

Evaluating the Expression of Iron and Sulfur Oxidation Genes related to *Sulfobacillus Thermosulfidooxidans* Strains under the Influence of Effective Parameters in the Bioleaching Process

Koorosh Poormahmoodian,

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran, kooroshpmn@gmail.com

Farokh Rokhbakhsh-Zamin*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran, rokhbakhsh@gmail.com

Ahmad Moghooeinejad

Research and Development Unit, Copper Complex, Sarcheshmeh, Iran, moghooeinejad_ah@nicico.com

Mohammad Hashemabadi

Department of Genetic, Faculty of Sciences, Tarbiat modares University, Tehran, Iran, mohammadhashemabadi@gmail.com

Abstract

Introduction: Sulfate adenylyltransferase catalyzes adenosine phosphosulfate (APS) to generate ATP and sulfate, which is the final stage of the sulfite oxidation to obtain energy, and 4Fe₄S ferredoxin as an enzyme member of the electron transfer chain plays an important role in the oxidation of ferrous iron in the bioleaching system. Efforts to optimize bacterial growth conditions will also increase the gene expression, which will be accompanied by an increase in the efficiency of the microbial leaching system. Accordingly, the present study aimed to investigate the gene expression related to the proteins in *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* along with the application of changing factors in the culture medium.

Materials and methods: For culture, different concentrations of chalcopyrite, yeast extract, and ferrous iron ion were added to a 9K medium. Bacteria were purified and bacterial RNA extraction and cDNA synthesis were performed. To investigate the expression level of the genes under study, the Real-time PCR reaction was performed and the results were analyzed by the 2^{-ΔΔCT} method. The results were also analyzed by Tukey and Duncan tests using SPSS version 21 with the P-value of <0.05.

Results: Using the results of the PCR, the genes in question were identified and primers were confirmed. The highest percentage of copper extraction in the four test environments was in the No. 2 environment with 48.75% in which the 4Fe₄S ferredoxin gene had the highest expression than the other test environments. The highest expression of the *Sulfate adenylyltransferase* gene was related to the medium No. 4 in which the percentage of copper extraction was 39.16%.

Discussion and conclusion: The composition of the bacterial culture medium can change the expression of genes and the percentage of copper extraction. The most suitable test medium was obtained for the extraction of copper in a 10-micron size, the presence of 1.5 g/L ferrous ion, and the absence of yeast extract.

Keywords: Sulfate Adenylyltransferas, 4Fe₄S Ferredoxin, *Sulfobacillus Thermosulfidooxidans*, Bioleaching.

* Corresponding author

Received: December 3, 2019/ **Accepted:** May 20, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال نهم، شماره ۳۵، پاییز ۱۳۹۹، صفحه ۱۷-۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱

Doi: 10.22108/BJM.2020.120297.1246

ارزیابی بیان ژن‌های اکسیدکننده آهن و گوگرد در باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس تحت تأثیر شاخص‌های مؤثر در فرایند آبشویه میکروبی

کوروش پورمحمودیان: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، kooroshpmn@gmail.com

فرخ رخ‌بخش زمین*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، rokhbakhsh@gmail.com

احمد مغوئی‌نژاد: کارشناس ارشد امور تحقیق و توسعه، شرکت ملی صنایع مس، سرچشمه، ایران، moghooeinejad_ah@nicico.com

محمد هاشم‌آبادی: کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، mohammadhashemabadi@gmail.com

چکیده

مقدمه: تأثیر آنزیم سولفات‌آدنیلیل‌ترانسفراز بر آدنوزین‌مونوفسفات سبب تولید ترکیبات سولفات و ATP می‌شود که مرحله نهایی اکسیداسیون سولفیت برای کسب انرژی است. در سیستم آبشویه میکروبی، آنزیم 4Fe-4S فردو کسین (عضو زنجیره انتقال الکترون) نقش مهمی را در اکسیداسیون آهن فرو ایفا می‌کند. تلاش به منظور بهینه‌کردن شرایط رشد باکتری، افزایش بیان ژن‌ها را در پی خواهد داشت که با افزایش بازده سیستم آبشویه میکروبی همراه می‌شود؛ بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن‌های مربوط به این پروتئین‌ها در باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس همراه با اعمال تغییر در عوامل تأثیرگذار در محیط کشت استفاده‌شده در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها: کشت باکتری‌ها در محیط پایه 9K با غلظت‌های متفاوتی از کنسانتره کالکوپیریتی، یون آهن فرو و عصاره مخمر انجام شد. پس از رشد باکتری‌ها و تخلیص آنها، استخراج RNA باکتری و ساخت cDNA انجام شد. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های یادشده، واکنش Real Time PCR انجام و تجزیه و تحلیل نتایج به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد. نتایج با آزمون‌های توکی و دانکن و با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) در سطح $P < 0.05$ بررسی شدند.

نتایج: با توجه به نتایج PCR، ژن‌های مدنظر شناسایی و آغازگرها تأیید شدند. بین چهار محیط آزمایش‌شده، بیشترین درصد استخراج مس به محیط شماره ۲ با میزان ۴۸/۷۵ درصد مربوط بود که در آن، ژن 4Fe-4S فردو کسین بیشترین بیان را نسبت به دیگر محیط‌های آزمایش داشت. بیشترین بیان ژن سولفات‌آدنیلیل‌ترانسفراز به محیط شماره ۴ مربوط بود که درصد استخراج مس در آن ۳۹/۱۶ درصد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیبات محیط کشت باکتری بیان ژن‌ها و درصد استخراج مس را تغییر دادند و مناسب‌ترین حالت محیط آزمایش برای استخراج مس در اندازه ذرات ۱۰ میکرون، حضور ۱/۵ گرم برلیتر یون آهن فرو و حضور نداشتن عصاره مخمر به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: سولفات‌آدنیلیل‌ترانسفراز، 4Fe-4S فردو کسین، سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس، آبشویه میکروبی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2020, 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

