مجله علوم و فنون هسته‌ای، جلد ۱۰۲، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱

Journal of Nuclear Science and Technology
Vol. 102, No. 1, 2023

بررسی زنده‌مانی، مورفولوژی و احیای زیستی اورانیم در باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* از کلونی‌های یک روزه و ده روزه

الهام راستخواه[۱]، فائزه فاطمی*[۲]، پروانه مقامی[۱]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران - ایران

۲. پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۸۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران- ایران

*Email: ffatemi@aeoi.org.ir

مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۹

چکیده

باکتری *Shewanella RCRI۷* توانایی حذف اورانیم در شرایط بی‌هوازی را دارد. در این پژوهش، عملکرد باکتری‌های کلونی کشت یک و ده روزه از نظر توان حذف اورانیم، تغییرات مورفولوژی و زنده‌مانی باکتری در محلول بی‌هوازی حاوی اورانیم و نیترات بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که باکتری یک روزه، رشد بیش‌تری نسبت به باکتری ده روزه در غلظت اورانیم ۲ میلی‌مولار دارد، در حالی‌که درصد حذف اورانیم باکتری ده روزه بیش‌تر از باکتری یک روزه بوده است. به نظر می‌رسد که این مهم توسط توده‌های باکتری مرده و به‌روش جذب زیستی انجام گرفته است. احیای زیستی اورانیم در باکتری‌های کشت یک روزه، در آنالیزهای XRD، اسپکتروفوتومتری و بررسی مورفولوژی به‌وسیله میکروسکوپ نوری اثبات گردید. نمونه‌های ۴ ماهه و ۹ ماهه از کلونی یک روزه، به ترتیب ۹۶٪ و ۹۹٪ حذف اورانیم داشتند که نشان‌دهنده‌ی پایداری حذف اورانیم محلول در بازه‌های زمانی طولانی می‌باشد. عملکرد نمونه‌های یک روزه و ۴ ماهه حاوی نیترات و اورانیم نیز توان حذف اورانیم را در حضور نیترات با غلظت ۲۰ گرم در لیتر تأیید نموده است. این نتایج توان این باکتری بومی در حذف زیستی اورانیم در حضور نیترات را نشان می‌دهد و این باکتری را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای مطالعات آینده معرفی می‌کند.

کلیدواژه‌ها: *Shewanella RCRI۷*، احیای زیستی اورانیم، اسپکتروفوتومتری، مورفولوژی، XRD

Investigating survival, morphology and bioremediation of uranium in native *Shewanella RCRI7* from one-day and ten-day colonies

E. Rastkhah[1], F. Fatemi*[2], P. Maghami[1]

1. Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775, Tehran - Iran
2. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box:11365-8486, Tehran-Iran

Research Article

Received 11.3.2022, Accepted 30.5.2022

Abstract

Shewanella RCRI7 can reduce uranium under anaerobic conditions. The bacterial function of one- and ten-day cultured colonies in terms of uranium removal ability, morphological changes, and viability in an anaerobic solution containing uranium and nitrate has been investigated in this study. The results showed that one-day bacteria grew faster than ten-day bacteria at a concentration of 2 mM Uranium. In contrast, the uranium removal percentage of ten-day bacteria is higher than that of one-day bacteria, which are adsorbed by the bacterial masses through biosorption. Bioremediation of uranium in one-day cultured bacteria was confirmed by XRD analysis, spectrophotometry, and morphological examination by light microscopy. 4-month and 9-month samples from a one-day colony had 96% and 99% uranium removal, respectively, indicating the stability of soluble uranium removal over long periods. One-day and 4-month samples containing nitrate and uranium also confirmed the ability to remove uranium in the presence of nitrate at a concentration of 20 g /L, which shows the ability of this native bacterium to reduce the uranium in the presence of nitrate, introducing this as a suitable option for future studies.

Keywords: *Shewanella RCRI7, Uranium Bioremediation, Spectrophotometry, Morphology, XRD*

۱. مقدمه

ورود آلاینده‌های پرتوزا به محیط به واسطه فعالیت‌های صنعتی، هنگام استخراج فلزهای مختلف و تولید پساب‌های آلوده به مراتب بیش‌تر از میزان ورود آن‌ها از طبیعت به محیط است. اکثر فلزات سنگین، کاتیون‌های فلزی هستند که به‌خاطر تشکیل ترکیبات پیچیده، نقش اساسی در واکنش‌های بیوشیمیایی بدن داشته و در غلظت‌های بالا برای بدن سمی هستند. هم‌چنین، سمیت آلاینده‌های رادیواکتیو، ناشی از پرتوزایی و آسیب آن‌ها به DNA جانداران می‌باشد که این موضوع می‌تواند برای تمام موجودات زنده خطرآفرین باشد. آسیب‌های احتمالی ناشی از این عناصر و نفوذ آن‌ها به منابع آب‌های زیرزمینی، لزوم حذف این سموم از محیط زیست را ثابت کرده است [۱].

کاربرد گسترده فلزات سنگین در صنایع مختلف، ورود غلظت‌های بالایی از این عناصر به محیط زیست را به دنبال داشته است. پاک‌سازی و بازیابی این آلاینده‌های پرخطر، اهمیت به‌سزایی در حفظ سلامت موجودات زنده دارد. حذف زیستی[1] اورانیم به‌روش احیای زیستی[2] روشی بهینه است که امکان پاک‌سازی اورانیم از محل آلوده را از پساب‌ها فراهم می‌سازد. برای این‌که حذف زیستی مؤثر باشد، محیط کشت مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها مورد نیاز است. در صورت رشد بهینه‌ی میکروارگانیسم‌ها، قادرند به آلاینده‌ها حمله کرده و آن‌ها را به محصولات بی‌ضرر تبدیل نمایند. اکثر سیستم‌های زیست پالایی تحت شرایط هوازی اجرا می‌شوند، اما در این پژوهش، حذف اورانیم در یک سیستم تحت شرایط بی‌هوازی انجام شده است. در این روش میکروارگانیسم‌های زنده، اورانیم محلول را به اورانیم نامحلول تبدیل می‌کنند [۲، ۳]. باکتری مورد استفاده در این پژوهش، باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* است که سال ۱۳۹۰ از دریاچه قوری‌گل تبریز جداسازی شده و توانایی انتقال الکترون به گستره وسیعی از گیرنده‌های الکترونی (از جمله اورانیم) را دارد [۴، ۵]. این باکتری واجد شباهت بالای فیلوژنتیکی (بیش از ۹۹٫۱٪) با باکتری *Shewanella oneidensis* MR-۱ (باکتری مدل پرکاربرد در پاک‌سازی زیستی و احیای فلزات سنگین) می‌باشد [۶، ۷].

در فرایند احیای زیستی اورانیم از حالت اکسایشی شش ظرفیتی محلول در آب (اورانیل)، به شکل چهار ظرفیتی نامحلول (اورانیتیت)، احیا شده و رسوب می‌کند [۸]. این باکتری‌ها حاوی آنزیم‌های تخصصی در دیواره هستند و با تولید انرژی از مسیر انتقال الکترون، توانایی حذف فلزات سنگین را از پساب‌های صنعتی دارند [۴، ۹]. پژوهش‌های پیشین بر روی این باکتری صورت گرفته و توانایی آن را در احیای زیستی فلزاتی هم‌چون اورانیم تأیید می‌کند [۱۰، ۱۱].

در این پژوهش توانایی زنده‌مانی، تغییرات مورفولوژی و احیای اورانیم از کشت TSB یک روزه و ده روزه‌ی باکتری *Shewanella RCRI۷* به روش آنالیز میکروسکوپی و ICP بررسی شد و حضور و عدم حضور اورانیتیت در محلول احیای مورد مطالعه به روش اسپکتروفوتومتری و XRD با هدف تأیید احیای اورانیم بررسی گردید. در ادامه، میزان پایداری احیای اورانیم در باکتری کشت یک روزه، در بازه‌ی زمانی طولانی‌تر (۴ و ۹ ماه انکوباسیون) مورد مطالعه قرار گرفت. هم‌چنین توانایی حذف اورانیم این باکتری بومی، در حضور نیترات در بازه‌های زمانی یک روز و ۴ ماه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه می‌تواند در راستای تعیین سن مناسب کلونی باکتری در آزمایشات آینده و شناخت دقیق‌تر سازوکار احیای زیستی اورانیم راهگشا باشد.

۲. روش کار

۱.۲ کشت باکتری و آماده‌سازی نمونه

در این پژوهش، ابتدا مقایسه‌ای میان در کشت یک روزه و ده روزه باکتری *Shewanella RCRI۷* در توان حذف اورانیم به روش احیای زیستی انجام گرفت. سپس حضور و عدم حضور اورانیتیت در محلول احیا از طریق دو آنالیز اسپکتروفوتومتری و XRD بررسی شده و باکتری مناسب جهت حذف اورانیم به روش احیای زیستی جهت انجام فرایند زیست پالایی پیشنهاد گردید. در ادامه، میزان پایداری احیای اورانیم در بازه‌ی زمانی طولانی‌تر ۴ و ۹ ماهه مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی اثر تداخلی غلظت بالای نیترات (۲۰ گرم در لیتر) در حضور اورانیم ۲ میلی‌مولار نیز از طریق آنالیز ICP انجام شد. در انتهای پژوهش نیز میزان پایداری احیای اورانیم در بازه‌ی زمانی طولانی‌تر ۴ ماهه، در نمونه‌های تیمار شده با نیترات ۲۰ گرم بر لیتر و اورانیم ۲ میلی‌مولار، مورد مطالعه قرار گرفت و با نمونه‌های کنترل تیمار شده با اورانیم ۲ میلی‌مولار مقایسه و بررسی شد (شکل ۱).

1. Bioremediation
2. Bioreduction

شکل ۱. مراحل انجام شده در این پژوهش.

پس از تأمین شرایط استریل (شامل استریل نمودن تمامی تجهیزات به وسیله اتوکالو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و بـه مدت ۱۵ دقیقه)، جهت نگه‌داری از باکتری، از استوک اولیه آن، تعداد زیادی استوک ۲ میلی‌لیتری تهیه شده و در فریزر با دمای ۸۰- نگه‌داری گردید. بدین‌صورت که از استوک اولیه باکتری در محیط مایع TSB با نسبت ۱ به ۱۰۰ تلقیح شد، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰، محیط کشت برداشته شده و به منظور تهیه تک کلونی در محیط جامد TSA کشت داده شد. این محیط کشت نیز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت با مشاهده کلونی‌های یکسان و یکنواخت در محیط کشت، بـه منظور خالص‌سازی، یکی از تک کلونی‌ها برداشته شده و مجدد در محیط TSB کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باکتری در شرایط ذکر شده، محیط کشت حاوی باکتری، سانتریفیوژ شـد. سپس پلت حاصل از آن به منظور کاهش احتمال آسیب به باکتری به همراه گلیسرول با نسبت ۵۰:۵۰ در کرایوتیوب‌های ۵ یا ۲ میلی‌لیتر ریخته شده و در فریز ۸۰- نگه‌داری گردید. در مراحل بعدی، از این استوک‌های نگه‌داری شده در فریزر استفاده گردید، ابتدا پیش‌کشت‌های ۱۸ ساعته با حجم‌های پایین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در محیط کشت TSB و با دور شیکر rpm ۱۵۰ انجام شد. سپس از پیش‌کشت به محلول اصلی با نسبت حجمی ۱ به ۱۰۰ در حجم‌های بالاتر اضافه گردید. ۲۴ ساعت پس از کشت باکتری، باکتری از شیکر انکوباتور خارج شـده و بـا دور ۴۵۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از جداسازی محیط کشت، جهت اطمینان از عدم وجود محیط کشت در اطراف باکتری، باکتری با محلول بیکربنات سدیم) با غلظت تقریبی ۲۲ میلی‌مولار (سوسپانسیون شده و مجدداً سانتریفیوژ گردید. سپس با جداسازی محلول روی پلت، با توجه به شمارش باکتری حاصل از شمارش با لام نئوبـار و حجم اولیه محیط ۱×۱۰^{۱۰} سلول بر میلی‌لیتر باشد، رسانده شد. پس از تنظیم pH در ۶/۴ کشت، پلت به حجم مناسبی که در آن شمارش باکتری و بی‌هوازی‌سازی سوسپانسیون حاصل، به هر کدام از نمونه‌های بی‌هوازی، ۴ میلی‌لیتر باکتری تلقیح گردید. رقت باکتری ورودی به محلول پس از تلقیح با گرفتن نسبت ۴ میلی‌لیتر باکتری به ۴۰ میلی‌لیتر محلول احیا، ۱۰ برابر کاهش می‌یابد، به صورتی که شمارش باکتری موجود در محلول پس از تلقیح ۱×۱۰^{۹} سلول بر میلی‌لیتر خواهد بود.

