

## تأثیر غلظت‌های مختلف کانسنگ اورانیوم در فرآیند بیولیچینگ از طریق آنالیز بیان ژن

سیتوکروم *AI* باکتری *اسیدیتیبوباسیلوس* گونه *FJ2*سمانه جهانی<sup>۱</sup>، فائزه فاطمی<sup>۲\*</sup> و سبا میری<sup>۳</sup><sup>۱</sup> قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی<sup>۲</sup> تهران، سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای<sup>۳</sup> تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده زیست‌شناسی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۸

## چکیده

فرایند اکسیداسیون و احیاء کانسنگ اورانیوم توسط باکتری *اسیدیتیبوباسیلوس فرواکسیدانس*، با کمک زنجیره انتقال الکترون انجام می‌گیرد که یکی از مهم‌ترین اجزاء این زنجیره که در فرایند اکسیداسیون آهن دخیل است، ژن *cydA* می‌باشد. در این پروژه، جهت افزایش راندمان بیولیچینگ اورانیوم، بیان ژن *cydA* در باکتری *اسیدیتیبوباسیلوس فرواکسیدانس* در حضور چگالی‌های مختلف از کانسنگ اورانیوم، بررسی شده است. بدین منظور، باکتری مورد نظر در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از کانسنگ اورانیوم (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵٪)، کشت داده شد. سپس در توالی‌های ۲۴ ساعته میزان استخراج اورانیوم، تغییرات pH، Eh و آهن فریک آنها اندازه‌گیری شد. زمانی که بازده استخراج اورانیوم به ۱۰٪ رسید، بیان ژن *cydA* باکتری با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد، با افزایش میزان چگالی پالپ، سرعت استخراج اورانیوم و فعالیت اکسیداسیونی باکتری کاهش پیدا می‌کند. همچنین، بیان ژن *cydA* در حضور کانسنگ اورانیوم به نسبت نمونه عاری از کانسنگ افزایش یافته و با افزایش بیشتر چگالی پالپ، به دلیل سمیت اورانیوم، روند کاهشی مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از آزمایشات نشان می‌دهد تغییرات pH، Eh و استخراج اورانیوم در فرآیند بیولیچینگ توسط باکتری *اسیدیتیبوباسیلوس* با چگالی پالپ بالای کانسنگ نسبت به باکتری‌های کشت یافته با چگالی پالپ پایین‌تر به تأخیر افتاده است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *cydA* باکتری در غلظت‌های مختلف کانسنگ نشان داد که غلظت کانسنگ بر روی بیان ژن مذکور مؤثر بوده است.

واژه‌های کلیدی: باکتری *اسیدیتیبوباسیلوس فرواکسیدانس*، سیتوکروم *AI*، اکسیداسیون آهن، بیولیچینگ اورانیوم\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۲۱۶۶۹۰، پست الکترونیکی: [ffatemi@aeoi.org.ir](mailto:ffatemi@aeoi.org.ir)

## مقدمه

کانسنگ معدن وجود دارند و به طور معمول باطله در نظر گرفته می‌شوند، را فراهم می‌کند. این فرایند بسیار مهم است و تا حد زیادی به ارزش فلزی که بازیابی می‌شود بستگی دارد (۳۱). استخراج اورانیوم از کانسنگ‌های معدنی کم عیار و پسماندهای هسته‌ای، از نظر تولید انرژی هسته‌ای حایز اهمیت است. اکسید اورانیوم چهار ظرفیتی

بیولیچینگ، فرآیندی را توصیف می‌کند که در آن انحلال فلزات از منبع معدنی آنها، توسط میکروارگانیسم‌های طبیعی معینی، صورت می‌گیرد (۷). در این فرآیند، باکتری‌های اکسیدکننده فلزات با واکنش‌های اکسیداسیون، باعث بازیابی فلزات از کانسنگ کم عیار می‌شوند. به علاوه، امکان بازیابی فلزات، حتی فلزاتی که به میزان کمی در

انتقال الکترون، کمپلکس  $bc_1$  الکترون‌ها را از یک سیتوکروم  $c$  دریافت نموده و آنها را به کوئینون پول منتقل می‌نماید (۱۹). نوع این سیتوکروم، سیتوکروم  $c_4$  پیشنهاد شده است که توسط ژن  $cycA1$  کد می‌شود (۸ و ۳۰). از آنجائیکه در بیولیچینگ مهمترین واکنشی که باکتری در آن دخیل می‌باشد، اکسیداسیون آهن فرو می‌باشد (۲۴، ۱۳) و به علاوه، چگالی پالپ در فرایند فروشویی زیستی تأثیر بسیار زیادی در فعالیت باکتری‌ها دارد (۳۹)، بررسی ژنهای دخیل در این مسیر و تأثیر چگالی پالپ بر آنها حائز اهمیت فراوانی می‌باشد. در واکنش اکسیداسیون آهن فرو، بیان ژن  $cycA1$  به عنوان اولین آنزیم در مسیر تولید NADH در زنجیره انتقال الکترون است. بنابراین، یکی از اهداف اصلی در این پروژه، چگالی پالپ‌های کانسنگ اورانیوم مختلف بر روی بیان این ژن است. قابل ذکر است که تاکنون بیان این ژن در چگالی پالپ‌های مختلف کانسنگ اورانیوم مورد بررسی قرار نگرفته است.

### مواد و روشها

**کانسنگ مورد استفاده در تحقیق:** کانسنگ استفاده شده در این تحقیق، از معدن ساغند (آنومالی ۲ ساغند) با اندازه  $106\mu\text{m}$  انتخاب گردید (۱۶). کانسار اورانیوم ساغند در شمال شرقی استان یزد و در فاصله ۱۸۵ کیلومتری شهرستان یزد و در منطقه ای به طول جغرافیائی "۳۰' ۵۵°۲۵ و عرض ۳۰' ۳۰°۳۲ در کویر مرکزی ایران قرار گرفته است. به منظور اطلاع از ترکیبات شیمیایی نمونه، کانسنگ خرد شده برای آنالیز XRF ارسال گردید.

**سازگار کردن باکتری اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس با غلظت های متفاوت پودر کانسنگ اورانیوم:** باکتری بومی اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس اس. پی FJ2 (۴۲)، در محیط کشت اختصاصی ۹K، تلقیح گردید. ترکیبات تشکیل دهنده این محیط کشت در جدول ۱ نشان داده شده است. سپس، با استفاده از اسید سولفوریک ۱۰ نرمال، سود ۱۰ نرمال و دستگاه pH متر (Metrohm827)، pH محیط کشت

( $\text{UO}_2$ ) که در کانسنگ وجود دارد، نامحلول می‌باشد که این ماده را می‌توان به وسیله اکسیداسیون شیمیایی با یون فریک بصورت اورانیوم ۶ ظرفیتی که محلول است، درآورد. البته، دستیابی به این اکسیدکننده‌ها هزینه زیادی را در بر دارد که می‌توان با استفاده از باکتری اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس با هزینه کمتری، اکسیدکننده‌ای مانند آهن فریک را تولید کرد (۲۳).

اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس (با نام سابق تیوباسیلوس فرواکسیدانس) اولین بار در سال ۱۹۴۷ توسط Kolmer و Hinkel از آب اسیدی یک معدن ذغال کانسنگ جدا شد و اولین میکروارگانیسم اکسیدکننده سولفید فلزی است که خصوصیاتش شرح داده شده و بیشترین مطالعات مربوط به آن می‌باشد (۱۲). این باکتری، یک شیمیولیتواتوتروف است که از انرژی حاصل از اکسیداسیون مواد معدنی شامل آهن و گوگرد برای رشد استفاده می‌کند (۳۶). به علاوه، یکی از معدود میکروارگانیسم‌هایی است که انرژی خود را از طریق اکسیداسیون آهن فرو در محیط‌های اسیدی به دست می‌آورد و از pH پایین محیط طبیعی استفاده می‌کند تا جریان معکوس الکترون، از آهن فرو به NADH را ایجاد کند (۳۷). وجود یک جریان معکوس الکترون از سیتوکروم  $c$ ، از طریق سیتوکروم  $bc_1$  به کوئینون و NAD(P)H دهیدروژناز به صورت واضح در باکتری اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس ATCC19859 شناسایی شده است. همچنین، ویژگی‌های اپرون کدکننده کمپلکس  $bc_1$  مربوط به سویه‌های ATCC19859 و ATCC33020 باکتری اسیدیتیبواسیلوس فرواکسیدانس مشخص شده است. القاء این ژن در باکتریهای اکسیدکننده آهن نسبت به باکتری های اکسیدکننده گوگرد، بیشتر است (۳۰، ۸). این اپرون علاوه بر سه زیرواحد از کمپلکس  $bc_1$  ( $PetA1B1C1$ )، یک سیتوکروم  $c$  ( $CycA1$ ) و یک آنزیم ریبیتول گلوگز دهیدروژناز ( $SdrA1$ ) را کد می‌نماید که عملکرد آخرین پروتئین ناشناخته است (۲۲) و سیتوکروم  $c_4$  کدشده توسط ژن  $cycA1$  نیز شناسایی شده است (۱۸). در مسیر معکوس

شده با آب مقطر pH=2 جبران شد. در نهایت، در هر چگالی پالپ، زمانی که میزان استخراج اورانیوم به ۱۰۰٪ رسید، باکتریها برای بررسی بیان ژن *cycAI* جمع‌آوری شده تا برای فرایند استخراج RNA مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت ۹K

مقادیر	مواد مورد نیاز
۳ g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
۰/۵ g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
۰/۵ g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰/۱ g	KCl
۰/۰۱ g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
۴۴/۷ g	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۱۰۰۰ cc	Distilled Water

**استخراج RNA و ساخت cDNA:** به منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA شرکت Thermo Scientific (#K0731) استفاده گردید. سپس، برای حذف DNA از RNA استخراج شده، از آنزیم DNase شرکت Thermo Scientific استفاده شد. لازم به ذکر می‌باشد که به جهت یکسان بودن غلظت RNA مصرفی در ساخت cDNA، غلظت RNA موجود در نمونه‌های تیمار شده با Dnase، توسط دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000) خوانده شد. در نهایت، میزان معینی از RNA برای ساخت تمامی cDNAها استفاده گردید. برای ساخت cDNA از RNA استخراج شده، از کیت شرکت Thermo Scientific (#K1622) استفاده شد.

**انجام واکنش PCR:** واکنش زنجیره ای پلیمرز و Real time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *cycAI* و *16s* در باکتری *اسیدیتیبویاسیلوس فرواکسیدانس* انجام و محصول آن بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری گردید. پرایمر مورد نظر با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI طراحی و پس از اطمینان، جهت سنتز به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده را نشان می‌دهد.

به روی ۲ تنظیم شد (۴۱، ۱۰). در مرحله بعدی، به میزان ۹۰ میلی لیتر از محیط کشت در داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و ۱۰ میلی لیتر از باکتری *اسیدیتیبویاسیلوس فرواکسیدانس* به آن افزوده گردید (۱۰٪ مایه تلقیح) و در نهایت مجدداً pH محلول بوسیله اسیدسولفوریک ۱۰ نرمال تنظیم شد. سپس، ارلن حاوی باکتری و محیط کشت، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و در انکوباتور شیکر دار با دور همزن ۱۸۰ rpm انکوبه شد (۳۵). در این تحقیق، از غلظت های متفاوت کانسنگ اورانیوم (۰/۵٪، ۱/۰٪، ۲/۵٪) برای سازگاری باکتری استفاده گردید. پس از آماده سازی محیط کشت ۹k (۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع)، تلقیح با باکتری مورد نظر به میزان ۱۰٪ صورت گرفت و محیط کشت با ۰.۵ g/L پپتون، ۱.۰ g/L تریپتیک سوی براث و ۰.۰۱٪ عصاره مخمر غنی گشت (۲۸، ۱۵) (جدول ۱). سپس، به این سوسپانسیون ۲/۵٪ کانسنگ اورانیوم افزوده و در نهایت نمونه در انکوباتور با دمای ۳۵°C و دور همزن ۱۵۰ rpm انکوبه شد (۱۴). زمانیکه استخراج اورانیوم در حضور ۲/۵٪ کانسنگ اورانیوم به صورت کامل انجام شد، باکتری جمع‌آوری شده و به ترتیب در غلظت های بالاتر پودر کانسنگ اورانیوم (که در بالا ذکر شد)، به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت و آزمایشات بیولیچینگ تکرار گردیدند. لازم به توضیح می‌باشد که غلظت باکتری استفاده شده در تمامی غلظت های کانسنگ، ثابت در نظر گرفته شده است (۱×۱۰<sup>۸</sup>).

**نمونه گیری و آنالیز:** در توالی های ۲۴ ساعته، تغییرات pH و Eh اندازه گیری و pH بر روی ۲ تنظیم گشت. میزان آهن فرو با اندازه گیری آهن فریک و آهن کل به روش کالرومتریکی اندازه گیری و محاسبه شد (۲۰). همچنین، برای تعیین زمانی که میزان استخراج اورانیوم به ۱۰۰٪ رسیده است، در توالی های ۲۴ ساعته میزان ۵cc از لیچ-لیکور برداشته شد و با فیلتر ۰/۲ میکرون، فیلتر شد. سپس، محلول حاصل از آن برای آنالیز طیف‌سنجی نشر اتمی ارسال گردید. لازم به ذکر است میزان لیچ‌لیکور برداشته

اطمینان حاصل کردن از عدم آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن، سه کنترل منفی در نظر گرفته شد که میزان الگوی مورد نظر (cDNA) با آب مقطر جایگزین گردید. در نهایت، از چرخه حرارتی ذکر شده در جدول ۳ استفاده و برای محاسبه میزان تغییرات بیان ژن *CycAI* از روش  $\Delta\Delta CT$  استفاده گردید.