توسعه زیست‌فناوری به شکل فناوری سازگار با محیط‌زیست، پژوهش‌ها در صنایع معدنی را به سوی استحصال فلزات از منابع معدنی سوق داده است (۱ و ۲). آبشویه میکروبی، فناوری ساده‌ای با کارایی مؤثر برای استخراج فلزات از کان‌سنگ‌های کم‌عیار و کنسانتره‌های معدنی محسوب می‌شود (۳). ریزموجودات به کاررفته در فرایند آبشویه میکروبی بر حسب مقاومت حرارتی به سه دسته مزوفیل، ترموفیل معتدل و ترموفیل مطلق تقسیم‌بندی می‌شوند که دامنه دمای کاربردی باکتری‌های مزوفیل ۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، باکتری‌های ترموفیل معتدل ۴۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ترموفیل مطلق ۶۰ تا ۸۵ درجه سانتی‌گراد است (۴-۶). کالکوپیریت مهم‌ترین کانی سولفیدی مس موجود در جهان است؛ با وجود این، مشکل عمده فرایند آبشویه میکروبی کنسانتره کالکوپیریتی مس با کاربرد باکتری‌های مزوفیل، سرعت کم واکنش انحلال و بازیابی کم مس است (۷ و ۸). استفاده از باکتری‌های ترموفیل دارای تحمل دمای بیشتر، ظرفیت تحمل‌پذیری بیشتر به فلز و دارای ویژگی‌های متابولیکی مناسب‌تر، دستیابی به نتایج قابل قبول را محتمل می‌کند (۹ و ۱۰). سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس^۱ باکتری ترموفیل معتدل گرم مثبت، هوازی و اسپوردار است که اسیدیته مناسب برای رشد آن ۱/۶ تا ۲/۴ است و در دمای ۴۵ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد فعال است (۱۱ و ۱۲). تاکنون اقدامات وسیعی در سراسر جهان در زمینه تغییرات ژنومی و مهندسی ژنتیک باکتری‌های مختلف انجام شده‌اند و نتایج مثبتی را به همراه داشته‌اند. در پژوهش‌های اخیر نیز توجه ویژه‌ای به باکتری‌های اسیددوست شده است و شرایط بهینه فعالیت و

ویژگی‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی آنها در حد مطلوبی تعیین شده‌اند (۱۳ و ۱۴)؛ بر این اساس، مشخص شده است ژن‌های کلیدی مختلفی مانند ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز^۲ و ژن $4Fe-4S$ فردوکسین^۳ در باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس با اکسیداسیون گوگرد و آهن طی سیستم آبشویه میکروبی فعال مرتبط هستند (۱۵). آنزیم سولفات آدنیلیل ترانسفراز، آدنوزین فسفوسولفات (APS) را برای تولید ATP و سولفات کاتالیز می‌کند که مرحله نهایی اکسیداسیون سولفید برای به دست آوردن انرژی است (۱۶-۱۸). فردوکسین‌ها، پروتئین‌های کوچک، اسیدی و انتقال‌دهنده الکترون هستند که در سیستم‌های احیای زیستی حضور دارند (۱۹). پروتئین $4Fe-4S$ فردوکسین عضو زنجیره انتقال الکترون است و نقش مهمی در اکسیداسیون آهن فرو در سیستم آبشویه میکروبی بازی می‌کند (۱۵). عوامل متعددی بر فرایند آبشویه میکروبی فلزات تأثیر می‌گذارند که عبارتند از: اسیدیته، دما، دور همزن، فلزات سنگین، یون آهن، چگالی پالپ، مواد معدنی و ترکیبات آلی، نوع کان‌سنگ، محیط کشت، سویه باکتری، دی‌اکسید کربن، اکسیژن، اندازه ذرات، پتانسیل اکسیداسیون و احیا (۲۰). عصاره مخمر یکی از منابع اصلی رشد باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس است و افزودن عصاره مخمر، افزایش میزان اکسیداسیون گوگرد و اکسیداسیون یون آهن فرو را در پی دارد (۱۱ و ۲۱). آهن در سطح زمین فراوان است و از این رو، اهمیت زیادی در چرخه طبیعی دارد و نقشی کلیدی در فرایندهای آبشویه میکروبی و اکسیداسیون زیستی^۴ ایفا می‌کند و روی رشد باکتری، بازدهی اکسایش و تشکیل رسوب تأثیر می‌گذارد (۲۲). در مطالعه حاضر، تأثیر

ساخته شده به علاوه باکتری یادشده در هر ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری وجود داشت. ارلن حاوی محیط کشت و باکتری به انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۵ دور در دقیقه انتقال یافت تا رشد انجام شود. پس از رشد باکتری، سازگار کردن انجام شد؛ به این ترتیب که ۳۰ میلی‌لیتر از کشت اولیه باکتری یادشده (درصد تلقیح ۱۵ درصد) به ۱۷۰ میلی‌لیتر محیط پایه 9k به علاوه کنسانتره کالکوپیریتی افزوده شد. پس از رشد باکتری در چگالی پالپ کمتر، انتقال به محیط جدید با چگالی پالپ بیشتر انجام شد تا در نهایت، باکتری با چگالی پالپ ۵ درصد سازگار شد. در همه مراحل سازگار کردن از انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۵ دور در دقیقه استفاده شد.

طراحی و تهیه چهار محیط رشد و کشت نهایی

باکتری: به منظور انجام پژوهش، چهار محیط آزمایش طبق شاخص‌های جدول ۱ طراحی شدند که محیط اول برای شاهد انتخاب شد؛ به این ترتیب که عصاره مخمر و یون آهن فرو را نداشت. باکتری‌های تکثیر شده در چگالی پالپ ۵ درصد با درصد تلقیح ۱۵ درصد به ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شدند؛ به طوری که در نهایت، ۲۰۰ میلی‌لیتر از ترکیب محیط کشت و باکتری در هر ارلن وجود داشت. ارلن‌ها به انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۵ دور در دقیقه منتقل شدند تا رشد انجام شود.

عوامل مختلف از جمله حضور یون آهن فرو و عصاره مخمر در محیط کشت روی بیان ژن‌های اکسیدکننده آهن و گوگرد در باکتری *سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس* بررسی شد تا با افزایش دادن بیان ژن‌های یادشده همراه با فعالیت بیشتر باکتری‌ها، هدف افزایش بازده آبشویه میکروبی تأمین شود.

مواد و روش‌ها

بررسی کنسانتره کالکوپیریتی: کنسانتره کالکوپیریتی

لازم از آزمایشگاه بیوهیدرومتالورژی مجتمع مس سرچشمه دریافت و پس از خرد کردن، اندازه ۸۰ درصد نمونه‌های عبوری برابر ۱۰ میکرون شد. بررسی شیمیایی کنسانتره کالکوپیریتی با تجزیه و تحلیل XRF و کانی‌شناسی آن به کمک میکروسکوپ با نور پلاریزه تعیین شد.

