریکا) برای ساخت cDNA از RNAهای استخراج شده استفاده شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:** برای تأیید ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای ژن مدنظر انجام شد. میزان و غلظت مواد استفاده شده برای ۲۵ میکرولیتر واکنش PCR به این شرح است: ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵۷ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر پرایمر مستقیم، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، ۵۰ نانوگرم DNA الگو و آب عاری از نوکلئاز. تمام مواد مصرفی برای تهیه مخلوط واکنش تولید شرکت Bioflux ژاپن هستند.

برای انجام واکنش PCR و Real time PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن *cyc2* و بخشی از ژن *16S rRNA* باکتری *اسیدیتوباسیلوس* استفاده شد. ژن *16S rRNA* در مطالعه حاضر به‌عنوان شاهد داخلی در نظر گرفته شد، زیرا میزان بیان این ژن به‌عنوان ژن شاهد داخلی (Housekeeping Gene)، در شرایط مختلف یکسان است و به‌عنوان ژن استاندارد برای مقایسه با بیان سایر ژن‌ها استفاده می‌شود (۱۰). جدول ۲، ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده شده را نشان می‌دهد.

در این مرحله، محیط کشت 9K در حجم مشخصی تهیه و با ۱۰ درصد از باکتری‌های جمع‌آوری شده از غلظت سنگ کمتر توسط سانتریفیوژ با دور ۲۴۲۲×g=۴۵۰۰rpm در زمان ۳۰ دقیقه، تلقیح و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰rpm انکوبه شد. میزان اسیدیته، فعالیت اکسیداسیون و احیای باکتری و میزان اورانیوم محلول موجود در نمونه در توالی‌های ۲۴ ساعته اندازه‌گیری و اسیدیته محیط روی ۲ تنظیم شد (۹).

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** بررسی‌های مولکولی در پی سازگارسازی باکتری‌های جهش‌یافته و وحشی به غلظت بیشتری از باکتری نیاز دارند. بنابراین، زمانی که استخراج اورانیوم در هر غلظت سنگ به ۱۰۰ درصد رسید، باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۲۴۲۲×g=۴۵۰۰rpm در زمان ۳۰ دقیقه جمع‌آوری و برای مرحله استخراج RNA استفاده شد.

**استخراج RNA:** در مطالعه حاضر، برای استخراج RNA از کیت تجاری استخراج RNA شرکت Thermo Scientific (آمریکا) استفاده شد.

**حذف DNA زئومی از RNA استخراج شده:** برای حذف DNA از RNA استخراج شده، میزان ۶ میکرولیتر RNA با ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم DNase و ۱ میکرولیتر بافر 10X شرکت Thermo Scientific (آمریکا) که حاوی MgCl<sub>2</sub> است، مخلوط و سپس با آب مقطر عاری از Nuclease به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد (۱۰). محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و محلول حاصل برای مرحله بعد (ساخت cDNA) استفاده شد. پیش از انجام مرحله بعد،

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده‌شده

نام ژن	توالی (5'-3')
<i>cyc2</i> (F)	CCGCCAGAGTAGGTCAAATGC
<i>cyc2</i> (R)	AACTCTAATGCGGGTGCTTCTC
<i>16S rRNA</i> (F)	CCTACGGGAGGCAGCAGCGG
<i>16S rRNA</i> (R)	TGCTTCTTCTGGATTACG

F: آغازگر (پرایمر) مستقیم، R: آغازگر (پرایمر) معکوس

سه تایی ریخته شدند. برای اطمینان از نبود آلودگی و خطاهای حاصل از آن، سه شاهد منفی برای هر ژن در نظر گرفته شد که میزان الگوی مدنظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین شده بود. در نهایت، از چرخه حرارتی یادشده در جدول ۳ و برای محاسبه میزان تغییرات بیان ژن مدنظر از روش  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد (۱۱).

**تحلیل آماری:** تفاوت‌های بین داده‌ها با نرم‌افزار SPSS، Tukey و تحلیل واریانس ANOVA تعیین شدند. با استفاده از این نرم‌افزار، P-value داده‌ها محاسبه و  $P < 0.05$ ، تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۳- چرخه حرارتی واکنش Real-Time PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
۱	۹۵ °C	۳۰"	۱
۲	۹۵ °C	۱۵"	۴۰
	۶۰ °C	۲۰"	
	۷۲ °C	۲۰"	
۳	۹۵ °C	۱۵"	۱
	۶۰ °C	۶۰"	
	۹۵ °C	۱۵"	

### نتایج

**میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری جهش یافته و وحشی *Acidithiobacillus* sp. FJ2:** نتایج فرآیند بیولیچینگ اورانیوم در حضور چگالی پالپ‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم با استفاده از باکتری‌های جهش‌یافته و وحشی در جدول ۴ مشاهده می‌شوند. مطابق نتایج، باکتری‌های *Acidithiobacillus* sp. FJ2 جهش‌یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های ۵،

چرخه حرارتی برای باکتری بررسی شده با استفاده از جفت پرایمر طراحی شده عبارت است از: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه؛ چرخه تکثیر شامل ۳۵ چرخه تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه؛ نگهداری نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای تکمیل نهایی ساختار DNA تکثیرشده. در نهایت، محصول با روش ژل الکتروفورز تأیید شد.