از آن‌جایی که احیای زیستی اورانیم از مسیر زنجیره انتقال الکترون تنها تحت شرایط بی‌هوازی انجام می‌شود، کلیه مراحل کشت باکتری در محیط بی‌هوازی انجام گرفت. پس از خروج کشت جدایه باکتری *Shewanella RCRI* ذخیره شده در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد، یک کشت جامد TSA، پس از کشت مایع محیط TSB، با هدف تهیه کلونی خالص از باکتری، تهیه شد. دو نمونه محیط کشت TSA پس از یک روز و ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. کلونی‌های یک روزه و ۱۰ روزه‌ی باکتری، در محیط مایع TSB کشت داده شده و پس از بی‌هوازی شدن، با تعداد اولیه ۱×۱۰^{۹} (cell/mL) به محلول احیای بی‌هوازی شده حاوی اورانیم ۲ میلی‌مولار تلقیح گردید.

پیش از تلقیح باکتری، محلول احیا به روش جایگزینی گاز، بی‌هوازی شد. ویال‌های حاوی محلول احیای بی‌هوازی شده، باکتری در دو مرحله به صورت هوازی در باکتری بر ۱۰ محیط کشت TSB، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰ به مدت ۱۸ و ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس، تعداد ۱۰ میلی‌لیتر، طبق رابطه $C_۲V_۲=C_۱V_۱$، با نسبت حجمی ۴ میلی‌لیتر باکتری در ۳۶ میلی‌لیتر محلول احیای بی‌هوازی شده (نسبت ۱ به ۹) تلقیح شد و انکوباسیون ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

تأمین شرایط بی‌هوازی در گلاوبگ طراحی شده با ابعاد ۴۵×۳۰×۳۰ سانتی‌متر انجام شد. ترکیب گاز به کار رفته در این پژوهش، مخلوط ۹۰٪ نیتروژن و ۱۰٪ دی‌اکسـیدکربن بوده

و تزریق گاز به درون گلاوبگ با هدف تأمین شرایط بی‌هوازی کامل غلظت اکسیژن ۱٪ انجام شد. در ادامه، گاز هیدروژن با هدف حذف اکسیژن باقی‌مانده در محیط به ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تزریق شد. لازم به ذکر است که اطمینان از صحت فرایند بی‌هوازی‌سازی توسط اندیکاتور شرایط بی‌هوازی تأیید گردید.

محلول احیای بی‌هوازی که حاوی مواد مورد نیاز برای رشد باکتری از جمله نمک‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، لاکتات سدیم به عنوان الکترون‌دهنده و نمک استات اورانیل و نیترات سدیم به عنوان الکترون گیرنده است، براساس آزمایشات ژروینسکی و پالز[1] (۲۰۰۸)، تهیه شده و بی‌هوازی گردید (شکل ۲). بی‌هوازی‌سازی نمونه‌ها پس از آماده‌سازی محلول احیا به کمک تزریق گازهای N_2، CO_2 و H_2 در گلاوبگ انجام شده و سپس درب آن کریمپ شد. صحت و نتیجه بخشی روش کار، در پژوهش‌های پیشین که بر روی این باکتری بومی انجام گرفته است تأیید شده است [۱۰، ۱۲، ۱۳].

ساخت محلول احیای اولیه در آزمایش مورد نظر در حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر مطابق جدول ۱ انجام شده است. نمونه حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول احیا و ۲۵ میلی‌لیتر محلول باکتری (نسبت ۱ به ۹) است. محلول احیا حاوی ۱۲۵ میکرولیتر از محلول مواد معدنی (۰٫۱۲۵ میلی‌لیتر)، ۱۳۷۵ میکرولیتر لاکتات سدیم (۱ و ۰٫۳۷۵ میلی‌لیتر) و ۲۵۰ میکرولیتر (۰٫۲۵۰ میلی‌لیتر) به ترتیب برای محلول آهن و ویتامین است و مواد نمکی مورد نیاز به صورت پودری به محلول احیا افزوده شد.

به منظور اطمینان از توان احیای اورانیم و زنده‌مانی باکتری بومی *شوانلا RCRI۷*، آزمایشات احیای اورانیم تحت شرایط بی‌هوازی انجام شد. این پژوهش شامل کنترل فاقد اورانیم در شرایط بی‌هوازی و کنترل حاوی اورانیم در شرایط هوازی در ۳ تکرار بود. دلیل انتخاب کنترل فاقد اورانیم، تعیین نقش اورانیم موجود در محلول احیا در میزان زنده‌مانی باکتری و دلیل انتخاب کنترل هوازی، اطمینان از صحت فرایند بی‌هوازی‌سازی و هم‌چنین اثبات فعال بودن مسیر احیای اورانیوم تحت شرایط بی‌هوازی می‌باشد.

۲.۲ محاسبات مربوط به آنالیزهای حذف اورانیم و شمارش سلولی

در این بررسی حذف اورانیم پس از انجام آنالیز ICP-AES[2] از دو فرمول درصد حذف اورانیم (فرمول ۱) و حذف مطلق اورانیم برحسب میکرومول (فرمول ۲) محاسبه شده است:

$$Uranium\ removal\ (percent) = \frac{(C_{u\circ} - C_{uf})}{C_{u\circ}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

$$Uranium\ removal\ (\mu mol) = (C_{u\circ} - C_{uf}) \times \frac{V}{۰٫۲۳۸} \quad (۲)$$

در این فرمول‌ها V، C_{u0} و C_{uf} به ترتیب حجم محلول (۴۰ میلی‌لیتر) ، غلظت اولیه (ppm) و غلظت نهایی اورانیم محلول (ppm) را نشان می‌دهند. میزان مطلق حذف در واقع مقدار اورانیم حذف شده در هر ویال را برحسب جرم (میکرومول) بدون در نظر گرفتن مقدار اولیه و نهایی بیان می‌کند. پارامتر میزان مطلق حذف نشان می‌دهد که یک مقدار مشخص از باکتری در شرایط مشخص چه میزان اورانیم را می‌تواند از محلول حذف کند. هم‌چنین تغییرات تعداد باکتری از طریق شمارش با لام نئوبار، از فرمول زیر محاسبه شده است:

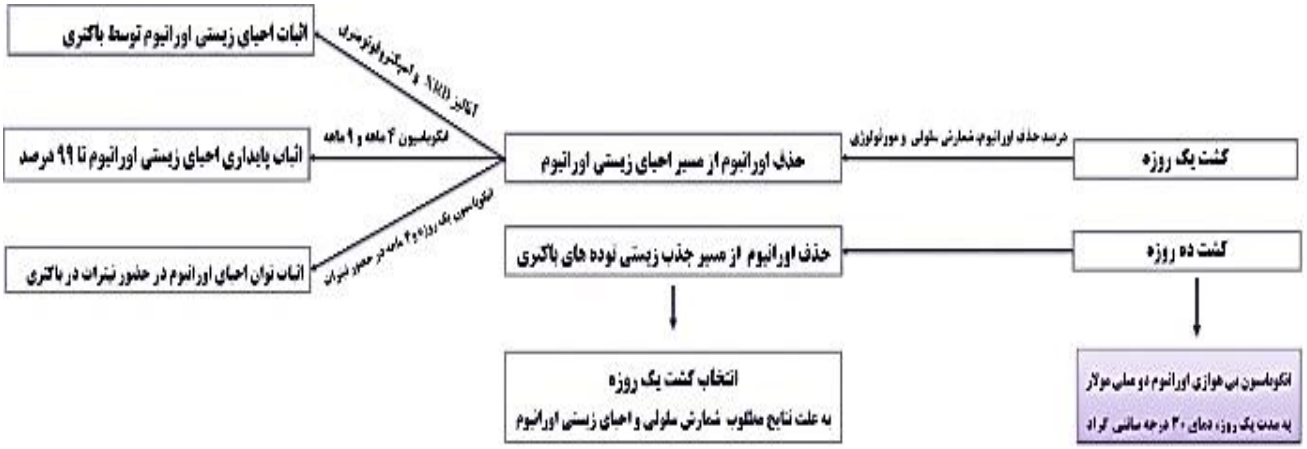
$$N = Df \times M \times S_f \quad (۳)$$

در فرمول فوق N، Df، M و Sf به‌ترتیب تعداد باکتری‌ها برحسب cell/ml، ضریب رقت[3]، میانگین حاصل از شمارش باکتری‌ها در ۱۶ خانه لام نئوبار و ضریب ویژه لام مورد نظر ($۱۰^۶ \times ۴$) می‌باشد.

۳.۲ اثبات احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI۷* به روش اسپکتروفوتومتری

احتمال اکسید شدن مجدد اورانیم احیا شده در حضور اکسیژن، بسیار بالا است، بنابراین بررسی کمی این رسوب با خطا همراه بوده و انجام فرایند احیا توسط باکتری، تنها با روش‌های کیفی مانند اسپکتروفوتومتری و آنالیز XRD انجام‌پذیر است [۱۰]. اسپکتروفوتومتری روشی برای اندازه‌گیری میزان جذب نور توسط مواد شیمیایی بوده که از طریق اندازه‌گیری چگالی نوری یک پرتو عبورکننده از نمونه انجام می‌شود. اساس این روش، جذب نور توسط هر ترکیب در بازه طول موجی معین است و با بررسی تفاوت موج‌های وارد شده و موج‌های خارج شده می‌توان ترکیبات موجود در محلول مورد بررسی را شناسایی کرد. در این پژوهش هدف از آنالیز اسپکتروفوتومتری بررسی حضور اورانیم (IV) یا اورانیتیت در محلول بوده و تأیید حضور این ماده به وسیله ارایه پیک در طول موج‌های ۵۶۰ نانومتر و ۶۶۲ نانومتر تأییدی بر احیا اورانیم (VI) و تولید اورانیم (IV) در محلول می‌باشد. هم‌چنین وجود پیک اورانیم (VI) در طول موج ۴۳۸ نانومتر، باقی‌مانده اورانیم محلول را نشان داده و با استفاده از فرمول‌های خاص سپکتروفوتومتری مقدار اورانیم (IV) و (VI) محلول قابل محاسبه است.

1. Czerwinski and Polz
2 .Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectroscopy
3. Dilution Factor



شکل ۲. مراحل تهیه نمونه.