کشت باکتری: به منظور کشت باکتری

سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس که از معدن مجتمع مس سرچشمه جدا شد، از محیط پایه 9k شامل ۳ گرم برلیتر سولفات آمونیوم، ۰/۵ گرم برلیتر سولفات منیزیم، ۰/۶۳ گرم برلیتر فسفات دی‌پتاسیم، ۰/۱ گرم برلیتر کلرید پتاسیم و ۰/۰۱۴ گرم برلیتر نترات کلسیم استفاده شد (۲۳).

به منظور کشت اولیه باکتری، ۵۰ گرم برلیتر سولفات آهن و ۵ گرم برلیتر سولفور استریل به محیط پایه 9k اضافه شد؛ به طوری که ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت

جدول ۱- چهار آزمایش طراحی شده با مقدار متفاوتی از ترکیبات استفاده شده

غلظت یون آهن فرو (گرم برلیتر)	عصاره مخمر (درصد)	اندازه ذرات (میکرون)	چگالی پالپ (درصد)	شماره آزمایش
۰	۰	۱۰	۵	۱
۱/۵	۰	۱۰	۵	۲
۰	۰/۰۴	۱۰	۵	۳

۴	۵	۱۰	۰/۰۴	۱/۵
---	---	----	------	-----

واکنش Real Time PCR، مقدار ۱ میکروگرم از هر RNA طبق دستور کار کیت (پارس توس) به cDNA تبدیل شد (۱۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: واکنش PCR برای کنترل کیفیت cDNA و تأیید اتصال آغازگرها انجام شد؛ به این ترتیب که ۱ میکرولیتر از هر یک از cDNA های سنتز شده همراه با آب و آغازگرهای مخصوص هر ژن که با استفاده از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast طراحی شدند و شرکت متابیون آلمان آنها را سنتز کرد (جدول ۲)، طبق دستور کار مستر میکس 2x PCRBIO Taq Mix (Red) (PCRBIO SYSTEMS انگلیس) آماده و سپس واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad، آمریکا) و طبق برنامه دمایی جدول ۳ انجام شد. تجزیه و تحلیل محصول PCR به کمک ژل الکتروفورز با آگارز ۲ درصد انجام شد. ژل آگارز با استفاده از تصویرساز ژل داک (Uvidoc، انگلیس) مشاهده شد.

ارزیابی و بررسی شرایط بهینه محیط‌های کشت: Eh و اسیدیته به ترتیب با Eh متر و pH متر اندازه‌گیری شدند و شمارش باکتری‌ها با میکروسکوپ نوری انجام شد (۲۴).

استخراج RNA باکتری: به منظور استخراج RNA باکتری، ابتدا کنسانتره با کاغذ واتمن درجه C از محلول جداسازی شد؛ سپس رسوب‌گیری باکتری‌ها در هریک از چهار محیط انجام و در نهایت، RNA با استفاده از کیت اختصاصی آن (BioBasic کانادا) استخراج شد (۱۳).

تجزیه و تحلیل کیفی و کمی RNA استخراج شده: ژل الکتروفورز با آگارز ۱ درصد برای بررسی کیفیت و تأیید RNA های استخراج شده استفاده شد و به منظور یکسان بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با DNase (سینازن) با دستگاه نانودراپ خواننده و برای ساخت cDNA هریک از نمونه‌ها، مقدار ۱ میکروگرم از RNA استفاده شد (۱۵).

ساخت cDNA: به منظور تبدیل RNA های استخراج شده از سلول به DNA و ساخت الگو برای انجام

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده

نام ژن	توالی (3-5)
<i>Sulfate adenylyltransferas</i> (F) <i>Sulfate adenylyltransferas</i> (R)	CCAAATTGCCACAGGAGCTT AGATGCAAATGACGAGCGAC
<i>4Fe-4S ferredoxin</i> (F) <i>4Fe-4S ferredoxin</i> (R)	GCCAAGACACCAAAGACCAG AAGCGGCGTTAATCTCGATG
<i>16S rRNA</i> (F) <i>16S rRNA</i> (R)	CCTACGGGAGGCAGCAGCGG TGCTTCTTGGATTACAG

جدول ۳- برنامه زمانی واکنش PCR

چرخه	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	توضیحات
۱	۷ دقیقه	۹۵	دنا توره شدن (جدا شدن دو رشته)
۴۲	۱۰ ثانیه	۹۵	دنا توره شدن
۴۲	۳۰ ثانیه	۵۶	اتصال (چسبیدن آغازگرها)
۴۲	۲۰ ثانیه	۷۲	طولیل شدن

طویل شدن	۷۲	۵ دقیقه	۱
----------	----	---------	---

نهایی مس، میزان بازیابی محاسبه شد.

نتایج

نتایج تجزیه و تحلیل کنسانتره کالکوپیریتی: نتایج

تجزیه و تحلیل شیمیایی و کانی‌شناسی کنسانتره کالکوپیریتی در جدول‌های ۴ و ۵ دیده می‌شوند.

نتایج اندازه‌گیری Eh و اسیدیته مرحله سازگار کردن باکتری‌ها با چگالی پالپ‌های مختلف: اطلاعات مربوط به اندازه‌گیری Eh نمونه‌ها در شکل ۱ و نتایج اندازه‌گیری اسیدیته آنها در شکل ۲ دیده می‌شوند.

جدول ۴- تجزیه و تحلیل شیمیایی کنسانتره کالکوپیریتی استفاده شده

درصد وزنی	نوع ماده
۲۳/۸۰	Cu
۰/۲۶	CuO
۲۹/۶۶	Fe
۲/۱۰	Al ₂ O ₃
۶/۱۲	SiO ₂
۰/۳۵	CaO
۳۳/۵۵	S

جدول ۵- تجزیه و تحلیل کانی‌شناسی کنسانتره کالکوپیریتی استفاده شده

درصد وزنی	ترکیب	نوع مینرال
۱/۱۹۵	Cu ₂ S	کالکوسیت
۲/۰۷۲	CuS	کولیت
۵۶/۸۰۰	CuFeS ₂	کالکوپیریت
۰	Cu-N	مس طبیعی
۲/۴۴۰	Cu ₃ FeS ₄	بورنیت
۲۶/۴۸۷	FeS ₂	پیریت
۰/۲۸۴	MoS ₂	مولیبدنیت
۰	FeOOH	لیمونیت
۰/۵۸۲	ZnS	اسفالریت
۰	Fe ₂ O ₃	هماتیت