جدول ۳- چرخه حرارتی واکنش Real-Time PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
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"	

آنالیز آماری: تفاوت های بین داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین گردید. با استفاده از این نرم افزار P-value داده ها، محاسبه گردید و  $P < 0.05$  به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد.

### نتایج و بحث

استخراج اورانیوم توسط باکتری *اسیدیتوباسیلوس فرواکسیدانس*: نتایج حاصل از آنالیز XRF در جدول ۴ قابل مشاهده می باشد.

جدول ۴- ترکیبات کانسنگ اورانیوم با استفاده از آنالیز XRF (کانسنگ مورد استفاده دارای میزان قابل قبولی اورانیوم جهت فرایند بیولیچینگ می باشد. به علاوه، میزان آهن و گوگرد موجود در سنگ به فعالیت باکتری در زمینه اکسیداسیون آهن و گوگرد کمک شایانی می کند)

MgO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	S	Cl	K <sub>2</sub> O	CaO	TiO <sub>2</sub>	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	JO <sub>2</sub>
19.03	1.49	24.83	0.23	0.75	0.26	0.34	1.03	0.11	0.37	500	49.67	465
Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	Wt %	ppm	Wt %	Ppm

کمتری در بردارد و اثرات زیست محیطی منفی روشهای مرسوم استخراج فلزات را نیز در بر ندارد (۱).

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن توالی پرایمرها (3'→5')

F= GCTCCCTATCTGGTCAAACAACCT *cycAI*  
R= GGTGGAGTCTGGGTAGAGAAGT

F= CCTACGGGAGGCAGCAG *16s*  
R= CGGTGCTTCTTCTGGATTACAG

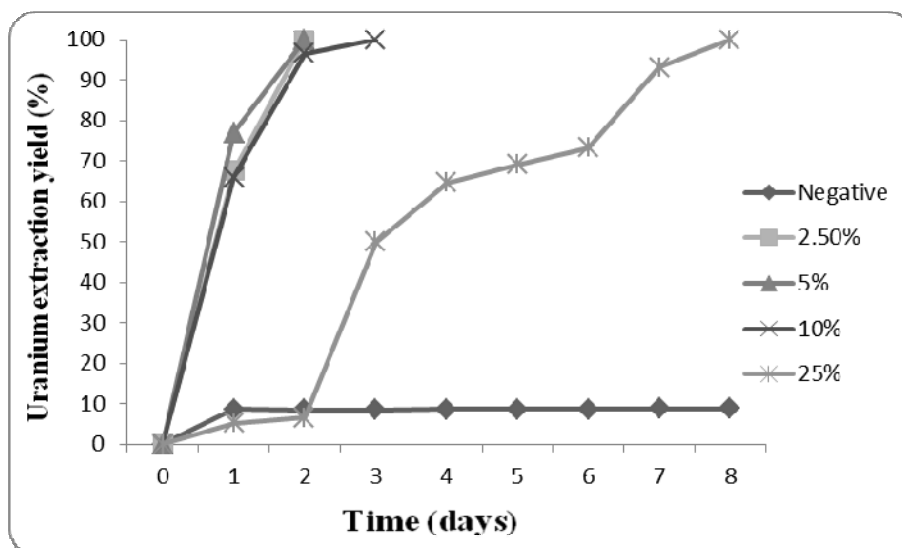
انجام واکنش Real time PCR : واکنش SYBER

با استفاده از پرایمر اختصاصی و کیت مخصوص SYBER Taq<sup>TM</sup> II Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa) انجام پذیرفت. این کیت حاوی تمام مواد لازم برای انجام واکنش PCR (آنزیم Taq، بافر همراه با MgCl<sub>2</sub> و dNTPs) و رنگ سایبرگرین می باشد که به عنوان مستر میکس مورد استفاده قرار می-گیرد. هر واکنش Real time PCR (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر) حاوی ۵ μl مسترمیکس، ۰/۴ μl پرایمرهای Forward و Reverse (جدول ۲)، ۰/۵ μl cDNA، ۰/۲ μl رنگ ROX و ۳/۹ μl آب عاری از Nuclease می باشد. پس از مخلوط کردن مواد مذکور، به جهت اطمینان از صحت انجام واکنش، نمونه های حاوی ژن مورد آزمایش (*CycAI*) و نمونه حاوی ژن کنترل داخلی (۱۶s) در پلیت ها به صورت سه تایی ریخته شد. لازم به توضیح می باشد که ژن کنترل داخلی به جهت نرمالایز کردن تمامی نتایج برای تمام نمونه ها گذاشته شد. نرمالایز کردن برای تصحیح و حذف اختلافها در بازده تکثیر، شرایط تخلیص و مقدار حجم اولیه نمونه می باشد. همچنین، برای

استفاده از باکتریهای اکسیدکننده آهن و گوگرد در بیولیچینگ فلزات موجود در کانیهای سولفیدی، ضمن به کارگیری کانسنگهای کم عیار در استخراج فلزات، هزینه

فرواکسیدانسان در حضور چگالی پالپ ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵٪ از کانسنگ معدن اورانیوم توانسته به ترتیب طی ۲، ۲، ۳ و ۸ روز اورانیوم را به طور کامل (۱۰۰٪) استخراج کند.

فرایند بیولیچینگ اورانیوم برای چگالی‌های پالپ مختلف کانسنگ اورانیوم، در شکل ۱ مشخص شده است، همانطور که مشاهده می‌شود، باکتری *اسیدیتیبوریاسیلوس*



شکل ۱- میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری *اسیدیتیبوریاسیلوس* فرواکسیدانسان در حضور چگالی‌های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم.

توریوم (Th)، اورانیوم (U)، جیوه (Hg) و نقره (Ag) می‌باشند که متابولیت‌های سلول را مهار می‌کنند و اثر سمی برای باکتری‌ها دارند (۷). میزان مقاومت به فلزات سنگین در هر باکتری، به سویه بستگی دارد. تجربه نشان می‌دهد که با اعمال فشار انتخابی بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها برای رشد در حضور یون فلزی، میزان مقاومت آنها به میزان قابل توجهی نسبت به اغلب فلزات افزایش می‌یابد؛ هر چند که ممکن است این فرآیند در برخی موارد زمان زیادی طول بکشد (۳۳).

