Nova Biologica Reperta 6(1): 50-60 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۵۰ الی ۶۰ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

توالی‌یابی ژن راستی‌سیانین قبل و بعد از جهش با دی اتیل سولفات در باکتری اسیدیتیوباسیلوس اس پی. FJ2

سمیه فرهمند[۱]، فائزه فاطمی[۲] و رضا حاجی حسینی[۱]
[۱]گروه علوم زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران؛ [۲]پژوهشکدهٔ مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: فائزه فاطمی، ffatemi@aeoi.org.ir

چکیده. در باکتری اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، پروتئین‌های موجود در مسیر زنجیره انتقال الکترون از جمله پروتئین راستی‌سیانین، با اکسیداسیون آهن فرو به فریک، سبب آزادشدن الکترون و در نهایت استحصال اورانیوم می‌شوند. تاکنون، ارتباط بین توالی این ژن با میزان استخراج اورانیوم در فرایند بیولیچینگ بررسی نشده است. بنابراین، در این مطالعه پس از تغییر میزان استحصال اورانیوم بر اثر جهش باکتری، بررسی تغییرات ژن *rus*، می‌تواند نقش مستقیم و دقیق این پروتئین را آشکار سازد. بدین منظور، در باکتری اسیدیتیوباسیلوس اس پی. FJ2 بومی با دو دوز ۰/۸٪ و ۱٪ از دی اتیل سولفات جهش تصادفی ایجاد شد. سپس، جهت انجام فرایند بیولیچینگ، باکتری‌ها به محیط حاوی ۵۰٪ سنگ معدن اورانیوم منتقل شدند. بعد از اندازه‌گیری میزان استخراج اورانیوم، آهن، میزان تغییرات اکسیداسیون و احیا و pH در فرایند بیولیچینگ، به‌منظور بررسی سکانس ژن راستی‌سیانین، DNA ژنومی استخراج و پس از انجام PCR، برای تعیین توالی فرستاده شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit v7.2.5، سکانس ژن وحشی با موتانت تحت مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که استخراج اورانیوم توسط باکتری جهش‌یافته با ۱٪ DES بین روزهای ۱۱-۷ نسبت به باکتری وحشی افزایش یافته است. با این وجود، تغییری در نواحی عمل‌کردی ژن راستی‌سیانین رخ نداده است. به‌نظر می‌رسد که احتمالاً، DES اثر خود را بر دیگر ژن‌های مؤثر در زنجیره انتقال الکترون و یا در نواحی تنظیمی گذاشته است که نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است.

واژه‌های کلیدی. انتقال الکترون، بیولیچینگ، پروتئین، جهش تصادفی، میکروارگانیسم

Sequencing of the *rus* gene before and after the mutation with DES in the bacterial *Acidithiobacillus* sp. FJ2

Somayeh Farahmand[1], Faezeh Fatemi[2], & Reza Hajihosseini[1]
[1]Department of Biology Sciences, School of Science, Payam-e-Noor University of Tehran, Tehran, Iran; [2]Materials and Nuclear Fuel Research School, NSTRI, Tehran, Iran
Correspondent author: Faezeh Fatemi, ffatemi@aeoi.org.ir

Abstract. In *Acidithiobacillus ferrooxidans*, the proteins present in the electron transfer pathway cause ferrous iron oxidation which leads to uranium extraction. The relationship between gene sequence and uranium extraction has not been investigated yet. Based on the changes in uranium extraction, the changes of rus gene sequence can reveal the direct and accurate role of this protein. For this purpose, a random mutation was induced in native *Acidithiobacillus* sp. FJ2 by two doses of 0.8% and 1% of DES. Then, the bacteria was transferred into a medium which contained 50% uranium ore to carry out the bioleaching process. After measuring the amount of the extracted uranium, iron, Eh and pH, genomic DNA was extracted to investigate the rusticyanin gene (rus) sequence sent for sequencing after performing PCR. Then, the wild-type gene sequence was compared with the mutant by Bioedit v7.2.5 software. The results showed that uranium extraction increased by mutant bacteria with DES 1% between 7-11 days in comparison with wild bacteria. However, there has been no change in the functional areas of the rusticyanin gene. It seems that DES affected other effective genes in the electron transport chain or regulatory areas, which required further studies.

Keywords. bioleaching, electron transport, microorganism, protein, random mutation

Received 08.12.2017/ Revised 01.05.2018/ Accepted 15.07.2018/ Published 01.05.2019
دریافت ۱۳۹۶/۹/۱۷/ اصلاح ۱۳۹۷/۰۲/۱۱/ پذیرش ۱۳۹۷/۴/۲۴/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

مقدمه

یکی از مهم‌ترین فرایندهای میکروبی، فرایندی موسوم به بیولیچینگ است که در آن، برای انجام یک سری واکنش‌های شیمیایی از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. در این فرایند، با استفاده از باکتری‌ها، فلزاتی همانند اورانیوم، مس، روی، کبالت و طلا به صورت محلول در می‌آیند (Borisovich & Mihaylovich, 2013). کاربرد عملی این علم از سال ۱۹۷۵ آغاز شد و در حال حاضر در بسیاری از کشور نظیر آمریکا، شیلی، کانادا و استرالیا انجام می‌شود (McCready & Gould, 1990).

اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، مهم‌ترین باکتری دخیل در بیولیچینگ اورانیوم است. در این تحقیق، باکتری بومی جداشده از چشمه آبگرم رامسر (اسیدیتیوباسیلوس اس پی. FJ2)، در فرایند بیولیچینگ اورانیوم به‌کار گرفته شده است (Jahani *et al*., 2015). اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، یک باکتری شیمیولیتوتروف، گرم منفی، اسید دوست و اکسیدکنندهٔ آهن است (Tsukasa *et al*., 2004). این باکتری از انتقال الکترون رها شده در مسیر اکسایش مواد معدنی (نظیر یون فرو، گوگرد عنصری، ترکیبات احیا شده گوگردی و کانه سولفیدی) در زنجیره تنفسی، انرژی مورد نیاز خود را تأمین می‌کند (Rawling, 2002; Ilbert & Bonnefoy, 2012). گیرنده نهایی الکترون در زنجیره تنفسی، اکسیژن مولکولی است که از طریق غشا وارد سلول می‌شود (Silverman & Lundgren, 1959).