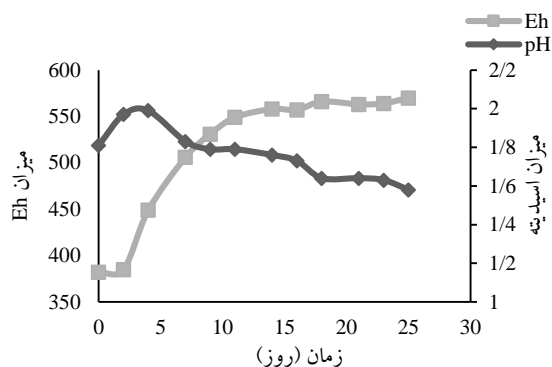
انجام Real Time PCR و واکنش

طبق دستور کار مسترمیکس 2x qPCR BIO SyGreen Mix (PCR BIOSYSTEMS، انگلیس) که حاوی رنگ سایبرگرین بود، انجام شد. هر واکنش Real Time PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس 2X، ۰/۸ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱ میکرولیتر cDNA و ۷/۴ میکرولیتر آب و عاری از نوکلئاز بود. این فرایند برای سنجش بیان هر دو ژن در هر سه نمونه آزمایش شده و نمونه شاهد انجام شد؛ علاوه بر این در همه نمونه‌ها، ژن *16S rRNA* باکتری که توالی آغازگر آن از مقاله (۱۳) الگوبرداری شد و شرکت متابیون آلمان آن را سنتز کرد (جدول ۲)، شاهد داخلی در نظر گرفته شد. به منظور اطمینان از درستی واکنش، دو تکرار برای هر آزمایش در نظر گرفته شد و برای اطمینان از نبود آلودگی و خطاهای حاصل از آن، سه شاهد منفی برای هر ژن منظور شد که در آنها، میزان الگوی مدنظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین شد. در نهایت به منظور تکثیر ژن‌ها با توجه به دمای اتصال آغازگر بهینه شده، برنامه دمایی جدول ۳ به دستگاه Real Time PCR (Roche مدل LightCycler96، آلمان) داده شد (۱۳). روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای محاسبه میزان تغییرات بیان ژن مدنظر استفاده شد. داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون‌های Duncan و Tukey و با نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱) بررسی شدند و $P < 0.05$ تفاوت معنادار در نظر گرفته شد (۱۳).

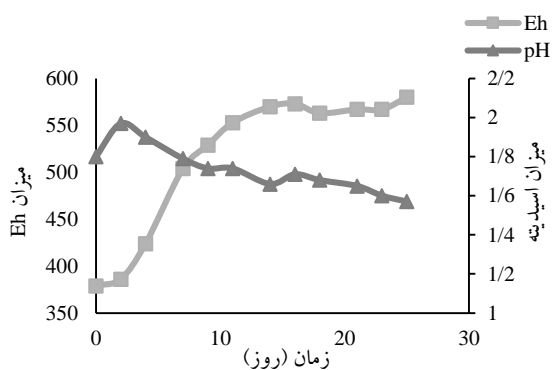
بررسی میزان بازیابی مس: بر اساس نتایج

تجزیه و تحلیل شیمیایی، میزان مس اولیه در کنسانتره کالکوپیریتی بررسی شده به دست آمد و با توجه به مقدار

آهن فرو سبب شد افزایش نمایی Eh بیشتر انجام شود. اندازه‌گیری Eh و اسیدیته محیط‌های آزمایش ۳ و ۴ نشان داد به علت حضور عصاره مخمر در این محیط‌ها، افزایش نمایی Eh از ابتدا انجام و زودتر به فاز سکون وارد می‌شود (شکل‌های ۵ و ۶)؛ البته حضور یون آهن فرو در محیط آزمایش ۴ سبب شد افزایش نمایی Eh بیشتر انجام شود. در روزهای پایانی آزمایش، نوساناتی در Eh‌ها مشاهده شد.

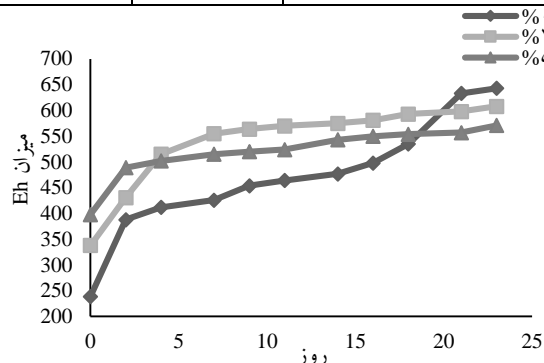


شکل ۳- نمودار میزان تغییرات Eh و اسیدیته محیط آزمایش ۱

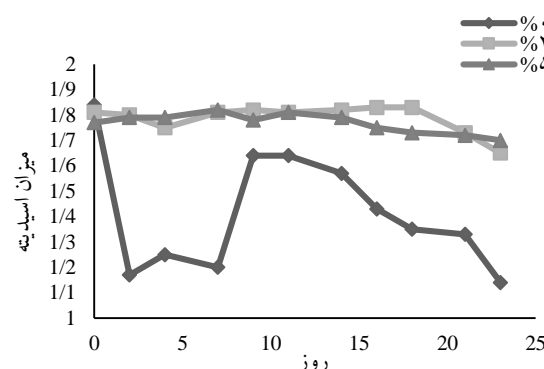


شکل ۴- نمودار میزان تغییرات Eh و اسیدیته محیط آزمایش ۲

مگنتیت	Fe ₃ O ₄	•
جمع کل مینرال‌های غیرفلزی	-	۹/۶۸۴
جمع کل مینرال‌های اکسیدی	-	۰/۴۵۶

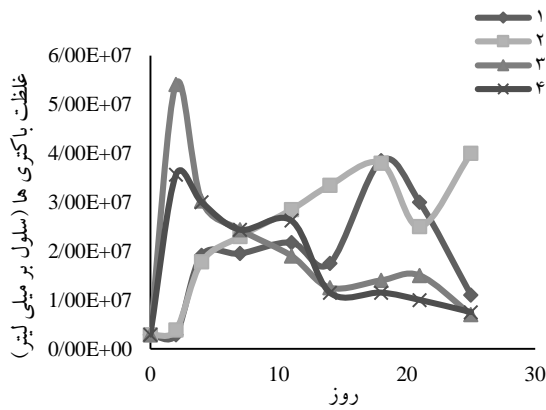


شکل ۱- میزان تغییرات Eh محیط کشت‌های دارای چگالی پالپ‌های مختلف کنسانتره کالکوپیریتی