### انجام واکنش Real time PCR: واکنش Real time

PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی و کیت مخصوص SYBER® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa، ژاپن) انجام شد. این کیت حاوی تمام مواد لازم برای انجام واکنش PCR (آنزیم Taq، بافر همراه با  $MgCl_2$  و dNTPs) و رنگ سایبرگرین (SYBR Green) است که به‌عنوان مستر میکس (Master mix) استفاده می‌شود. هر واکنش Real time PCR (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) حاوی ۵ میکرولیتر مستر میکس، ۰/۴ میکرولیتر پرایمرهای Forward و Reverse (جدول ۲)، ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ میکرولیتر رنگ ROX و ۳/۹ میکرولیتر آب عاری از Nuclease است. پس از مخلوط کردن مواد یادشده و برای اطمینان از درستی انجام واکنش، نمونه‌های حاوی ژن *cyc2* و نمونه حاوی ژن شاهد داخلی (*16S rRNA*) در پلیت‌ها به شکل

مطابق جدول ۴، هرچه میزان چگالی پالپ افزایش یابد، توانایی استخراج اورانیوم کاهش می‌یابد و زمان بیشتری برای استخراج کامل نیاز است ( $P < 0.05$ )؛ به طوری که، باکتری در حضور چگالی پالپ ۲۵ درصد و طی ۸ روز، اورانیوم را به طور کامل استخراج می‌کند ولی این اتفاق در چگالی پالپ ۵ درصد طی ۳/۵ روز رخ می‌دهد.

۱۰، ۱۵ و ۲۵ درصد سنگ معدن اورانیوم، اورانیوم را به طور کامل (۱۰۰ درصد) طی روزهای مختلف استخراج می‌کنند. به علاوه، نتایج نشان می‌دهند که باکتری جهش یافته با اشعه UV به مدت ۱۸۰ ثانیه، بیشترین استخراج اورانیوم را در چگالی پالپ ۵۰ درصد و در روز سیزدهم انجام می‌دهد که تأثیر مثبت جهش را روی عملکرد باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2 نشان می‌دهد.

جدول ۴- میزان استخراج اورانیوم در چگالی پالپ‌های مختلف با استفاده از باکتری‌های جهش یافته و وحشی

چگالی پالپ	5	10	15	25	50
روزهای استخراج اورانیوم - درصد استخراج اورانیوم					
(وحشی) Control	100%-3.5	100%-4	100%-3	100%-8	94.62%-13
(جهش یافته) UV60	100%-3.5	100%-3.5	100%-3	100%-8	92.47%-13
(جهش یافته) UV120	100%-3.5	100%-3.5	100%-10	100%-8	92.04%-13
(جهش یافته) UV180	100%-2	100%-3.5	100%-3	100%-11	96.34%-13

از علت‌های دیگری که میزان استخراج اورانیوم در چگالی پالپ‌های کم، نرخ زیادی دارد و سریع‌تر انجام می‌شود، این است که اکسیژن یکی از اساسی‌ترین مواد مغذی برای رشد باکتری‌هاست و با افزایش چگالی پالپ، میزان اکسیژن کاهش می‌یابد. در چگالی پالپ‌های کم، میزان انتقال جرمی اکسیژن بین تولید و مصرف آن متعادل است، در حالی که در چگالی پالپ‌های زیاد، نرخ اکسیژن لازم با میزان اکسیژن تولید شده طی فرآیند انتقال آن بین گاز و مایع کمتر است (۱۴ و ۱۵). با توجه به نتایج استخراج اورانیوم در مطالعه حاضر، روند استخراج با افزایش چگالی پالپ کاهش درخور توجهی دارد و همان‌گونه که بیان شد، جهش روی فرآیند استخراج اورانیوم اثرگذار است. یکی از مطالعه‌های بینگبو و همکاران

پژوهش‌های مختلفی نشان داده‌اند که عوامل متعددی بر سرعت و کیفیت فرآیند فرسایشی (بیولیچینگ) فلزها تأثیر می‌گذارند. برخی از این عوامل با توجه به محدوده عملکرد بهینه خود، باعث مهار یا بهبود بیولیچینگ می‌شوند و مواردی نظیر چگالی پالپ و اندازه ذره‌ها به فلز درگیر در فرآیند بیولیچینگ مربوط هستند و روی فعالیت باکتری تأثیر می‌گذارند (۱۲). عناصر سنگین روی رشد ریزموجودات اثر مهاری شدیدی دارند و برای ریزموجودات مرگ‌آور هستند. این فلزها شامل توریوم (Th)، اورانیوم (U)، جیوه (Hg) و نقره (Ag) هستند که متابولیت‌های سلول را مهار می‌کنند و اثر سمی روی باکتری‌ها دارند (۱۲). میزان مقاومت به فلزهای سنگین در هر گونه، به سویه باکتری بستگی دارد (۱۳).