چندین پروتئین در فضای پری پلاسمی باکتری وجود دارد که در زنجیره انتقال الکترون شرکت می‌کنند (Robert *et al*., 1994; Sand *et al*., 1995). با تحلیل بیوانفورماتیکی سکانس ژنوم اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، اجزای اصلی زنجیره انتقال الکترون که در اکسیداسیون آهن و سولفور نقش دارند، شناسایی شده است (Valdes *et al*., 2008). بر اساس مطالعات رونویسی، بیوشیمیائی و ژنتیک، پیشنهاد شده است که الکترون‌ها از اکسیداسیون آهن فرو از طریق Cyc2 به راستی‌سیانین جریان پیدا می‌کنند (Holmes & Bonnefoy, 2006). از اینجا، بعضی از الکترون‌ها مسیر پائین رونده و بعضی مسیر بالارونده را طی می‌کنند. در مسیر پایین رونده، الکترون از طریق سیتوکروم Cyc1 ,c به سیتوکروم اکسیداز aa3 منتقل می‌شود (Valdes *et al*., 2008). در این میان، راستی‌سیانین، یک پروتئین مس آبی پری پلاسمیک (۱۶/۵kDa) است که نقش مهمی در اکسیداسیون فرو دارد. با افزایش میزان راستی‌سیانین در محیط کشت، اکسیداسیون آهن افزایش می‌یابد (Yarzabal *et al*., 2003). rus دارای یک پروموتور مستقل است و رونویسی ژن‌های این اپرون، هدف تنظیمات پس از ترجمه است (Yarzabal *et al*., 2004). این پروتئین جزء اصلی در زنجیره انتقال الکترون بوده و بیش از ۵٪ کل پروتئین‌های موجود در زنجیره را تشکیل می‌دهد (Hall *et al*., 1998). بیان اپران rus بستگی به سوبستراهای انرژی‌زای محیط کشت دارد (Yarzabal *et al*., 2003). بنابراین، بیان اپران rus مداوم نیست، بلکه احتمالاً در سطح ترجمه، بسته به منبع انرژی تنظیم می‌شود (Pulgar *et al*., 1993).

یکی از دغدغه‌های اساسی در مورد فروشویی زیستی اورانیوم، انجام اقداماتی جهت بهبود، تسریع و افزایش استخراج اورانیوم در چگالی پالپ‌های بالا است که تاکنون اقدام عملی در مورد آن انجام نگرفته و تنها، تعداد معدودی فرضیه و مدل‌سازی برای آن صورت گرفته است. بنابراین مطالعات و با توجه به اهمیت نقش ژن‌ها در بازده فرایند بیولیچینگ اورانیوم، می‌توان با ایجاد تغییراتی بیولوژیکی در جمعیت باکتری وحشی، بازده بیولیچینگ و نیز ارتباط آن با ساختار باکتری را تحت بررسی قرار داد.

با توجه به اینکه ایجاد جهش بر روی باکتری می‌تواند تأثیر بسزایی در بازده فرایند بیولیچینگ اورانیوم داشته باشد، در این مطالعه، تصمیم گرفته شد تا از یکی از عوامل موتاژن شیمیایی با نام دی‌اتیل سولفات (DES) با فرمول شیمیایی ($C_4H_{10}O_4S$)، به‌منظور ایجاد جهش مورد استفاده قرار گیرد. DES از عوامل آلکینه‌کننده است که برای القای جهش و دیگر تغییرات ژنتیکی در تعداد زیادی از ارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. DES قادر به آلکینه کردن نوکلئوتیدها در مکان های اکسیژن شامل موقعیت O^6-G بوده و قادر به تبدیل GC به AT است (Hoffman, 1980). در این پژوهش برای اولین بار، پس از ایجاد جهش تصادفی در جمعیت باکتری وحشی، میزان بازده استخراج اورانیوم در نمونه‌های جهش‌یافته و وحشی تحت بررسی قرار گرفته و در مرحله بعدی، جهت تعیین مکان و میزان جهش، توالی ژن *rus* تعیین و با ژن وحشی مقایسه می‌شود.

مواد و روش‌ها

جهش با دی اتیل سولفات (DES)

باکتری اسیدیتیوباسیلوس اس پی. FJ2 مورد استفاده در این مطالعه، در تحقیقات قبلی، از چشمه گوگردی رامسر جدا شده

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

است (Jahani *et al.*, 2015). به منظور جهش با دی اتیل سولفات، غلظت های مختلف DES در آب مقطر تهیه شد. سپس، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری با غلظت cell/ml $۱×۱۰^۸$ به دو پلیت انتقال داده شده و غلظت‌های (V/V) ٪۰/۸ و (V/V) ٪۱ از دی‌اتیل سولفات برای هر پلیت استفاده شد. هر پلیت به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از مگنت استیرر هم زده شده و درنهایت، ۴۰ میکرولیتر از سدیم تیوسولفات ٪۲۵، به منظور پایان دادن به القای جهش به آن اضافه گردید. جهت ماندگاری تاثیرات جهش، نمونه ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Ru-an *et al.*, 2009; Jian *et al.*, 2009).

کشت باکتری و تهیه مایه تلقیح

به منظور تهیه مایه تلقیح از باکتری وحشی و موتانت، باکتری‌ها در محیط کشت ۹k کشت داده شدند. محیط کشت ۹k حاوی $(NH_4)_2SO_4$ ۳/۰g، K_2HPO_4 ۰/۵g ، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵g، KCl ۰/۱g، $Ca(No_3)_2.4H_2O$ ۰/۰۱g و $FeSO_4.7H_2O$ ۴۴/۷g در ۱۰۰۰ml آب مقطر است (Fatemi *et al.*, 2016). پس از اضافه کردن ٪۱۰ باکتری ها به محیط کشت، pH محیط به روی ۲ تنظیم شد (Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). سپس، محیط های کشت حاوی باکتری، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با دور همزن ۱۸۰rpm به مدت ۲ روز (تا زمان رسیدن باکتری ها به فاز لگاریتمی) انکوبه شدند (Shahroz *et al.*, 2012). پس از آن، باکتریها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۲۴۲۲×g =۴۵۰۰rpm در زمان ۳۰ دقیقه، جمع آوری شدند.

تحلیل سنگ معدن

کانسار اورانیوم از سنگ معدن اورانیوم کم عیار از منطقه معادن ساغند در شمال شرقی استان یزد و در فاصله ۱۸۵ کیلومتری شهرستان یزد جمع آوری شده است. به منظور انجام فرایند بیولیچینگ، ابعاد سنگ $d_{۸۰}$ =۱۰۶μm انتخاب شد (Fatemi *et al.*, 2015). به منظور بدست آوردن ترکیبات شیمیایی نمونه سنگ خرد شده، نمونه برای تحلیل XRF فرستاده شد و نتایج حاصل، نشان دهندهٔ کوارتز، پیریت و همچنین اورانیوم به عنوان ترکیبات اصلی بود.

فرایند بیولیچینگ اورانیوم

به منظور انجام فرایند بیولیچینگ، ٪۱۰ از مایه‌های تلقیح (باکتری وحشی و موتانت) به محیط کشت ۹k حاوی (W/V) ٪۵۰ سنگ معدن اورانیوم منتقل شد. نمونه‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه سانتیگراد و دور همزن ۱۵۰ rpm انکوبه شدند. زمانیکه میزان استخراج اورانیوم به بالاترین حد خود رسید، بیولیچینگ متوقف شد. در این زمان، باکتریها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۲۴۲۲×g= ۴۵۰۰rpm در زمان ۳۰ دقیقه، جمع آوری شدند. در نمونه کنترل منفی موجود، به جای مایه تلقیح از مخلوط متانول - فرمالدهید به نسبت ۹:۱ استفاده شد.