یکی از دلایل دیگری که در چگالی‌های پالپ‌های پایین، میزان استخراج اورانیوم نرخ بالایی دارد و سریعتر انجام می‌شود این است که  $O_2$  یکی از اساسی‌ترین مواد مغذی برای رشد باکتری‌ها محسوب می‌شود و با افزایش چگالی پالپ میزان  $O_2$  کاهش می‌یابد. در چگالی‌های پالپ‌های پایین، میزان انتقال جرمی اکسیژن بین تولید و مصرف آن متعادل است در حالی که برای چگالی‌های پالپ‌های بالا نرخ اکسیژن

نتایج این آزمایشات حاکی از آن است که کاهش نرخ استخراج اورانیوم با افزایش چگالی پالپ رخ می‌دهد. به بیان دیگر، هر چه میزان چگالی پالپ افزایش پیدا کند توانایی استخراج اورانیوم رو به کاهش است و مدت زمان بیشتری جهت استخراج کامل نیاز می‌باشد ( $P < 0.05$ ) به طوریکه، باکتری در حضور چگالی پالپ ۲۵٪ توانسته طی ۸ روز، اورانیوم را به طور کامل استخراج کند.

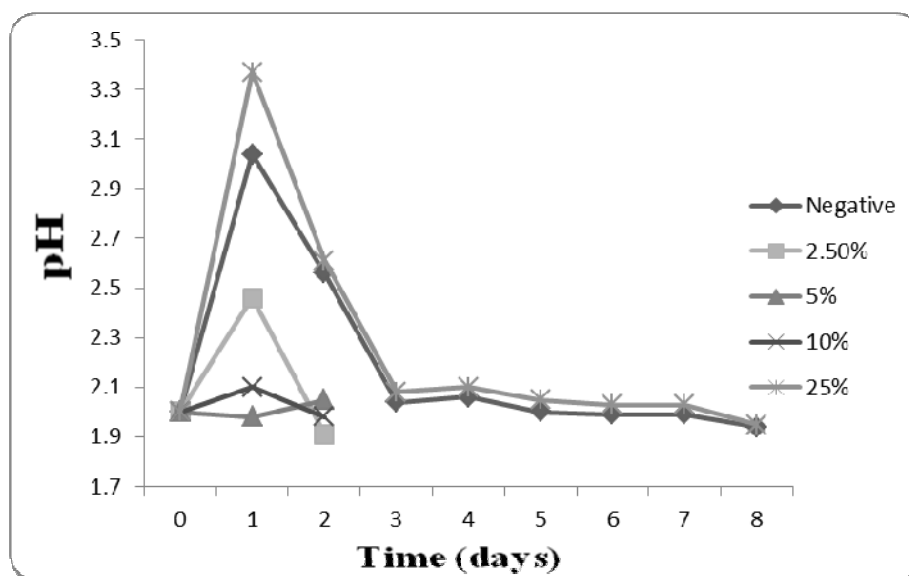
تحقیقات مختلفی نشان داده است که عوامل متعددی بر سرعت و کیفیت فرآیند فروشویی فلزات تاثیر می‌گذارند. برخی از این عوامل با توجه به محدوده عملکرد بهینه خود، باعث مهار یا بهبود فرآیند بیولیچینگ می‌شوند و مواردی نظیر چگالی پالپ و اندازه ذرات، متعلق به فلز درگیر در فرآیند می‌باشند که بر روی فعالیت باکتری تاثیرگذارند (۷). عناصر سنگین به شدت اثر مهاری روی رشد میکروارگانیسم‌ها دارند و می‌توانند برای میکروارگانیسم‌ها مرگ آور باشند. این فلزات شامل

های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد. همانطور که در تحقیقات مختلف نشان داده شده است باکتری مورد بررسی در این مطالعه اسیددوست می‌باشد (۲). در شکل ۲ کاملاً مشخص است که میزان pH در حضور غلظت‌های مختلف از کانسنگ معدن، در روزهای ابتدایی روند افزایشی داشته است. به گونه‌ای که، در چگالی پالپ ۲۵٪ بعد از گذشت یک روز میزان pH به ۳/۴ رسیده که این میزان برای چگالی پالپ‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰٪ به ترتیب ۲/۴۵، ۲ و ۲/۱۱ می‌باشد. با گذشت زمان این روند افزایشی رو به کاهش رفته و میزان pH دارای روند کاهشی شده است. بدین صورت که در روز هشتم در حضور چگالی پالپ ۲۵٪ میزان pH تا ۱/۹۷ کاهش داشته است. لازم به ذکر می‌باشد که این روند در حضور تمامی چگالی پالپ‌های کانسنگ معدن اورانیوم مشاهده شده است.

مورد نیاز با میزان اکسیژن تولید شده طی انتقال آن بین گاز و مایع کمتر می‌باشد (۲۶، ۶).

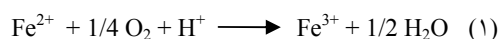
همچنین، در تحقیقاتی مشخص شد که کاهش میزان اکسیژن، سبب کاهش غلظت باکتری‌های مؤثر در فرایند فروشویی زیستی و همین‌طور کاهش غلظت یون فریک و در نهایت کاهش استخراج مس می‌گردد. زمانی که غلظت اکسیژن به کمتر از ۱۵ درصد برسد، رشد باکتری‌ها نیز محدود خواهد شد (۳۸). در این مطالعه نیز با توجه به نتایج استخراج اورانیوم مشاهده می‌شود که با افزایش چگالی پالپ در روند استخراج، کاهش قابل توجهی صورت گرفته است.

**تغییرات pH در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم: تغییرات pH محیط کشت توسط باکتری اسیدیتیبویاسیلوس فرواکسیدانس در حضور غلظت**



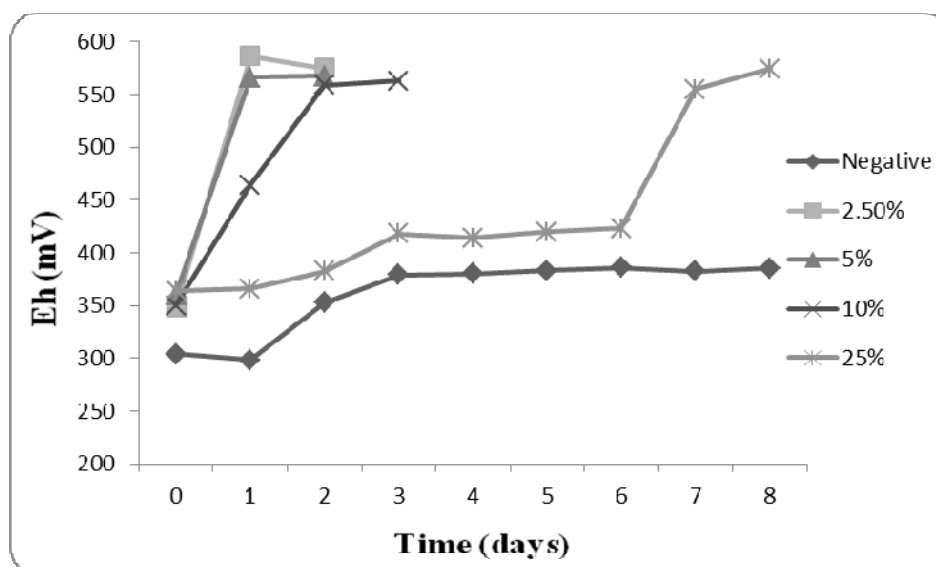
شکل ۲- میزان تغییرات pH توسط باکتری اسیدیتیبویاسیلوس فرواکسیدانس در حضور چگالی پالپ‌های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم.