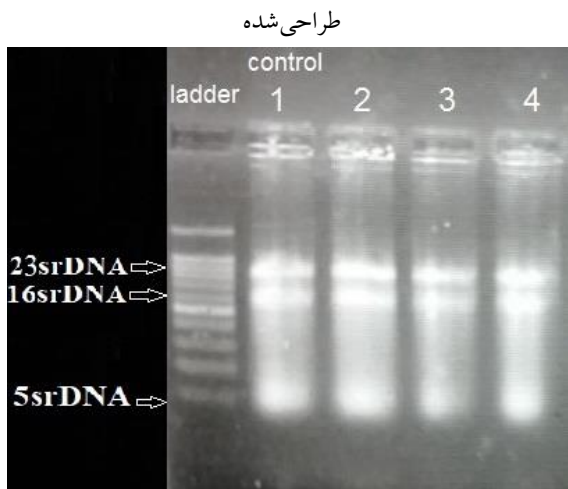


شکل ۲- میزان تغییرات اسیدیته محیط کشت‌های دارای چگالی پالپ‌های مختلف کنسانتره کالکوپیریتی

نتایج اندازه‌گیری Eh و اسیدیته هر یک از محیط‌های آزمایش: پس از سازگار شدن باکتری‌ها با چگالی پالپ ۵ درصد، کشت نهایی باکتری‌ها طبق ترکیبات جدول ۳ در چهار محیط آزمایش انجام شد. اندازه‌گیری Eh و اسیدیته محیط‌های آزمایش ۱ و ۲ نشان داد در این محیط‌ها، ابتدا اسیدیته افزایش می‌یابد و Eh تقریباً ثابت است؛ اما با رشد باکتری‌ها، اسیدیته کاهش و Eh افزایش می‌یابد تا به فاز سکون برسد (شکل‌های ۳ و ۴)؛ در محیط آزمایش ۲، حضور یون



شکل ۷- مقایسه رشد باکتری‌ها در چهار محیط آزمایش



شکل ۸- باندهای RNAهای استخراج‌شده حاصل از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد

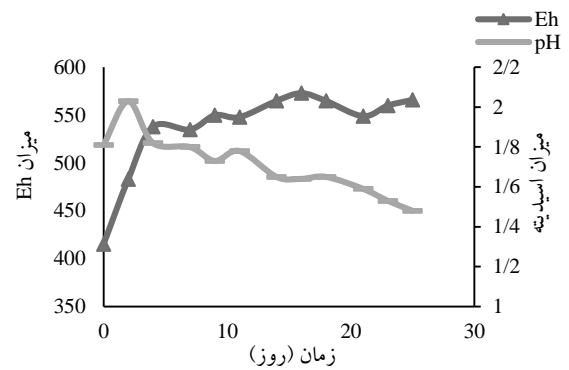
جدول ۶- بررسی کمی و غلظت RNAها با نانودراپ

شماره نمونه RNA	میکرولیتر/نانوگرم
۱	۱۴۱/۶
۲	۲۶۷/۵
۳	۲۶۱/۴
۴	۲۶۶/۴

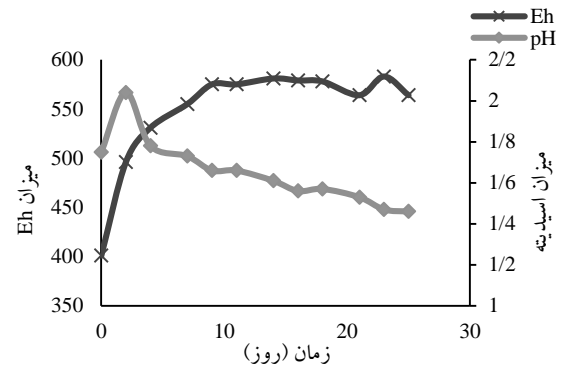
جدول ۷- بررسی RNAها برای وجود آلودگی‌های الکی و

پروتئینی

شماره نمونه RNA	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰
۱	۱/۹۵	۱/۸۶
۲	۱/۸۶	۱/۸۰



شکل ۵- نمودار میزان تغییرات Eh و اسیدیته محیط آزمایش ۳



شکل ۶- نمودار میزان تغییرات Eh و اسیدیته محیط آزمایش ۴

نتایج شمارش باکتری‌ها: شمارش باکتری‌ها طی ۲۶

روز انجام شد و نتایج چهار محیط آزمایش در شکل ۷ دیده می‌شوند که تغییر تعداد باکتری‌ها طی گذر زمان را بیان می‌کنند.

تعیین کیفیت RNAها با استفاده از ژل الکتروفورز:

باندهای 23S، 16S و 5S RNAهای استخراج‌شده از باکتری‌ها در محیط کشت‌های متفاوت در شکل ۸ دیده می‌شوند.

تجزیه و تحلیل کمی RNAها: کمیت RNAهای

حاصل و وجود آلودگی‌های الکی و پروتئینی موجود در نمونه‌ها با نانودراپ تجزیه و تحلیل شد و نتایج در جدول‌های ۶ و ۷ دیده می‌شوند.

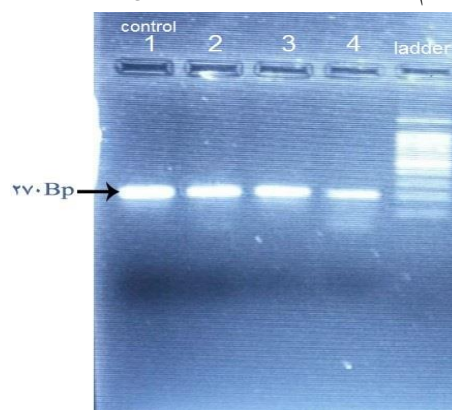
شکل ۱۰- باند حاصل از انجام PCR برای ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز روی ژل آگارز ۲ درصد