تحلیلهای لیچ لیکور حاصل از فرایند بیولیچینگ اورانیوم

میزان اورانیوم

به منظور تعیین زمانی که میزان استخراج اورانیوم به بالاترین میزان خود رسیده است، در توالی‌های ۲۴ ساعته، میزان ۱۰cc از لیچ لیکور برداشته شده و با فیلتر ۰/۲ میکرون، فیلتر شده و محلول حاصل از آن برای تحلیل طیف سنجی نشر اتمی یا ICP (و همچنین اندازه‌گیری آهن) فرستاده شد. در نهایت میزان لیچ لیکور برداشته شده با آب مقطر pH=۲ جبران شد.

pH و Eh

میزان pH و Eh، با استفاده از دستگاه pH متر و Eh متر (Metrohm 827)، اندازه‌گیری شد. pH محیط بر روی ۲ تنظیم و در توالی های ۲۴ ساعته اندازه‌گیری و مجددا بر روی ۲ تنظیم می‌شد. همانند pH، میزان تغییرات Eh نیز در توالی های ۲۴ ساعته در حضور باکتری وحشی و تنش‌یافته با دزهای مختلف DES اندازه‌گیری شد. اعداد به دست آمده در این مرحله به صورت نمودار رسم شده‌اند.

میزان آهن

میزان آهن فرو با بدست آوردن اختلاف آهن فریک از آهن کل محاسبه شد. به منظور اندازه گیری آهن III موجود در نمونه مورد نظر، پس از تهیه منحنی کالیبراسیون، میزان ۱ میلی‌لیتر از لیچ‌لیکور فیلتر شده، در یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ٪۱۰ به آن اضافه و با آب مقطر به حجم رسانده شد. در نهایت، جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) در طول موج ۵۰۰ نانومتر در مقابل محلول شاهد خوانده شد (Karamanev *et al.*, 2002). به منظور اندازه‌گیری آهن کل موجود در نمونه مورد نظر، پس از تهیه منحنی کالیبراسیون، میزان ۱ میلی‌لیتر از نمونه لیچ‌لیکور فیلتر شده در بالن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ٪۱۰ و ۳ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ٪۲۵ به آن اضافه و با آب مقطر به

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

حجم رسانده شد. پس از مدت زمان کوتاهی، جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV- Vis) در طول موج ۴۲۵ نانومتر در مقابل محلول شاهد خوانده شد (Karamanev *et al*., 2002). در نهایت میزان آهن فرو محاسبه گشت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR

در این مرحله، باکتری‌های جمع آوری شده در فرایند بیولیچینگ اورانیوم، مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA ژنومی از اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس با کیت استخراج DNA (سیناژن) پس از دستورالعمل های تامین کننده انجام شد. ژن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ((5′-GAC AAC GAT CTT ACC F(GAA C-3′) و (5′-TAT GTA ACT GTT GGT GCG R(G-3′) تکثیر شد. این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Primer3 و ژن runner طراحی شدند. برای انجام PCR از ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs،۰/۷۵ میکرولیتر MgCl2، ۳/۱ میکرولیتر DNA الگو و ۰/۴ میکرولیتر pfu DNA polymerase در مجموع با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. مراحل بعدی PCR به ترتیب دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه (۵ دقیقه)، واکنش مرحله دوم در ۳۵ سیکل، شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه (۲۰ ثانیه)، Annealing در دمای ۶۰ درجه (۳۰ ثانیه) و طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد (۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه) انجام پذیرفت. پس از تکمیل چرخه، طویل سازی نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. به منظورکنترل و تأیید صحت انجام هر تست PCR از نمونه‌های کنترل منفی و مثبت استفاده شد. محصولات PCRبا استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ٪۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و باندها بعد از رنگ‌آمیزی با Safe stain توسط نور UV مشاهده شدند.

تعیین توالی ژن راستی‌سیانین

محصول PCR ژن *rus* پس از تکثیر، جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. جهت بررسی وجود یا عدم وجود جهش بر روی ژن *rus*، تحلیل توالی ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit v7.2.5 انجام شد.

آنالیز آماری

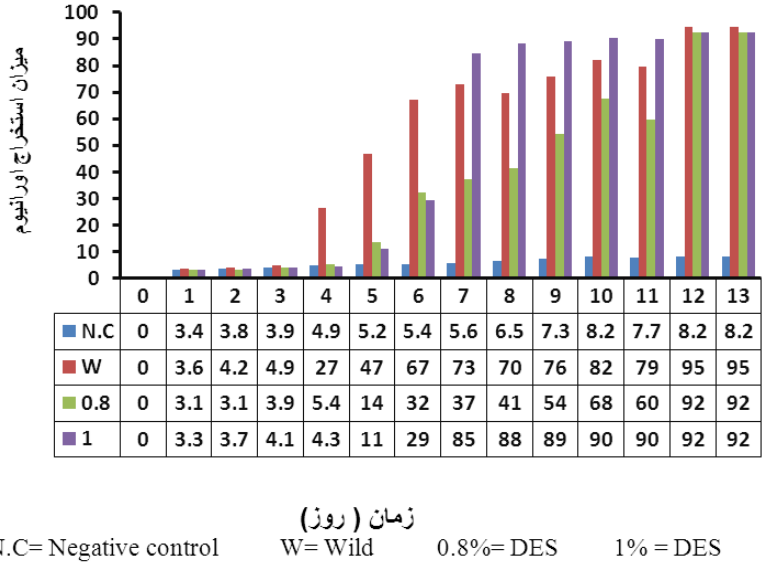
تفاوت‌های بین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و تست ANOVA تعیین شد. با استفاده از این نرم افزار P- value داده‌ها، محاسبه شد و P<۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel به دست آمد.

نتایج و بحث

میزان اورانیوم استخراج شده در طی فرایند بیولیچینگ

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES در پالپ (W/V) ٪۵۰، در حد فاصل روزهای ۷ تا ۱۱ نسبت به باکتری وحشی به تدریج رو به افزایش است. نتایج بیانگر این مطلب بود که استخراج اورانیوم موجود در محیط پس از ایجاد جهش با (V/V) ٪۱ DES در روز دهم به (٪۹۰/۳۲) رسیده است که این میزان استخراج بیشتر از باکتری وحشی(٪۸۲/۱۵) در همان روز است. میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری جهش‌یافته با (V/V) ٪۰/۸ DES کمتر از باکتری وحشی در روز دهم است. این نتایج بیانگر این مطلب است که غلظت (V/V) ٪۱ DES ، اثر مطلوبتری در استخراج اورانیوم داشته است. نتایج حاصل از این بخش با نتایج Ru-an و همکارانش که نشان دادند با تأثیر دزهای متفاوت جهش DES بر روی اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، ضریب فرونشست فسفر محلول حاصل از سنگ فسفات سولفید آهن، با کاربرد اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس القا شده با دی اتیل سولفات (V/V) ٪۱ به میزان بالایی افزایش یافته است، مطابقت دارد (Ru-an., 2009). مطالعات Ehling و همکاران روی القای خاص لوکوس و جهش غالب-کشنده با DES روی اسپرماتوزوآ و اسپرماتید تاخیری موش نر انجام شد. نتایج بیانگر آن بود که جهش ناشی از القای خاص لوکوس، منجر به ٪۸۳ مرگ و میر در اسپرماتوزوآ و اسپرماتید تاخیری می‌شود. در حالی که جهش روی لوکوسهای غالب-کشنده بسته به دوز DES میزان جهش متغیر است. بطوریکه در فاصله روزهای ۸-۵ فراوانی جهش با mg/kg ۲۰۰= DES برابر با $۱۷/۵\times۱۰^{-۵}$ و جهش با mg/kg ۳۰۰= DES برابر با $۷/۵\times۱۰^{-۵}$ در هر لوکوس بود (Ehling & Neuhiuser-Klaus, 1988). با توجه به اینکه در پژوهش حاضر در دوز (V/V) ٪۱ از DES نتایج بهتری نسبت به دوز (V/V) ٪۰/۸ حاصل گشته است، می‌توان این گونه بیان نمود که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج Ehling مطابقت دارد. بیشترین میزان استخراج تاکنون در پالپ ٪۱۲/۵ از باکتری اسیدیتیوباسیلوس اس پی. FJ2 به میزان ٪۲/۶ ±۶۸ در مدت ۲۰ روز گزارش شده بود (Jahani *et al*., 2015).