یادشده، آهن نقش بسیار کلیدی در فرایند بیولیچینگ اورانیوم بازی می‌کند و نسبت میزان آهن فرو به آهن فریک در افزایش پتانسیل اکسیداسیون و احیا بسیار مؤثر است و نقش مهمی دارد. گفتنی است که میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیای مشاهده شده در نمونه شاهد منفی، به اکسیداسیون جزئی آهن فرو (ناشی از تماس با اکسیژن موجود در هوا) مربوط است (۱۷).

آهن فریک و سولفوریک اسید برای استحصال اورانیوم طی فرآیند بیولیچینگ ضروری هستند. آهن فریک، عامل اکسیدکننده مؤثر اورانیوم چهارظرفیتی است و اگر در شرایط اسیدی به سنگ معدن اضافه شود، اورانیوم را به شکل محلول یا شش ظرفیتی تبدیل می‌کند. غلظت آهن فریک طی اکسیداسیون اورانیوم کاهش می‌یابد و توسط باکتری‌های اکسیدکننده آهن و اسیددوست مانند باکتری *Acidithiobacillus* دوباره تولید می‌شود، هرچند این بازیابی به علت تشکیل رسوب ژاروسیت به کندی انجام می‌شود. بسیاری از سنگ معدن‌هایی که دارای اورانیوم هستند، پیریت نیز دارند (۱۸). در بیولیچینگ اورانیوم، باکتری‌ها مستقیم به سنگ معدن اورانیوم حمله نمی‌کنند، بلکه این ریزموجودات پیریت و آهن فرو را اکسید می‌کنند و باعث تولید آهن فریک (واکنش ۱) می‌شوند. سپس، آهن فریک به راحتی به اورانیومی (IV) حمله می‌کند که به شکل ترکیب با مواد معدنی است (واکنش ۲) و آن را به اورانیوم (VI) محلول در سولفوریک اسید رقیق تبدیل می‌کند (۱۹).

نشان می‌دهد که پرتو UV به جهش مشهودی در باکتری *Acidithiobacillus* منجر می‌شود و فعالیت زیستی و قابلیت بیولیچینگ آن را افزایش می‌دهد (۱۶) که تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر است.

### میزان تغییرات Eh در حضور چگالی پالپ‌های

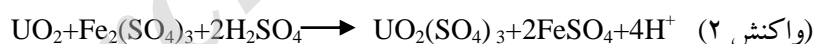
**مختلف و باکتری‌های جهش یافته و وحشی:** مطابق جدول ۵، میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا در تمام نمونه‌ها با گذشت زمان افزایش معناداری داشته است ( $P < 0.05$ ). این نتایج کاملاً مشابه نتایج پژوهش‌های Ahmadi در سال ۲۰۱۲ هستند که روند فعالیت باکتری و فرآیند بیولیچینگ را نشان می‌دهند؛ در نمونه‌ای که ۱۸۰ ثانیه UV به آن تابیده شده و در حضور چگالی پالپ ۵ درصد، پتانسیل اکسیداسیون و احیا پس از چهار روز از ۳۶۹ میلی‌ولت به ۵۹۰ میلی‌ولت افزایش یافته است ( $P < 0.05$ )، در حالی که پتانسیل اکسیداسیون و احیای باکتری وحشی در همین زمان فقط به ۵۶۷ میلی‌ولت رسیده است. در تمام نمونه‌ها، کمترین میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا در نمونه شاهد منفی فاقد باکتری مشاهده شد.

مهم‌ترین عامل استخراج اورانیوم در بیولیچینگ، یون فریک حاصل از اکسیداسیون یون فرو توسط باکتری است. بنابراین، افزایش فعالیت اکسیداسیون و احیا نقش تعیین‌کننده‌ای در استخراج اورانیوم دارد و یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های باکتری در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم، فرآیند اکسیداسیون آهن و تبدیل آهن فرو به آهن فریک است. آهن فریک تولیدشده در این مرحله، عامل اصلی اکسیدکننده کانی‌های سولفیدی است (۱۵). با توجه به مطالب



جدول ۵- میزان تغییرات پتانسیل اکسیداسیون و احیا (Eh) در چگالی پالپ‌های مختلف در حضور باکتری جهش‌یافته و وحشی که واحد آن میلی‌ولت است.

