

## بررسی تاثیر تثبيت میکروارگانيسمها بر روی تنوع و دانسيته گروههای عاملی موجود بر روی سطح جاذب ترکیبی

صحبته زاده، هژبر - کشتکار، علیرضا\* - صفدری، سید جابر - فاطمی، فائزه - قاسمی ترک آباد، مرتضی  
سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای

### چکیده:

در این پژوهش، تاثیر تثبيت سلولهای باکتریایی درون جاذب ترکیبی بر دانسيته گروههای عاملی موجود روی سطح جاذب بررسی گردید. مقایسه نتایج تیتراسیون پتانسیومتری جاذب ترکیبی با کیتوزان نشان داد که تثبيت موجب اضافه شدن گروههای عاملی آمین/هیدروکسیل آزاد به جاذب ترکیبی می شود در حالی که کیتوزان تنها دارای گروههای عاملی آمین پروتونه شده بود. همچنین مشخص شد که دانسيته کل گروههای عاملی روی جاذب ترکیبی و کیتوزان به ترتیب  $6/00 \text{ meq/g}$  و  $4/78 \text{ meq/g}$  بوده است. بطور کلی ثابت شد که بهبود ظرفیت جذب زیستی گزارش شده در منابع برای جاذب ترکیبی نسبت به کیتوزان ناشی از تثبيت و حضور سلولهای باکتریایی غنی از گروههای عاملی بوده است. کلمات کلیدی: جاذب ترکیبی، جذب زیستی، باکتری *Pseudomonas putida*، تیتراسیون پتانسیومتری، دانسيته گروه عاملی

### مقدمه:

در سالهای اخیر، به کارگیری بیوتکنولوژی در زمینه کنترل و حذف آلودگی های ناشی از فلزات در محیطهای آبی مورد توجه قرار گرفته است و به تدریج به مبحثی داغ در زمینه کنترل آلودگی تبدیل شده است که ناشی از قابلیت های کاربردی آن می باشد [۱]. از میان روش های مختلف بیولوژیکی، ثابت شده است که جذب زیستی (Biosorption) از پتانسیل مناسبی جهت جایگزین شدن به جای روش های متداول شیمیایی در حذف آلودگی ها برخوردار می باشند [۲].

جداسازی و بازیابی فلز بعد از فرآیند جذب و قابلیت استفاده مجدد جاذبها از مهم ترین دغدغه ها در تجاری سازی فرآیند جذب زیستی می باشد [۳]. ژل دانه ها (Gel beads) معمولا به عنوان بهترین شکل جاذب برای جذب فلزات سنگین بویژه از محلول های آبی در مقیاس پیوسته می باشند [۴]. اما از آنجایی که تبدیل جاذب از حالت پودری یا پولکی به شکل ژل دانه ها، موجب محدودیت دسترسی به جایگاه های فعال واقع در درون ژل دانه و متعاقبا کاهش ظرفیت جذب جاذب به ازای واحد جرم جاذب بارگذاری شده می شود، لذا تثبيت میکروارگانيسمها با مساحت سطح بسیار بالا و قابلیت جذب مستقیم فلزات سنگین درون این ژل دانه ها می تواند موجب تقویت دانسيته گروههای عاملی درون جاذب ترکیبی و رفع مشکل افت ظرفیت جاذبها در حالت ژل دانه گردد [۵، ۶]. روش های مختلفی برای شناسایی تاثیر حضور میکروارگانيسمها

درون جاذب ترکیبی وجود دارد. تیتراسیون پتانسیومتری (Potentiometric titration) یکی از آنهاست که به منظور تعیین ثوابت پروتون زدایی ( $pK_a$ ) و دانسیته گروه‌های عاملی موجود در جاذب مورد استفاده قرار می‌گیرد [۷].

در این پژوهش، تاثیر تثبیت سلول‌های باکتریایی *P.putida* درون کیتوزان بر تنوع و دانسیته گروه‌های عاملی جاذب ترکیبی در مقایسه با کیتوزان مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش کار:

### میکروارگانیسم و مواد

باکتری *P.putida* بشکل لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) و پودر کیتوزان از محصولات شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. محلول‌های آبی حاوی اورانیم از انحلال نمک نیترات اورانیل  $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (شرکت مرک) در آب بدون یون تهیه شد. مقادیر pH محلول‌ها با استفاده از  $HNO_3$  و  $NaOH$  یک مولار و به وسیله یک pH متر (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) تنظیم شد.