انجام واکنش Real Time PCR و تجزیه و تحلیل بیان

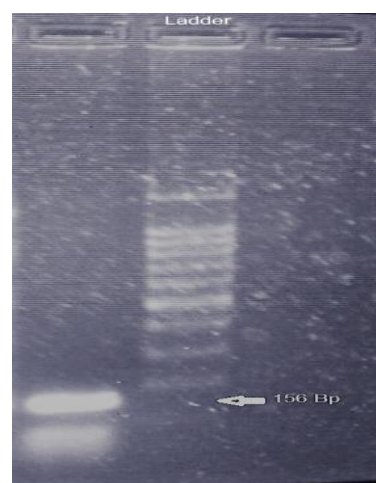
ژن‌ها: نتایج و منحنی تکثیر ژن‌های سولفات آدنیلیل ترانسفراز و *4Fe-4S* فردوکسین با استفاده از Real Time PCR نشان دادند تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب انجام شده است (شکل‌های ۱۱ و ۱۲). تغییرات بیان ژن‌های سولفات آدنیلیل ترانسفراز و *4Fe-4S* فردوکسین برای باکتری‌های هریک از سه محیط کشت نسبت به شاهد طی واکنش Real Time PCR بررسی و نتایج آن به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شدند. نتایج تغییرات بیان ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز نشان دادند افزایش بیان این ژن در محیط ۴ نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشینه است (این محیط شامل ۰/۰۴ درصد عصاره مخمر و ۱/۵ گرم برلیتر یون آهن فرو علاوه بر محیط پایه 9k به علاوه کنسانتره بود) (شکل ۱۳). تغییرات یادشده برای ژن *4Fe-4S* فردوکسین در محیط کشت ۲ بیشینه بود (این محیط شامل ۱/۵ گرم برلیتر یون آهن فرو علاوه بر محیط پایه 9k به علاوه کنسانتره و بدون عصاره مخمر بود) (شکل ۱۴).

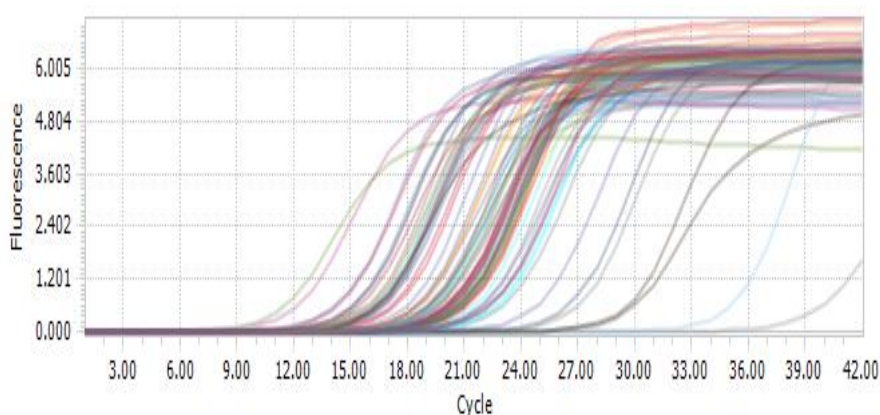
۳	۱/۸۹	۱/۸۱
۴	۱/۹۱	۱/۹۰

ژل الکتروفورز محصولات PCR: تجزیه و تحلیل محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد به منظور تعیین کیفیت آغازگرها و مشخص کردن نقطه اتصال آنها برای ژن *4Fe-4S* فردوکسین و ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز به ترتیب در شکل‌های ۹ و ۱۰ دیده می‌شود. کیفیت مناسب cDNAهای استخراج شده برای انجام Real Time PCR در شکل ۹ نمایان است.

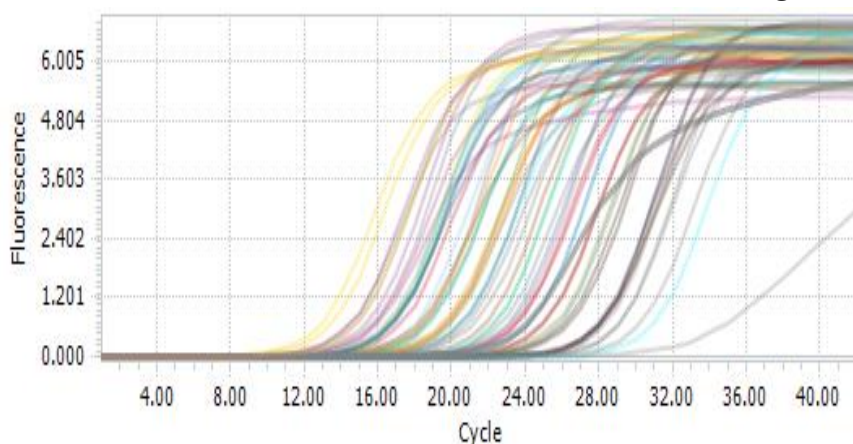


شکل ۹- باند حاصل از انجام PCR برای ژن *4Fe-4S* فردوکسین روی ژل آگارز ۲ درصد

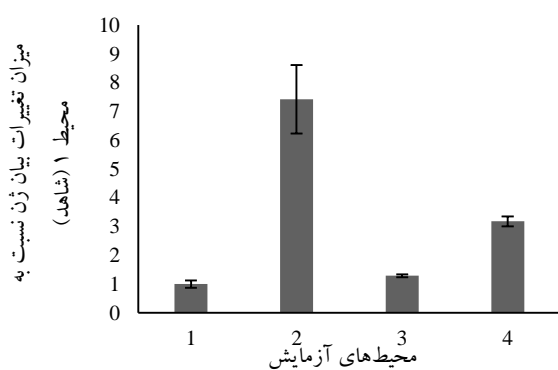




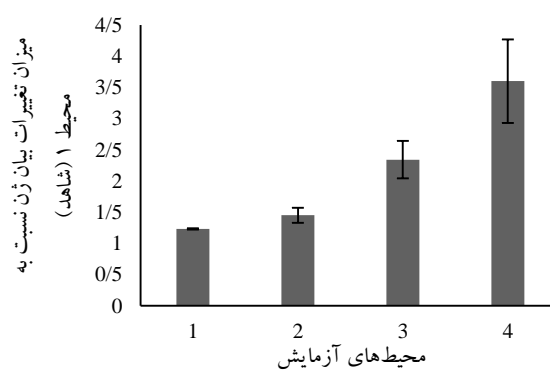
شکل ۱۱- منحنی تکثیر ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز؛ طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر چرخه را به شکل منحنی تکثیر نشان می‌دهد؛ به طوری که هر چه میزان محصول تولیدشده بیشتر شود، تعداد رنگ متصل بین دو رشته DNA بیشتر و در نتیجه، میزان نور فلورسنت ساطع شده بیشتر می‌شود.