اکسیداسیون آهن فرو می‌باشد، در این واکنش اکسیژن گیرنده الکترون می‌باشد (۲۱، ۲۷، ۲۹).

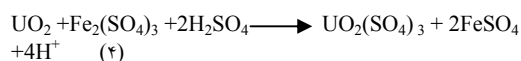
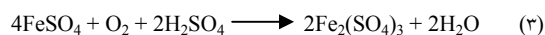


افزایش pH در حضور باکتری اسیدیتیبویاسیلوس فرواکسیدانس را می‌توان درگیر با واکنش‌هایی دانست که مصرف‌کننده اسید هستند (واکنش ۱) (۲۴، ۱۳). مکانیسم اصلی باکتریایی دخیل در انحلال سولفیدهای معدنی،

تغییرات Eh در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم: شکل ۳ میزان تغییرات Eh توسط باکتری اسیدیتئوباسیلوس فرواکسیدانس در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم را نشان می‌دهد. همانگونه که قابل مشاهده است، میزان Eh، با افزایش میزان چگالی پالپ کاهش معنی‌دار پیدا کرده است ( $P < 0.05$ ). به بیانی دیگر، هر چه میزان چگالی پالپ افزایش پیدا کرده، میزان پتانسیل اکسیداسیون و احیا باکتری اسیدیتئوباسیلوس فرواکسیدانس کاهش یافته است. به طور مثال، در روز اول در حضور چگالی پالپ ۲/۵٪ از کانسنگ معدن اورانیوم، میزان Eh به ۵۸۶ میلی‌ولت رسیده است، در حالی که در همین روز، در حضور چگالی پالپ ۲۵٪، میزان Eh ۳۶۶ میلی‌ولت می‌باشد.



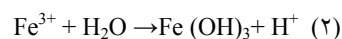
شکل ۳- میزان تغییرات Eh توسط باکتری اسیدیتئوباسیلوس فرواکسیدانس در حضور چگالی پالپ‌های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم.



آهن فریک از اکسیداسیون پیریت که اغلب همراه با کانسنگ معدن اورانیوم است و یا در طی فرآیند بیولیچینگ اضافه می‌گردد، تولید می‌شود. در تحقیقات پیشین نشان داده شده است که مهمترین عامل استخراج اورانیوم در

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

با پیشرفت زمان، میزان آهن فریک در محیط افزایش می‌یابد و این آهن در واکنش‌های هیدرولیزی که منجر به تولید  $\text{H}^+$  می‌شود شرکت می‌کند (واکنش ۲) که این واکنش‌ها می‌توانند باعث کاهش pH محیط در مراحل بعدی فرآیند شوند (۱۳).

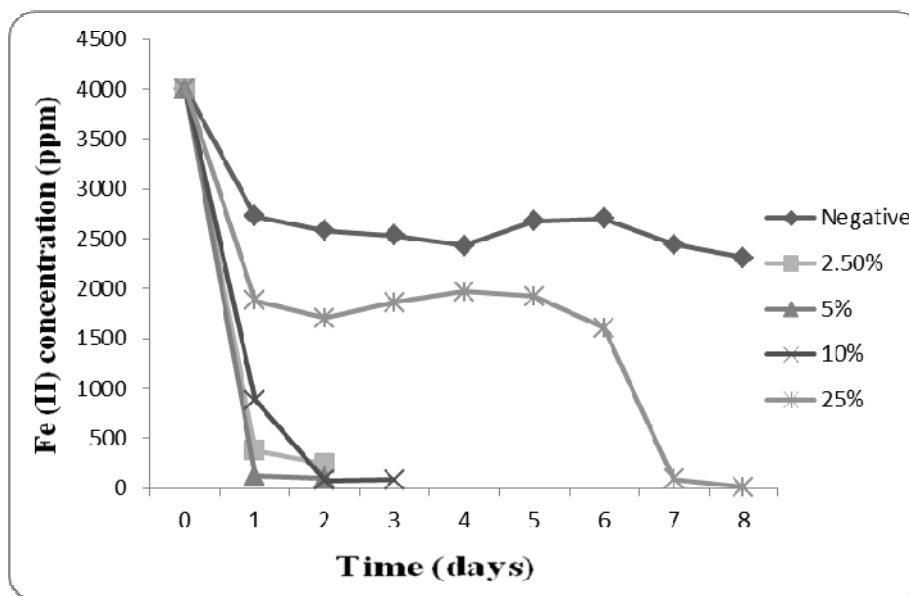


در فروشویی اورانیوم، باکتریها مستقیماً به کانسنگ معدن اورانیوم حمله نمی‌کنند، بلکه این میکروارگانیسم‌ها پیریت و آهن فرو را اکسید می‌کنند و باعث تولید آهن فریک (واکنش ۳) می‌شوند. سپس، آهن فریک براحتی به اورانیوم (IV) که به صورت ترکیب با مواد معدنی وجود دارد حمله می‌کند (واکنش ۴) و آنرا به اورانیوم (VI) که محلول در اسید سولفوریک رقیق است تبدیل می‌کند (۳۴).

تغییرات آهن فرو در حضور چگالی پالپ های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم: شکل ۴ نشان دهنده تغییرات آهن فرو در فرآیند بیولیچینگ اورانیوم توسط باکتری *اسیدیتوباسیلوس فرواکسیدانس* می‌باشد. نتایج حاصل نشان دهنده این است که میزان آهن فرو در حضور کانسنگ اورانیوم با پیشرفت زمان روند کاهشی داشته است و با افزایش میزان چگالی پالپ، روند تغییرات کاهشی با تاخیر انجام شده است ( $P < 0.05$ ). به طوریکه در روز دوم در حضور چگالی پالپ ۲/۵٪ از کانسنگ معدن اورانیوم، میزان آهن فرو به ۲۵۰ ppm رسیده است، در حالی که در همین روز، در حضور چگالی پالپ ۲۵٪، میزان آن ppm ۱۰۷۰۵ می‌باشد.