### کشت باکتری

برای احیای باکتری از حالت لیوفیلیزه و کشت آن از محیط کشت نوترینت براث (Nutrient broth): پیتون، ۵ گرم در لیتر؛ بیف اکسترکت، ۳ گرم در لیتر؛ و آب مقطر، ۱ لیتر؛ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دور همزن  $150 \text{ rpm}$  بمدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به فاز ساکن استفاده شد. ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه و دور  $7000 \text{ rpm}$  سانتریفوژ و دو بار با آب مقطر شستشو شد. برای بدست آوردن باکتری غیرفعال شده، باکتری با محلول  $C_2H_5OH$  ۶۰٪ به مدت یک ساعت و در دمای اتاق آمیاش شد. سپس سلول‌ها با بافر فسفات شستشو و در نهایت ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ترکیبی درون آب مقطر به منظور اضافه کردن به محلول کیتوزان تهیه شد [۸].

### آماده‌سازی جاذب

برای تهیه جاذب ترکیبی، ۲ گرم پودر کیتوزان درون ۶۰ میلی‌لیتر محلول ۰.۵٪ حجمی اسید استیک اضافه شده و با اعمال اختلاط، اجازه داده شد تا کل کیتوزان درون محلول اسیدی حل شود. بمنظور انحلال کامل کیتوزان، عمل اختلاط به مدت یک شب اعمال گردید. پس از انحلال کامل کیتوزان، ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی سلول‌ها به محلول اضافه و تا دستیابی به یک محلول کاملاً همگن اختلاط ادامه پیدا کرد. سپس محلول با یک سرنگ بصورت قطره‌ای درون محلول ۰/۵ مولار  $NaOH$  چکانده شد. برای جلوگیری از چسبیدن ژل‌دانه‌ها، درون محلول اختلاط اعمال گردید. همچنین برای استحکام مکانیکی ژل‌دانه‌ها اجازه داده شد تا آن‌ها حداقل نیم‌ساعت درون محلول بازی باقی بمانند. ژل‌دانه‌ها سپس از محلول بازی خارج و با

آب مقطر شستشو داده شد تا تمام هیدروکسید سدیم آن حذف گردد. سپس ژل دانه‌ها در دمای اتاق خشک شدند. برای تهیه ژل دانه کیتوزان فاقد باکتری (کیتوزان)، به جای سوسپانسیون باکتری، ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به محلول کیتوزان اضافه گردید [۹].

### تیتراسیون پتانسیومتری

برای تیتراسیون پتانسیومتری، بصورت جداگانه سوسپانسیونی از مقدار مشخصی (۰/۳ گرم) از جاذب ترکیبی و کیتوزان درون ۵۰ میلی لیتر آب بدون یون تهیه گردید. سپس سوسپانسیون درون یک سیستم تیتراسیون اتوماتیک (Metrohm, 796 Titroprocessor) ریخته شد. ضمن ایجاد اختلاط درون سوسپانسیون، دی اکسید کربن محلول درون سوسپانسیون نیز با اعمال جریان گاز آرگون از ۳ ساعت قبل از شروع تیتراسیون تا انتهای آزمایش خارج گردید. پس از آن، سوسپانسیون با محلول 0.1M HCl تا pH=۲/۵ و به صورت معکوس با 0.1M NaOH تا pH=۱۱/۵ تیتر شد. آب بدون یون به عنوان نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. بعد از هر بار افزودن تیترانت و با در نظر گرفتن نرخ نوسان کمتر از ۰/۴ mV/min به عنوان معیار حصول حالت تعادل، مقدار pH سوسپانسیون ثبت گردید.

### نتایج:

داده‌های آزمایشگاهی به دست آمده از تیتراسیون پتانسیومتری کیتوزان و جاذب ترکیبی با استفاده از برنامه ProtoFit Version 2.1 مورد تحلیل قرار گرفت و  $pK_a$  و مقادیر دانسیته جایگاه‌ها برای هر دو جاذب زیستی در جدول (۱) گردآوری شد. همچنین منحنی برازش شده مربوط به داده‌های آزمایشگاهی تیتراسیون جاذب ترکیبی به همراه منحنی‌های مشتقات اول و دوم در شکل (۱) نشان داده شده‌اند.