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]



	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
N.C	0	3.4	3.8	3.9	4.9	5.2	5.4	5.6	6.5	7.3	8.2	7.7	8.2	8.2
W	0	3.6	4.2	4.9	27	47	67	73	70	76	82	79	95	95
0.8	0	3.1	3.1	3.9	5.4	14	32	37	41	54	68	60	92	92
1	0	3.3	3.7	4.1	4.3	11	29	85	88	89	90	90	92	92

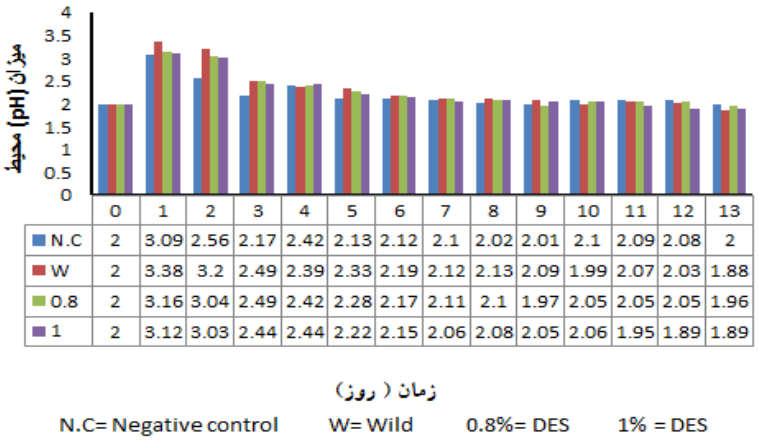
شکل ۱- میزان استخراج اورانیوم توسط باکتری وحشی در مقایسه با باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ و ٪۰/۸ DES (N.C: کنترل منفی، W: باکتری وحشی، ٪۰/۸: جهش ناشی از (V/V) ٪۰/۸ DES، ٪۱: جهش ناشی از (V/V) ٪۱ DES).

Fig. 1. Uranium extraction concentrations by wild bacteria compared with mutated bacteria by (V/V) 1%; 0.8% DES. (NC: Negative Control, W: wild Bacteria, 0.8%: Mutation caused by DES 0.8% (V/V), 1%: Mutation caused by DES 1% (V/V)).

بررسی تغییرات pH و Eh

نتایج حاکی از آن است که میزان pH در روزهای ابتدایی افزایش یافته و پس از آن به تدریج کاهش می‌یابد. میزان pH در باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES در روز ۱۲ به حداقل مقدار خود (pH=۱/۸۹) رسیده است که این میزان pH مصرفی در باکتری وحشی در همان روز برابر با pH=۲/۰۳ است (شکل ۲). همهٔ باکتری‌هایی که در فروشویی میکروبی بکار می‌روند، در یک محدوده خاصی از pH اسیدی فعالیت دارند. کاهش زیاد pH می‌تواند روی پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون تأثیر سوء داشته باشد، به‌طوریکه pH زیر ۱/۵ فعالیت باکتری را کاهش می‌دهد (Fetter, 1998). در طی انجام فرایند بیولیچینگ، pH محیط در روز اول افزایش و از روز دوم تا دوازدهم کاهش یافته است. pH، یکی از فاکتورهای مهم در رشد باکتری است که می‌تواند روی اکسیداسیون آهن فرو تأثیر گذار باشد (Meruane & Vargas, 2003). در روزهای ابتدایی، باکتری با مصرف H^+ در اکسیداسیون آهن فرو شرکت نموده که این امر باعث افزایش pH محیط می‌شود. با پیشرفت زمان فروشویی باکتریایی، Fe^{+2} به Fe^{+3} اکسید می‌شود و باعث تشکیل H^+ می‌شود که در نهایت به کاهش تدریجی pH محیط منجر می‌شود (Meruane & Vargas, 2003; Dong *et al.*, 2011). Ru-an و همکاران (2009) روی ضریب فرونشست فسفر محلول حاصل از سنگ فسفات سولفید آهن، با کاربرد اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس القا شده با (V/V) ٪۱ از DES مطالعه نمودند و اظهار داشتند که میزان pH پس از 5 روز به حداقل مقدار خود (مقدار تعادل) رسیده است. با توجه به اکسیداسیون سولفید آهن از طریق اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس یون Fe^{+2} که از Fe_2SO_4 حاصل شده است به Fe^{+3} تبدیل می‌شود. واکنش مزبور با کاهش pH محیط، موجب ایجاد انرژی لازم برای رشد اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس شده و سنگ معدن مزبور نیز به کمک H_2SO_4 به حالت محلول در میاید و در نهایت منجر به تولید فسفر محلول می‌شود (Ru-an., 2009). Hiroyoshi و همکاران(1999) نشان دادند که جاروسیت به عنوان یک عامل ممانعت کننده بر رشد باکتری محسوب می‌شود زیرا مواد مورد نیاز باکتری را از دسترس آن خارج می‌کند. تنظیم میزان pH محیط می‌تواند پدیدهٔ جاروسیت را کنترل نموده و آن را به حداقل برساند (Hiroyoshi *et al.*, 1999). این نتایج با یافته های حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]



شکل ۲- تغییرات pH محیط توسط باکتری وحشی در مقایسه با باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ و ٪۰/۸ DES. (N.C: کنترل منفی، W: باکتری وحشی، ٪۰/۸: جهش ناشی حاصل از (V/V) ٪۰/۸ DES، ٪۱: جهش ناشی از (V/V) ٪۱ DES) .

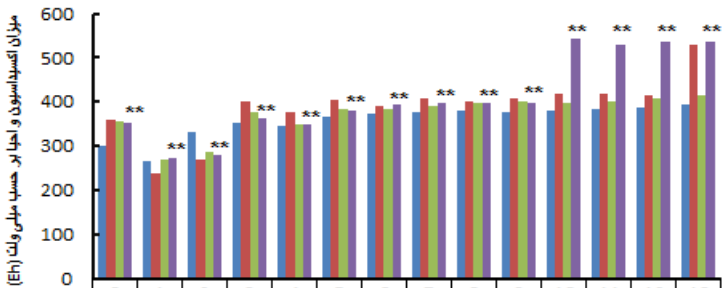
Fig. 2. The values of the environmental pH by wild bacteria compared with mutated bacteria by DES 0.8%, 1% (V/V). (NC: Negative Control, W: wild Bacteria, 0.8%: Mutation caused by DES 0.8% (V/V), 1%: Mutation caused by DES 1% (V/V)).