%۱۰								%۵								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها
					۳۷۱	۳۶۹	۲۹۴						۳۷۸	۳۲۲	۲۹۹	Negative
					۵۶۳	۵۶۸	۳۵۰						۵۶۷	۵۶۳	۳۶۰	Control
					۵۶۶	۵۷۴	۳۵۴						۵۰۳	۵۵۴	۳۲۹	UV60
					۵۷۰	۵۶۹	۳۵۲						۵۷۳	۵۶۴	۳۵۵	UV120
					۵۵۶	۵۶۰	۳۳۹						۵۹۰	۵۷۴	۳۶۹	UV180
%۲۵								%۱۵								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها
	۳۸۴	۳۸۹	۳۸۵	۳۸۰	۳۸۰	۳۵۲	۳۰۴			۳۸۹	۳۹۱	۳۷۶	۳۶۹	۳۰۹	۲۰۶	Negative
	۴۹۷	۵۵۶	۵۷۴	۴۲۵	۴۱۴	۳۸۲	۳۶۴						۵۵۴	۵۵۵	۳۴۰	Control
	۶۲۰	۶۱۴	۵۸۴	۵۴۵	۴۱۶	۳۷۸	۳۵۵						۵۵۲	۵۵۵	۳۴۰	UV60
	۵۸۸	۵۷۰	۵۷۶	۴۴۴	۴۱۵	۳۸۱	۳۴۴			۶۰۷	۵۶۴	۳۸۶	۳۷۶	۳۵۳	۳۳۰	UV120
	۵۵۶	۵۴۹	۵۷۰	۴۳۵	۴۱۵	۳۸۷	۳۵۹						۵۴۲	۵۴۴	۳۶۱	UV180
%۵۰								%۱۰								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها
																Negative
	۳۹۶	۳۸۹	۳۸۶	۳۸۸	۳۸۱	۳۴۵	۳۳۱									Control
	۴۸۹	۵۶۶	۵۱۴	۴۱۴	۴۰۲	۳۷۵	۲۶۹									UV60
	۵۵۰	۵۷۸	۵۳۷	۵۴۹	۳۹۵	۳۵۷	۲۸۷									UV120
	۵۱۴	۵۵۲	۵۱۸	۴۵۴	۳۹۵	۳۲۶	۲۸۵									UV180
	۵۲۰	۵۵۶	۵۱۱	۴۰۳	۳۹۷	۳۵۸	۲۸۷									



پالپ افزایش یابد، فعالیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد (۲) و بنابراین، تأخیر در افزایش فعالیت اکسیداسیون و احیا در چگالی پالپ‌های زیاد توضیح داده می‌شود. Yingbo و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که سرعت اکسیداسیون آهن فرو در باکتری جهش‌یافته ۱۸ ساعت کمتر از زمان مربوط به باکتری وحشی در شرایط بیولیچینگ مشابه است و اثبات کردند که پس از گذشت ۳۰ روز، استخراج مس توسط باکتری جهش‌یافته در مقایسه با باکتری وحشی، ۱۷ درصد افزایش یافته است. به‌طور کلی نتایج آزمایش‌های آنها

آهن فریک از اکسیداسیون پیریت تولید می‌شود که بیشتر همراه سنگ معدن اورانیوم است و یا طی بیولیچینگ اضافه می‌شود. آهن فریک در اسیدیته اسیدی محلول است و به‌عنوان اکسیدکننده قوی سبب اکسیدشدن بیشتر کانی‌ها می‌شود. در محلول اسیدی فاقد باکتری، مقدار آهن فرو ثابت می‌ماند و سرعت بیولیچینگ غیرمستقیم که به واسطه آهن فریک انجام می‌شود، آهسته است. پژوهشگران اظهار داشتند که در فرآیند بیولیچینگ، چگالی پالپ تأثیر بسیار زیادی بر فعالیت باکتری‌ها دارد، به این شکل که هرچه چگالی

اکسیداسیونی آهن و سولفور توسط باکتری است. گفتنی است که افزایش اولیه اسیدیته به علت واکنش‌های شیمیایی مصرف کننده اسید است (۲۰). Meruane و Vargas (۲۰۰۳)، پژوهش مشابهی درباره تغییرات اسیدیته در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم با استفاده از باکتری *Acidithiobacillus* انجام دادند و به نتایج کاملاً مشابهی با نتایج پژوهش حاضر رسیدند که تأییدی بر درستی انجام این آزمایش‌هاست. مطابق جدول ۶، کمترین میزان اسیدیته در چگالی پالپ ۵۰ درصد در نمونه‌ای که ۱۸۰ ثانیه به آن UV تابیده شد و در روز دهم با توجه به بیشترین فعالیت باکتری و در نتیجه تولید سولفوریک اسید بیشتر مشاهده شد.

