

Investigation the UV Effect on Uranium Bioleaching Process in Acidithiobacillus sp FJ2 and its Possible Consequences on the CoxB Gene Sequence

Roghayeh Jafarpoor

Ph.D. Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, jafarpoorroghayeh21@gmail.com

Faezeh Fatemi *

Associate Professor, Institute of materials and nuclear fuel, Research Center for Nuclear Science and Technology, Tehran, Iran, ffatemi@aeoi.org.ir

Faramarz Mehrnejad

Assistant Professor, Tehran University, Tehran, Iran, mehrnejad@ut.ac.ir

Akram Eidi

Professor, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, akram_eidi@yahoo.com

Abstract

Introduction: The increasing use of uranium as a suitable source of energy in various industries has led to the depletion of high-grade uranium mines in different countries. Today, the uranium bioleaching process has been used in different countries for easy and cheap access to uranium. In this process, microorganisms are used to extract uranium from low-grade mines.

Materials and methods: The *Acidithiobacillus* sp. FJ2 bacterium was exposed to UV radiation. Then, the uranium bioleaching process was conducted in the presence of bacteria exposed to UV and non-exposed bacteria. In followings, this gene was amplified by PCR technique after DNA extraction from bacterial species and *coxB* gene primer design. Subsequent to gene sequencing and editing with bioedit software, the final sequence of the *coxB* gene was determined from both bacterial species. Later than, the sequences were examined and compared to prove the presence or absence of the mutation in the radiation sample.

Results: The amount of uranium extraction in the presence of bacteria exposed to UV reached to 100% on the second day at the 5% pulp density, whereas the 96.36% extraction yield was obtained on the thirteenth day in pulp density of 50%. This amount was recorded in an unexposed bacterium, in the third and thirteenth days at 5% and 50% pulp densities, respectively. The *coxB* gene sequence was identical in both bacterial specimens.

Discussion and conclusion: In this study, UV irradiation to *Acidithiobacillus* sp. FJ2 increased the rate of uranium bioleaching in the pulp density of 5%, whereas uranium extraction yield was sustained in the 50% pulp density. These effects were independent to the *coxB* gene.

Key words: Uranium Bioleaching, UV, *CoxB*, *Acidithiobacillus* sp. FJ2.

* Corresponding author

Received: July 07, 2018 / **Accepted:** February 24, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۹۵-۱۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۶

بررسی اثر UV روی فرایند فروشویی زیستی اورانیوم در باکتری *Acidithiobacillus* sp. FJ2 و اثر احتمالی آن روی توالی ژن *coxB*

رقیبه جعفرپور: دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، jafarpoorroghayeh21@gmail.com
فائزه فاطمی*: دانشیار، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران، ffatemi@aeoi.org.ir
فرامرز مهرنژاد: استادیار، گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران، mehrnejad@ut.ac.ir
اکرم عیدی: استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، akram_eidi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: استفاده روزافزون از اورانیوم برای منبع مناسب تأمین انرژی در صنایع گوناگون و کشورهای مختلف باعث تخلیه معادن با عیار بالای این عنصر شده است. امروزه فرایند فروشویی زیستی اورانیوم برای دستیابی آسان و ارزان به اورانیوم لازم در کشورهای مختلف استفاده می‌شود. در این فرایند، ریز موجودات برای استخراج اورانیوم از معادن با عیار پایین آن استفاده می‌شوند.

مواد و روش‌ها: ابتدا باکتری اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 در معرض UV قرار گرفت، سپس فرایند فروشویی زیستی اورانیوم در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV انجام شد. پس از استخراج DNA از هر دو نوع باکتری و طراحی آغازگر ژن *coxB*، تکثیر ژن با استفاده از PCR انجام شد. پس از تعیین توالی ژن و ویرایش با نرم‌افزار بیوایت، توالی نهایی ژن *coxB* هر دو نوع باکتری تعیین و برای اثبات وجود داشتن یا نداشتن جهش در نمونه قرار گرفته در معرض UV بررسی و مقایسه شد.

نتایج: میزان استخراج اورانیوم در باکتری قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵ درصد در نیمه روز سوم به ۱۰۰ درصد و در چگالی پالپ ۵۰ درصد در روز سیزدهم به ۹۴/۶۲ درصد رسید. این میزان در حضور باکتری قرار گرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵ درصد در روز دوم به ۱۰۰ درصد و در چگالی پالپ ۵۰ درصد در روز سیزدهم به ۹۶/۳۴ درصد رسید. توالی ژن *coxB* در هر دو نمونه باکتری یکسان بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، پرتو دهی با UV در باکتری اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 سرعت فروشویی زیستی اورانیوم در چگالی پالپ ۵ درصد را افزایش داد؛ در حالی که میزان استخراج اورانیوم در چگالی پالپ ۵۰ درصد ابقا شد. نتیجه یادشده غیروابسته به ژن *coxB* است.

واژه‌های کلیدی: فروشویی زیستی اورانیوم، UV، *coxB*، اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه.

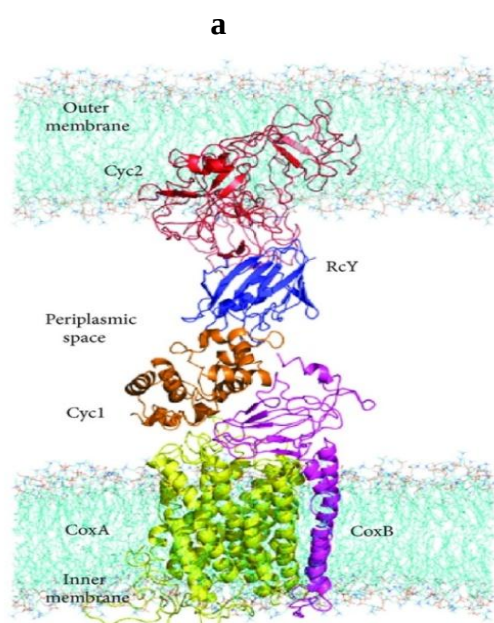
استفاده روزافزون از اورانیوم برای مداوم انرژی در صنعت حمل‌ونقل، انرژی هسته‌ای و تولید برق موجب تخلیه پیوسته معادن اورانیوم با عیار بالا و فرسودگی این ذخایر شده است (۱)؛ این مسئله باعث شکل‌گیری عزم و اراده برای جستجو و یافتن روش‌های ساده، مؤثر و منجر به آلودگی‌های کمتر در استخراج اورانیوم از معادن شده است (۲ و ۳). روش‌های هیدرومتالورژیکال (استخراج فلزها به وسیله آب) دارای معایبی مانند بازیابی ضعیف، قیمت زیاد انرژی، پردازش زیاد و افزایش آلودگی منابع آب هستند (۴ و ۵). در روش فروشویی شیمیایی نیز استخراج اورانیوم از معادن با عیار پایین به علت بسیار کم بودن حجم معادن اورانیوم از نظر وزنی مقرون به صرفه نیست. استفاده از روش اسیدفروشویی، فرایندی که در آن اسیدهای قوی به عنوان معرف استفاده می‌شوند، نیز علاوه بر ایجاد مشکلات محیطی نیازمند مقدار زیاد انرژی و مستلزم واحد صنعتی پیچیده است (۶)؛ به همین علت، فروشویی زیستی (بیولیچینگ) معادن با عیار پایین راهکاری عمومی در نظر گرفته می‌شود. فروشویی زیستی استفاده از ریزموجودات برای استخراج فلزها از معادن است. این فرایند از توانایی طبیعی ریزموجودات برای تغییر دادن شکل فلزهای موجود در معادن از شکل جامد به شکل محلول استفاده می‌کند (۷). در فروشویی زیستی اورانیوم، یون فریک به شکل پذیرنده الکترون عمل می‌کند و U^{+4} را به U^{+6} (حالتی که در آب حل می‌شود) تبدیل می‌کند و خود احیا و به یون فروس تبدیل می‌شود؛ از این رو فلز وارد محلول آبی می‌شود (۸ و ۹). این فرایند ارزان‌تر و آسان‌تر از روش‌های رایج است، از نظر اقتصادی به صرفه و از نظر زیست‌محیطی

مناسب است (۷). در این فرایند، ریزموجودات مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها که توانایی رشد در محیط‌های دارای اسیدیته زیاد (اسیدیته‌های بین ۱/۵ تا ۳) و حجم زیاد یون‌های فلزهای سنگین را دارند به عنوان کاتالیست‌های فروشویی به کار می‌روند (۱، ۸، ۱۰)؛ علاوه بر این، انعطاف‌پذیری ریزموجودات بدون مشکل تطبیق‌یافتن آنها با شرایط زندگی متفاوت سودمندی درخور توجهی است (۷). اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس یکی از باکتری‌هایی است که به طور گسترده در فرایند فروشویی زیستی اورانیوم به کار می‌رود. اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس باکتری گرم منفی و گاما- پروتئوباکتری است که به طور بهینه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۲ رشد می‌کند (هرچند می‌تواند در اسیدیته ۱ یا کمتر نیز رشد کند) (۱۱) و انرژی را از اکسیداسیون آهن فروس و ترکیبات سولفور احیا به دست می‌آورد (۱۲). بیشترین بازدهی فروشویی اورانیوم (۱۸ درصد در نبود باکتری‌ها) به دنبال وارد کردن اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در حدود ۸۰ درصد افزایش می‌یابد (۱۳).