شکل ۱۲- منحنی تکثیر ژن $4Fe-4S$ فردوکسین



شکل ۱۴- میانگین تغییر بیان ژن $4Fe-4S$ فردوکسین با $P < 0.05$ در سه محیط آزمایش نسبت به شاهد (بیشترین تغییر بیان ژن به محیط ۲ مربوط است)

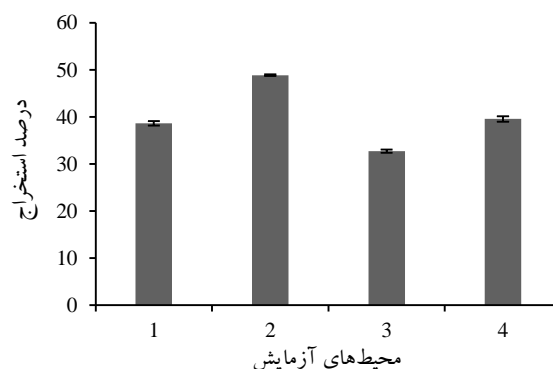


شکل ۱۳- میانگین تغییر بیان ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز با $P < 0.05$ در سه محیط آزمایش نسبت به شاهد (بیشترین تغییر بیان ژن به محیط ۴ مربوط است)

استخراج مس در محیط‌های آزمایش طراحی شده محاسبه شد. نتایج نشان دادند بیان دو ژن یادشده در چهار محیط آزمایش طراحی شده (باتوجه به اینکه ترکیبات محیط‌ها متفاوت بود)، تغییر می‌کند؛ به طوری که با افزایش یک یا هر دو ژن، درصد استخراج مس در همه محیط‌ها افزایش می‌یابد.

ساکارومایسس سرویزیه، مخمری است که در طبیعت یافت می‌شود و به علت داشتن ژنتیک و فیزیولوژی منحصر به فرد، کاربردهای وسیعی دارد. عصاره مخمر یادشده محرک بسیار قوی برای رشد باکتری‌ها است و تا حدی ویتامین، نیتروژن، آمینواسیدها و کربن را برای باکتری در محیط فراهم می‌کند (۲۵)؛ البته عصاره مخمر به شکل محلول رقیق سبب کم شدن اثر مسموم‌کنندگی املاح فلزی موجود در محیط پرورش باکتری می‌شود (۲۶). در پژوهش حاضر، حضور عصاره مخمر سبب افزایش بیان دو ژن و در نتیجه، افزایش درصد استخراج مس شد، اما بهترین نتیجه به حضور یون آهن فرو بدون حضور عصاره مخمر مربوط بود. طبق پژوهش Azmayandeh و همکاران، یون‌های آهن فرو نقش منبع انرژی را برای سلول‌های باکتری ایفا می‌کنند. حضور یون‌های فرو بر پتانسیل محلول لیچینگ تأثیر می‌گذارد؛ به طوری که سبب افزایش استخراج مس از کالکوپیریت می‌شود (۲۷). در پژوهش حاضر، محیطی که به آن آهن فرو اضافه شد، بهترین بیان یکی از دو ژن سولفات آدنیل ترانسفراز و $4Fe-4S$ فردوکسین را داشت و درصد استخراج مس نسبت به دیگر محیط‌ها بیشتر بود. حضور هم‌زمان یون آهن فرو و عصاره مخمر در محیط سبب افزایش بیان دو ژن و درصد استخراج مس شد؛ به طوری که نتایج گویای تأثیر بیشتر

میزان بازیابی مس: نتایج نشان دادند بیشترین میزان بازیابی مس به محیط ۲ با ۴۸/۷۵ درصد مربوط است؛ این محیط شامل ۱/۵ گرم برلیتر یون آهن فرو علاوه بر محیط پایه 9k و کنسانتره بود (شکل ۱۵).



شکل ۱۵- درصد استخراج مس در چهار محیط آزمایش طراحی شده (بیشترین بازیابی مس به محیط آزمایش ۲ مربوط است)

بحث و نتیجه‌گیری

طبق پژوهش‌های ژو^۵ و همکاران، دو ژن سولفات آدنیل ترانسفراز و $4Fe-4S$ فردوکسین با اکسیداسیون آهن و گوگرد طی سیستم آبشویه میکروبی مرتبط هستند (۱۵). در این پروژه، شناسایی دو ژن باتوجه به Blast آنها در ژنوم باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس و همچنین باتوجه به تکثیر شدن دو ژن در PCR و بررسی محصول PCR با ژل الکتروفورز انجام و میزان بیان آنها تحت تأثیر عوامل مؤثر در فرایند آبشویه میکروبی از جمله حضور داشتن و حضور نداشتن آهن فرو و عصاره مخمر در محیط کشت باکتری یادشده تعیین شد. نتایج نشان دادند حضور هر دو عامل یادشده در چگالی پالپ ۵ درصد و اندازه ذرات ۱۰ میکرون برای افزایش بیان ژن‌های بررسی شده مؤثر است. درصد

سپاسگزاری

نویسندگان از سرکار خانم فاطمه حسین‌زاده پاریزی (کارشناس ارشد میکروبیولوژی مس سرچشمه) که در جدا کردن باکتری استفاده شده در پژوهش حاضر ایفای نقش کردند، سپاسگزاری می‌کنند؛ در ضمن، از پرسنل محترم شرکت ملی صنایع مس سرچشمه و مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان تقدیر می‌شود.

References

- (1) Dreisinger DB., Copper WC., Young SK. Silver-catalyzed bioleaching of low-grade copper ores. Part 1: Shake flasks tests. *Hydrometallurgy* 2007; 88: 3-18.
- (2) Devasia P., Natarajan KA. Bacterial leaching: Biotechnology in the mining industry. *Science Education* 2004; 9(8): 27-34.
- (3) Johnson DR. The microbiology of biomining development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 2007; 153(2): 315-324.
- (4) Ziegler S., Dolch K., Geiger K., Krause S., Asskamp M., Eusterhues K., et al. Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *The ISME Journal* 2013; 7(9): 1725-1737.
- (5) Blazquez ML., Alvarez A., Ballester A., Gonzalez F., Munoz JA. Bioleaching Behaviour of Chalcopyrite in the Presence of Silver at 350 and 680C. *Biohydrometallurgy and Environment, Part A*. 1999; 9: 127-137.
- (6) Pradhan N., Nathsarma KC., Srinivasa Rao K., Sukla LB., Mishra BK. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering* 2008; 21: 355-365.
- (7) Petersen J., Dixon DG. Thermophilic heap leaching of a chalcopyrite concentrate.