جدول ۱. تهیه محلول احیا

الکترون‌دهنده		نمک‌ها (در ۵۰۰cc)		ویتامین (در ۱۰۰cc)		مواد معدنی (در ۵۰۰cc)	
ماده	مقدار (ml/L)	ماده	مقدار (g/L)	ماده	مقدار (g/L)	ماده	مقدار (g/L)
لاکتات سدیم (Mcr*k ٪۵۰)	۵/۵	NH_4Cl	۲۵۰	p-amino benzoic acid	۰/۰۵	$MnCl_2.4H_2O$	۰/۱
		KCl	۵۰۰	Thiamine-HCl	۰/۰۲	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۱۲
		$CaCl_2.2H_2O$	۱۵۰	B_6	۰/۱	$ZnCl_2$	۰/۰۷
		NaCl	۱۰۰۰	B_{12}	۰/۰۰۱	H_3BO_3	۰/۰۶
		$MgCl_2.6H_2O$	۶۲۰			$NiCl_2.6H_2O$	۰/۰۲۵
						$CuCl_2.2H_2O$	۰/۰۱۵
						$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲۵
						$FeCl_2.4H_2O$	۱/۵

آماده‌سازی نمونه‌ها بر اساس پژوهش فرانسیس و همکاران در سال ۲۰۰۸، در غلظت ۲ میلی‌مولار اورانیم انجام شده و پس از انکوباسیون یک ماهه در نمونه‌های بی‌هوازی شده و بی‌هوازی نشده مورد آنالیز قرار گرفتند. به این صورت که بعد از اتمام دوره انکوباسیون، کل محیط احیا در شرایط بی‌هوازی درون گلاوبگ به یک تیوب سانتریفیوژ منتقل شده، سپس در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن برای جلوگیری از اکسایش مجدد اورانیتیت، مایع رویی در زیر گلاوبگ برداشته شده و پلت در ۱۰ میلی‌لیتر سیتریک اسید ۱۰ میلی‌مولار حل گردید تا گونه‌های اورانیم استخراج شوند. سپس محلول از خلال یک غشای ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد تا باکتری از محلول جدا گردد. محلول شفاف عبور داده شده برای بررسی جذب اورانیم (VI) و (IV) در طول موج ۴۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر به کمک دستگاه SQ-Single Beam Scanning UV/Visible Spectrophotometer مورد بررسی قرار گرفت.

۴.۲ اثبات احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI۷* به روش XRD

XRD یک تکنیک رایج برای شناسایی مواد کریستالی و آنالیز ابعاد هر واحد از آن است که در سال ۱۹۱۲ توسط Max von Laue ابداع گردید. اساس این روش بر پایه برخورد سازنده اشعه‌های مونوکروماتیک ایکس و نمونه‌های کریستالی می‌باشد. این روش یک روش کیفی است و در این پژوهش از آن برای شناسایی کریستال‌های UO_2 در رسوب استفاده شده است که در آن حضور اورانیتیت به صورت پیک‌هایی نمایش داده شده و تبدیل اورانیل به اورانیتیت از طریق فرایند احیا را تأیید می‌نماید.

در این پژوهش پس از گذشت یک هفته از انکوباسیون نمونه‌های یک روزه‌ی بدون نیترات و نیترات‌دار، نمونه‌های ۴ ماهه نیترات‌دار و ۴ ماهه بدون نیترات و ۹ ماهه بدون نیترات، با هدف بررسی اثبات احیای اورانیم و حضور اورانیتیت توسط

باکتری *Shewanella RCRI۷* به روش XRD مطابق پژوهش لی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ آماده‌سازی و آنالیز شد.

پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، رسوب به همراه باکتری‌های ته‌نشین شده به رنگ قهوه‌ای در کف ظرف مشاهده شد. بدین‌منظور، پس از ریختن محلول در تیوب در شرایط گلاوبگ بی‌هوازی شده و سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه (مجدداً در شرایط بی‌هوازی)، محلول رویی دور ریخته شده و رسوب در شرایط گلاوبگ بی‌هوازی شده و تحت فشار مستقیم مخلوط گاز نیتروژن (۹۰٪) و دی‌اکسیدکربن (۱۰٪) جهت جلوگیری از اکسایش در معرض اکسیژن هوا خشک گردید. در نهایت این نمونه به وسیله دستگاه STOE MP-STADY Germany مورد آنالیز قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۱.۳ شمارش سلولی، درصد حذف و میزان حذف مطلق اورانیم

مطابق شکل ۳ الف، نمونه‌های کشت باکتری حاصل از کلونی‌های یک روزه حاوی نیترات و بدون نیترات و ۱۰ روزه بدون نیترات در محلول بی‌هوازی حاوی اورانیم، پس از یک روز انکوباسیون جهت انجام آنالیزهای شمارش سلولی نمونه‌گیری شدند. هدف از بررسی شمارش سلولی این نمونه‌ها، مقایسه میزان باکتری‌های زنده و فعال در محیط بی‌هوازی حاوی ۲ میلی‌مولار اورانیم است.

شکل ۳ الف شمارش سلولی باکتری‌های زنده را در این سه نمونه ذکر شده نشان می‌دهد. تعداد باکتری در نمونه باکتری بدون نیترات پس از ۲۴ ساعت با $۳/۷\times۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر، بیش‌ترین مقدار و در نمونه باکتری نیترات یک روزه کم‌ترین مقدار ($۱/۸\times۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر)، گزارش شده است. باکتری بدون نیترات یک روزه با دو نمونه باکتری ۱۰ روزه و باکتری نیترات‌دار اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۵$) (A). نمونه باکتری کلونی ۱۰ روزه با شمارش سلولی $۲/۸\times۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر، نمونه‌های باکتری کلونی یک روزه بدون نیترات و نیترات‌دار اختلاف معنادار دارد ($p < ۰/۰۵$) (C). هم‌چنین نمونه باکتری نیترات‌دار یک روزه (با کم‌ترین شمارش سلولی) با دو نمونه‌ی دیگر دارای اختلاف معنادار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$) (B).

چنان‌چه ذکر شد، بیش‌ترین رشد مشاهده شده در نمونه بدون نیترات یک روزه مشاهده شده است، در نتیجه کلونی کشت شده از باکتری ۲۴ ساعت، شرایط مناسب‌تری نسبت به کلونی ۱۰ روزه برای احیای اورانیم دارد و باکتری ۱۰ روزه در برابر اثر سمی اورانیم با کاهش رشد مواجه شده است. مقایسه میان دو نمونه محلول احیای بدون نیترات و نیترات‌دار در باکتری کلونی یک روزه، اثر سمی حضور نیترات را در حضور اورانیم نشان می‌دهد. به‌طوری‌که جمعیت بسیار کمی از باکتری‌ها در حضور عامل سمی نیترات علاوه بر اثر سمیت اورانیم قادر به زنده ماندن و احیای زیستی اورانیم بودند. کم‌ترین میزان رشد باکتری، در حضور نیترات دیده می‌شود که اثر سمی نیترات را در حضور اورانیم نشان می‌دهد. سمیت نیترات با غلظت ۲۰ گرم بر لیتر، جمعیت باکتری زنده را از $۳/۷\times۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر در نمونه بدون نیترات به $۱/۸\times۱۰^{۹}$ سلول بر میلی‌لیتر در نمونه حاوی نیترات (با حدود ۵۰٪ کاهش زنده مانی)، کاهش داده است ($p < ۰/۰۵$).

تغییرات پتانسیل احیای محیط، تغییرات غلظت الکترون دهنده (قند سدیم لاکتات) و الکترون گیرنده (اورانیم)، فاز رشد باکتری و میزان اکسیژن موجود در محیط از جمله عواملی هستند که تاکنون به عنوان عوامل مؤثر بر راه‌اندازی تنفس بی‌هوازی در باکتری جنس شوانلاسه معرفی شده‌اند [۱۴-۱۷]. در مطالعه‌ی حاضر تمام شرایط مربوط به محلول احیا، از جمله پتانسیل احیا و میزان الکترون دهنده و الکترون گیرنده در دو گروه مورد بررسی برابر است، لذا می‌توان تفاوت رفتار باکتری کشت داده شده از کلونی یک روزه و ده روزه، در برابر اورانیم را مربوط به فاز رشد آن دانست. چرا که باکتری جنس شوانلاسه یک باکتری مزوفیل بوده و در بازه‌ی دمایی وسیع از جمله دماهای نزدیک به صفر درجه نیز قادر است رشد کند. بنابراین می‌توان در نظر گرفت که با قرار گرفتن در محیط کشت جامد حاوی باکتری در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، باکتری با روندی کندتر هم‌چنان مسیر رشد خود را ادامه می‌دهد [۱۸]. از این‌رو می‌توان دریافت که احتمالا فاز رشد این دو باکتری با یک‌دیگر متفاوت بوده است، چرا که باکتری ده روزه توانایی رشد مناسب در حضور اورانیم را ندارد. از طرفی دیگر (چنان‌چه در بخش بررسی مورفولوژی نیز اشاره خواهد شد)، در نمونه باکتری کلونی ۱۰ روزه، باکتری‌های مرده، فیلامنت‌ها (رشته‌های زاید خارج شده از باکتری مرده) و باکتری‌های به هم چسبیده و گاهی دراز و کشیده مشاهده شد که دلیلی دیگر بر فعال بودن مسیر احیای زیستی در باکتری‌های فعال کلونی یک روزه می‌باشد.

شکل ۳ ب درصد حذف اورانیم پس از یک روز انکوباسیون باکتری در محلول دارای غلظت ۲ میلی‌مولار اورانیم را نشان می‌دهد. چنان‌چه مشاهده می‌شود نمونه‌های باکتری بدون

نیترات کشت یک روزه و باکتری بدون نیترات کشت ۱۰ روزه، به میزان قابل توجهی بیش‌تر از باکتری نیترات‌دار یک روزه می‌توانند اورانیم را از محلول حذف کنند ($P < ۰/۰۵$) (E,C). هم‌چنین توان حذف اورانیم در نمونه باکتری بدون نیترات ۱۰ روزه و باکتری بدون نیترات یک روزه با یک‌دیگر تفاوت معناداری دارد ($P < ۰/۰۵$). دو کنترل بدون باکتری و باکتری کشته شده به ترتیب ۲۶٪ و ۳۶٪ حذف اورانیم را نشان دادند و با سایر نمونه‌ها اختلاف معنادار در سطح ۵٪ نشان دادند که به ترتیب با A و B نشان داده شده‌اند ($P < ۰/۰۵$). نتایج حاصل از این دو کنترل اهمیت فعال بودن مسیر احیای اورانیم را در باکتری زنده و فعال را نشان داده و تأکیدی بر انجام احیای اورانیم در باکتری‌های زنده از مسیر احیای زیستی می‌باشد.