نشان دادند که آثار باکتری جهش یافته پس از پرتوتابی UV بهتر از باکتری‌های وحشی و همچنین بسیار بهتر از لیچینگ شیمیایی هستند (۱۶) که تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر است.

#### میزان تغییرات اسیدیته در حضور چگالی پالپ‌های

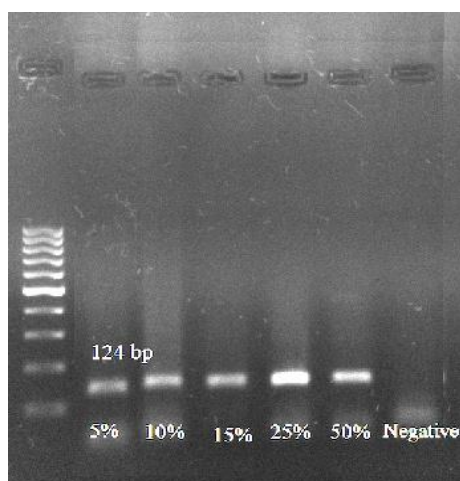
مختلف در باکتری جهش یافته و وحشی: جدول ۶، تغییرات اسیدیته را در باکتری‌های جهش یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهند که در همه نمونه‌ها بجز نمونه شاهد منفی، میزان اسیدیته در روزهای ابتدایی روند افزایشی و پس از آن، روند کاهشی داشته است ( $P < 0.05$ ) که بیشتر به دلیل فعالیت

جدول ۶- میزان تغییرات اسیدیته (pH) در چگالی پالپ‌های مختلف در حضور باکتری جهش یافته و وحشی

%۱۰								%۵								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها
					۲/۰۳	۲/۳	۲						۲	۲/۰۶	۲	Negative
					۱/۸۸	۱/۷۶	۲						۱/۹۴	۱/۸۴	۲	Control
					۱/۸۶	۱/۷۹	۲						۱/۸۶	۱/۷۷	۲	UV60
					۱/۸۶	۱/۸۲	۲						۱/۹۲	۱/۷۹	۲	UV120
					۱/۸۳	۱/۷۵	۲						۱/۹۴	۱/۸۲	۲	UV180
%۲۵								%۱۵								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها
	۲/۰۱	۲/۰۱	۲/۰۱	۲	۲/۰۶	۲/۵۶	۲			۲/۰۱	۲/۰۱	۲/۱۹	۲/۱۶	۲/۶۶	۲	Negative
	۱/۹۳	۱/۹۲	۱/۹۵	۲/۰۳	۲/۱	۲/۶۱	۲						۱/۹	۱/۷۲	۲	Control
	۱/۸۹	۱/۹	۱/۹۵	۱/۷۹	۲/۱	۲/۵۹	۲						۱/۹۳	۱/۸۱	۲	UV60
	۱/۹۵	۱/۹۴	۱/۹۹	۲/۰۷	۲/۰۹	۲/۶۶	۲		۱/۸۴	۱/۶۸	۲/۲	۲/۰۱	۲/۴۷	۲	UV120	
	۱/۹۷	۱/۹۶	۱/۸۹	۲/۰۸	۲/۱۲	۲/۶۱	۲						۱/۹۲	۱/۷۶	۲	UV180
%۵۰								%۵								چگالی پالپ
۱۳	۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۰	روزها								
	۲/۱۱	۲/۱۲	۲	۲/۰۸	۲/۰۲	۲/۴۲	۲/۵۶	۲	Negative							
	۱/۷۲	۲/۰۶	۱/۸۸	۲/۰۳	۲/۱۳	۲/۳۹	۳/۰۲	۲	Control							
	۱/۹۵	۲/۰۸	۱/۷۸	۱/۸۵	۲/۱۲	۲/۴	۳/۰۲	۲	UV60							
	۲	۲/۰۴	۱/۷۷	۱/۹۴	۲/۱۲	۲/۶۹	۳/۰۹	۲	UV120							
	۲/۰۳	۲/۰۳	۱/۷۲	۱/۹۹	۲/۱۱	۲/۳۵	۲/۹۶	۲	UV180							