بیولیچینگ، یون فریک تشکیل شده از اکسیداسیون یون فرو توسط باکتری می‌باشد. بنابراین، افزایش Eh در استخراج اورانیوم دارای نقش تعیین کننده‌ای می‌باشد (۴). چگالی پالپ در فرآیند بیولیچینگ تأثیر بسیار زیادی در فعالیت باکتری‌ها دارد، به این صورت که هر چه چگالی پالپ افزایش یابد، فعالیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد (۳۹)، بنابراین، تاخیر در افزایش Eh در چگالی پالپ‌های بالا را می‌توان اینگونه توضیح داد.

همانطور که در نمودارهای مربوط به تغییرات Eh، قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۳)، در نمونه کنترل منفی به دلیل عدم وجود باکتری در محیط، تغییرات Eh کمتر بوده و افزایش اندک Eh به دلیل اکسیداسیون یون فرو توسط هوا می‌باشد (۴).



شکل ۴- میزان تغییرات آهن فرو توسط باکتری *اسیدیتوباسیلوس فرواکسیدانس* در حضور چگالی پالپ های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم.

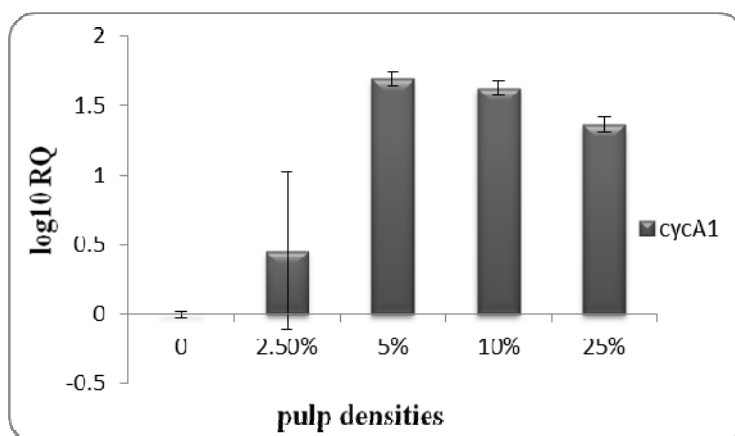
می‌پذیرد. مطالعات و آزمایشات مختلفی در رابطه با تأثیر چگالی پالپ بر روی فرآیند فروشویی زیستی روی و منگنز انجام شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که استخراج روی، در چگالی پالپ ۱ درصد به میزان ۱۰۰ درصد است و اگر چگالی پالپ به ۸ درصد افزایش یابد، میزان استخراج روی به ۲۹/۹ درصد کاهش پیدا می‌کند. در

همانطور که در واکنش ۳ و ۱ قابل مشاهده می‌باشد، باکتری در طی فرآیند بیولیچینگ، آهن فرو را به آهن فریک اکسید می‌کند و به طوریکه میزان آهن فرو محیط کشت با پیشرفت فرآیند کاهش می‌یابد که این کاهش نشان دهنده فعالیت اکسیداسیونی باکتری می‌باشد اما، با افزایش میزان چگالی پالپ، روند تغییرات کاهشی با تاخیر انجام



تغییرات بیان ژن *cycA1* باکتری اسیدتیوباسیلوس *فررواکسیدانس* در حضور چگالی پالپ‌های مختلف از کانسنگ معدن اورانیوم: شکل ۵ نمودار ترسیم شده مربوط به بیان ژن *cycA1* باکتری اسیدتیوباسیلوس *فررواکسیدانس* در حضور غلظت‌های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۵٪ پودر کانسنگ معدن اورانیوم کم عیار ساغند یزد آنومالی ۲) را نشان می‌دهد. همانگونه که از نتایج مشخص می‌باشد، بیان ژن مورد نظر با افزایش میزان چگالی پالپ نسبت به نمونه کنترل (بدون چگالی پالپ) افزایش پیدا کرده است. همچنین، در چگالی پالپ ۵٪ بیشترین میزان بیان ژن و در چگالی پالپ ۲/۵٪ کمترین میزان بیان ژن مشاهده شده است ( $P < 0.05$ ).

رابطه با استخراج منگنز، در چگالی پالپ ۱ درصد، میزان استخراج ۹۴ درصد است و با افزایش چگالی پالپ به ۸ درصد، این میزان به ۲/۵ درصد کاهش می‌یابد که کاهش چشم‌گیری است (۳۹). در این مطالعه نیز با توجه به نتایج استخراج اورانیوم مشاهده می‌شود که با افزایش چگالی پالپ در روند استخراج، کاهش قابل توجهی صورت گرفته است. در نمونه کنترل منفی به دلیل عدم وجود باکتری در محیط، کاهش آهن فرو کمتر از سایر نمونه‌های حاوی باکتری می‌باشد که این کاهش اندک به دلیل اکسیداسیون یون فرو توسط هوا می‌باشد (۴). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که در یک محلول اسیدی که فاقد باکتری است، مقدار آهن فرو ثابت می‌ماند و سرعت فروشویی غیرمستقیم که به واسطه آهن فریک انجام می‌شود، آهسته خواهد بود (۳).



شکل ۵- میزان تغییرات به بیان ژن *cycA1* باکتری اسیدتیوباسیلوس *فررواکسیدانس* در حضور چگالی پالپ‌های مختلف کانسنگ معدن اورانیوم.

عوامل تنشی که از حد آستانه تحمل باکتری بیشتر می‌باشد، روند کاهشی نشان می‌دهند (چگالی پالپ‌های ۱۰ و ۲۵٪) که این تغییرات کاهشی نیز به طور واضح در نتایج استخراج اورانیوم مشهود می‌باشد. به طوریکه، باکتری در چگالی پالپ‌های پائین‌تر (۲/۵ و ۵٪) توانسته اورانیوم را در طی دو روز به طور کامل استخراج کند ولی در چگالی پالپ‌های بالاتر (۱۰ و ۲۵٪) نیاز به روزهای بیشتری برای استخراج کامل اورانیوم دارد.