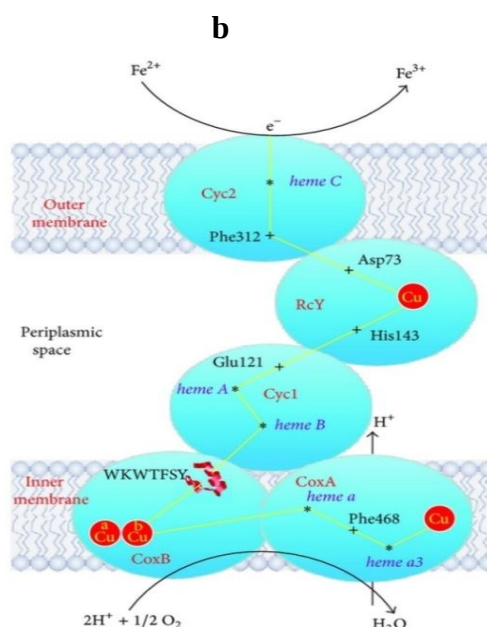
باکتری اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 گونه‌ای بومی از جنس اسیدی تیوباسیلوس^۱ است که از چشمه‌های رامسر در ایران جدا شده و قادر به فروشویی زیستی اورانیوم است (۱۴). از آنجا که پدیده فروشویی زیستی مستلزم وجود موجودات زنده است محصول فروشویی فلز از عوامل فیزیکی شیمیایی، زیستی و محیطی تأثیر می‌پذیرد (۱ و ۸). متابولیسم بیوانرژتیک در باکتری اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس مستلزم زنجیره انتقال الکترونی است که اکسیداسیون آهن فروس را به احیای O_2 (آخرین پذیرنده الکترون) مرتبط می‌کند. مسیر زنجیره تنفسی اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس به شکل زیر است (۱۵):



آمینواسید اول این زیرواحد یک توالی طولانی و استاندارد تشکیل می‌دهند. این زیرواحد از دو دامنه عبورکننده از غشا در انتهای N و یک دامنه پری پلاسمیک در انتهای C تشکیل شده است و الکترون‌ها را از پروتئین Cyc1 می‌گیرد و به زیرواحد CoxA منتقل می‌کند (۱۷ و ۱۸). مسیر حرکت الکترون و جایگاه این زیرواحد در غشای باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در شکل ۱ نشان داده شده است (۱۹).



ژن‌های اپرون *rus* این پروتئین‌ها را کد می‌کنند. ترتیب ژن‌های اپرون یادشده در ژنوم/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس به شکل زیر است (۱۶): *cyc2*, *cyc1*, *ORF1*, *coxB*, *coxA*, *coxC*, *coxD*, and *rus*. کمپلکس ژنی *coxBACD* کدکننده چهار زیرواحد تشکیل دهنده سیتوکروم اکسیداز نوع aa3 است. ژن *coxB* کدکننده زیرواحد CoxB II سیتوکروم اکسیداز نوع aa3 است. CoxB پلی پپتیدی با ۲۵۴ آمینواسید و وزن مولکولی ۲۸۲۴۰ کیلودالتون است (۱۶). ۵۱



شکل ۱- a. مسیر حرکت الکترون در زنجیره انتقال الکترون در غشای باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس، b. الگوی استقرار و اتصال اجزای زنجیره انتقال الکترون در غشای باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس

نانومتر است که مشابه طیف جذبی DNA عموم باکتری‌ها است؛ از این رو، جهش UV دارای اثر باکتریایی قوی است (۲۱). هدف پژوهش حاضر، بررسی میزان بهبود فرایند فروشویی زیستی اورانیوم در حضور باکتری/اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 متأثر از اشعه UV در چگالی پالپ ۵ و ۵۰ درصد سنگ معدن اورانیوم است. همچنین برای

جهش یافته‌های اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس که با استفاده از عوامل فیزیکی و شیمیایی ایجاد می‌شوند به‌طور فزاینده‌ای برای بهبود فعالیت فروشویی زیستی گونه‌ها استفاده می‌شوند (۲۰). جهشی که UV القا می‌کند ساده‌ترین و مؤثرترین روش ایجاد جهش فیزیکی در باکتری‌ها است و طول موج UV مؤثر حدود ۲۵۵

قراردادن باکتری اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2
در معرض UV: برای تاباندن UV، ابتدا باکتری در فاز نمایی برداشته و با سانتریفیوژ در دور $4000 \times g = 3320$ به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شد. سپس رسوب باکتری سه بار با آب اسیدی شسته و در نهایت در محیط کشت بدون منبع آهن حل شد. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری‌های آماده‌سازی شده درون پلیت ریخته شد. فاصله بین پلیت و منبع نور UV برابر ۳۰ سانتی‌متر تنظیم شد. نمونه به مدت ۱۸۰ ثانیه در معرض نور UV با قدرت ۳۰ وات و طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفت. پس از آن، به منظور حفظ تغییر ایجاد شده و بازسازی نشدن ژنوم باکتری، نمونه به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۶). در نهایت، نمونه در محیط کشت 9K (همان‌طور که در مرحله پیش توضیح داده شد) در شرایط بهینه رشد کشت و برای آزمایش‌های فروشویی زیستی اورانیوم استفاده شد.

فرایند فروشویی زیستی اورانیوم: برای انجام فرایند فروشویی زیستی، ۱۰ درصد از مایه‌های تلقیح باکتری‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV به‌طور جداگانه به محیط کشت‌های 9K حاوی ۵ و ۵۰ درصد سنگ معدن اورانیوم اضافه شد. نمونه شاهد منفی به جای مایه تلقیح حاوی مخلوط متانول-فرمالدهید به نسبت ۹:۱ بود (۲۷). نمونه‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد و دور $150 \times g$ گرماگذاری شدند. میزان استخراج اورانیوم هر ۲۴ ساعت یک بار اندازه‌گیری شد و زمانی که به بیشینه استخراج رسید فروشویی زیستی متوقف شد. پس از توقف، باکتری‌ها با سانتریفیوژ در دور $4500 \times g = 3735$ به مدت ۳۰ دقیقه جمع‌آوری شدند.

بررسی آثار احتمالی UV روی توالی نوکلئوتیدی ژن *coxB*، این ژن از باکتری‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV استخراج و توالی نوکلئوتیدی آن در هر دو نوع باکتری تعیین و با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری: باکتری اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 باکتری استفاده شده در مطالعه حاضر است که جهانی و همکاران (۲۰۱۵) آن را از چشمه‌های گوگردی رامسر در ایران جدا کرده‌اند (۱۴).

تهیه سنگ معدن اورانیوم: در مطالعه حاضر از سنگ معدن اورانیوم با عیار پایین و تهیه شده از معدن ساغند یزد استفاده شد. نمونه سنگ معدن آزمایش شده در ابعاد $d_{80} = 106 \mu m$ انتخاب شد. به منظور به دست آوردن ترکیب شیمیایی نمونه سنگ خرد شده، نمونه برای تجزیه و تحلیل XRF فرستاده شد.

کشت باکتری و تهیه مایه تلقیح: برای تهیه مایه تلقیح از باکتری‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV، باکتری‌ها در محیط کشت 9K (حاوی ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۵ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم KCl ، ۰/۰۱ گرم $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ و ۴۴/۷ گرم $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ در ۱۰۰ ملی‌لیتر آب مقطر) کشت شدند (۲۲). اسیدیته محیط کشت پس از اضافه کردن ۱۰ درصد (v/v) باکتری به محیط روی ۲ تنظیم شد (۲۳ و ۲۴) و به مدت دو روز (تا زمان رسیدن باکتری‌ها به فاز نمایی) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار با دور $180 \times g$ گرماگذاری شد (۲۵). پس از آن، باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور $2422 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه جمع‌آوری شدند.