تأثیر گذار بر رشد باکتری و اکسیداسیون آهن فرو است

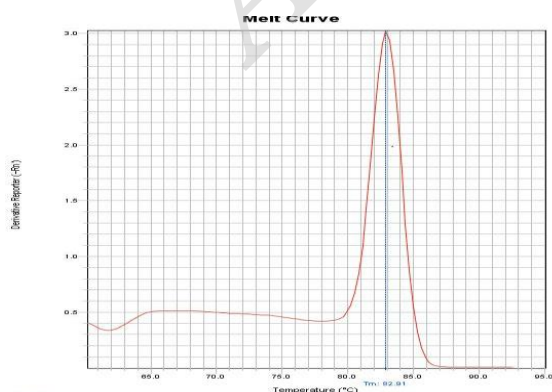
در کشت باکتری، اسیدیته یکی از عوامل مهم و



شکل ۱- نمونه‌ای از بارگذاری محصولات واکنش PCR از cDNAهای ساخته‌شده در باکتری وحشی از هر چگالی پالپ (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد) با استفاده از پرایمر ژن *cyc2* برای اطمینان از درستی استخراج RNA و ساخت cDNA

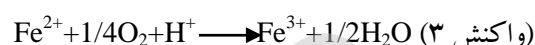
#### بررسی بیان ژن *cyc2* در باکتری *Acidithiobacillus*

sp. FJ2 جهش‌یافته و وحشی در حضور چگالی پالپ‌های مختلف سنگ اورانیوم: پس از انجام هر واکنش PCR Real-Time و برای اطمینان از تکثیر نشدن غیر اختصاصی، منحنی ذوب با دستگاه رسم و ثبت شد. منحنی دارای تک قله در  $T_m$  اختصاصی و مربوط به هر ژن، تکثیر کاملاً اختصاصی همان ژن را نشان داد و تمام نمونه‌ها، پس از انجام هر واکنش از نظر منحنی ذوب بررسی شدند. شکل ۲، نمونه‌ای از منحنی ذوب ژن‌های مدنظر است.



شکل ۲- منحنی ذوب استخراج‌شده از واکنش Real-Time PCR ژن *cyc2*

(۲۱). مطابق تغییرات اسیدیته در بخش نتایج، در حضور چگالی پالپ‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم، اسیدیته محیط در روزهای ابتدایی روند افزایشی و با گذشت زمان، روند کاهشی نشان می‌دهد. در مطالعه‌های پیشین نشان داده شده است که در مراحل اولیه بیولیچینگ، اکسیداسیون آهن فرو، مهم‌ترین واکنشی است که باکتری در آن دخیل است (واکنش ۳).



این واکنش، مصرف‌کننده  $\text{H}^+$  است و از این رو، باعث افزایش اسیدیته محیط در مراحل اولیه می‌شود. به بیان دیگر، افزایش اسیدیته در حضور باکتری *Acidithiobacillus* درگیر واکنش‌هایی است که مصرف‌کننده اسید هستند. با پیشرفت زمان بیولیچینگ،  $\text{Fe}^{2+}$  به  $\text{Fe}^{3+}$  اکسیده و باعث تشکیل شدن  $\text{H}^+$  و کاهش تدریجی اسیدیته محیط در مراحل بعدی بیولیچینگ می‌شود (۲۱ و ۲۲).

**نتایج واکنش PCR:** برای اطمینان از درستی روند استخراج RNA و رونوشت‌برداری معکوس (ساخت cDNA)، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *cyc2* و *16S rRNA* انجام شد و محصولات آن روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. واکنش PCR برای تمام cDNAهای ساخته‌شده از هر چگالی پالپ انجام شد و نتایج آن در شکل ۱ دیده می‌شوند. با توجه به شکل ۱، روند استخراج RNA و ساخت cDNA در هر چگالی پالپ به درستی انجام شده و هیچ بانده غیر اختصاصی مشاهده نشده که نشانه عملکرد دقیق پرایمرها است.

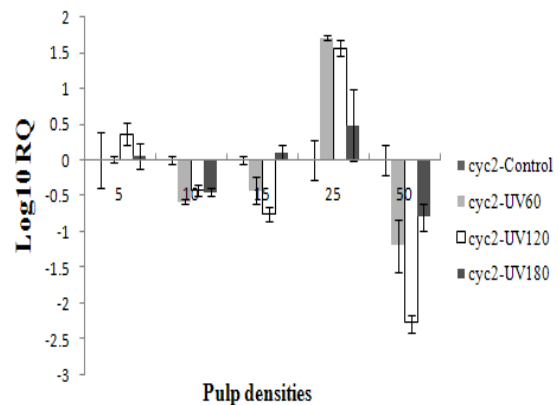
فرو را انجام می‌دهد (۲۳). تصور می‌شود که این پروتئین، یک سوپر کمپلکس تنفسی تشکیل می‌دهد که غشاهای داخلی و خارجی را فرا می‌گیرد و الکترون‌ها را از آهن (یا پیریت) به اکسیژن منتقل می‌کند (۳ و ۲۴). بر اساس مطالعه‌های ژنتیکی و متابولیکی مشخص شده است که الکترون‌های حاصل از اکسایش آهن فرو از راه *cyc2* به راستی‌سیانین (Rusticyanin) منتقل می‌شوند و از آنجا، برخی مسیر سرازیری (Downhill) الکترون را از راه سیتوکروم *cycI* به سیتوکروم اکسیداز  $aa_3$  و برخی نیز مسیر سربالایی (Uphill) الکترون را طی می‌کنند؛ در این مسیر، دهنده عمومی الکترون (NADH) توسط جریان معکوس الکترون از طریق سیتوکروم *cydA1* (نخستین گیرنده سربالایی) به کمپلکس  $bc_1$  و سپس به منبع یوبی‌کینون و در نهایت NAD دهیدروژناز تولید می‌شود (۱).