نتایج حاصل از بیان این ژن (شکل ۵) نشان دهنده این امر است که در فرآیندهای ابتدایی بیولیچینگ که با درصد کانسنگ کمتری آغاز می‌شود، باکتری، سعی در تطبیق خود با محیط دارد و بیان ژن مورد نیاز برای اکسیداسیون آهن بالا می‌رود و با افزایش چگالی پالپ افزایش بیشتری مشاهده می‌شود (از چگالی پالپ ۲/۵ به ۵٪). اما با پیشرفت فرآیند و افزایش بیشتر کانسنگ اورانیوم محیط، ژنهای دخیل در اکسیداسیون آهن در اثر مواجهه شدن با

اند که فعالیت /اسیدیتیبیواسیلوس فرواکسیدانس در معادن اورانیوم در غلظت ۱۲ گرم بر لیتر اورانیوم ( $U_3O_8$ ) می باشد، در حالی که اینز و شوارتز مقدار اورانیوم ۰/۷۵  $Kg/m^3$  را گزارش کرده اند. آقایان تووین و کلی اظهار داشتند سمیت اورانیوم باعث ضعیف شدن پیوند و اتصال بین سطوح و سلولها می شود که در نتیجه باعث کاهش  $CO_2$  و اکسیداسیون یون فرو می گردد. به علاوه، بیان کردند که غلظت های اورانیوم بالای ( $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup>) برای /اسیدیتیبیواسیلوس فرواکسیدانس سمی است (۳۲). در این مطالعه نیز، نتایج نشان می دهد که باکتری تا چگالی پالپ ۵٪ قادر به تحمل سمیت اورانیوم می باشد ولی در چگالی پالپ های بیشتر، سمیت اورانیوم تاثیرات منفی در فعالیت این باکتری دارد.

### نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق حاکی از آن است که تغییرات بیان ژن *cycAI* که نقش مهمی را در فرایند اکسیداسیون آهن و در نتیجه میزان استخراج اورانیوم دارد، در حضور کانسنگ اورانیوم به نسبت نمونه عاری از کانسنگ افزایش می یابد و با افزایش بیشتر چگالی پالپ به دلیل سمیت اورانیوم روند کاهشی نشان می دهد. در نتیجه، با افزایش میزان چگالی پالپ سرعت استخراج اورانیوم و فعالیت اکسیداسیونی باکتری کاهش پیدا می کند و باکتری برای استخراج کامل اورانیوم نیاز به مدت زمان بیشتری دارد.

در طی فرایند اکسیداسیون آهن، *cyc2* الکترون ها را مستقیماً از آهن فرو می پذیرد و با جایگاهی که در غشای خارجی دارد، اولین مرحله در اکسیداسیون آهن فرو را انجام می دهد (۴۰). تصور می شود که این پروتئین یک سوپر کمپلکس تنفسی را شکل می دهند که غشاهای داخلی و خارجی را فرا گرفته و الکترون ها را از آهن (یا پیریت) به اکسیژن منتقل می کند (۵، ۹، ۱۷). بر اساس مطالعات ژنتیکی و متابولیکی، مشخص شد که الکترون های حاصل از اکسایش آهن فرو از طریق *cyc2* به راستی سیانین منتقل می شوند. از آنجا، برخی الکترون ها مسیر سرازیری الکترون را از طریق سیتوکروم *cycI* به سیتوکروم اکسیداز *aa3* طی کرده و برخی نیز مسیر سربالایی الکترون را طی می کنند که در این مسیر، دهنده عمومی الکترون، یعنی NADH توسط جریان معکوس الکترون از طریق سیتوکروم *cycAI* (اولین گیرنده سربالایی) به کمپلکس *bc1* و سپس به منبع یوبی-کینون و در نهایت NAD دهیدروژناز، تولید می شود (۳۶).

از سوی دیگر، افزایش بیان این ژن در حضور چگالی پالپ کانسنگ اورانیوم یک مکانیسم برای تولید NADH از طریق انتقال الکترون از Fe(II) به NAD(P) می باشد که باکتری را قادر به مواجهه با عوامل تنش زای اکسیداتیو می کند، زیرا NADH برای این مبارزه در مقابل عوامل تنشی مثل اورانیوم، ضروری می باشد (۱۱).

همچنین، سمیت اورانیوم برای /اسیدیتیبیواسیلوس فرواکسیدانس توسط محققان زیادی بررسی شده است. آقایان دان کن و بروینستین در طی تحقیقاتی مشاهده کرده

### منابع

باکتریهای اکسید کننده گوگردی جدا سازی شده از خاک معدن مس و شناسایی مولکولی آنها بر اساس توالی 16S rRNA. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۳۰ (۱).

۱. نقوی، ه.، سام، ع و سالاری، ح. ۱۳۹۴. امکان سنجی پیریت زدایی از زغالسنگ با استفاده از بیوفلوتاسیون. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۸ (۳). ۴۳۰-۴۳۷.

۲. مهدی صادقی پور مروی، احمد علی پوربابایی، حسینعلی علیخانی، احمد حیدری، زهرا منافی. ۱۳۹۶. ارزیابی عملکرد

Alternate Uranium Ore Processing Technology for India". Energy Procedia. 7, 158-162.

3. Abhilash S, Mehta K.D, Kumar V, Pandey B.D, Tamrakar P. K. 2010. "Bioleaching - An

4. Akcil A. 2004. "Technical note: potential bioleaching developments towards commercial reality". *Minerals Engineering*. 17, 477–480.
5. Appia-Ayme C, Guilian N, Ratouchniak J, Bonnefoy V. 1999. "Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa3-type cytochrome oxidase and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020". *Appl Environ Microbiol*. 65, 4781–4787.
6. Boon M, Heijnen J.J. 1998. Gas-liquid mass transfer phenomena in biooxidation experiments of sulphide minerals: a review of literature data. *Hydrometallurgy*. 48:187-204.
7. Brandl H. 2008. "Microbial leaching of metals". Wiley-VCH. 8.
8. Bruscella P. 2004. Etude des opérons *petI* et *petII* codant pour deux complexes *bc1* chez la bactérie acidophile chimioautotrophe stricte *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II.
9. Castelle C, Guiral M, Malarte G, Ledgham F, Leroy G, Brugna M, Giudici-Orticoni M.T. 2008. A new iron-oxidizing/O<sub>2</sub>-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biol Chem*. 283:25803–25811.
10. Chen P, Yan L, Wang Q, Li Y, Li H. 2012. "Surface alteration of realgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*" *International microbiology*. 15: 9-15.
11. Dekker L, Arsene-Ploetze F, Santini J.M. 2016. Comparative proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in the presence and absence of uranium. *Research in Microbiology*. 167:234–239.
12. Donati E. R, Sand W. 2007. "Microbial processing of metal sulfides". 151-168.
13. Dong Y, Lin H, Wang H, Mo X, Fu K, Wen H. 2011 "Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings" *Minerals Engineering*. 24: 870–875.
14. Fatemi F, Arabieh M, Jahani S. 2016. Application of response surface methodology to optimize uranium biological leaching at high pulp density. *Radiochimica Acta*. 104 (4): 239–246.
15. Fatemi F, Jahani S, Miri S. 2017. The effect of peptone and Tryptic Soy Broth (TSB) on uranium bioleaching efficiency. In local language, In press.
16. Fatemi F, Rashidi A, Jahani S. 2015. Isolation and Identification of Native Sulfur-Oxidizing Bacterium Capable of Uranium Extraction. *Journal of Science University of Tehran. Progress in Biological Sciences*. 5:207–221.
17. Fukumori Y, Yano T, Sato A, Yamanaka T. 1988. "FeII oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*". *FEMS Microbiology*. 20, 169–172.
18. Giudici-Orticoni M. T, Leroy G, Nitschke W, Bruschi M. 2000. Characterization of a new dihemic c4-type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry*. 39: 7205–7211.
19. Griesbeck C, Hauska G, Schütz M. 2000. Biological sulfide oxidation: sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. In: Pandalai SG (ed) *Recent research developments in microbiology*. Research Signpost, Trivandrum. 4: 179–203.
20. Karamanev D.G, Nikolov L.N, Mamartarkova V. 2002. "Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions" *Mineral Engineering*. 15 (5): 341–346.
21. Kupka D, Kupsa'kova' I. 1999. "Iron(II) oxidation kinetics in *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metals". In: *Amils, R., Ballester, A. (Eds.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, Part A*, Elsevier Press, Amsterdam. 387–396.
22. Levican G, Bruscella P, Guacunano M, Inostrza C, Bonnefoy V, Holmes D, Jedlicki E. 2002. Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*. 184: 1498–1501.
23. McCready R.G.L, Gould W.B. 1990. "Bioleaching of uranium". In: Ehrlich HL, Brierley CL (eds) *Microbial mineral recovery. McGraw-Hill*, New York. 107–125.
24. Meruane G, Vargas T. 2003. "Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0". *Hydrometallurgy*. 71 (1–2), 149–158.
25. Meruane G, Vargas T. 2003. "Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0". *Hydrometallurgy*. 71 (1–2), 149–158.
26. Moon-Sung C, Kyung-Suk C, Dong-Su K, Hee-Wook R. 2005. Bioleaching of uranium from low grade black schists by *Acidithiobacillus*