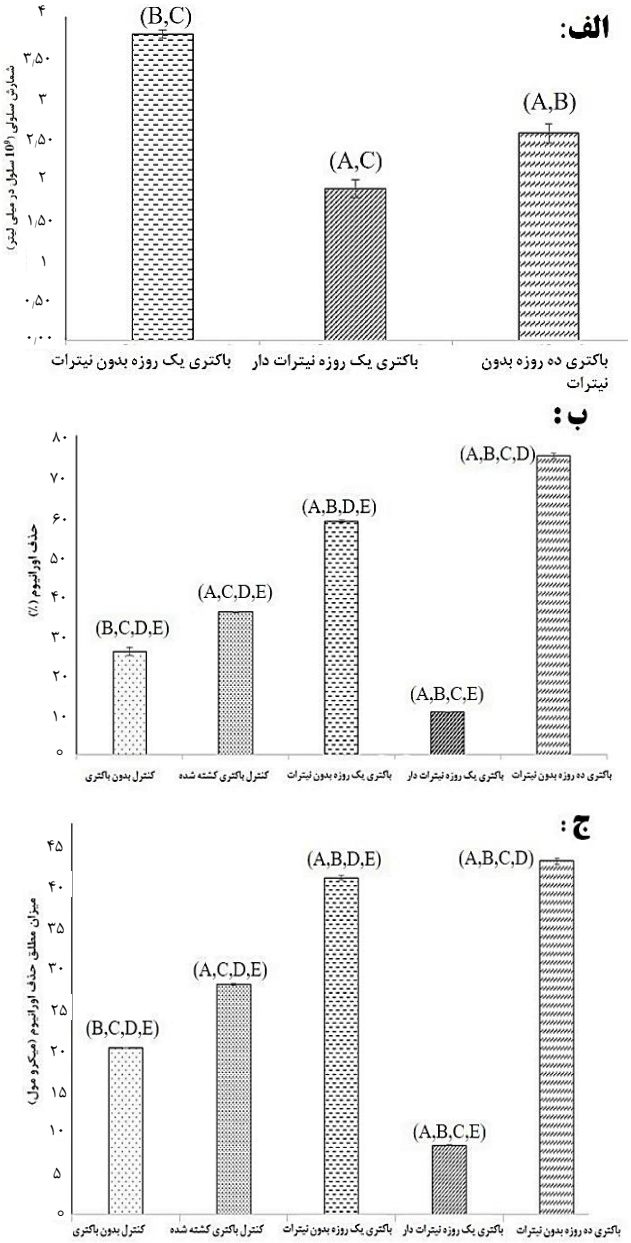
بیش‌ترین درصد حذف اورانیم در نمونه کشت باکتری از کلونی ۱۰ روزه گزارش شده است (۷۵٪) (E)، حال آن‌که مطابق شکل ۳ الف بیش‌ترین شمارش سلولی در باکتری بدون نیترات یک روزه گزارش شده بود ($p < ۰/۰۵$) (C). این موضوع نشان می‌دهد که افزایش درصد حذف در باکتری ۱۰ روزه ممکن است به دلیل جذب سطحی اورانیم بر روی توده‌های باکتری مرده باشد. این نتایج با مشاهدات مورفولوژی باکتری و نتایج اسپکتروفوتومتری و XRD مطابقت دارد.

کم‌ترین درصد حذف در نمونه باکتری نیترات‌دار از کلونی یک روزه گزارش شده است (۱۰/۶٪) که طبق شکل ۳ الف کم‌ترین میزان رشد سلولی را نیز دارا می‌باشد. این داده‌ها تأییدی بر احیای زیستی اورانیم توسط باکتری‌های زنده و از مسیر انتقال الکترون در این نمونه‌ها می‌باشد، هم‌چنین علت کاهش چشمگیر رشد و حذف اورانیم در این نمونه، اثر سمیت بالای نیترات و اورانیم به طور هم‌زمان بر باکتری است. اثر سمی نیترات بر باکتری پیش از این آزمایش نیز در تحقیقات ظاهری و همکاران در سال ۲۰۱۷ تا غلظت ۱۰ گرم بر لیتر مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج مشابهی ارایه شده است [۴].

درصد حذف باکتری بدون نیترات از کشت یک روزه (۵۹٪) بیش‌ترین میزان باکتری شمارش شده را نشان داده است، با وجود نشان دادن اختلاف معنادار با نمونه باکتری ۱۰ روزه ($P < ۰/۰۵$)، ۱۴٪ از باکتری ۱۰ روزه درصد حذف کم‌تری را نشان می‌دهد. این موضوع نشان می‌دهد که بخش عمده‌ی حذف اورانیم از محلول در نمونه‌ی باکتری از کلونی یک روزه، توسط باکتری‌های زنده و فعال و از مسیر زنجیره انتقال الکترون در این باکتری است. مطابق این نتایج، نمونه‌ی کشت یک روزه برای آزمایشاتی که با هدف احیای زیستی اورانیم بر روی باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* انجام می‌شوند انتخاب شد و در ادامه‌ی این پژوهش، میزان پایداری و ثبات اورانیم حذف شده از محیط محلول در نمونه‌های ۴ ماهه و ۹ ماهه مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۳ ج میزان حذف مطلق اورانیم را در نمونه‌های حاوی باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* تحت شرایط بی‌هوازی بعد از یک روز انکوباسیون نشان می‌دهد. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان مطلق حذف اورانیم به ترتیب در نمونه‌های ۱۰ روزه و یک روزه با نیترات (به ترتیب ۴۳ میکرومول و ۸ میکرومول) گزارش شده است و به ترتیب با حروف E و D در شکل ۳ ج نشان داده شده‌اند. میزان مطلق حذف اورانیم در باکتری از کشت یک روزه بدون نیترات ۴۱ میکرومول است که با دو نمونه ۱۰ روزه بدون نیترات و کشت یک روزه نیترات‌دار اختلاف معنادار نشان داده است ($P < ۰/۰۵$) (C). کنترل‌های بدون باکتری و باکتری کشته شده به ترتیب ۲۰ و ۲۸ میکرومول حذف اورانیم را نشان دادند و با سایر نمونه‌ها اختلاف معنادار در سطح ۵٪ نشان دادند و به ترتیب با حروف A و B نشان داده شده‌اند ($P < ۰/۰۵$).

مقایسه هر سه شکل ارایه شده نشان می‌دهد که باکتری کشت یک روزه و ۱۰ روزه از نظر توان حذف اورانیم از محیط محلول با وجود داشتن اختلاف معنادار در سطح ۵٪، تفاوت چشمگیری با یک‌دیگر نشان نمی‌دهند. باکتری کشت ۱۰ روزه را می‌توان به عنوان گزینه این مناسب برای پژوهش‌های احیای اورانیم، با هدف حذف زیستی به روش جذب در مصارف صنعتی پیشنهاد داد، چرا که رشد مناسب و نیز میزان حذف اورانیم مناسبی داشته و با وجود کاهش جمعیت نسبت به باکتری یک روزه، می‌تواند اورانیم بیش‌تری را از محلول حذف کند. از آن‌جا که حذف اورانیم محلول توسط باکتری، وابسته به دو فرایند جذب زیستی و احیای زیستی بوده و جذب زیستی وابسته به جمعیت و توده‌ی زیستی در دسترس برای باکتری است [۱۹]، می‌توان دریافت که در باکتری‌های ۱۰ روزه توان حذف اورانیم به روش جذب زیستی بیش‌تر از باکتری‌های یک روزه بوده است و همین موضوع موجب عملکرد مناسب‌تر این باکتری شده است، اما در این پژوهش که هدف، مطالعه‌ی فعالیت احیای زیستی اورانیم از مسیر زنجیره انتقال الکترون می‌باشد، سایر آنالیزهای تشخیصی احیای زیستی مانند اسپکتروفوتومتری و XRD و بررسی میزان پایداری احیای اورانیم در بازه‌های زمانی طولانی‌تر (۴ و ۹ ماهه) در بر روی باکتری کشت شده از کلونی یک روزه انجام شده است.



شکل ۳. نتایج حاصل از آنالیز کلونی‌های یک روزه و ۱۰ روزه باکتری بومی *Shewanella RCRIV* پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی در حضور اورانیم ۲ میلی‌مولار (دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد). الف) شمارش سلولی. ب) درصد حذف باکتری. ج) میزان حذف مطلق اورانیم. توضیح: در قسمت الف، حروف A، B و C به ترتیب اختلاف معنی‌دار نمونه‌های کشت یک روزه بدون نیترات، کشت یک روزه نیتراتدار و کشت ده روزه بدون نیترات را نشان می‌دهند و در قسمت ب و ج حروف A، B، C، D و E به ترتیب اختلاف معنادار بین نمونه‌های کنترل بدون باکتری، کنترل باکتری کشته شده، باکتری یک روزه بدون نیترات، باکتری یک روزه نیتراتدار و باکتری ده روزه بدون نیترات را نشان می‌دهد.

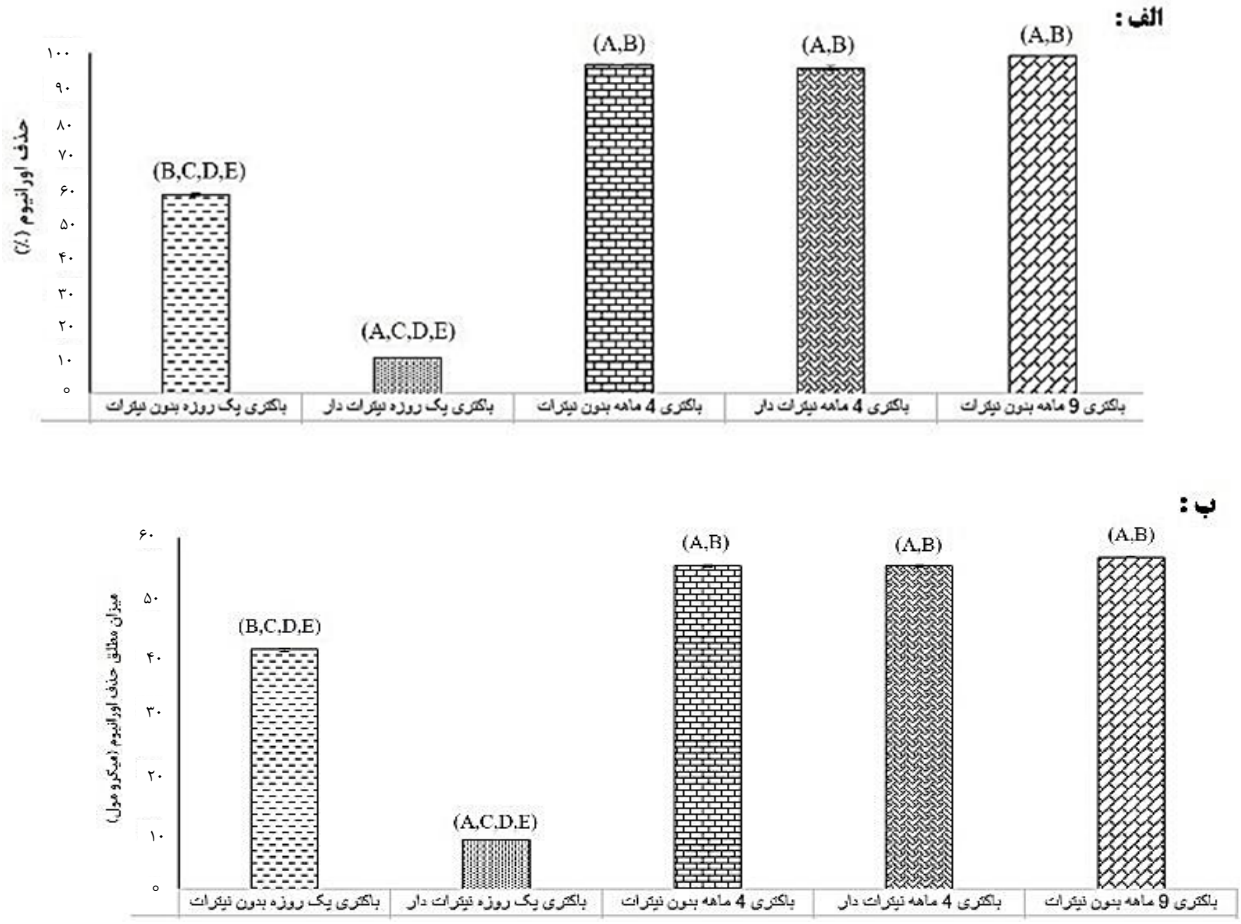
اهمیت بررسی اثر نیترات، از این جهت است که معمولاً نیترات به عنوان یک عامل مزاحم و حتی بازدارنده در احیای میکروبی اورانیم شناخته می‌شود، در حالی‌که بسیاری از محیط‌های آلوده به اورانیم حاوی مقادیر قابل توجه‌ی از نیترات هستند [۲۰]. تعداد سویه‌های شناخته شده ای که قادر به احیای اورانیم در حضور نیترات هستند کم است. به عنوان مثال می‌توان به گونه‌های *Geobacter sulfurreducens* و *Clostridium acetobutylicum* اشاره نمود که بی‌هوازی مطلق هستند. مطالعات در منابع علمی موجود نشان داد که تاکنون گزارشی در خصوص وجود یک گونه‌ی باکتریایی از جنس شوانلا که توانایی حذف اورانیم را در حضور نیترات داشته باشد، مشاهده نشده است. لذا در این تحقیق، باکتری *RCRIV* به عنوان یک گونه‌ی بی‌هوازی اختیاری از جنس شوانلا و قادر به احیای اورانیم در حضور مقادیر قابل توجهی از نیترات، معرفی شده است. در مقایسه‌ی باکتری *RCRIV* با سویه‌ی مهم و معروف *Shewanella oneidensis*، می‌توان به مزیت *RCRIV* در توانایی احیای اورانیم در حضور نیترات اشاره نمود. اگرچه برخی باکتری‌های بی‌هوازی مطلق هم‌چون ژئوباکتر و کلستریدیوم مستقل از نیترات قادراند اورانیم را احیا کنند [۲۰].