استخراج DNA از باکتری‌های قرارگرفته و قرارنگرفته در معرض UV: برای بررسی و تعیین توالی ژن *coxB* در هر دو نوع باکتری قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV، استخراج DNA از هر دو نوع باکتری با کیت جداسازی DNA CinnaPure (کد PR881603، ساخت شرکت سیناژن) پس از فرایند فروشویی زیستی انجام شد.

طراحی آغازگر ژن *coxB*: به منظور تکثیر ژن *coxB* استخراج شده، ابتدا آغازگرهای اختصاصی 5'-F (3'-TTTGCCACCCAAGTCTTG و 5'-R (3'-TGGCTTGATGGTCTG با نرم افزارهای Primer3 و Gen runner طراحی شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: برای انجام PCR، محلول ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۰/۴ میکرومولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۰/۲ میکرومولار)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ میلی مولار)، ۳/۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 4x PCR، و ۰/۴ میکرولیتر DNA polymerase (2u/25 μ l) با افزودن آب تا حجم کل ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. سه مرحله PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد؛ ۳۵ چرخه واسرشت شدن شامل ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه اتصال آغازگر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و پس از تکمیل چرخه، طویل سازی نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور کنترل و تأیید درستی انجام هر آزمون PCR از نمونه‌های شاهد منفی و مثبت استفاده شد. نمونه شاهد مثبت واکنشی از PCR بود که در آن cDNA تأیید شده قبلی وجود داشت و نمونه شاهد منفی واکنشی از PCR بود که در آن cDNA وجود نداشت.

اندازه‌گیری میزان استخراج اورانیوم: برای اندازه‌گیری میزان استخراج اورانیوم، هر ۲۴ ساعت یک بار ۵ میلی لیتر از محلول آب شویه برداشته شد و پس از فیلتر شدن برای تجزیه و تحلیل طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP^۲) فرستاده شد. هر بار به میزان آب شویه برداشته شده آب مقطر با اسیدیته ۲ اضافه شد. نمونه برداری تا زمانی ادامه یافت که میزان استخراج اورانیوم در هر دو چگالی پالپ به ۱۰۰ درصد رسید (۱۴).

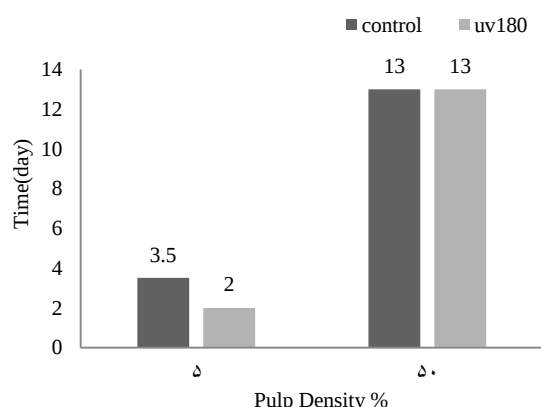
اندازه‌گیری اسیدیته: اسیدیته اولیه محیط روی ۲ تنظیم شد. اسیدیته هر ۲۴ ساعت یک بار اندازه‌گیری و دوباره روی ۲ تنظیم می‌شد. مقدار اسیدیته با دستگاه pH متر (Metrohm827) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پتانسیل احیا: میزان پتانسیل احیا (Eh) با دستگاه Eh متر (Metrohm827) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری آهن فروس: آهن فروس با به دست آوردن اختلاف آهن فریک و آهن کل اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری آهن فریک و آهن کل، پس از تهیه منحنی کالیبراسیون برای هریک، میزان ۲ میلی لیتر از آب شویه برداشته و در دو بالن ۵۰ میلی لیتری (۱ میلی لیتر درون هر کدام) ریخته شد و به هریک از بالن‌ها ۳ میلی لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۱۰ درصد اضافه شد. به بالن دوم، ۳ میلی لیتر محلول آمونیاک ۲۵ درصد نیز اضافه شد. سپس، محتویات دو بالن به حجم رسانده شد. میزان آهن فریک با تعیین جذب محلول بالن اول با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان آهن کل با اندازه‌گیری جذب محلول بالن دوم در طول موج ۴۲۵ نانومتر به دست آورده شد (۲۸).

تیوباسیلوس سویه FJ2 و تأثیر آن روی فرایند فروشویی زیستی اورانیوم مشاهده نشده است.

بررسی میزان استخراج اورانیوم در باکتری‌های قرارگرفته و قرارنگرفته در معرض UV در چگالی پالپ‌های ۵ و ۵۰ درصد: مطابق نتایج شکل ۲، میزان استخراج اورانیوم در چگالی پالپ ۵ درصد در حضور باکتری قرارگرفته در معرض UV در روز دوم و در حضور باکتری قرارنگرفته در معرض UV در نیمه روز سوم به ۱۰۰ درصد می‌رسد. استخراج اورانیوم در چگالی پالپ ۵۰ درصد در هر دو نمونه باکتری پس از ۱۳ روز به حداکثر می‌رسد. از سوی دیگر، بیشترین استخراج در چگالی پالپ ۵ درصد به ۱۰۰ درصد می‌رسد اما در چگالی پالپ ۵۰ درصد در نمونه قرارگرفته در معرض UV به ۹۶/۳۴ درصد و در نمونه قرارنگرفته در معرض UV به ۹۴/۶۲ درصد می‌رسد؛ بنابراین در چگالی پالپ ۵ درصد، زمان رسیدن به بیشترین استخراج کوتاه‌تر و مقدار استخراج نیز بیشتر است و میزان استخراج در چگالی پالپ ۵۰ درصد ابقا می‌شود. در نتیجه، تابش UV روی باکتری باعث بهبود فرایند فروشویی زیستی اورانیوم می‌شود.



شکل ۲- میزان استخراج اورانیوم در حضور باکتری‌های قرارگرفته و قرارنگرفته در معرض UV در چگالی پالپ‌های ۵ و ۵۰ درصد

الکتروفورز: برای اطمینان یافتن از استخراج و تکثیر ژن مدنظر، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد و باندها با نور UV مشاهده شدند. باند مربوط به ژن *coxB* در حدود ناحیه مربوط به آن (۷۲۰ جفت باز) مشاهده شد و استخراج این ژن از هر دو نمونه تأیید شد.

تعیین توالی ژن *coxB* باکتری‌های قرارگرفته و قرارنگرفته در معرض UV: در این مرحله، ژن‌های تکثیرشده از هر دو نمونه برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شدند و توالی دقیق ژن‌ها با نرم‌افزار Bioedit v 7.2.5 تعیین و وجود داشتن یا نداشتن جهش بررسی شد.

آنالیز آماری: تفاوت‌های بین داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA تعیین شدند. با این نرم‌افزار *P* value داده‌ها محاسبه و $P < 0.05$ تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. در تمام شکل‌ها منظور از نمونه کنترل (شاهد)، نمونه قرارنگرفته در معرض UV و منظور از نمونه UV180، نمونه قرارگرفته در معرض UV است. نمونه شاهد منفی نیز نمونه‌ای است که در آن باکتری حضور ندارد. در نمودارها حرف‌های غیریکسان نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.