شکل ۳ تغییرات اکسیداسیون و احیا (Eh) در باکتری جهش یافته نسبت به باکتری وحشی را نشان می‌دهد. نتایج نشان دهندهٔ افزایش تدریجی Eh در باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES، به تدریج در حدفاصل روزهای ۱۰ تا ۱۳ است. میزان Eh در باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES در روز ۱۰ به حداکثر مقدار خود (mv ۵۴۱/۶۶) رسیده است که این میزان Eh، بیشتر از باکتری وحشی(mv ۴۱۸/۳۳) است. میزان اکسیداسیون و احیا توسط باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۰/۸ DES کمتر از باکتری وحشی است که با نتایج استخراج اورانیوم همخوانی دارد. اکسیداسیون غیرمستقیم باکتریایی که سبب آزادسازی فلزات بوسیله آهن فریک می‌شود، به میزان Eh بسیار وابسته است. در طول اکسیداسیون آهن فرو بوسیله باکتری، Eh محیط به تدریج افزایش می‌یابد. باکتری-های هوازی به پتانسیل ردوکس مثبت احتیاج دارند که این افزایش پتانسیل در نتیجه اکسایش یون فرو و افزایش یون فریک است که حاکی از فعالیت باکتری‌ها است (Natarajan, 1998). با استناد به جدول پتاسیل ردوکس (E_0 = −۰/۱۴V , E_0 Fe^{+3}= −۰/۰۲V) (Fe^{+2}) و با توجه به بالا بودن غلظت یون فرو در محیط و تبدیل آن به یون فریک طی فرایند بیولیچینگ و با استناد به معادلهٔ نرنست، میزان Eh محیط افزایش می‌یابد. در مطالعه ای که Kanbi و همکاران (2002) انجام دادند، بیان نمودند که پس از ایجاد جهش بر روی ژن *rus* و با تبدیل met148leu میزان Eh به اندازهٔ ۸۰۰mV افزایش یافته است. همچنین، طبق مطالعهٔ Barrett و همکاران (2006)، پس از ایجاد جهش بر روی ژن *rus* و با تبدیل H143M، میزان Eh تقریبا به اندازهٔ ۴۰۰mV نسبت به نوع وحشی افزایش یافته است (Barrett *et al*., 2006). این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

میزان آهن فرو

شکل ۴ میزان Fe^{+2} مصرفی محیط را در باکتری جهش یافته نسبت به باکتری وحشی نشان می‌دهد. مشاهدات بیانگر کاهش آهن محیط در باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES، به تدریج در حدفاصل روزهای ۱۰ تا ۱۲ است. میزان آهن فرو در باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES در روز ۱۲ به حداقل مقدار خود (۰ ppm) رسیده است، در حالیکه مصرف آهن در باکتری وحشی در همان روز (۱۳۰۰ ppm) است. مطالعات بیانگر این مطلب است که کاهش تدریجی pH ارتباط مستقیمی با میزان مصرف Fe^{+2} محیط دارد (Walsh, 1997). آهن برای رشد باکتری ضروری است. باکتری با اکسیداسیون آهن دو ظرفیتی به سه ظرفیتی و در نتیجه مصرف آن، انرژی مورد نیاز خود را به دست می‌آورد. بنابراین، با مصرف آهن فرو در محیط، و تولید آهن فریک، U(IV) به فرم قابل حل U(VI) اکسیده شود (Dutrizac & MacDonald, 1974). این نتایج با مطالعات Yingbo و همکاران (2011) که نشان دادند پس از ایجاد جهش در باکتری

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]



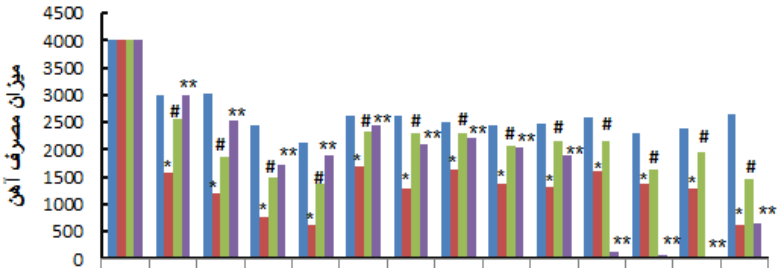
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
N.C	301	264	331	354	345	368	373	377	381	376	379	385	388	393
W	361	236	270	402	375	403	392	406	403	409	418	418	414	531
0.8	355	268	288	375	348	385	384	391	399	400	397	400	407	416
1	353	272	281	364	348	379	394	396	396	396	542	530	535	537

زمان (روز)

N.C= Negative control W= Wild 0.8%= DES 1% = DES

شکل ۳- میزان اکسیداسیون و احیا توسط باکتری وحشی در مقایسه با باکتری جهش یافته با (V/V) ۱٪و ۰/۸٪ DES. (N.C: کنترل منفی، W: باکتری وحشی، ۰/۸٪: جهش ناشی حاصل از (V/V) ۰/۸٪ DES، ۱٪: جهش ناشی از (V/V) ۱٪ DES. علامت ** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از تحلیل آماری باکتری جهش‌یافته با ۱٪ DES بوده که با باکتری وحشی معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

Fig. 3. Oxidation and reduction rates by wild bacteria compared with mutated bacteria by DES 0.8%, 1%. (NC: Negative Control, W: wild Bacteria, 0.8%: Mutation caused by DES 0.8% (V/V), 1%: Mutation caused by DES 1% (V/V)). The ** sign represents the result of statistical analysis Des 1% (V/V) mutant, which is significant with Wild bacteria (*P* <0.05).



	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
N.C	4000	3000	3020	2437	2135	2615	2630	2495	2435	2482	2595	2300	2395	2650
W	4000	1573	1208	772	625	1700	1300	1630	1375	1330	1600	1375	1300	620
0.8	4000	2565	1865	1503	1365	2320	2292	2315	2070	2168	2165	1635	1948	1452
1	4000	2995	2525	1722	1890	2455	2100	2215	2035	1900	130	60	0	653

زمان (روز)

N.C= Negative control W= Wild 0.8%= DES 1% = DES

شکل ۴- میزان مصرف Fe^{+2} توسط باکتری وحشی در مقایسه با باکتری جهش یافته با (V/V) ۱٪ و ۰/۸٪ DES. (N.C: کنترل منفی، W: باکتری وحشی، ۰/۸٪: جهش ناشی حاصل از (V/V) ۰/۸٪DES، ۱٪: جهش ناشی از (V/V) ۱٪DES). علامت * نشان‌دهنده نتیجه حاصل از تحلیل آماری باکتری وحشی بوده که با گروه کنترل معنی‌دار است (P<۰/۰۵). علامت ** نشان‌دهنده نتیجه حاصل از تحلیل آماری باکتری جهش یافته با (V/V) ۱٪ DES بوده که با گروه کنترل معنی‌دار هستند(P<۰/۰۵). علامت # نشان‌دهنده نتیجه حاصل از تحلیل آماری باکتری جهش یافته با (V/V) ۰/۸٪ DES بوده که با باکتری وحشی معنی‌دار هستند(P<۰/۰۵).

Fig. 4. Fe $^{+2}$ consumption rates by wild bacteria compared with mutated bacteria by DES 0.8%, 1% (V/V). (NC: Negative Control, W: wild Bacteria, 0.8%: Mutation caused by DES 0.8% (V/V), 1%: Mutation caused by DES 1% (V/V)). The * sign represents the result of statistical analysis of the Wild bacteria, which is significant with Negative control (*P* <0.05). The ** sign represents the result of statistical analysis Des 1% (V/V) mutant, which is significant with Wild bacteria (*P* <0.05). The # sign represents the result of statistical analysis Des 0.8% mutant, which is significant with Wild bacteria (*P* <0.05).