مشاهده شده است که غلظت‌های بالای نیترات (۱۵۰-۵۰ mM) در آب‌های زیرزمینی آلوده‌شده با رادیونوکلییدها مانع از احیای میکروبی می‌شود و خارج کردن نیترات از این آب‌ها موجب افزایش احیای اورانیم شش ظرفیتی می‌شود [۲۱]. در صورت وجود یون نیترات در کنار یون اورانیل UO_2^{2+} در محیط کشت باکتری *RCRIV*، یون‌های نیترات در واکنش احیا با اورانیم رقابت خواهد کرد. این موضوع به نوع باکتری بستگی دارد. باکتری شوانلا تمایل زیادی به احیای نیترات دارد، بنابراین محلول اولیه حاوی اورانیم نباید دارای نمک نیترات باشد، زیرا باکتری در مراحل اولیه احیا، ابتدا شروع به احیا نیترات می‌کند. بهتر است آنیون همراه با اورانیم محلول به گونه‌ای باشند که بتواند در متابولیسم باکتری مشارکت کند. مانند استات یا لاکتات که منبع انرژی باکتری می‌باشند و یا حداقل به گونه‌ای باشد که به عنوان رقیب اورانیم توسط باکتری احیا نشود، زیرا باکتری برای انجام واکنش احیا به یک دهنده الکترون نیاز دارد [۲۲].

براساس اصول ترمودینامیک، گیرنده‌های الکترونی مانند اکسیژن، منگنز، آهن و نیترات نسبت به اورانیم در اولویت احیا هستند و سولفات و گوگرد و دی‌اکسید کربن در اولویت پس از اورانیم هستند. به همین دلیل است که در محیط حاوی نیترات، اکسیژن و آهن به همراه اورانیم، امکان اکسید شدن مجدد اورانیم وجود دارد [۲۲].

چنان‌چه گفته شده، نمونه‌های با زمان ۴ و ۹ ماه، با هدف بررسی پایداری احیای زیستی اورانیم در مدت زمان‌های طولانی‌تر انکوباسیون باکتری در شرایط بی‌هوازی تهیه شده و نتایج درصد حذف این نمونه‌ها در شکل ۴ الف با نمونه یک روزه نیترات‌دار و بدون نیترات مقایسه گردید. چنان‌چه مشاهده می‌شود درصد حذف اورانیم از ۵۹٪ در نمونه یک روزه بدون نیترات، تا ۹۶٪ و ۹۹٪ در نمونه‌های ۴ ماهه و ۱۰ ماهه به ترتیب افزایش یافته ($P < ۰/۰۵$) که به ترتیب با حروف C و E نشان داده شده‌اند. نکته‌ی قابل توجه توان حفظ اورانیم نامحلول حذف شده به روش احیای زیستی، در مدت زمان‌های بسیار طولانی توسط این باکتری بومی می‌باشد و این موضوع تأکیدی بر توان بالای باکتری در کاربردهای صنعتی با هدف تصفیه‌ی پساب است. نکته‌ی مورد توجه دیگر، اثر ناچیز سمیت نیترات بر حذف اورانیم در بازه‌های طولانی (نمونه ۴ ماه) می‌باشد.

چنان‌چه مشاهده شد، نمونه کشت یک روزه نیترات‌دار کم‌ترین شمارش سلولی (شکل ۳ الف) و کم‌ترین درصد حذف (شکل ۳ ب) را نشان داده است که با حرف B در شکل ۴ ب دیده می‌شود ($P < ۰/۰۵$). شایان ذکر است که این اثر سمی در نمونه باکتری ۴ ماهه حاوی نیترات دیده نشده، هم‌چنین نمونه ۴ ماهه بدون نیترات و ۴ ماهه نیترات‌دار هیچ اختلاف معناداری با یک‌دیگر و با باکتری ۹ ماهه بدون نیترات نشان نمی‌دهند ($P > ۰/۰۵$) (E). عدم تأثیر سمیت نیترات با غلظت ۲۰ گرم در لیتر در حضور اورانیم ۲ میلی‌مولار تحت شرایط انکوباسیون بی‌هوازی در مدت ۴ ماه، گویای عدم تداخل حذف زیستی اورانیم با حذف نیترات در بازه‌های زمانی طولانی بوده و عملکرد مناسب این باکتری بومی را در بازه‌های زمانی طولانی نشان می‌دهد. پیش از این، عملکرد حذف نیترات تا غلظت ۱۰ گرم در لیتر در بازه زمانی یک روزه در پژوهش ظاهری و همکاران ۲۰۱۷ مورد بررسی قرار گرفت [۱۰].



شکل ۴. نتایج حاصل از آنالیز نمونه یک روزه، ۴ ماهه و ۹ ماهه بدون نیترات باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی در حضور اورانیم ۲ میلی‌مولار و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و از کلونی یک روزه. الف) درصد حذف باکتری. ب) میزان حذف مطلق اورانیم. توضیح: حروف A، B، C، D و E به ترتیب اختلاف معنادار بین باکتری یک روزه بدون نیترات، باکتری یک روزه نیترات‌دار، باکتری ۴ ماهه بدون نیترات، باکتری ۴ ماهه نیترات‌دار و باکتری ۹ ماهه بدون نیترات را نشان می‌دهد.

شکل ۴ ب میزان حذف مطلق اورانیم را در این باکتری در بازه‌های زمانی یک روزه، ۴ ماهه و ۹ ماهه نشان می‌دهد. چنان‌چه مشاهده می‌شود میزان مطلق حذف اورانیم به ازای هر باکتری، از ۴۱ میکرومول در نمونه یک روزه، به ۵۵ و ۵۷ میکرومول در نمونه ۴ ماهه و ۹ ماهه افزایش یافته ($P < ۰/۰۵$) که به ترتیب با حروف C و E نشان داده شده‌اند.

نتایج نمونه باکتری کشت یک روزه نیترات‌دار در مدت زمان انکوباسیون ۴ ماهه نیز با نمونه‌های باکتری ۴ ماهه بدون باکتری و باکتری ۹ ماهه فاقد اختلاف معنادار بوده و چنان‌چه اشاره شد، بر پایداری مولکولی اورانیم حذف شده از محلول تحت شرایط بی‌هوازی در مدت زمان های طولانی دلالت دارد ($P > ۰/۰۵$) (E). این نتایج نیز این باکتری را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای حذف فلزات سنگین از جمله اورانیم از پساب‌های صنعتی در بازه‌های زمانی طولانی نشان می‌دهد.

۲.۳ تغییرات مورفولوژی باکتری

بررسی تغییرات مورفولوژی باکتری با هدف تعیین اثر سن کلونی بر فعالیت باکتری توسط مشاهدات میکروسکوپ نوری، حین شمارش باکتری انجام گرفت. معیارهای مورد بررسی در این مرحله، بررسی رنگ نمونه‌ها پس از زمان انکوباسیون (زمان یک روز برای نمونه‌های کشت یک روزه بدون نیترات، یک روزه حاوی نیترات و کشت ده روزه بدون نیترات) و ۹ ماه برای کشت از کلونی یک روزه بدون نیترات است که در شکل ۲ نشان داده شده است. تمایل رنگ نمونه به رنگ قرمز و صورتی به عنوان معیاری از باکتری فعال با توان حذف اورانیم در نظر گرفته شد، چرا که این باکتری به دلیل دارا بودن محتوای بالای پروتیین‌های آهن‌دار سیتوکروم در مسیر انتقال الکترون، به رنگ قرمز دیده می‌شود [۲۰]. رنگ محلول نمونه در شرایط طبیعی قرمز روشن مایل به صورتی می‌باشد (شکل ۵ الف)، با افزایش مرگ و میر باکتری رنگ محلول به سمت قرمز تیره متمایل می‌شود (شکل ۵ ب) و با کاهش شمارش سلولی و کاهش باکتری فعال در نمونه، رنگ باکتری به زرد روشن متمایل خواهد شد (شکل ۵ ج). با افزایش زمان انکوباسیون (بازه بیش‌تر از یک هفته) و مرگ باکتری‌های زنده که با ایجاد توده‌های سلولی و جذب بخش عمده‌ی اورانیم همراه است، رنگ محلول نمونه سیاه رنگ می‌شود (شکل ۵ د). بررسی رنگ پلت باکتری پس از برداشت نمونه و سانتریفیوژ اولیه در شکل ۶، برای نمونه‌های مذکور نشان داده شده است. هدف از بررسی پلت علاوه بر تشخیص رنگ کلی باکتری، تخمین کلی حجم توده سلولی باکتری به عنوان معیاری از رشد باکتری در نمونه‌ی مورد بررسی می‌باشد. هم‌چنین ویژگی‌های ساختاری مانند اندازه نسبی باکتری، میزان تحرک و نوع فعالیت باکتری (انواع حرکات درجا، چرخشی و سرعت حرکات باکتری) حین شمارش سلولی به‌وسیله لام نئوبار مورد بررسی قرار گرفته است (شکل ۷). باکتری فعال با اندازه نسبی متوسط به عنوان باکتری فعال و عادی با توان بالای حذف زیستی اورانیم معرفی شده است (شکل ۸ الف) [۲۱].