نتایج و بحث

تاکنون چندین مطالعه در زمینه بررسی اثر چگالی پالپ‌های مختلف سنگ معدن معادن مختلف روی فرایند فروشویی زیستی اورانیوم و تأثیر UV روی فرایند فروشویی زیستی مس در باکتری اسیدی/تیوباسیلوس *فرواکسیدانس* انجام شده است (۱۴، ۲۱، ۲۹-۳۲) اما هیچ گزارشی مبنی بر ایجاد جهش با UV در اسیدی

در مطالعه پال^۳ و همکاران (۲۰۱۰) درباره فروشویی زیستی نمونه کان سنگ با عیار پایین معادن جیدی گودا^۴ هند مشخص شد بازدهی فروشویی زیستی اورانیوم با افزایش چگالی تا ۱۰ درصد افزایش می یابد اما پس از آن، بازدهی با افزایش چگالی پالپ کاهش می یابد (۲۹). نتایج پژوهش فاطمی^۵ و همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان داد در باکتری /سیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 میزان استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ کاهش می یابد. آنها بیشترین میزان استخراج را در چگالی پالپ ۵ درصد مشاهده کردند (۳۰). در پژوهش جهانی^۶ و همکاران (۲۰۱۵) درباره فروشویی زیستی اورانیوم توسط باکتری /سیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 مشخص شد از چگالی پالپ ۲ تا ۱۰ درصد (البته با افزایش زمان فروشویی) بازدهی به ۱۰۰ درصد می رسد و پس از آن، کاهش بازدهی در چگالی ۱۲/۵ درصد دیده می شود (۱۴). عبداللهی^۷ و همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند بازدهی استخراج در چگالی پالپ های ۷/۵ و ۱۰ درصد پس از ۲۶۰ ساعت به بیشترین مقدار یعنی به ترتیب ۱۰۰ و ۹۸ درصد می رسد؛ در حالی که در چگالی های پالپ ۲/۵ و ۵ درصد در زمان کوتاه تری به ۱۰۰ درصد می رسد (۳۱). در نتایج پژوهش ابهیلاش^۸ و پاندی^۹ (۲۰۱۱) درباره کان سنگ های با عیار پایین از معدن تورامدی، جیدی گودا هند بیشترین بازدهی در چگالی پالپ ۲۰ درصد دیده شد. طبق نتایج آنها، در چگالی پالپ ۲۰ درصد (W/V)، اندازه ذره کمتر از ۷۶ میکرومتر، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، زمان ۴۰ روز و اسیدیته ۱/۷ بازیابی زیستی اورانیوم ۹۸ درصد است (۳۲)؛ بنابراین، آنچه اهمیت پژوهش حاضر را آشکار می کند ارائه روشی

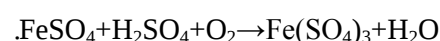
است که با انجام آن بازدهی فرایند فروشویی زیستی در چگالی پالپ ۵ درصد در زمان کوتاه تری به ۱۰۰ درصد رسید و در چگالی پالپ ۵۰ درصد در روز ۱۳ (با افزایش بسیار جزئی) در میزان ۹۶/۳۴ درصد ابقا شد. آنچه بیشتر پژوهشگران در توجیه کاهش بازدهی با افزایش چگالی در فرایند فروشویی زیستی بر آن تأکید داشته اند نفوذ ناکافی اکسیژن و کم شدن رشد باکتریایی در چگالی پالپ بیشتر است (۳۳)؛ علاوه بر این، زیاده شدن غلظت یون های فلزی با افزایش چگالی پالپ روی سیستم فروشویی زیستی اثر سمی و بازدارندگی دارد (۳۴). گین^{۱۰} و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند آثار سمی فلزهای سنگین روی رشد باکتری ها از عملکرد غلظت فلز سنگین نیست بلکه به زمان تماس جمعی آنها بستگی دارد (۳۵).

بررسی میزان تغییرات اسیدیته در باکتری های

قرارد گرفته و قرارد نگرفته در معرض UV در چگالی

پالپ های ۵ و ۵۰ درصد: شرایط بهینه اسیدیته برای باکتری /سیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 به منظور بیشترین استخراج اورانیوم ۲ است و استخراج اورانیوم در اسیدیته های ۱/۵ و ۲/۵ کاهش می یابد (۱۴). نگهداشتن اسیدیته محیط فروشویی بین ۱/۵ تا ۲/۵ الزامی است زیرا باکتری ها در اسیدیته بیش از ۲/۵ فعالیتشان را از دست می دهند. اسیدیته بیش از ۲ باعث تشکیل ژاروسیت^{۱۱} می شود که سدی فیزیکی بین آهن فروس و باکتری ایجاد و از اکسیداسیون آهن ممانعت می کند (۳۱). در اسیدیته کمتر از ۱ نیز رسوب بازی سولفات های فریک در حضور یون های هیدروژن تشکیل می شود که سطوح سولفید معدنی را غیرفعال و حتی از روند رشد

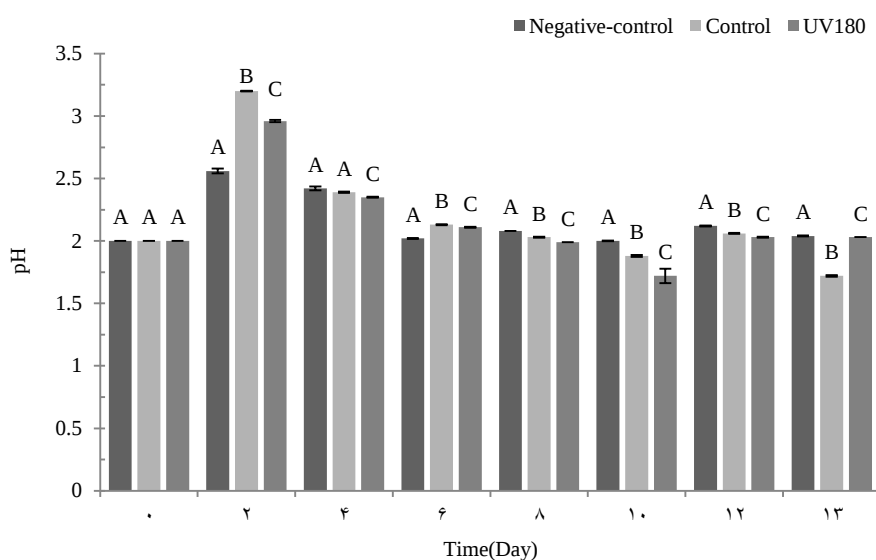
محیط کشت ممانعت می‌کند (۳۶). علت افزایش مقدار اسیدیته در دو روز اول در چگالی پالپ ۵۰ درصد در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV به انحلال شیمیایی تغلیظ‌شده‌ها بین روز آغازی و روزهای اولیه نسبت داده می‌شود (۳۰) اما از سوی دیگر، در ابتدای فروشویی زیستی مطابق واکنش زیر اکسیداسیون آهن فروس به فریک اتفاق می‌افتد:



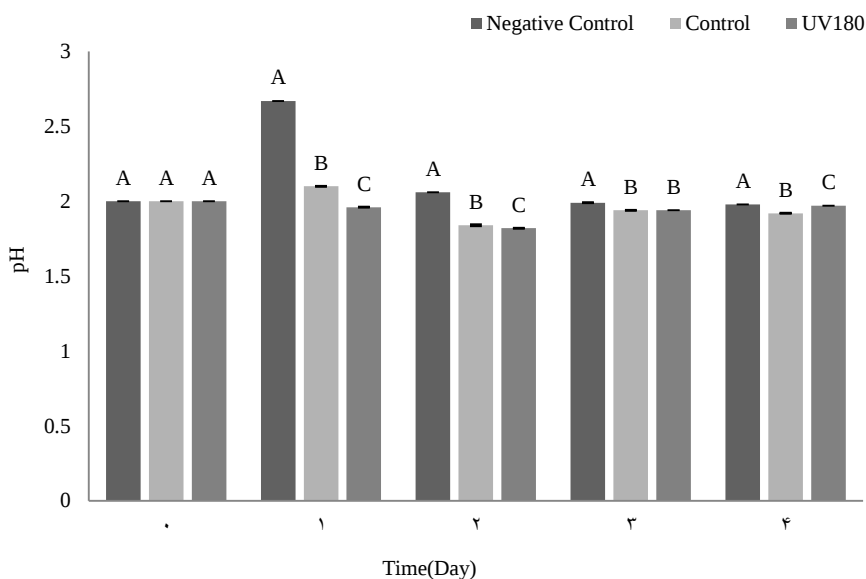
این واکنش در حضور باکتری‌ها انجام می‌شود.

در نتیجه، افزایش اسیدیته به مصرف اسید در واکنش یادشده نسبت داده می‌شود. در چگالی پالپ ۵ درصد در روز اول و در چگالی پالپ ۵۰ درصد از روز دوم به بعد کاهش اسیدیته دیده می‌شود (شکل‌های ۳ و ۴). این کاهش به علت تولید یون‌های فریک از یون‌های فروس به وسیله باکتری‌ها و هیدرولیز یون‌های فریک است که

به تولید سولفوریک اسید منجر می‌شود. رسوب ژاروسیت‌ها همراه با تولید H^+ و عملکرد شلاته‌کننده از EPS که دارای OH - و COOH - برای آزاد کردن H^+ به درون محلول است به وجود می‌آید (۳۷-۳۹). تجزیه پیریت پس از شروع فروشویی زیستی و آزادشدن آن از کان‌سنگ نیز دلیلی بر اسیدی شدن محیط است (۴۰). در چگالی پالپ ۵ درصد در حضور باکتری قرار گرفته در معرض UV در روز اول کاهش اسیدیته دیده می‌شود؛ از این رو، پیشنهاد می‌شود در این محیط نیز ابتدا افزایش اسیدیته وجود داشته است اما این افزایش به علت افزایش سرعت فروشویی زیستی تا پیش از اندازه‌گیری اسیدیته در روز اول بسیار سریع اتفاق افتاده است به‌طوری‌که در زمان اندازه‌گیری اسیدیته در روز اول کاهش اسیدیته مشاهده می‌شود.