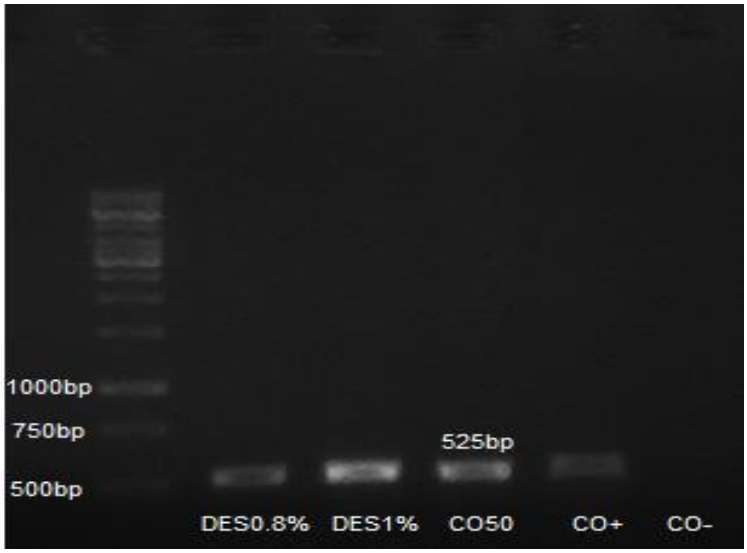
[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس، سرعت اکسیداسیون آهن فرو در باکتری جهش‌یافته نسبت به باکتری وحشی افزایش می‌یابد مطابقت دارد. بررسی میزان استخراج اورانیوم، تغییرات اکسیداسیون و احیا، مصرف pH و آهن محیط بیانگر این مطلب بود که باکتری جهش یافته با (V/V) ٪۱ DES توانسته است با تنظیم pH محیط پدیدهٔ جاروسیت را در چگالی پالپ بالا کنترل کند و با اکسیداسیون آهن فرو و تولید آهن فریک در محیط و مصرف آن، U^{+4} را به فرم قابل حل U^{+6} اکسید کند (Vaghar, 1999; Hiroyoshi *et al*., 1999). بهترین نتایج در نمونه های حاصل از پالپ (W/V) ٪۵۰، در مورد پارامترهای pH، آهن و Eh در روز ۱۰-۱۲ حاصل شده است، بطوریکه در روز دوازدهم میزان آهن فرو و pH به کمترین مقدار خود رسیده است و این مقدار کمتر از باکتری وحشی در همان روز است. میزان Eh نیز در روز دهم به بیشترین مقدار خود رسیده است که این مقدار بیشتر از باکتری وحشی در همان روز است. در طی این مدت نیز میزان استخراج اورانیوم به تدریج افزایش یافته است. این میزان استخراج اورانیوم در روز دهم به ٪۹۰/۳۲ رسید و از روز دوازدهم به بعد فعالیت باکتری وحشی مجددا افزایش یافته است که این نشان دهندهٔ این مطلب است که باکتری های جهش یافته سعی در تطابق خود با محیط داشته و تا حد آستانه خاصی قادر به تحمل شرایط سمی اورانیوم هستند.

نتایج PCR و توالی‌یابی با نرم‌افزار Bioedit

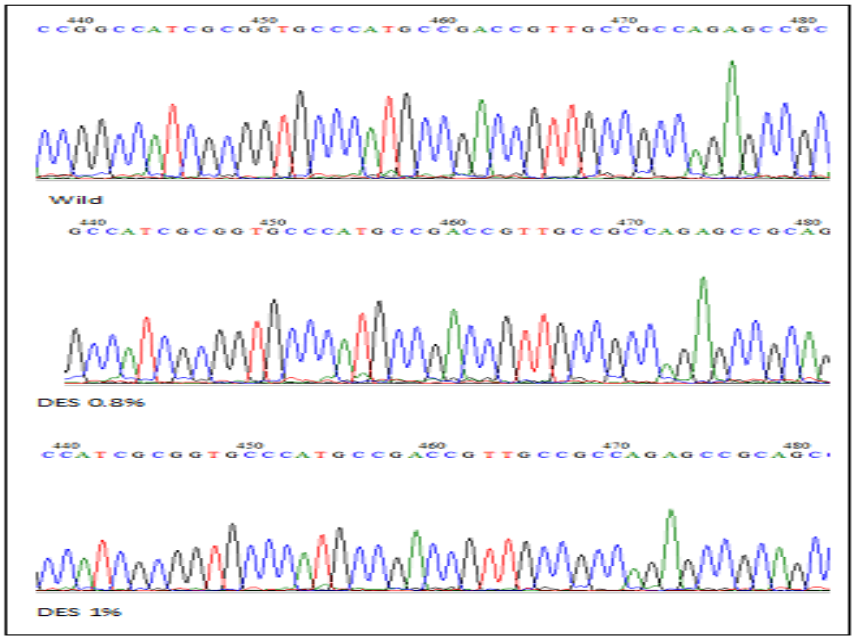
بنابر نتایج حاصله، ژن *rus* به عنوان یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در انتقال الکترون، انتخاب شده و توالی مورد نظر از DNA ژن *rus* در باکتری وحشی و جهش‌یافته که به روش PCR تکثیر یافتند تحت بررسی قرار گرفتند (شکل ۵). پس از تعیین توالی ژنهای جهش یافته، جهت بررسی مکان جهش، تحلیل توالی‌ها با نرم افزار Bioedit v7.2.5 v تحت ارزیابی قرار گرفتند. ژن *rus* دارای ۱۸۷ نوکلئوتید است که ۳۲ نوکلئوتید اول آن سیگنال پپتید است. این ژن با احتساب سیگنال پپتید دارای یک دومین (۸۵-۱۸۷) است (www.uniprot.org). بررسی ها نشان می‌دهد که هیچ جهشی در توالی ژنها رخ نداده است (شکل ۶). با توجه به اینکه طبق نتایج فوق استخراج اورانیوم افزایش یافته است، امکان دارد جهش در بقیهٔ ژنها و یا مراکز ژنها رخ داده باشد. De ley پس از ایجاد جهش با UV، روی باکتری آگروباکتریوم تومه فاسینس و مقایسهٔ آن با نوع وحشی، میزان جهش را از روی نقطهٔ ذوب تحت ارزیابی قرار داد. وی مشاهده نمود که نقطهٔ ذوب در DNA ی باکتری وحشی ۹۴/۶±۰/۱ و میزان GC برابر با ٪۶۱/۵ است، در حالی‌که در باکتری جهش یافتهٔ مقاوم به گلایسین نقطهٔ ذوب ۹۶/۲±۰/۱ و میزان GC برابر با ٪۶۵/۵ است. طبق این نتایج، تغییر زیادی در توالی نوکلئوتیدی پس از ایجاد جهش مشاهده نشده است (De Ley, 1964). مطالعات Ronen و همکاران (1964) که با ایجاد جهش توسط DES جهت بازگشت لوسین روی سالمونلاتایفی موریوم اگزوتروف انجام شد، بیانگر این مطلب بود که ۵ml از DES بعد از ۵ روز تغییرات کمی در باکتری ایجاد می‌کند. از بین ۱۰ لوله آزمایشی که ارزیابی شد، در ۵ لوله میزان بازگشت لوسین برابر با (۱۰$^{-۵}$×۶-۰/۵) بود و در ۵ لولهٔ دیگر این میزان جهش کمتر و برابر با (۱۰$^{-۶}$×۱۰/۳-۱$^{-۸}$×۵) بود (Ronen, 1964). طبق مطالعات Albooshoke و همکاران (2017) نتایج هم ردیفی نوکلئوتیدی توالی جهش یافتهٔ ژن *cyc1* موجود در زنجیره انتقال الکترون در مرغ بومی خراسان، ٪۹۹ شباهت را با توالی مشابه در ژنوم نوکلئوتید مرغ وحشی نشان داد. بیشترین تنوع ژنتیکی در توالی ناحیه غیرکدشونده گزارش شده است. مطالعات Xie و همکاران (2013) روی جداسازی آرسنیک و آهن از سنگ آرسنیک حاوی طلا پس از ایجاد جهش ترکیبی UV60s و اولتراسونیک به مدت ۱۰ دقیقه روی مخلوطی از باکتری‌های اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس و اسیدیتیوباسیلوس کریپتوم، نشان دهندهٔ این مطلب بود که اکسیداسیون آهن فرو افزایش یافته است. در طی بیولیچینگ سنگ آرسنیک حاوی طلا، تراکم باکتری‌های جهش یافته طی ۱۵ روز، به بیش از ۱۰ برابر باکتری ها در کشت اصلی رسید. میزان استخراج آهن پس از ۱۵ روز به میزان ٪۹/۹ و میزان استخراج آرسنیک پس از ۱۲ روز به میزان ٪۴۶/۱ در مقایسه با باکتری وحشی افزایش یافت. همچنین میزان pH در روزهای ابتدایی افزایش یافت و پس از آن تا روز هجدهم از مقدار آن به تدریج کاسته شد. این میزان کاهش pH در باکتری جهش یافته بیشتر از باکتری وحشی گزارش شده است. مطالعات Kang و همکاران (2009) روی بیولیچینگ کلکوسیت به وسیلهٔ ایجاد جهش توسط مواد جهش زای شیمیایی $NO2^-$، DES و UV روی مخلوطی از باکتری‌های جدا شده (اسیدیتیوباسیلوس، لپتوسپیریلیوم، اسیدیفیلوم و سولفوبا سیلوس) از شیرابه های معادن نشان داد که ایجاد جهش توسط (V/V)