۱.۲.۳ مورفولوژی نمونه یک روزه بدون نیترات

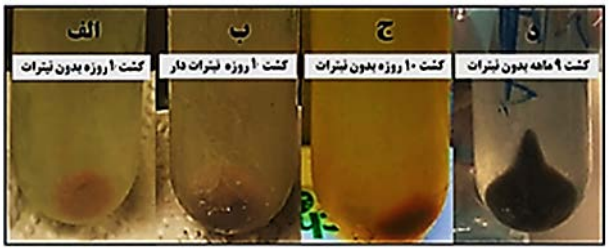
این نمونه حاوی باکتری فعال با شمارش سلولی و توانایی حذف اورانیم بالا بوده، به طوری‌که رنگ نمونه و رنگ پلت پس از سانتریفیوژ صورتی پر رنگ می‌باشد (شکل ۵ و ۶ الف). باکتری بسیار سریع به اطراف (راست و چپ) حرکت کرده و دارای انواع حرکات سریع چرخشی و درجا بودند. اندازه‌ی باکتری نسبت به باکتری اولیه تغییری نکرده و هیچ‌گونه توده باکتری مرده مشاهده نشد (شکل ۸ ب).

۲.۲.۳ مورفولوژی نمونه یک روزه نیترات‌دار

در این نمونه، باتوجه به اعمال تنش سمیّت نیترات علاوه بر حضور اورانیم، باکتری ضعیف‌تری نسبت به نمونه دو میلی‌مولار بدون نیترات مشاهده شد. رنگ نمونه و پلت صورتی کم رنگ و حرکات بسیار کند برای باکتری ثبت شد (شکل ۵ و ۶ ب). حرکات کند به سمت اطراف (راست یا چپ) مشاهده گردید و هیچ‌گونه حرکت سریع چرخشی مشاهده نشد و باکتری‌هایی که زنده بودند حرکت در جا و آرام را نشان دادند که نشان‌دهنده‌ی فعال نبودن باکتری می‌باشد. با دقت در اندازه‌ی باکتری، مشاهده شد که اندازه‌ی نسبی باکتری نسبت به باکتری اولیه کمی کوچک‌تر شده و موارد متعددی به شکل کروی دیده شدند (شکل ۷ د). کوچک‌تر شدن اندازه باکتری در نتیجه تقسیم دوتایی متعدد و عدم رشد باکتری‌های جدید مشاهده شد. این پدیده در شرایط تنش بالای محیطی اتفاق می‌افتد، چرا که با تقسیم شدن باکتری نسبت سطح به حجم باکتری افزایش می‌یابد و کوتاه شدن باکتری نشان می‌دهد که باکتری در حال تلاش برای زنده ماندن تحت شرایط تنش مواد سمی هم‌چون نیترات و اورانیم در شرایط بی‌هوازی است. کوتاه شدن باکتری‌ها مکانیسمی دفاعی است که از طریق هضم درون سلولی سیتوپلاسم و غشای خارجی باکتری انجام می‌شود [۲۲، ۲۳].

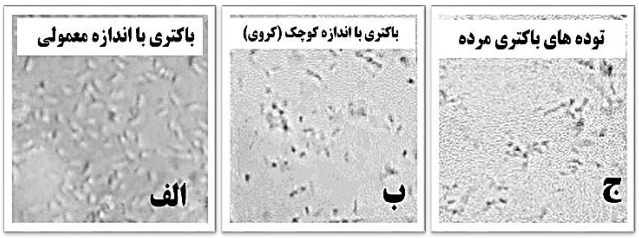
توده‌هایی از باکتری‌های مرده، در این نمونه مشاهده شد که با نتایج شمارش سلولی مطابقت دارد. جمعیت باکتری نسبت به باکتری بدون نیترات یک روزه و باکتری ۱۰ روزه بدون نیترات به شدت کاهش یافته بود (شکل ۳ الف). بسیاری از مطالعات ایجاد توده سلولی و تشکیل بایوفیلم را در بسیاری از شرایط تنش باکتری گزارش نموده‌اند. این مطالعات برای باکتری‌هایی که تشکیل توده سلولی داده‌اند تا ۱۰۰۰ برابر، تطابق‌پذیری بیش‌تری را با محیط نسبت به حالت باکتری آزاد در نظر گرفته‌اند (شکل ۸ ج) [۲۳-۲۵].

شکل ۵. تفاوت در رنگ نمونه‌های باکتری *Shewanella RCRI۷*. الف) نمونه کشت باکتری ۱ روزه بدون نیترات. ب) نمونه کشت باکتری ۱ روزه نیترات‌دار. ج) نمونه کشت باکتری ۱۰ روزه بدون نیترات. د) نمونه کشت باکتری ۹ ماهه بدون نیترات.



شکل ۶. مقایسه رنگ پلت نمونه‌های باکتری *Shewanella RCRI۷*. الف) نمونه کشت باکتری ۱ روزه بدون نیترات. ب) نمونه کشت باکتری ۱ روزه نیترات‌دار. ج) نمونه کشت باکتری ۱۰ روزه بدون نیترات. د) نمونه کشت باکتری ۹ ماهه بدون نیترات.

شکل ۷. بررسی مورفولوژی باکتری *Shewanella RCRI۷* زیر میکروسکوپ نوری (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×). الف) نمونه کشت باکتری ۱ روزه بدون نیترات. ب) نمونه کشت باکتری ۱ روزه نیترات‌دار. ج) نمونه کشت باکتری ۱۰ روزه بدون نیترات. نکته: نمونه کشت باکتری ۹ ماهه بدون نیترات فاقد باکتری زنده بوده و تنها توده‌های متراکم باکتری مشاهده شد.



شکل ۸. مقایسه تغییرات مورفولوژی باکتری *Shewanella RCRI۷* زیر میکروسکوپ نوری (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×). الف) باکتری با اندازه معمولی. ب) باکتری با اندازه کوچک (به شکل کروی). ج) توده‌های تجمع یافته از باکتری مرده.

۳.۲.۳ مورفولوژی نمونه ۱۰ روزه بدون نیترات

رنگ نمونه و پلت مشاهده شده تفاوت چندانی با باکتری یک روزه فاقد نیترات نشان نداد و به رنگ صورتی پر رنگ با نقاط تیره رنگ مشاهده شد (شکل ۵ و ۶ ج). حرکت باکتری نسبت به باکتری بدون نیترات یک روزه، کندتر بوده و بیش‌تر باکتری‌ها تنها حرکت درجا داشتند. حرکت چرخشی بسیار کم مشاهده شده و حرکت باکتری‌ها بیش‌تر به اطراف (راست و چپ) مشاهده شد. باکتری‌های ۱۰ روزه نسبت به باکتری‌های یک روزه بدون نیترات، کشیده‌تر بودند، به طوری‌که فیلامنت‌هایی (رشته‌های طویل سیتوپلاسمی) در نتیجه تجمع باکتری‌ها به دور یک‌دیگر دیده شد. توده‌هایی در این مجموعه مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی وجود باکتری‌های مرده می‌باشد. به طور کلی باکتری ۱۰ روزه نسبت به باکتری یک روزه بدون نیترات، در نوع حرکت و افزایش تعداد باکتری مرده تفاوت بارز نشان دادند.

۴.۲.۳ مورفولوژی نمونه ۹ ماهه بدون نیترات

رنگ نمونه و پلت مشاهده شده کدر و تیره رنگ متمایل به سیاه نشان داد (شکل ۵ و ۶ د) و توده‌های سلولی بسیار متراکم در زیر میکروسکوپ مشاهده شده و هیچ‌گونه باکتری زنده مشاهده نشد.

۳.۳ نتایج اسپکتروفوتومتری

برای اثبات احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI۷*، باید از روشی استفاده نمود که وجود اورانیم نامحلول (اورانیتیت) U (IV) را در محلول احیا اثبات نماید. وجود پیک اورانیتیت در بازه ۵۶۰ و ۶۶۲ نانومتر در شکل حاصل از آنالیز اسپکتروفوتومتری، می‌تواند دلیلی بر احیای زیستی اورانیم از مسیر زنجیره انتقال الکترون باشد [۲۶]. از آن‌جا که در پژوهش حاضر هدف از بررسی اسپکتروم محلول، تنها تشخیص تولید و یا عدم تولید اورانیتیت در محلول پس از تلقیح باکتری می‌باشد، این بررسی بر روی نمونه‌های کشت یک روزه، با زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفته است.

نمونه‌های مورد استفاده در این بررسی شامل کنترل فاقد باکتری، کنترل هوازی، کنترل باکتری کشته شده و نمونه بی‌هوازی یک روزه می‌باشد. در ادامه، نتایج حاصل از بررسی اسپکتروم این نمونه‌ها ارایه می‌گرد.

دقت در شکل ۹ الف که مربوط به نمونه کنترل فاقد باکتری است، نشان می‌دهد که پیش از تلقیح باکتری به محلول احیای حاوی اورانیم احیا نشده (اورانیل)، تنها پیک مشاهده شده در

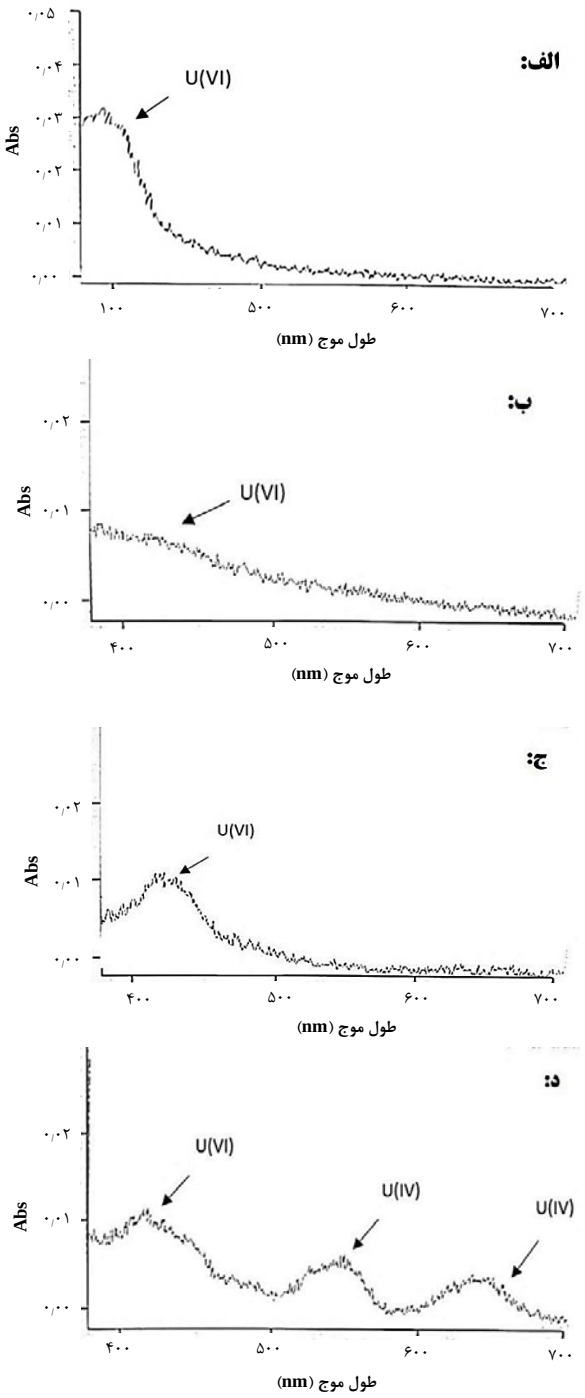
حد فاصل ۴۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر متعلق به اورانیم احیا نشده یا اورانیل می‌باشد و هیچ پیک اورانیتیت U(IV) مشاهده نمی‌گردد، پس هیچ احیایی نیز صورت نگرفته است. این نتیجه، احیای اورانیم را تنها در شرایط وجود باکتری زنده و از مسیر احیای زیستی اورانیم اثبات می‌کند.