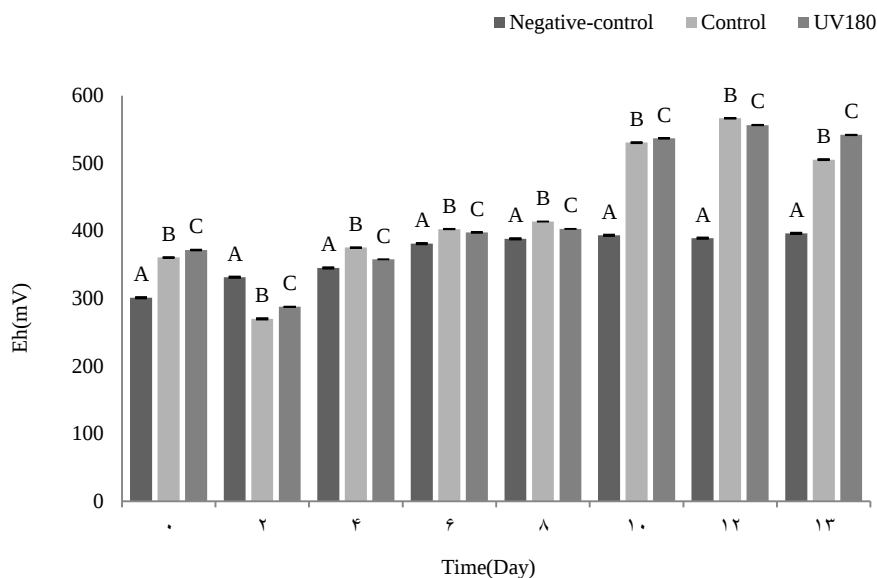
شکل ۳- تغییرات اسیدیته در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV و شاهد منفی در چگالی پالپ ۵۰ درصد. حرف‌های غیر یکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.



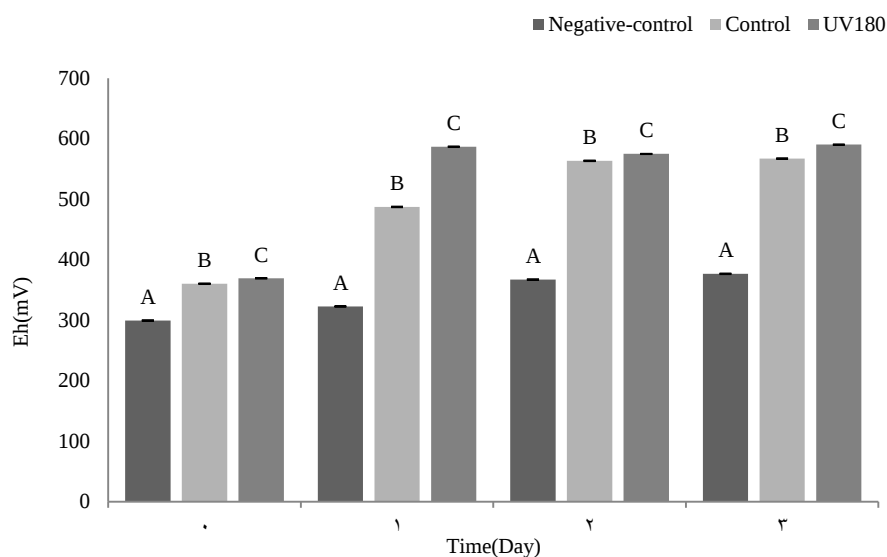
شکل ۴- تغییرات اسیدیته در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵ درصد. حرف‌های غیر یکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.

قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV بود که نشان‌دهنده فعالیت اکسیداتیوی باکتری‌ها است (شکل‌های ۵ و ۶).

بررسی میزان تغییرات Eh در باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ‌های ۵ و ۵۰ درصد: تغییرات Eh نمونه شاهد منفی در هر دو چگالی پالپ ۵ و ۵۰ درصد کمتر از نمونه‌های



شکل ۵- تغییرات Eh در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵۰ درصد. حرف‌های غیر یکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.



شکل ۶- تغییرات Eh در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵ درصد. حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.

Fe(III) و اسیدیته محلول روی فروشویی زیستی آن اثر بگذارند (۳۲). در آزمایش‌های فروشویی زیستی، سولفات فروس به شکل اکسیدانت قوی عمل می‌کند (۱۳). مقدارهای کم آهن برای اکسید کردن مقادیر مختلف اورانیوم مناسب هستند (۴۲). در محلول اسیدی بدون باکتری، Fe(II) پایدار است و فروشویی به وسیله Fe(III) به آهستگی انجام می‌شود. اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس واکنش اکسیداسیون را بیش از یک میلیون بار شتاب می‌بخشد (۴۳). نقش اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس در فروشویی زیستی اورانیوم در تولید اکسیدانت (سولفات فریک) و در تولید عامل حل‌کننده (سولفوریک اسید) است و این کار را از طریق حمله فیزیکی به پیریت که نسبت به مواد معدنی رادیواکتیو در دسترس‌تر قرار گرفته است و تولید آهن فریک و سولفوریک اسید انجام می‌دهد (۳۲). با انحلال مواد معدنی، مقدار اضافی یون‌های آهن استخراج شده دارای اثر منفی روی سرعت انحلال اورانیوم هستند.

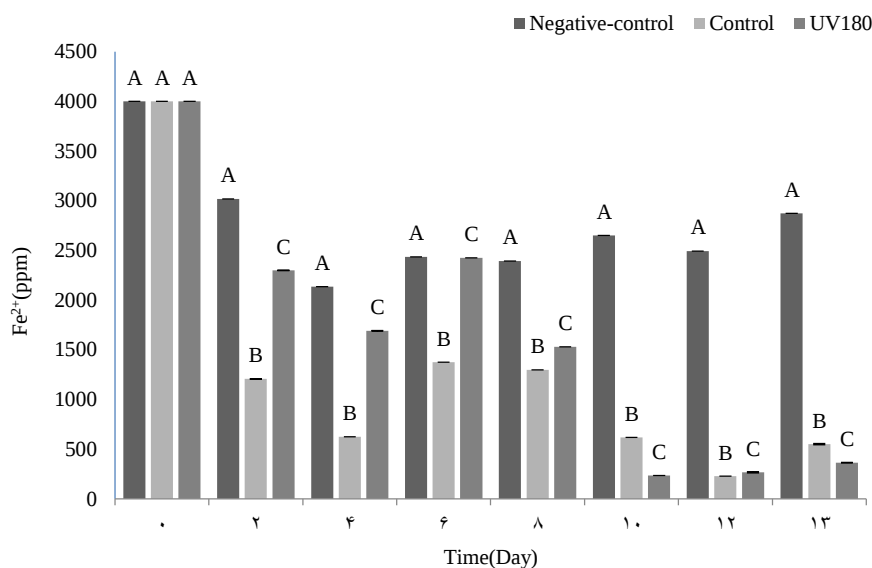
تغییرات Eh (پتانسیل احیا) طی فرایند فروشویی زیستی اورانیوم نشان می‌دهد این فرایند دارای طبیعت الکتروشیمیایی است و پتانسیل احیا به علت اکسیداسیون Fe^{2+} توسط باکتری و افزایش غلظت Fe^{3+} افزایش می‌یابد (شکل‌های ۵ و ۶) (۱۳). از نظر بیوهیدرومتالیکالی، این ریز موجود از تفاوت پتانسیل احیا بین جفت $Fe(II)/Fe(III)$ و S^0/SO_4^{2-} یا O_2/H_2O به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند (۴۱).