این حالت نسبت به حضور عصاره مخمر به تنهایی در محیط بود، ولی بهترین بازیابی مس زمانی به دست آمد که یون آهن فرو به تنهایی در محیط حضور داشت. در محیط آزمایش ۱ که بدون یون آهن فرو و عصاره مخمر بود، میزان بیان دو ژن بررسی شده کمتر از محیط‌های دیگر بود، ولی میزان بازیابی مس تفاوت اندکی با سایر محیط‌ها داشت و حتی میزان آن نسبت به محیط آزمایش ۳ که حاوی عصاره مخمر بود، بیشتر بود که گویای وجود و تأثیر ژن‌های دیگری علاوه بر ژن‌های بررسی شده در فرایند بیولیچینگ از طریق سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس است؛ این ژن‌ها کمتر به وجود عصاره مخمر وابسته هستند، ولی یون آهن فرو روی آنها مؤثر است؛ زیرا نتایج نشان دادند بیان ژن‌ها و بازیابی مس در محیط‌هایی بیشتر است که یون آهن فرو دارند؛ در نتیجه با افزایش یون آهن فرو و عصاره مخمر در چگالی پالپ ۵ درصد و اندازه ذرات ۱۰ میکرون به محیط کشت باکتری سولفوباسیلوس ترموسولفیدواکسیدانس، می‌توان بیان دو ژن سولفات آدنیلیل ترانسفراز و $4Fe-4S$ فردوکسین را افزایش داد که نتیجه آن، افزایش درصد استخراج مس در فرایند آبخویه میکروبی است. بیشترین درصد استخراج مس در پژوهش حاضر به محیط شماره ۲ با $48/75$ درصد مربوط بود که در این محیط، $1/5$ گرم بر لیتر یون آهن فرو حضور داشت و عصاره مخمر وجود نداشت. گفتنی است ضمن تأمین شدن تمام اهداف پژوهش، شناسایی و بررسی میزان بیان ژن‌های یادشده زمینه را برای انجام پژوهش‌های بعدی نظیر کلون کردن فراهم کرد تا باکتری دارای کارایی بیشتر برای فرایند آبخویه میکروبی تهیه شود.

- et al. *Sulfobacillus thermotolerans* sp nov a thermotolerant chemolithotrophic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; 56(5): 1039-1042.
- (12) Tabrizi Mosafa R. Identification and purification of moderate thermophilic bacteria isolated from Sarcheshmeh copper mine in broth media [Dissertation]. Kerman: Islamic Azad University; 2017.
- (13) Fatemi F., Sheydaie M., Haji Hosseini R. Evaluation the effect of uranium ore concentrations on the *cyc2* gene expression in the mutated *Acidithiobacillus* sp. FJ2. *Biological Journal of Microorganism* 2018; 26: 21-41.
- (14) 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.
- (15) Zhou D., Peng T., Zhou H., Liu X., Gu G., Chen M., et al. Expression of Critical Sulfur- and Iron-Oxidation Genes and the Community Dynamics During Bioleaching of Chalcopyrite Concentrate by Moderate Thermophiles. *Springer* 2015; 71: 62-69.
- (16) Bick JA., Dennis JJ., Zylstra GJ., Nowack J. Identification of a new class of 50-adenosulfate (APS) reductase from sulfate-assimilating bacterial. *Journal of Bacteriology* 2000; 182: 135-142.
- (17) Leustek T., Martin MN., Bick JA., Davies JP. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Biology* 2000; 51: 141-165.
- (18) Saito K. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology* 2004; 136: 2443-2450.
- (19) Zeng J., Huang X., Liu Y., Liu J., Qiu G. Expression, purification, and characterization of a [Fe₂S₂] cluster containing ferredoxin from *Acidithiobacillus* *Minerals Engineering* 2002; 15: 777-785.
- (8) Rawlings DE., Dew D., Du-Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *TRENDS in Biotechnology* 2003; 21(1): 38-44.
- (9) Dixon DG., Petersen J. Thermophilic heap leaching of a chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering* 2002; 15: 777-785.
- (10) Nemati M., Harrison STL. Effect of solid loading on thermophilic bioleaching of sulfide minerals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2000; 75(7): 526-532.
- (11) Tat'yana IB., Tsaplina IA., Kondrat'eva TF., Duda VI., Suzina NE., Melamud VS., *ferrooxidans*. *Current Microbiology* 2007; 55: 518-523.
- (20) Chen D., Lin J., Che Y., Liu X., Lin J. Construction of recombinant mercury resistant *Acidithiobacillus caldus*. *Microbiological Research* 2011; 166: 515-520.
- (21) Roy S., Roy M. Bioleaching of Heavy Metals by Sulfur Oxidizing Bacteria: A Review. *International Research Journal of Environment Sciences* 2015; 4(9): 75-79.
- (22) Ozkaya B., Sahinkaya E., Nurmi P., Kaksonen A., Puhakka J. Iron oxidation and precipitation in simulated heap leaching solution in a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm reactor. *Hydrometallurgy* 2007; 88: 67-74.
- (23) Walting HR. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides- A review. *Hydrometallurgy* 2006; 84: 81-108.
- (24) Jafarpour R., Fatemi F., Mehrnejad F., Eidi A. Investigation the UV Effect on Uranium Bioleaching Process in *Acidithiobacillus* sp FJ2 and its Possible Consequences on the *CoxB* Gene Sequence. *Biological Journal of Microorganism* 2018; 27: 95-111.
- (25) Peter G., Carlos R. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts in: The Yeast Handbook. Kurtzman CP. Fell JW. Yeast

Systematics and Phylogeny-Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. *Springer* 2005; 11-30.

- (26) Vaghar R., Oliazadeh M., Vaghar MR. *Biotechnology in metallurgy*. Tehran: University of Industries and Mines; 2000.
- (27) Azmayandeh M., Abdollahi H., Riahimadvar A. Investigation of the effect of chemical compounds on leaching and bioliching of copper sulfide minerals. International Conference on Science and Engineering, Dubai, United Arab Emirates; 2015.

¹- *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

²- *Sulfate adenyltransferase gene*

³- *4Fe-4S ferredoxingene gene*

⁴- Biooxidation

⁵- Zhou