از سوی دیگر، افزایش بیان این ژن در حضور سنگ معدن اورانیوم، سازوکاری برای تولید NADH از طریق انتقال الکترون از Fe(II) به NAD(P) است که باکتری را قادر به مواجهه با عوامل تنش‌زای اکسیداتیو می‌کند، زیرا NADH برای مبارزه با عوامل تنش‌یافته مانند اورانیوم ضروری است (۲۵).

Duncan و Bruynesteyn مشاهده کردند که فعالیت اسیدیتوبیواسیلوس فرواکسیدانس در معادن اورانیوم در غلظت ۱۲ گرم بر لیتر اورانیوم ( $U_3O_8$ ) است، در حالی که Ebner و Schwartz مقدار اورانیوم را ۰/۷۵ کیلوگرم بر متر مکعب گزارش کرده‌اند. Kelly و Tuovinen اظهار داشتند که سمیت اورانیوم باعث ضعیف شدن پیوند بین سطوح و سلول‌ها و در نتیجه باعث کاهش  $CO_2$  و اکسیداسیون یون فرو

شکل ۳، بیان ژن *cyc2* باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2 را در حضور غلظت‌های مختلف سنگ معدن اورانیوم نشان می‌دهد. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهند، بیشترین میزان بیان ژن در چگالی پالپ ۲۵ درصد و کمترین میزان بیان ژن در چگالی پالپ ۵۰ درصد مشاهده شده است ( $P < 0.05$ ).

نتایج بیان این ژن نشان می‌دهند که در فرآیندهای ابتدایی بیولیچینگ که با درصد سنگ کمتری آغاز می‌شوند، باکتری، سعی در تطبیق خود با محیط دارد و بیان ژن لازم برای اکسیداسیون آهن زیاد می‌شود و با افزایش چگالی پالپ، افزایش بیشتری مشاهده می‌شود. با پیشرفت فرآیند و افزایش بیشتر سنگ اورانیوم در محیط، بیان ژن‌های دخیل در اکسیداسیون آهن بر اثر مواجه شدن با عوامل تنشی بیشتر از حد آستانه تحمل باکتری، روند کاهشی نشان می‌دهد که این تغییرات کاهشی در نتایج استخراج اورانیوم مشهود هستند.



شکل ۳- میزان بیان ژن *cyc2* در حضور چگالی پالپ‌های مختلف و باکتری جهش‌یافته و وحشی.

RQ: تعیین مقدار نسبی (Relative Quantification)

طی فرایند اکسیداسیون آهن، *cyc2*، الکترون‌ها را مستقیم از آهن فرو می‌پذیرد و با جایگاهی که در غشای خارجی دارد، نخستین مرحله اکسیداسیون آهن

- (3) Castelle C., Guiral M., Malarte G., Ledgham F., Levoy G., Brugna M. A new Fe-oxidizing/O<sub>2</sub>-reducing super complex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of biochemistry* 2008; 283(38): 25803-25811.
- (4) Chen P., Yan L., Wang Q., Li Y., Li H. Surface alteration of realgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International microbiology* 2012; 15: 9-15.
- (5) Zhang Y., Qin W., Wang J., Zhen S., Yang C., Zhang J., et al. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2008; 18: 1491-1496.
- (6) Yuan X., Xie X., Fan F., Zhu W., Liu N., Liu J. Effects of mutation on a new strain *Leptospirillum ferriphilum* YXW and bioleaching of gold ore. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2013; 23: 2751-2758.
- (7) Jahani S., Fatemi F., Firoz-e-zare MA., Zolfaghari MR. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain FJS from Ramsar, Iran. *Electronic Journal of Biology* 2015; 11(4): 138-146.
- (8) Russian federation ministry of atomic energy. Report of processing technology developed for uranium ores from Saghand deposit Islamic Republic of Iran. 1996.
- (9) Abhilash S., Mehta KD., Kumar V., Pandey BD., Pandey VM. Dissolution of uranium from silicate-apatite ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 2009; 95: 70-75.
- (10) Huizhou Q., Hong C., Jingqun A., Hongbo Z., Xinhua C. Identification of differentially expressed genes in *Sulfobacillus* sp. TPY grown on either elemental sulphur or Fe<sup>2+</sup>. *J. Gen. Appl. Microbiol* 2012; 56: 389-397.
- (11) Yarzabal A., appia C. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* 2004; 150: 2113-2123.