بررسی میزان تغییرات (Fe^{2+}) در باکتری‌های

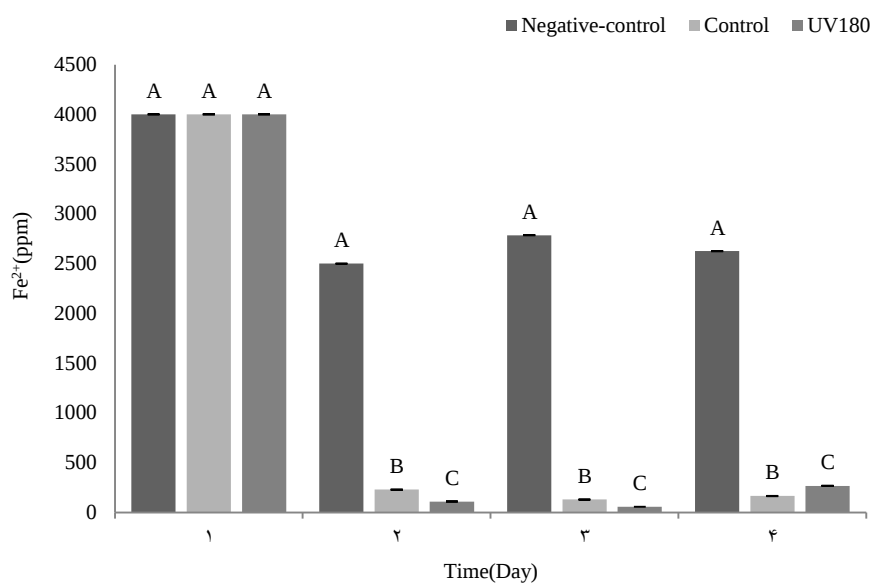
قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی

پالپ‌های ۵ و ۵۰ درصد: اسیدی تیوباسیلوس

فرواکسیدانس باکتری شیمیولیتوتروف و اسید دوستی است که از آهن و سولفور برای منبع انرژی استفاده می‌کند. غلظت آهن فروس و اسیدیته اثر زیادی روی فعالیت باکتری‌ها در فرایند فروشویی زیستی دارند (۱۴). رشد این باکتری به اکسیداسیون $Fe(II)$ (منبع انرژی) بستگی دارد و ممکن است سه عامل غلظت $Fe(II)$ و



شکل ۷- تغییرات (Fe^{2+}) در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵۰ درصد. حرف‌های غیریکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.



شکل ۸- تغییرات (Fe^{2+}) در حضور باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ ۵ درصد. حرف‌های غیریکسان نشان‌دهنده معناداری اختلاف دو نمونه و حرف‌های یکسان نشان‌دهنده معنادار نبودن اختلاف دو نمونه هستند.

و ممانعت از انتقال الکترون از سلول‌های باکتری ممانعت می‌کند (۴۴ و ۴۵). مطابق نتایج (شکل‌های ۷ و ۸) در هر دو چگالی پالپ ۵ و ۵۰ درصد کاهش اولیه (Fe^{2+}) در هر سه نمونه دیده می‌شود. کاهش آهسته

هنگام فرایند فروشویی زیستی، ژاروسیت به تدریج تشکیل می‌شود و سطح سنگ معدن واکنش‌نداده را می‌پوشاند. رسوب ژاروسیت فروشویی اورانیوم را از طریق ایجاد سد فیزیکی بین فروش و سطح باکتری‌ها

ارزیابی کلی تغییرات اسیدیت، Eh و (Fe^{2+}) طی

فرایند فروشویی زیستی اورانیوم: فعالیت اکسیداسیون باکتری‌ها در سیستم‌های فروشویی زیستی در هر دو چگالی پالپ با افزایش مقدار Eh، کاهش آهن فروس و کاهش اسیدیت همراه است. همچنان که آهن فروس به آهن فریک اکسید می‌شود مقدار اسیدیت کاهش و مقدار Eh افزایش می‌یابد؛ افزایش مقدار Eh دلیلی بر فعالیت اکسیداسیون باکتری است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند مقدار افزایش Eh در چگالی پالپ ۵۰ درصد کمتر از افزایش در چگالی پالپ ۵ درصد است. افزایش بیشتر Eh در چگالی پالپ ۵ درصد نشان‌دهنده سرعت اکسیداسیون بیشتر در این سیستم است.

بررسی اثر UV روی فرایند فروشویی زیستی: در

چند پژوهش انجام شده مشخص شده است UV یک جهش‌زای فیزیکی است که در بهبود فرایند فروشویی زیستی عناصر مختلف نقش دارد. در پژوهش انگبو^{۱۲} و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد تابش UV روی باکتری اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس LD-1 به مدت ۳۰ دقیقه نسبت به ۱۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه باعث بهترین بهبود در فرایند فروشویی زیستی مس می‌شود و در این شرایط، استخراج مس حدود ۱۷ درصد افزایش می‌یابد؛ علاوه بر این، آنها نشان دادند استفاده از باکتری‌های قرار گرفته در معرض UV زمان فروشویی را ۶ تا ۸ روز کم می‌کند (۲۱). در پژوهش دیگری اثر UV روی دو گونه باکتریایی اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس ^{13}GF و اسیدیفلوم کریپتوم DX1-1^{۱۴} و میزان بهبود فرایند فروشویی زیستی مس بررسی شد. اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس GF پس از جهش دارای ظرفیت اکسیدکنندگی آهن بیشتری نسبت به گونه اولیه شد و مشخص شد فروشویی زیستی در حضور مخلوط دو

(Fe^{2+}) در نمونه شاهد منفی در هر دو چگالی پالپ. به علت اکسیداسیون هوایی آهن است که مطابق با زمان پیش رفته است؛ هرچند نوسانات اندکی داشته است. در نمونه‌های قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV کاهش درخور توجه (Fe^{2+}) در روز دوم دیده می‌شود که به علت اکسیداسیون این یون به یون فریک و نشانه پیشرفت روند فروشویی زیستی است اما در روزهای چهارم و ششم افزایش (Fe^{2+}) مشاهده می‌شود. پس از روز دوم نیز به علت حمله باکتری به کان‌سنگ، مقدار اضافی یون‌های آهن استخراج شده به تشکیل رسوب ژاروسیت روی باقیمانده کان‌سنگ منجر می‌شوند و در نتیجه، اکسیداسیون (Fe^{2+}) کاهش و مقدار (Fe^{2+}) کمی افزایش می‌یابد. در روزهای هشتم، نهم و دهم کاهش (Fe^{2+}) دیده می‌شود که نشانه پیشرفت روند فروشویی زیستی است. در روز سیزدهم، مقدار (Fe^{2+}) در هر دو محیط حاوی باکتری قرار گرفته و قرارنگرفته در معرض UV نسبت به شروع فرایند کاهش چشمگیری دارد (کاهش در حضور باکتری قرار گرفته در معرض UV ۳۶۳۵ واحد و در حضور باکتری قرارنگرفته در معرض UV ۳۴۴۹ واحد است) که نشان‌دهنده پیشرفت خوب فرایند فروشویی زیستی است. در چگالی پالپ ۵ درصد، کاهش (Fe^{2+}) در روزهای اول و دوم در هر دو نمونه زیاد است که نشان‌دهنده پیشرفت سریع‌تر روند فروشویی زیستی در چگالی پالپ کمتر نسبت به ۵۰ درصد است. در نمونه قرار گرفته در معرض UV در روز دوم کاهش نهایی ۳۹۴۳/۳۴ واحد مشاهده می‌شود که نسبت به نوع قرارنگرفته در معرض UV کاهش درخور توجه‌تری است..