شکل ۹ ب، شکل اسپکتروم نمونه باکتری کشته شده با حرارت را نشان می‌دهد که با کشته شدن باکتری، تنها پیک مشاهده شده در حد فاصل ۴۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر متعلق به اورانیم احیا نشده یا اورانیل است. در این نمودار هیچ پیک اورانیتیت U(IV) مشاهده نمی‌گردد و در صورت مشاهده‌ی کاهش اورانیم محلول (اورانیل) در این نمونه، به روش جذب زیستی در سطوح توده‌های باکتری مرده انجام شده است.

شکل ۹ ج اسپکتروم محلول احیای باکتری انکوبه شده در محیط هوازی را نشان می‌دهد. در این شکل تنها پیک قابل مشاهده، در حد فاصل ۴۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر متعلق به اورانیم احیا نشده یا اورانیل می‌باشد که فعال بودن مسیر زنجیره‌ی انتقال الکترون در احیای اورانیم را تنها تحت شرایط بی‌هوازی به وضوح نشان می‌دهد.

شکل ۹ د اسپکتروم حاصل از نمونه حاوی باکتری یک روزه انکوبه شده در شرایط بی‌هوازی با محلول احیای ۲ میلی‌مولار را نشان می‌دهد. این شکل علاوه بر پیک U(VI) دارای پیک U(IV) در طول موج‌های ۵۶۰ و ۶۶۲ نانومتر می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی احیای زیستی اورانیم می‌باشد. هم‌چنین با دقت در نمونه‌ی بدون باکتری و مقایسه با این شکل مشاهده می‌شود که ارتفاع پیک U(VI) کم‌تر شده است که تا حدودی کاهش اورانیم احیا نشده را نشان می‌دهد.

چنان‌چه مشاهده شد، نتایج اسپکتروم نمونه‌های کنترل فاقد باکتری، باکتری کشته شده و باکتری هوازی فاقد پیک اورانیم احیا شده U(IV) می‌باشد و تنها نمونه حاوی باکتری بی‌هوازی پیک اورانیم احیا شده را به وضوح نشان داده است. این نتایج تأییدی بر فعال بودن مسیر احیای اورانیم تحت شرایط بی‌هوازی است و صحت شرایط انجام آزمایش در محیط بی‌هوازی و احیای اورانیم در مسیر زنجیره انتقال الکترون را نشان می‌دهد.



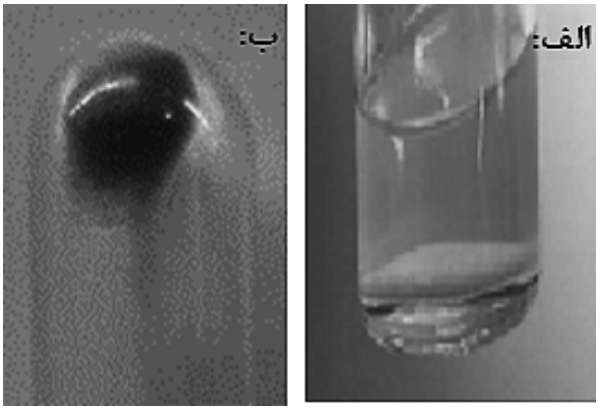
شکل ۹. اسپکتروم محلول احیای باکتری *Shewanella RCRI۷* انکوبه شده در غلظت ۲ میلی‌مولار اورانیم. الف) نمونه فاقد باکتری؛ در این تصویر پیک متعلق به اورانیل در طول موج‌های بین ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر U(VI) مشاهده می‌گردد و هیچ‌گونه اورانیتیت احیا شده مشاهده نشده است. ب) نمونه باکتری کشته شده؛ در این شکل پیک اورانیم احیا نشده (اورانیل) قابل تشخیص است. ج) نمونه باکتری هوازی؛ در این شکل پیک اورانیم احیا نشده قابل تشخیص است. د) شکل ۶ اسپکتروم نمونه یک روزه در شرایط بی‌هوازی؛ در این شکل پیک اورانیم احیا شده U (IV) (اورانیتیت)، در طول موج‌های ۵۶۰ و ۶۶۲ نانومتر قابل تشخیص است.

بررسی پیک اورانیتیت با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در مطالعات متعددی صورت گرفته است. به طور مثال در مطالعه‌ای فرانسیس و همکاران (۲۰۰۸)، احیای اورانیم توسط چند سویه از جنس کلستریدیوم را با این روش به اثبات رسانده‌اند. آن‌ها هم‌چنین در pHهای مختلف این بررسی را انجام داده و دریافتند که اورانیم در pHهای نزدیک به خنثی پیک بلندتری می‌دهد و در نتیجه احیا در این شرایط بهتر صورت گرفته است. هم‌چنین، احیای اورانیم توسط این باکتری‌ها را در چند غلظت متفاوت انجام داده و دریافتند که این باکتری در غلظت ۰٫۶ میلی‌مولار نسبت به غلظت‌های پایین‌تر احیا مناسب‌تری دارد [۲۷]. در مطالعه‌ی دیگری گائو و فرانسیس در سال ۲۰۱۳ به بررسی تأثیر حضور یا عدم حضور آهن در محیط، بر احیا اورانیم توسط باکتری *Clostridium sp. BC1* پرداخته و دریافتند که حضور آهن به طور قابل توجهی احیا اورانیم را افزایش می‌دهد و باعث می‌شود اسپکتروم پیک مناسب‌تری برای اورانیتیت ارایه دهد [۲۸].

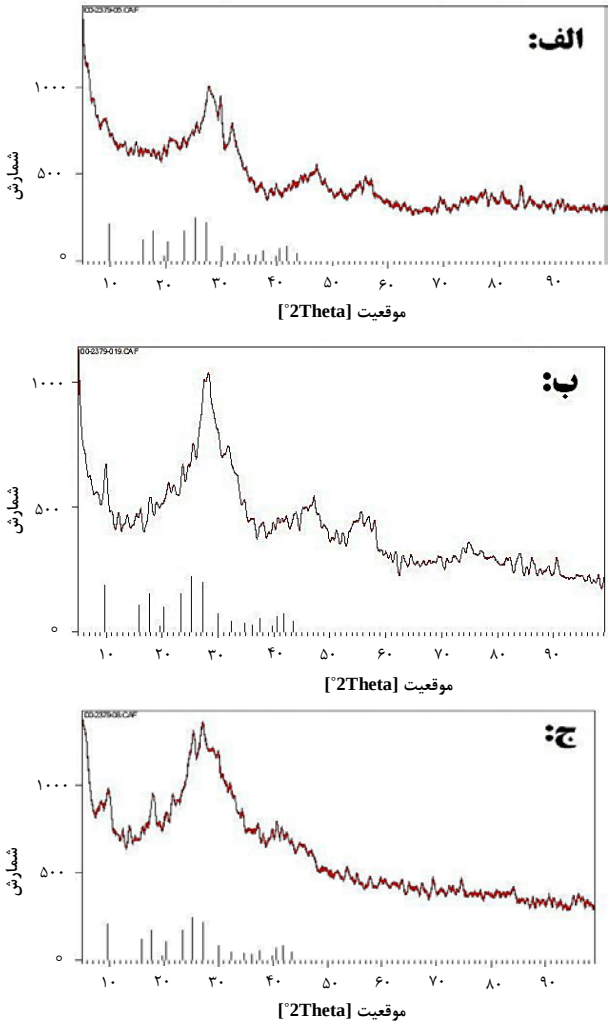
۴.۳. نتایج XRD

اثبات احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRIV* به روش XRD یکی از روش‌هایی است که در پژوهش‌های مختلف جهت اثبات احیای اورانیم بر روی نمونه‌های دارای باکتری یا فاقد آن انجام گرفته است. در این روش با تجزیه و تحلیل کریستال‌های تشکیل شده در رسوب، تشخیص ترکیبات شکل گرفته در آن را ممکن می‌شود [۲۹]. برای انجام این آنالیز، پس از انکوباسیون باکتری و مشاهده رسوب حاصل از نمونه‌های دارای غلظت ۲ میلی‌مولار اورانیم، محلول نمونه‌های دارای رسوب مناسب سانتریفیوژ شده و در اتمسفر بی‌هوازی خشک گردیدند (شکل ۱۰).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، حضور اورانیتیت در تمامی نمونه‌های ۴ ماهه بدون نیترات (شکل ۱۱ الف) و ۴ ماهه نیترات‌دار (شکل ۱۱ ب) و ۹ ماهه‌ی بدون نیترات (شکل ۱۱ ج) در آنالیز XRD مشاهده و به اثبات رسید. حضور اورانیتیت در نمونه‌های ۴ ماهه نیترات‌دار و بدون نیترات تأییدی بر انجام فرایند احیا است. بررسی نمونه‌های نیترات‌دار و بدون نیترات در بازه‌ی زمانی ۴ ماهه هم‌چنین نمونه‌ی بدون نیترات ۹ ماهه تأییدی بر پایداری و حذف اورانیم از محلول مورد مطالعه در بازه‌ی زمانی طولانی‌تر است. چنان‌چه مطابق شکل ۹ الف حذف ۹۶٪ اورانیم در نمونه‌های ۴ ماهه بدون نیترات و نیترات‌دار، هم‌چنین حذف ۹۹٪ اورانیم، در نمونه‌ی با مدت زمان انکوباسیون ۹ ماهه به اثبات رسیده است.



شکل ۱۰. بررسی رسوب نمونه ۲ میلی‌مولار اورانیم. شکل (الف و ب) به ترتیب رسوب اورانیم پس از برداشته شدن ویال از انکوباتور و رسوب اورانیم پس از سانتریفیوژ را نشان می‌دهند. رنگ سیاه رسوب مشاهده شده در کف ویال، پس از سانتریفیوژ و فشرده شدن قابل تشخیص می‌گردد.



شکل ۱۱. بررسی حضور اورانیتیت در نمونه دارای اورانیم ۲ میلی‌مولار اورانیم از کشت یک روزه، با مدت زمان انکوباسیون ۴ ماه از طریق آنالیز XRD. الگوی ارایه شده در سطح زیرین پیک XRD، جایگاه دقیق پیک‌های استاندارد اورانیتیت (U (IV)) را در نمونه مورد بررسی تعیین می‌کند. الف) نمونه ۴ماهه بدون نیترات ب) نمونه ۴ ماهه نیترات‌دار ج) نمونه ۹ ماهه بدون نیترات.

براساس مشاهدات صورت گرفته آنالیز XRD در بازه‌های زمانی، ۴ ماهه و ۹ ماهه، هر چه مدت زمان انکوباسیون طولانی‌تر می‌گردد، رسوب و حجم حاصل از احیای اورانیم باکتری بیش‌تر شده و رنگ رسوب تیره‌تر و کریستال‌های قهوه‌ای تیره مایل به سیاه اورانیتیت مشخص‌تر می‌گردد. این مسأله در نمونه‌های انکوبه ۹ ماهه نسبت به نمونه‌ی با مدت زمان انکوباسیون کم‌تر کاملاً مشخص و مشهود بود. پیک حاصل از نمونه ۲ میلی‌مولار در شکل ۱۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود پیک‌های بلند نشان‌گر حجم بالای اورانیم احیا شده در نمونه به صورت اورانیتیت می‌باشد. هم‌چنین پیک‌های بلندی که متعلق به ترکیب دیگری از اورانیم در رسوب حاصله به نام اورانیم هیدروکساید ($UO_2(OH)_2$) می‌باشد قابل تشخیص است.