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]



شکل ۵- باند محصولات PCR بر روی ژل اگاروز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *rus*.

Fig. 5. PCR product band on agarose gel using *rus* gene specific primers.



شکل ۶- گراف ترسیم شده توسط نرم افزار Bioedit توالی باکتری اسیدیتیوباسیلوس فرواکسیدانس قبل و بعد از جهش با (V/V) ٪ ۱ و ٪۰/۸ DES.

Fig. 6. Graph depicted by Bioedit software. Sequence analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* before and after mutation by DES 0.8%, 1% (V/V).

٪۱ DES به مدت ۶۰ دقیقه بهترین عمل‌کرد را در لیچینگ کلکوسیت دارد و این جهش منجر به افزایش استخراج Cu^{+2} در مدت ۲۰ روز در مقایسه با نمونه وحشی می‌شود. مطالعات Wu و همکاران (2017) نشان داد که پس از ایجاد جهش توسط UV به مدت ۱۲۰ ثانیه روی باکتری پروویدنسیا JAT-1، تراکم سلول‌های باکتری جهش یافته در فاز ثابت ٪۲۶ و آمونیاک تولیدشده توسط باکتری‌های جهش‌یافته نیز ٪۱۲ افزایش یافته است. این امر به افزایش استخراج مس به میزان ٪۱۰/۶ توسط باکتری‌های جهش یافته در مقایسه با باکتری‌های وحشی منجر می‌شود. این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق حاکی از آن است که هرچند تغییری در توالی ژن جهش یافتهٔ *rus* در پالپ (W/V) ٪۵۰

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

مشاهده نشده است، اما جهش ناشی از DES ۱٪ (V/V) تأثیر بسزایی در افزایش استخراج اورانیوم در پالپ (W/V) ۵۰٪ از روز ۷-۱۱ داشته است. به عبارتی دیگر، باکتری جهش یافته با (V/V) DES۰/۸٪ در پالپ (W/V) ۵۰٪ فعالیتی کمتر از باکتری وحشی داشته است، در حالیکه فعالیت باکتری‌های جهش یافته با (V/V) DES ۱٪ افزایش نشان می دهند. با توجه به تصادفی بودن جهش و عدم مشاهده تغییر در توالی باکتری، می توان اینگونه نتیجه گیری نمود که احتمالا جهش در بقیهٔ ژنها یا مراکز ژنها رخ داده است که این امر منجر به ازدیاد استخراج اورانیوم در پالپ مورد نظر شده است. با توجه به اهمیت موضوع، با بررسی سایر ژنها و یا ایجاد جهش هدفمند، می توان ژن یا مراکز ژنی را که پس از جهش، منجر به افزایش استخراج اورانیوم می‌شود، پیدا نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از خانم سبا میری که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر می‌کنند.

REFRENCES

Albooshoke, N., Tahmoorespour, M. and Nassiry M.R. 2017. Identification and sequencing of Mt-COX1 gene in Khorasan native chicken. – Genetics in the 3rd Millennium 12: 3520-3527.

Barrett, M.L., Harvey, I., Sundararajan, M., Surendran, R.R., Hall, J.F., Ellis, M.J., Hough, M.A., Strange, R.W., Hillier, I.H. and Hasnain, S.S. 2006. Atomic resolution crystal structures, EXAFS, and quantum chemical studies of rusticyanin and its two mutants provide insight into its unusual properties. – Biochem. J. 45: 2927-2939.

Borisovich, U.A. and Mihaylovich, K.A. 2013. Bioleaching of low grade uranium ore containing pyrite using *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*. – J. Radioanal. Nucl. Chem. 295: 151-156.

Chen, P., Yan, L., Wang, Q., Li, Y. and Li, H. 2012. Surface alteration of realgar (As4S4) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. – Int. Microbiol. 15: 9-15.

De Ley, J. 1964. Effect of mutation on DNA-composition of some bacteria. – Antonie van Leeuwenhoek 30: 281-288.

Dong, Y., Lin, H., Wang, H. and Mo, X. 2011. Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. – Miner. Eng. 24: 870-875.

Dutrizac, J.E. and MacDonald, R.J.C. 1974. Ferric iron as a leaching medium. – Miner. Sci. Engng. 6: 59-62.

Ehling, U.H. and Neuhiuser-Klaus, A. 1988. Induction of specific-locus and dominant-lethal mutations in male mice by diethyl sulfate (DES). – Mutat Res. 199: 191-198.

Fatemi, F., Arabieh, M. and Jahani, S. 2016. Application of response surface methodology to optimize uranium biological leaching at high pulp density. – Radiochim. Acta. 104: 239-246.

Fatemi, F., Rashidi, A. and Jahani, S. 2015. Isolation and Identification of native sulfur-oxidizing bacterium capable of uranium extraction. – Prog. Biol. Sci. 5: 207-221.