بررسی و مقایسه توالی ژن *coxB* باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV: مطابق نتیجه بلاست ژن *CoxB* نمونه‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV (شکل ۱۰) بجز نواحی ابتدایی و انتهایی که درخور توجه نیستند در تمام نواحی به‌ویژه در ناحیه‌ای که انتظار می‌رود ناحیه احتمالی عملکردی باشد هیچ تغییری در توالی نمونه قرار گرفته در معرض UV نسبت به نمونه قرار نگرفته در معرض UV دیده نمی‌شود.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1225 bits(663)	0.0	680/687(99%)	5/687(0%)	Plus/Plus
Query 3	CTGGTGTACCACTT-ACCAGAGCGCGCATCAACGAGTGTCCGTTGCCAAATCAAGG	61		
Sbjct 1	CTGGTGTACCACTTAAACGAGCGCGCATCAACGAGTGTCCGTTGCCAAATCAAGG	60		
Query 62	AACACTGTACACGACATGGGGTTTGTAGCGTTGTCCAGCATGGTGGTGTAAATAA	121		
Sbjct 61	AACACTGTACACGACATGGGGTTTGTAGCGTTGTCCAGCATGGTGGTGTAAATAA	120		
Query 122	ACAAGTGCACGACCTTCAITTTGGGATCACGCTCTTTTCTCACCCAGGAGGTACCCAAA	181		
Sbjct 121	ACAAGTGCACGACCTTCAITTTGGGATCACGCTCTTTTCTCACCCAGGAGGTACCCAAA	180		
Query 182	AATCGTGCATGACGCTCTTTGTCCGAGAGAAAGTCTATGGTGCAGCCCTCTGGAAACA	241		
Sbjct 181	AATCGTGCATGACGCTCTTTGTCCGAGAGAAAGTCTATGGTGCAGCCCTCTGGAAACA	240		
Query 242	CCAGTTGTGAACATCCGTTACGCGCTGCTGGGATAAGAGAACGCTCCACTTCCATTTGT	301		
Sbjct 241	CCAGTTGTGAACATCCGTTACGCGCTGCTGGGATAAGAGAACGCTCCACTTCCATTTGT	300		
Query 302	GCAGGTTACATCGATCACCAGTGGATTTTGTATCTAAGTGGATACCCAAAGTTGTT	361		
Sbjct 301	GCAGGTTACATCGATCACCAGTGGATTTTGTATCTAAGTGGATACCCAAAGTTGTT	360		
Query 362	CCAGGCCACATACACCGGGTAAATGGATTTGCCAGGTTGATGCTATGGCCAAACCA	421		
Sbjct 361	CCAGGCCACATACACCGGGTAAATGGATTTGCCAGGTTGATGCTATGGCCAAACCA	420		
Query 422	GCCAGGTCATACGAAAGTGCAGGTCGCGCTTTTGTATAGCGCGCGCGAGTGTCTG	481		
Sbjct 421	GCCAGGTCATACGAAAGTGCAGGTCGCGCTTTTGTATAGCGCGCGCGAGTGTCTG	480		
Query 482	ACATGGAGATGCGCGAAACGAACGCGCTATATACACCGCACGCGGACGACACAT	541		
Sbjct 481	ACATGGAGATGCGCGAAACGAACGCGCTATATACACCGCACGCGGACGACACAT	540		
Query 542	ATATGGCTACGGGCTGCATACAGGTTATGTTGGCATCCGCGGTAAATAGCGCTGGA	601		
Sbjct 541	ATATGGCTACGGGCTGCATACAGGTTATGTTGGCATCCGCGGTAAATAGCGCTGGA	600		
Query 602	TACTCCCCAAATGGCCAGTTACCGATGCCCGAGCCATCAGCGTTGTGCGCA-TCG-C	659		
Sbjct 601	TACTCCCCAAATGGCCAGTTACCGATGCCCGAGCCATCAGCGTT-TGCGCAATCGCC	659		
Query 660	AGGCCAATATCCAGACTACCCCGAG 686			
Sbjct 660	AGGCCAATATCCAGACA-ACACCCAG 685			

شکل ۱۰- بلاست توالی ژن *coxB* باکتری‌های قرار گرفته و

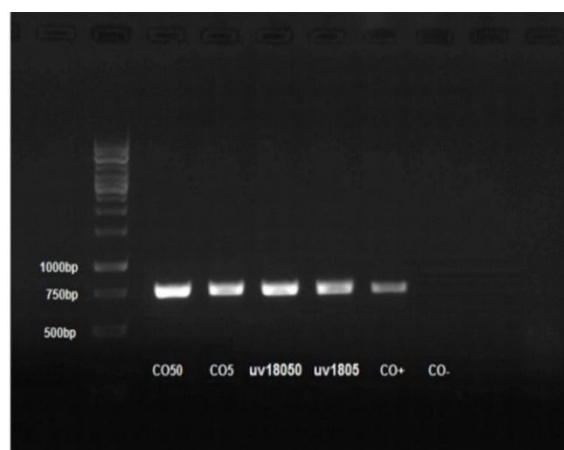
قرار نگرفته در معرض UV

طبق نتایج بلاست و تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار بیوایت مشخص شد UV هیچ اثر جهش‌زایی روی توالی ژن *coxB* نداشته است.

ژن *coxB* کدکننده زیرواحد CoxB II سیتوکروم اکسیداز نوع aa3 است. سیتوکروم اکسیداز نوع aa3 پروتئین انتهایی زنجیره انتقال الکترون باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس است که از چهار زیرواحد تشکیل شده است. پژوهش‌های انجام‌شده درباره این پروتئین به علت موقعیت خاص و فرورفتن آن در غشا و مشکل دسترسی آسان به آن اندک بوده و این پروتئین

باکتری جهش‌یافته دارای بازدهی بیشتری نسبت به فروشویی زیستی در حضور مخلوط آنها پیش از جهش است (۴۶)؛ بنابراین، نتایج دو پژوهش یادشده با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارند و هر سه نتیجه تأییدکننده بهبود فرایند فروشویی زیستی توسط باکتری قرار گرفته در معرض تابش UV است. استفاده از UV روش مؤثری است که به‌طور مکرر برای ایجاد جهش استفاده می‌شود. بازهای پیریمیدین دارای قدرت جذب UV هستند و وقتی اشعه UV را جذب کنند تیمین‌های دوتایی همسایه در زنجیره DNA تشکیل دایمر تیمین می‌دهند که باعث جهش می‌شود (۴۶).

بررسی نتیجه الکتروفورز: ژن *coxB* با توجه به تعداد جفت بازهای آن بایستی در ناحیه ۷۵۰ جفت باز ظاهر شود. طبق نتایج الکتروفورز (شکل ۹) ظاهر شدن باندها در موقعیت تقریبی ۷۲۰ جفت باز نشان‌دهنده درستی انجام PCR است. همچنین ظاهر شدن باندهای مربوط به ژن‌های *coxB* باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در یک ناحیه نشان‌دهنده یکسانی و ایجاد نشدن جهش در این ژن‌ها پس از تابش UV است.



شکل ۹- ژل الکتروفورز محصولات PCR با آغازگر ویژه برای ژن *coxB* استخراج‌شده از باکتری‌های قرار گرفته و قرار نگرفته در معرض UV در چگالی پالپ‌های ۵ و ۵۰ درصد

References

- (1) Choi M-S., Cho K-S., Kim D-S., Ryu H-W. Bioleaching of uranium from low grade black schists by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21(3): 377-380.
 - (2) Torma AE. Biotechnology applied to mining of metals. *Biotechnology Advances* 1983; 1(1): 73-80.
 - (3) Bosecker K. Microbial leaching in environmental clean-up programmes. *Process Metallurgy* 1999; 9: 533-536.
 - (4) Bruynesteyn A. Mineral biotechnology. *Journal of Biotechnology* 1989; 11(1): 1-10.
 - (5) Dwivedy K., Mathur A. Bioleaching- our experience. *Hydrometallurgy* 1995; 38(1): 99-109.
 - (6) Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 1997; 20(3-4): 591-604.
 - (7) Willner J., Fornalczyk A. Extraction of metals from electronic waste by bacterial leaching. *Environment Protection Engineering* 2013; 39(1): 197-208.
 - (8) Munoz J., Gonzalez F., Blazquez M., Ballester A. A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I: A review of the bacterial leaching in the treatment of uranium ores. *Hydrometallurgy* 1995; 38(1): 39-57.
 - (9) Munoz J., Ballester A., Gonzalez F., Blazquez M. A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part II: Orbital shaker experiments. *Hydrometallurgy* 1995; 38(1): 59-78.
 - (10) Agate A. Recent advances in microbial mining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1996; 12(5): 487-495.
 - (11) Vera M., Schippers A., Sand W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation- part A. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97(17): 7529-7541.
- تاکنون از نظر ساختمانی و عملکردی به طور دقیق بررسی نشده است. سیتوکروم اکسیداز نوع aa3 از باکتری/اسیدی تیوباسیلوس فرواکسیدانس ۲۳۲۷۰ تخلیص جزئی شده (۴۷) و مشخص شده است دارای فعالیت سولفیت اکسیدازی است (۴۸).
- ### نتیجه گیری کلی
- (۱) میزان استخراج اورانیوم در چگالی پالپ ۵ درصد نسبت به چگالی پالپ ۵۰ درصد بیشتر بود. قرارداد باکتری/اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 در معرض UV سرعت فروشویی زیستی اورانیوم در چگالی پالپ ۵ درصد را افزایش داد و میزان بازدهی فروشویی زیستی در چگالی پالپ ۵۰ درصد را ابقا کرد.
 - (۲) در روش ارائه شده در مطالعه حاضر، اشعه UV هیچ گونه اثر جهش‌زایی روی توالی ژن *coxB* باکتری/اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 نداشت.
 - (۳) سازوکارهای احتمالی تأثیر UV روی باکتری/اسیدی تیوباسیلوس سویه FJ2 که به بهبود فرایند فروشویی زیستی اورانیوم در حضور این باکتری منجر می‌شوند عبارتند از:
 - تأثیر UV روی باکتری از طریق تأثیر و ایجاد جهش در نواحی تنظیمی مربوط به ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در فرایند فروشویی زیستی در باکتری و تأثیر بر میزان بیان این ژن‌ها؛
 - تأثیر اشعه UV بر ساختمان و عملکرد پروتئین‌های دخیل در فرایند فروشویی زیستی از طریق ایجاد جهش در mRNA مربوط به این پروتئین‌ها؛
 - این احتمال وجود دارد که اشعه UV از طریق افزایش تعداد سلول‌های باکتریایی باعث بهبود فروشویی زیستی اورانیوم شود اما اثبات هر یک از این پیشنهادها یادشده نیازمند مطالعه‌های آتی است.