می‌شود؛ همچنین، بیان کردند که غلظت‌های اورانیوم زیاد  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  مول بر دسی‌متر مکعب برای اسیدی‌تیوباسیلوس فرواکسیدانس سمی هستند (۲۶). نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهند که سمیت اورانیوم بر فعالیت این باکتری آثار منفی دارد و جهش باعث بهبود روند فرآیند بیولیچینگ اورانیوم می‌شود.

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند که جهش و چگالی پالپ اورانیوم، دو عامل مؤثر بر تغییرات بیان ژن *cyc2* هستند. همچنین، ایجاد جهش در باکتری مدنظر، تأثیر مثبتی بر فرآیند بیولیچینگ اورانیوم و نقش مهمی در فرآیند بیولیچینگ غلظت‌های زیاد سنگ معدن اورانیوم دارد. از سوی دیگر، با افزایش چگالی پالپ به علت سمیت اورانیوم، روند کاهشی در فرآیند استخراج اورانیوم مشاهده می‌شود که حاکی از نقش مهم این عامل در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم است و با افزایش میزان غلظت سنگ، سرعت استخراج اورانیوم و فعالیت اکسیداسیونی باکتری کاهش می‌یابد و باکتری برای استخراج کامل اورانیوم به مدت زمان بیشتری نیاز دارد.

### References

- (1) Valdes J., Pedroso I., Quatrini R., Holmes DS. Comparative genome analysis of *acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 2008; 94: 180-184.
- (2) Xin B., Jiang W., Li X., Zhang K., Liu C., Wang R., Wang Y. Analysis of reasons for decline of bioleaching efficiency of spent Zn-MN batteries at high pulp densities and exploration measure for improving performance. *Bioresource Technology* 2012; 112: 186-192.

- (12) Brandl H. Microbial leaching of metals. *Wiley-VCH* 2008; 8.
- (13) Sand W., Gehrke T., Hallmann R., Schippers A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism-critical evaluation of bacterial leaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1995; 43: 961-966.
- (14) Moon-Sung C., Kyung-Suk C., Dong-Su K., Hee-Wook R. Bioleaching of uranium from low grade black schists by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2005; 21: 377-380.
- (15) Boon M., Heijnen JJ. Gas-liquid mass transfer phenomena in biooxidation experiments of sulphide minerals: a review of literature data. *Hydrometallurgy* 1998; 48: 187-204.
- (16) Yingbo D., Hai L., Han W., Xiaolan M., Kaibin F., Hongwei W. Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. *Minerals engineering* 2011; 24: 870-875.
- (17) Ahmadi A. Influence of Ferric and Ferrous Iron on Chemical and Bacterial Leaching of Copper Flotation Concentrates. *International Journal of Nonferrous Metallurgy* 2012; 1: 42-48.
- (18) Keith-Roach MJ., Livens FR. *Interactions of microorganisms with radionuclides*. 1st ed. Elsevier Science ; 2002.
- (19) Sapsford DJ., Bowell RJ., Geroni JN., Penman KM., Dey M. Factors influencing the release rate of uranium, thorium, yttrium and rare earth elements from a low grade ore. *Minerals engineering* 2012; 39: 165-172.
- (20) Sandstorm A., Petersson S. Bioleaching of a complex sulphide ore with moderate thermophilic and extreme thermophilic microorganism. *Hydrometallurgy* 1997; 46(1-2): 181-190.
- (21) Meruane G., Vargas T. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0. *Hydrometallurgy* 2003; 71(1-2): 149-158.
- (22) Dong Y., Lin H., Wang H., Mo X., Fu K., Wen H. Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. *Minerals Engineering* 2011; 24: 870-875.
- (23) Yarzabal A., Brasseur G., Ratouchniak j., lund k., lemesle-meunier d. The high-molecular-weight cytochrome c *Cyc2* of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology* 2002; 184: 313-317.
- (24) Appia-Ayme C., Guiliani N., Ratouchniak J., Bonnefoy V. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa3-type cytochrome oxidase and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4781–4787.
- (25) Dekker L., Arsene-Ploetze F., Santini JM. Comparative proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in the presence and absence of uranium. *Research in Microbiology* 2016; 167: 234-239.
- (26) Rossi G. Biohydrometallurgy. Hamburg: *McGraw-Hill*; 1990.