بررسی مقالات مختلف استفاده از آنالیز XRD را جهت اثبات احیا اورانیم با بررسی وجود اورانیتیت نشان می‌دهد. مطالعات خیجنیاک و همکاران در سال ۲۰۰۵، بر روی یک باکتری ترموفیل به نام *Thermo terra bacterium ferrireducens* [۲۹] هم‌چنین پژوهش روه و همکاران در سال ۲۰۰۲، بر روی سویه‌ای از خانواده *Thermoanaerobacter* [۳۰]، احیای زیستی اورانیم در آنالیز XRD را اثبات می‌کند. از طرفی دیگر، در پژوهش وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۸، احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella Putrefaciens* در حضور ریبوفلاوین و AQS به عنوان شاتل‌های الکترونی مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش به کمک XRD احیای اورانیم را به صورت اورانیتیت توسط باکتری نشان داده و بیان می‌دارد که باکتری در حضور شرایط بی‌هوازی، قادر است اورانیم را به صورت U(IV) (اورانیتیت) رسوب دهد، چرا که اورانیتیت دارای کریستال‌های مکعبی و مشخص بوده، اما U(IV) مشاهده شده در این شرایط بدون تشکیل کریستال رسوب کرده است. این موضوع می‌تواند امکان وجود اورانیم احیا شده غیراورانیتیتی را در رسوبات حاصل از احیای اورانیم نشان دهد [۳۱].

از سویی دیگر، در پژوهش‌های مختلف پیوند اورانیم با هیدروکسیل در طی فرایند جذب زیستی مورد تأیید قرار گرفته است. در بررسی وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۸ به وجود ترکیبات هیدروکسید اورانیم بر روی سطح باکتری *S.putrefaciens* اشاره شده و بیان گردیده است که وجود گروه‌های عاملی مختلف مانند هیدروکسیل و آمید بر روی سطح باکتری موجب ایجاد پیوند میان این گروه‌ها و اورانیم شده و اورانیم را به سطح باکتری متصل یا به عبارتی جذب می‌کنند [۳۱]. هم‌چنین، این رسوب را می‌توان حاصل رسوب خود به خودی اورانیم محلول که پس از مدتی در محیط حاوی آن ایجاد می‌شود، دانست. بر اساس پژوهشی که کنگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام داده‌اند، اورانیم محلول (UO^{2+}_2) در pH بین ۶ الی ۹ پس از گذشت چند روز به صورت خود به خودی و با ترکیب $UO_2(OH)_2$ رسوب می‌کند. از آن‌جا که pH محلول احیا ۶٫۴ می‌باشد، می‌توان وجود این ماده را حاصل رسوب خود به خودی اورانیم نیز دانست [۳۲]. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که رسوب حاصل از نمونه مورد بررسی به جز فرایند احیا، می‌تواند در نتیجه فرایند جذب و به میزان کم‌تری رسوب خود به خودی اورانیم محلول حاصل شده باشد و این امر از اهمیت تأثیر مکانیسم احیا در ایجاد رسوب اورانیم نمی‌کاهد [۳۳-۳۵].

۴. نتیجه‌گیری

باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* قادر به حذف اورانیم در شرایط بی‌هوازی می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری کشت جامد یک روزه به دلیل توانایی رشد و زنده‌مانی بیش‌تر و ویژگی‌های مورفولوژی از قبیل رنگ پلت صورتی پررنگ مایل به قرمز در باکتری شوانلا و تحرک بیش‌تر به عنوان نمونه‌ی مناسب‌تر جهت احیای اورانیم نسبت به باکتری از کلونی ۱۰ روزه پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین، حذف اورانیم در نمونه‌های ۴ و ۹ ماهه تا ۹۹٪ افزایش یافته است که یکی دیگر از کاربردهای این باکتری در مقیاس صنعتی را نشان می‌دهد. آنالیز XRD و اسپکتروفوتومتری نیز احیای اورانیم در شرایط بی‌هوازی را اثبات نموده است. این نتایج این باکتری را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای صنعتی معرفی می‌کند.

از سوی دیگر، در این پروژه، کاهش ۴۸٪ حذف اورانیم، بر باکتری کشت یک روزه حاصل از تأثیر حضور آنیون سمی نیترات مشاهده شد. حضور این آنیون علاوه بر کاهش روند احیا، بر روی توانایی تولیدمثل و زنده‌مانی و مورفولوژی باکتری نیز اثر منفی داشته است. از این‌رو، در پژوهش‌های آتی در این زمینه، پیشنهاد می‌گردد که بر روی نحوه‌ی ارتقاء و افزایش قابلیت باکتری شوانلا مطالعات بیش‌تری انجام گردد تا نه تنها این باکتری در غلظت‌های بالای اورانیم، توانایی احیای بالاتری داشته باشد، بلکه در حضور سایر آنیون‌ها خصوصاً نیترات، توانایی حذف و احیای اورانیم خود را حفظ نماید.

مراجع

1. A. Abdelouas A, et al. *Reduction of U (VI) to U (IV) by indigenous bacteria in contaminated ground water*, Journal of Contaminant Hydrology., **35**, 217 (1998).
2. K. Nealson, D. Saffarini, *Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation*, Annual Reviews in Microbiology., **48**, 311 (1994).
3. S. Pirbadian, et al. *Shewanella oneidensis MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components*, Proceedings of the National Academy of Sciences., **111**, 12883 (2014).
4. A. Zaheri Abdehvand, et al. *Removal of U (VI) from aqueous solutions using Shewanella sp. RCRI7, isolated from Qurugöl Lake in Iran*, Radiochimica Acta., **105**, 109 (2017).
5. A. Ayangbenro, O. Babalola, *A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents*, International Journal of Environmental Research and Public Health., **14**, 94 (2017).
6. Tarhriz V, et al. *Isolation and characterization of some aquatic bacteria from Qurugol Lake in Azerbaijan under aerobic conditions*, Advances in Environmental Biology., **9**, 3173 (2011).
7. P. Subramanian, S. Pirbadian, E. Naggar, *Ultrastructure of Shewanella oneidensis MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography*, Proceedings of the National Academy of Sciences., **115**, 3246 (2018).
8. B. Gu, et al. *Bioreduction of uranium in a contaminated soil column*, Environmental Science & Technology., **39**, 4841 (2005).
9. I. Zinicovscaia, et al., *Selective metal removal from chromium-containing synthetic effluents using Shewanella xiamenensis biofilm supported on zeolite*, Environmental Science and Pollution Research., **11**, 1 (2020).
10. A. Abdehvand, et al., *Removal of U (VI) from aqueous solutions using Shewanella sp. RCRI7, isolated from Qurugöl Lake in Iran*, Radiochimica Acta., **105**, 109 (2017).
11. V. Tarhriz, et al., *Isolation and characterization of naphthalene-degradation bacteria from Qurugol Lake located at Azerbaijan*, Biosci Biotechnol Res Asia., **11**, 715 (2014).
12. R. Ghasemi, et al., *Evaluation of mtr cluster expression in Shewanella RCRI7 during uranium removal*, Archives of Microbiology., **202**, 2711 (2020).
13. K.R. Czerwinski K.R. MF. Polz, *Uranium enrichment using microorganisms*, (Google Patents; 2008).
14. R. Bencheikh-Latmani, et al., *Global transcriptional profiling of Shewanella oneidensis MR-1 during Cr (VI) and U (VI) reduction*, Appl Environ Microbiol, **71**, 7453 (2005).
15. T. Kasai, et al., *Transcriptional mechanisms for differential expression of outer membrane cytochrome genes omcA and mtrC in Shewanella oneidensis MR-1*, BMC Microbiology, **15**, 68 (2015).
16. H. Wang, et al, *Metabolomic analyses show that electron donor and acceptor ratios control anaerobic electron transfer pathways in Shewanella oneidensis*, Metabolomics, **9**, 642 (2013).
17. G. Zhou, et al, *Combined effect of loss of the caa 3 oxidase and Crp regulation drives Shewanella to thrive in redox-stratified environments*, The ISME Journal, **7**, 1752 (2013).
18. R. Abboud, et al, *Low-temperature growth of Shewanella oneidensis MR-1*, Appl Environ Microbiol, **71**, 811 (2005).
19. L. Newsome, K. Morris K. *The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides*, Chemical Geology, **363**, 164 (2014).
20. H. Zhang, et al, *Impacts of nitrate and nitrite on physiology of Shewanella oneidensis*, PLoS One, **626**, 4 (2013).
21. J. Wall, et al, *Uranium reduction*, Annu. Rev. Microbiol, **60**, 149 (2006).
22. B. Mohapatra, et al, *Biochemical and genomic facets on the dissimilatory reduction of radionuclides by microorganisms–A review*, Minerals Engineering, **23**, 8 (2010).
23. H. Fu, et al, *Dissociation between iron and heme biosyntheses is largely accountable for respiration defects of Shewanella oneidensis fur mutants*, Appl Environ Microbiol, **84**, 39 (2018).
24. M. Zarei, et al, *U (VI) tolerance affects Shewanella sp. RCRI7 biological responses: growth, morphology and bioreduction ability*, Archives of Microbiology, **204**, 13 (2022).
25. C. Astudillo, F. Acevedo, *Adaptation of Sulfolobus metallicus to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate*, Hydrometallurgy, **92**, 11 (2008).
26. P. Prabhakaran, et al, *Microbial stress response to heavy metals in the environment*, Rsc Advances, **6**, 111 (2016).
27. S. Lai, et al. *Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance*, Environmental microbiology, **11**, 126 (2009).
28. T. Manobala, S. Shukla, *A new uranium bioremediation approach using radio-tolerant Deinococcus radiodurans biofilm*, Journal of Biosciences, **44**, 122 (2019).
29. A. Francis A, C. Dodge, *Bioreduction of uranium (VI) complexed with citric acid by Clostridia affects its structure and solubility*, Environmental Science & Technology, **42**, 8277 (2008).
30. W. Gao, Aj. Francis, *Fermentation and hydrogen metabolism affect uranium reduction by clostridia*, (ISRN biotechnology, 2013).
31. B.L. Dutrow BL, C.M. Clark, *X-ray powder diffraction (XRD)*, (Geochemical Instrumentation and Analysis, 2012).

32. T. Khijniak, et al, *Reduction of uranium (VI) phosphate during growth of the thermophilic bacterium Thermoterrabacterium ferrireducens*, Appl Environ Microbiol, **71**, 6423 (2005).
33. Y. Roh, S. Liu, *Isolation and characterization of metal-reducing Thermoanaerobacter strains from deep subsurface environments of the Piceance Basin, Colorado*, Appl Environ Microbiol, **68**, 6013 (2002).
34. P. Wang, et al. *Effects of riboflavin and AQS as electron shuttles on U (vi) reduction and precipitation by Shewanella putrefaciens*, RSC advances, **54**, 30692 (2018).
35. M.J. Kang, et al. *Precipitation and adsorption of uranium (VI) under various aqueous conditions*, Environmental Engineering Research, **7**, 149 (2002).

COPYRIGHTS
©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

استناد به این مقاله
الهام راستخواه، فائزه فاطمی، پروانه مقامی (۱۴۰۱)، بررسی زنده‌مانی، مورفولوژی و احیای زیستی اورانیم در باکتری بومی *Shewanella RCRI۷* از کلونی‌های یک روزه و ده روزه، ۱۰۲، ۱۵۶-۱۷۱

DOI: 10.24200/nst.2022.1479 **Url**: https://jonsat.nstri.ir/article_1422.html