- (12) Johnson DB., Hallberg KB. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 2003; 154(7): 466-473.
- (13) Baranska JA., Sadowski Z. Bioleaching of uranium minerals and biosynthesis of UO₂ nanoparticles. *Physicochemical Problems of Mineral Processing* 2013; 49(1): 71-79.
- (14) Fatemi F., Rashidi A., Jahani S. Isolation and identification of native sulfuroxidizing bacterium capable of uranium extraction. *Progress in Biological Sciences* 2015; 5(2): 207-221.
- (15) 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. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65(11): 4781-4787.
- (16) Yarzabal A., Brasseur G., Ratouchniak J., Lund K., Lemesle-Meunier D., DeMoss JA., et al. The high-molecular-weight cytochrome c C_{yc2} of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology* 2002; 184(1): 313-317.
- (17) Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 1995; 376: 660-669.
- (18) Lappalainen P., Watmough NJ., Greenwood C., Saraste M. Electron transfer between cytochrome c and the isolated CuA domain: identification of substrate-binding residues in cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 1995; 34(17): 5824-5830.
- (19) Patra MC., Pradhan SK., Rath SN., Maharana J. Structural analysis of respirasomes in electron transfer pathway of *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a computer-aided molecular designing study. *ISRN Biophysics* 2013; 2013: 1-14.
- (20) Xia L., Zeng J., Ding J., Yang Y., Zhang B., Liu J., et al. Comparison of three induced mutation methods for *Acidithiobacillus caldus* in processing sphalerite. *Minerals Engineering* 2007; 20(14): 1323-1326.
- (21) 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(8): 870-875.
- (22) Fatemi F., Arabieh M., Jahani S. Application of response surface methodology to optimize uranium biological leaching at high pulp density. *Radiochimica Acta* 2016; 104(4): 239-246.
- (23) Zeng L., Huang J., Zhang Y., Qiu G., Tong J., Chen D., et al. An effective method of DNA extraction for bioleaching bacteria from acid mine drainage. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 79(5): 881.
- (24) Chen P., Xu R., Yan L., Wu Z., Wei Y., Zhao W., et al. Properties of realgar bioleaching using an extremely acidophilic bacterium and its antitumor mechanism as an anticancer agent. *Biological Research* 2017; 50(1): 17.
- (25) Khan S., Haq F., Hasan F., Saeed K., Ullah R. Growth and biochemical activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* collected from black shale. *Journal of Microbiology Research* 2012; 2(4): 78-83.
- (26) Yuan X-w., Xie X-h., Fan F-x., Zhu W-x., Na L., Liu J-s. Effects of mutation on a new strain *Leptospirillum ferriphilum* YXW and bioleaching of gold ore. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2013; 23(9): 2751-2758.
- (27) Neely WB. Action of formaldehyde on microorganisms III. Bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde on *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 1963; 86(3): 445-448.
- (28) Karamanev D., Nikolov L., Mamatarikova V. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and

- ferrous ions in drainage waters and similar solutions. *Minerals Engineering* 2002; 15(5): 341-346.
- (29) Pal S., Pradhan D., Das T., Sukla L., Chaudhury GR. Bioleaching of low-grade uranium ore using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Indian Journal of Microbiology* 2010; 50(1): 70-75.
- (30) Fatemi F., Miri S., Jahani S. Effect of metal sulfide pulp density on gene expression of electron transporters in *Acidithiobacillus* sp. FJ2. *Archives of Microbiology* 2017; 199(4): 521-530.
- (31) Abdollahy M., Shojaosadati SA., Zare Tavakoli H., Valivand A. Bioleaching of low grade uranium ore of Saghand mine. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)* 2011; 30(4): 71-79.
- (32) Abhilash BD. Pandey. Role of ferric ions in bioleaching of uranium from low tenor Indian ore. *Canadian Metallurgical Quarterly* 2011; 50(2): 102-112.
- (33) Pradhan D., Kim DJ., Ahn JG., Lee SW. Microbial leaching process to recover valuable metals from spent petroleum catalyst using iron oxidizing bacteria. *World Academy Science, Engineering Technology* 2010; 38: 495-499.
- (34) Li H-M., Ke J-J. Influence of Cu^{2+} and Mg^{2+} on the growth and activity of *Ni*²⁺ adapted *Thiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 2001; 14(1): 113-116.
- (35) Ginn T., Sengor SS., Barua S., Moberly J., Peyton B. Metal toxicity effects on microbial growth and degradation. In: *Slovenia and US Workshop on Environmental Science and Engineering*. Ljubljana: Slovenia; 2006: 39-40
- (36) Rossi G. *Biohydrometallurgy*. New York: McGraw-Hill Companies; 1990.
- (37) Gomez E., Ballester A., Gonzalez F., Blazquez M. Leaching capacity of a new extremely thermophilic microorganism, *Sulfolobus rivotincti*. *Hydrometallurgy* 1999; 52(3): 349-366.
- (38) Yu R-l., Tan J-x., Gu G-h., Hu Y-h., Qiu G-z. Mechanism of bioleaching chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in agar-simulated extracellular polymeric substances media. *Journal of Central South University of Technology* 2010; 17(1): 56-61.
- (39) Liang G., Tang J., Liu W., Zhou Q. Optimizing mixed culture of two acidophiles to improve copper recovery from printed circuit boards (PCBs). *Journal of Hazardous Materials* 2013; 250: 238-245.
- (40) Umanskii AB., Klyushnikov AM. Bioleaching of low grade uranium ore containing pyrite using *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2013; 295(1): 151-156.
- (41) Abhilash BD. Pandey. Microbially assisted leaching of uranium- A review. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* 2013; 34(2): 81-113.
- (42) Cabral T., Ignatiadis I. Mechanistic study of the pyrite- solution interface during the oxidative bacterial dissolution of pyrite (FeS_2) by using electrochemical techniques. *International Journal of Mineral Processing* 2001; 62(1-4): 41-64.
- (43) Tuovinen OH., Hsu JC. Effect of pH, iron concentration, and pulp density on the solubilization of uranium from ore material in chemical and microbiological acid leach solutions: Regression equation and confidence band analysis. *Hydrometallurgy* 1984; 12(2): 141-149.
- (44) Shafia F., Wilkinson RF. Growth of *Ferrobacillus ferrooxidans* on organic matter. *Journal of Bacteriology* 1969; 97(1): 256-260.
- (45) Fu K., Lin H., Luo D., Jiang W., Zeng P. Comparison of bioleaching of copper sulphides by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *African Journal of Biotechnology* 2014; 13(5): 664-672.
- (46) Xu A-L., Xia J-L., Zhang S., Yu Y., Nie Z-Y., Qiu G-Z. Bioleaching of chalcopyrite by UV-induced mutagenized *Acidiphilium*

cryptum and *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
Transactions of Nonferrous Metals Society of China 2010; 20(2): 315-321.

(47) Taha TM., Kanao T., Takeuchi F., Sugio T. Reconstitution of iron oxidase from sulfur-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(21): 6808-6810.

(48) Sugio T., Ako A., Takeuchi F. Sulfite oxidation catalyzed by aa3-type cytochrome c oxidase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2010; 74(11): 2242-2247.

¹- *Acidithiobacillus*

²- Inductively coupled plasma

³- Pal

⁴- Jaduguda

⁵- Fatemi

⁶- Jahani

⁷- Abdollahy

⁸- Abhilash

⁹- Pandey

¹⁰- Ginn

¹¹- Jarosite

¹²- Yingbo

¹³- *Acidithiobacillus ferrooxidans* GF

¹⁴- *Acidiphilium cryptum* DX1-1