Fetter, C.W. 1998. Applied hydrogology. Pub New York, pp: 4-5.

Hall, F.J., Kanbi, D.L., Harvay, I., Murphy, M.M. and Hasnain, S.S. 1998. Modulating the Redox Potential and Acid Stability of Rusticyanin by Site-Directed Mutagenesis of Ser86. – Biochem. 37: 11451-11458.

Hiroyoshi, N., Hirota, M., Hirajima, T. and Tsunekawa, M. 1999. Inhibitory effect of iron-oxidizing bacteria on ferrous-promoted chalcopyrite leaching. – Biotechnol. Bioeng. 64: 478-83.

Hoffmann, G.R. 1980. Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds. – Mutat. Res. 75: 63-129.

Holmes, D. and Bonnefoy, V. 2006. Genetic and bioinformatic insights into iron and sulfur oxidation mechanisms of bioleaching organisms. – Biomining pp: 281-307.

Ilbert, M. and Bonnefoy, V. 2012. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. – Biochim Biophys Acta 1827: 161-75.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]

Jahani, S., Fatemi, F., Firoz-e-zare, M.A. and Zolfaghari, M.R. 2015. Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain FJS from Ramsar, Iran. – eJBio. 11: 138-146.

Jian, k., Guan-zhou, Q., Jian, G., Hai-hua, W. and Xue-ling, W. 2009. Bioleaching of chalcocite by mixed microorganisms subjected to mutation. – J. Cent. South Univ. T. 16: 0218-0222.

Karamanev, D.G., Nikolov, L.N. and Mamatarkova, V. 2002**.** Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. – Miner. Eng. 15: 341-346.

Kanbi, L.D., Svetlana, A., Hough, M.A., Hall, J. F., Dodd, F.E. and Hasnain, S.S. 2002. Crystal Structures of the Met148Leu and Ser86Asp Mutants of Rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: Insights into the Structural Relationship with the Cupredoxins and the Multi Copper Proteins. – J. Mol. Biol. 320: 263-275.

Kang, J., Qiu, G.Z. and Gao, J. 2009. Bioleaching of chalcocite by mixed microorganisms subjected to mutation. – J. Cent. South Univ. T. 16: 0218-0222.

Meruane, G. and Vargas, T. 2003. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5-7.0. – Hydrometallurgy 71: 149-158.

McCready, R.G. and Gould, W.D. 1990. Bioleaching of uranium. In Microbial mineral recovery, (H. L. Erlich and C. L. Brierley, Eds.). – McGraw-Hill, New York. pp: 107-126.

Natarajan, K.A. 1998. Electro chemical aspects of bioleaching of base treatal sulfides, microbial mineral Recovery. – Erlich, H. pub, New York, 162 pp.

Pulgar, V., Nunez, L. and Moreno, F. 1993. Expression of rusticyanin gene is regulated by growth condition in Thiobacillus ferrooxidans. In: Torma AE, Wey JE, Lakshmanan VI (eds) Biohydrometallurgical technologies. – TMS. 2: 541-548.**Rawlings, D.E.** 2002. Heavy metal mining using microbes. – Annu. Rev. Microbiol. 56: 65-91.

Robert, C., Black, I.I. and Shute, A.E. 1994. Respiratory Enzymes of *Thiobacillus ferrooxidance* kinetic properties of an Acid stable Iron: Rusticyanin oxidoreductae. – Biochem. 33: 9220-8.

Ronen, A. 1964. Back mutation of leucine-requiring auxotrophs of *Salmonella typhimurium* induced by diethylsulphate. – J. Gen. Microbil. 37: 49-58.

Ru-an, C.H., Xiao-hui, H., Chun-qiao, X., Yuan-xin, W.U. and Wen-xue, Z. 2009. Bioleaching of soluble phosphorus from rock phosphate containing pyrite with DES-induced *Acidithiobacillus ferrooxidans.* – J. Cent. Sout Univ T. 16: 0758-0762.

Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R. and Shippers, A. 1995. Sulfur chemistry, biofilm and the (in) direct attack mechanisms- a crucial evaluation of bacterial leaching. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 961-965.

Silverman, M.P. and Lundgren, D.G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus* ferrooxidans. I. An improved medium and a harvestingnprocedure for securing high cell yields. – J. Bacteriol. 77: 642-647.

Shahroz, K., Faizul, H., Fariha, H., Kausar, S. and Rahat, U. 2012. Growth and Biochemical Activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* Collected from Black Shale. – J. Microbiol. Res. 2: 78-83.

Tsukasa, I., Kenichi, S. and Satoshi, O. 2004. Isolation, characterization, and in situ detection of a novel chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium in wastewater biofilms growing under microaerophilic conditions. – Appl Environ Microbiol. 70: 3122-3129.

Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J.A. and Holmes, D.S. 2008. Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications. – BMC Genomics 11: 597-621.

Vaghar, R. 1999. Microbial technology in metallurgy. – Univ. Ind. Mines. Tehran, 372 pp.

Walsh, D. 1997. Recent developments at the Girilambone heap leach-SX-EW operation. Girilambone copper company, pub. In: ALTA Copper Hydrometallurgy Forum, October 20–21. – Queensland, Australia pp: 1-15.

Wu, A.X., Hu, K.J., Zhang, A.Q. and Yang, Y. 2017. Effect of ultraviolet mutagenesis on heterotrophic strain mutation and bioleaching of low grade copper ore. – J. Cent. South Univ T. 24: 2245-2252.

Xie, X., Yuan, X., Liu, N., Chen, X., Abdelgadir, A. and Liu, J. 2013. Bioleaching of Arsenic-Rich Gold Concentrates by Bacterial Flora before and after Mutation. – Biomed. Res. Int. 2013: 1-10.

Yarzabal, A., Duquesne, K. and Bonnefoy, V. 2003. Rusticyanin gene expression of Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC33020 in sulfur- and in ferrous iron-media. – Hydrometallurgy 71: 107-114.

Yarzabal, A., Appia-Ayme, C., Ratouchniak, J. and Bonnefoy V. 2004. Regulation of the expression of the Acidithiobacillus ferroxidans rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. – Microbiology 150: 2113-2123.

Yingbo, D., Hai, L., Han, W., Xiaolan, M., Kaibin, F. and Hongwei, W. 2011. Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. – Miner. Eng. 24: 870-875.

Zhang, Y., Qin, W., Wang, J., Zhen, S., Yang, C., Zhang, J., Nai, S. and Qiu, G. 2008. Bioleaching of chalcopyrite by pure and mixed culture. – Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 18: 1491-1496.

*****

How to cite this article:

Farahmand, S, Fatemi, F. and Hajihosseini, R. 2019. Sequencing of the *rus* gene before and after the mutation with DES in the bacterial *Acidithiobacillus* sp. FJ2. – Nova Biol. Reperta 6: 50-60.

فرهمند، س.، فاطمی، ف. و حاجی‌حسینی، ر. ۱۳۹۸. توالی‌یابی ژن راستی سیانین قبل و بعد از جهش با دی اتیل سولفات در باکتری اسیدیتیوباسیلوس اس پی FJ2. – یافته های نوین در علوم زیستی ۶: ۶۰-۵۰.

[Downloaded from isharat.khu.ac.ir on 2026-10-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.3.8]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.50]