- ferrooxidans*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21:377-380.
27. Nakamura K, Noike T, Matsumoto J. 1986. "Effect of operation conditions on biological Fe<sup>2+</sup> oxidation with rotating biological contactors". Water Resources. 20 (1), 73–77.
  28. Patel M, Tipre D, Dave S. 2011. "Isolation, identification, characterization and polymetallic concentrate leaching studies of tryptic soy- and peptone-resistant thermotolerant *Acidithiobacillus ferrooxidans* SRDSM2". Bioresource Technology. 102, 1602–1607.
  29. Pesic B, Oliver D.J, Wichlacz P. 1989. "An electrochemical method of measuring the oxidation rate of ferrous iron to ferric iron in presence of *Thiobacillus ferrooxidans*". Biotechnol. Bioengineering. 33, 428–439.
  30. Quatrini R, Appia-Ayme C, et al. 2005. Global analysis of the ferrous iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarrays transcriptome profiling. In: Harrison STL, Rawlings DE, Petersen J (eds) 16th international biohydrometallurgy symposium proceedings, Cape Town. 761–771.
  31. Rawlings D.E. 2004. Microbially assisted dissolution of minerals and its use in the mining industry, Pure and Applied Chemistry. 76: 847–859.
  32. Rossi G. 1990. "Biohydrometallurgy". McGraw-Hill, Hamburg.
  33. Sand W, Gehrke T, Hallmann R, Schippers A. 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism – critical evaluation of bacterial leaching. App Microbiol Biotechnol. 43:961–966.
  34. Sapsford D.J, Bowell R.J, Geroni J.N, Penman K.M, Dey M. 2012. "Factors influencing the release rate of uranium, thorium, yttrium and rare earth elements from a low grade ore". Minerals Engineering. 39, 165–172.
  35. Shahroz K, Faizul H, Fariha H, Kausar S, Rahat U. 2012. "Growth and Biochemical Activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* Collected from Black Shale" Journal of Microbiology Research. 2(4): 78-83.
  36. Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson R, Tettelin H, Blake R, Eisen J, Holmes D. 2008a. "*Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications". BMC genomics. 9:597.
  37. Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Holmes D.S. 2008b. "Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology". Hydrometallurgy. 94, 180–184.
  38. Witne J, Philips A. 2001. "Bioleaching of Ok Tedi copper concentrator oxygen and carbon dioxide-enriched air". Minerals Engineering. 14, 25-48.
  39. Xin B, Jiang W, Li X, Zhang K, Liu C, Wang R, Wang Y. 2012. "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. 112, 186-192.
  40. Yarzabal A, Brasseur G, Ratouchniak j, lund k, lemesle-meunier d. 2002. "The high-molecular-weight cytochrome c Cys2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein". J Bacteriology. 184, 313–317.
  41. Zhang Y, Qin W, Wang J, Zhen S, Yang C, Zhang J, Nai S, Qiu G. 2008. "Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture" Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 18: 1491-1496.
  42. Jahani S, Fatemi F, Firoz-e-zare M.A, Zolfaghari M.R. 2015. "Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain FJS from Ramsar, Iran" Electronic Journal of Biology. 11(4), 138-146.

## Effect of different uranium ore concentration in the bioleaching process by analysis of *Acidithiobacillus* sp. FJ2 cytochrome A1 gene expression

Jahani S.<sup>1</sup>, Fatemi F.<sup>2</sup> and Miri S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Dept., Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> Biotechnology Dept., Faculty of Life Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

The iron and sulfur oxidation process in *Acidithiobacillus ferrooxidans* is performed using an electron transport chain, which *cycA1* as the most important component. Regarding the importance of this protein in the bioleaching process, the study of *Acidithiobacillus ferrooxidans cycA1* gene in the presence of different pulp densities is the one of the main objectives to increase the efficiency of uranium bioleaching. For this purpose, the bacteria cultivated in the presence of different pulp densities of uranium ore (2.5, 5, 10 and 25%). Uranium extraction, variation of pH, Eh and ferrous iron values measured at 24 h intervals. Then, when the uranium extraction yield reached to 100%, gene expressions of *cycA1 Acidithiobacillus ferrooxidans* were analyzed. The results showed, with increasing pulp density, the uranium extraction rate and oxidation activity of bacteria was reduced. In addition, the results of *cycA1* gene expression showed that the target gene expression increases in the presence of uranium ore compare to sample with absence of uranium ore, and with further increase of pulp density, due to the toxicity of uranium, show a decreasing trend. In addition, the changes of Eh, pH and uranium extractions at bioleaching process *Acidithiobacillus* have been delayed in the presence of high pulp density in compare with lower one. The results of *cycA1* gene expressions bacteria in the presence of ore different concentrations showed that mutations and ore concentration has been effective on the expression of this gene.

**Key words:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Cytochrome A1, Iron oxidation, Uranium bioleaching