### بحث و نتیجه‌گیری:

همان‌طور که در جدول (۱) آورده شده است، کیتوزان تنها دارای یک  $pK_a$  در ۶/۵۷ بود که مربوط به گروه‌های آمین پروتونه شده ( $-NH_3^+$ ) می‌باشد که از مرحله تهیه ژل دانه (رابطه (۱)) به دست آمده است. این نتایج ثابت کرد که غلظت آمین آزاد ( $-NH_3$ ) در کیتوزان در مقایسه با نوع پروتونه شده آن قابل صرف نظر است. طبق مطالعات قبلی انجام شده [۱۰]، وجود گروه‌های آمین پروتونه شده در کیتوزان تایید شده است.



برای جاذب ترکیبی، دو مقدار  $pK_a$  متمایز و به ترتیب در ۶/۳۵ و ۱۱ شناسایی شد. مقادیر در محدوده ( $pK_a$  6.1-6.8) به گروه‌های فسفات و در محدوده‌های ( $pK_a$  8-11) و ( $pK_a$  9.5-13) به ترتیب به گروه‌های آمین و هیدروکسیل می‌توانند نسبت داده شوند [۱۱]. اما به دلیل دانسیته پایین گروه‌های فسفات در سلول‌های باکتریایی [۱۲] تثبیت شده درون این جاذب، مقدار  $pK_a=۶/۳۵$  عمدتاً مربوط به گروه‌های آمین

پروتونه شده است. هم چنین،  $pK_a=11$  مربوط به گروه های آمین/هیدروکسیل به شکل آزاد می باشد که عمدتاً ناشی از سلول های باکتریایی می باشند [۱۲]. کل دانسیته (غلظت) جایگاه های فعال در کیتوزان و جاذب ترکیبی به ترتیب  $4/78 \text{ meq/g}$  و  $6/0 \text{ meq/g}$  برآورد گردید. علاوه بر این، دانسیته جایگاه های آمین/هیدروکسیل آزاد قابل مقایسه با جایگاه های آمین پروتونه شده درون جاذب ترکیبی بود (جدول (۱)). لذا ثابت شد که تثبیت موجب یک افزایش در دانسیته جایگاه های اتصال فلزی به دلیل حضور گروه های عاملی متعدد در سلول های باکتریایی می شود. با توجه به نتایج تحقیقات قبلی گروه نویسندگان مبنی بر بهبود ظرفیت جذب جاذب ترکیبی در مقایسه با کیتوزان (نتایج در این جا آورده نشده است)، این بهبود می تواند ناشی از همین افزایش در دانسیته جایگاه های اتصال باشد.

جدول (۱): گروه های عاملی سطحی و دانسیته های تعیین شده با استفاده از تیتراسیون پتانسیومتری

گروه عاملی	جاذب ترکیبی					
	داده های ProtoFit V2.1		داده های ProtoFit V2.1		داده های برازش مدل	
	دانسیته $\text{meq/g}$	$pK_a$	دانسیته $\text{meq/g}$	$pK_a$	دانسیته $\text{meq/g}$	$pK_a$
آمین پروتونه شده	$4/78 \pm 0/12$	$6/57 \pm 0/40$	$3/42 \pm 0/17$	$6/35 \pm 0/07$	$3/00$	$6/6$
آمین / هیدروکسیل آزاد	-	-	$2/58 \pm 0/06$	$11 \pm 0/01$	$2/85$	$10/95$
کل	$4/78 \pm 0/12$	-	$6/00 \pm 0/11$	-	$5/85$	-

برای تحلیل بیش تر داده های تیتراسیون پتانسیومتری جاذب ترکیبی، از برخی مدل ها با فرض حضور یک، دو و یا سه نوع گروه عاملی متمایز استفاده شد. این مدل ها محققین را قادر می سازد تا دانسیته مربوط به هر یک از گروه های عاملی شناسایی شده را تعیین نماید. بنابراین، پس از برازش داده های تیتراسیون با هر سه مدل، مشخص شد که جاذب ترکیبی دارای دو گروه عاملی متمایز می باشد. مدل بهتر برازش شده توسط یک رابطه غیرخطی بین کسر مولی تیرانت اضافه شده ( $x_{add}$ ) و مقدار pH به صورت رابطه (۲) می باشد:

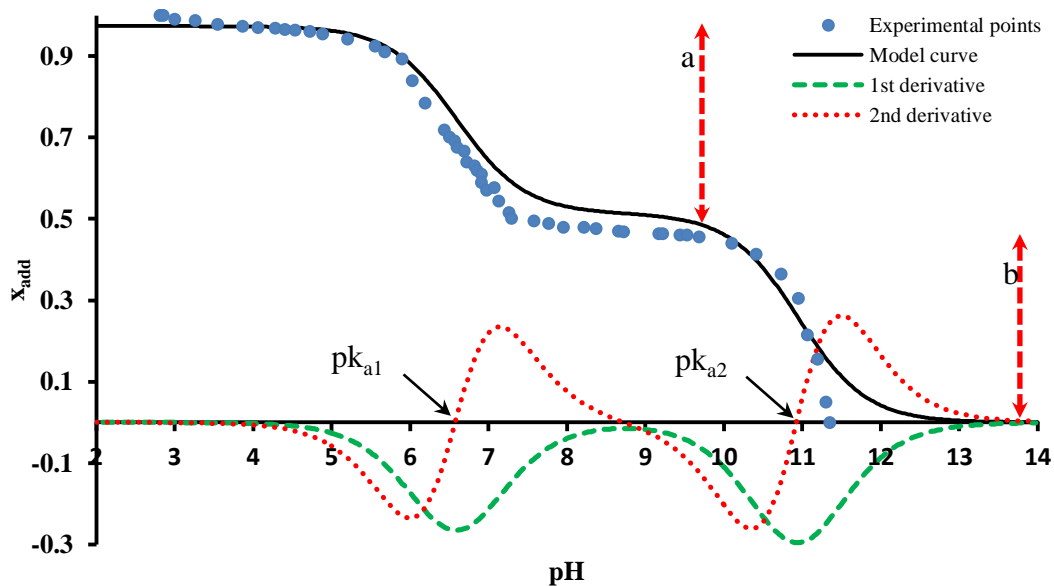
$$x_{add} = \frac{a}{1 + \frac{10^{-pH}}{K_{a1}} + 10^{pH} K_{a2}} + \frac{2b}{1 + 10^{pH} K_{a1} + 10^{2pH} K_{a1} K_{a2}} \quad (2)$$

که  $a$  و  $b$  ثوابت مدل هستند که معادل با کسرهای مولی گروه های عاملی اول و دوم و  $K_{ai}$  ثابت تفکیک اسیدی آمین گروه عاملی می باشد. پارامترهای مدل با استفاده از رگرسیون غیرخطی و براساس استفاده از مشتقات اول و دوم محاسبه شدند. منحنی برازش شده مدل به همراه منحنی های مشتقات اول و دوم در شکل (۲) نشان داده شده اند. ثوابت اسیدی ( $pK_a$ ) جایگاه های اتصال جاذب ترکیبی از روی صفرهای منحنی مشتق دوم به دست آورده شد. براساس مقادیر  $pK_a$  محاسبه شده، آمین پروتونه شده ( $pK_a 6.75$ ) و گروه های آزاد آمین یا هیدروکسیل ( $pK_a 11.0$ ) به عنوان گروه های عاملی حاضر در جاذب شناسایی شدند. علاوه بر این،

برای تخمین دانسیته هر یک از گروه‌های عاملی، دو پارامتر شامل: (۱) کسر مولی مربوط به هر گروه عاملی که متناظر با ارتفاع جهش ناگهانی مربوطه در شکل (۲) می‌باشد و (۲) ظرفیت تبادل کاتیونی ( $q_{cat. exch.}$ )، جاذب مورد استفاده قرار گرفت. در عمل، ( $q_{cat. exch.}$ ) از طریق رابطه (۳) به دست آمد [۱۳]:

$$q_{cat. exch.} = \frac{mEq_{biosorb.susp.}^{titrant} - mEq_{blank}^{titrant}}{m_{biosorbent}}, \quad ([mEq_{sample}^{titrant}] = [meq]) \quad (3)$$

که  $mEq_{biosorb.susp.}^{titrant}$  و  $mEq_{blank}^{titrant}$  به ترتیب مقدار میلی‌اکی‌والان تیرانت مصرف شده توسط جاذب ترکیبی و نمونه شاهد (آب دیونیزه) می‌باشد، در حالی که  $m_{biosorbent}$  جرم جاذب (g) استفاده شده است. نتایج دانسیته گروه‌های عاملی و نیز مقدار کل جایگاه‌های اتصال شناسایی شده در جدول (۱) نشان داده شده است. به طوری که مشخص است، جاذب ترکیبی شامل گروه‌های آمین پروتونه شده به عنوان بخش اصلی جایگاه‌های اتصال و گروه‌های عاملی آمین / هیدروکسیل آزاد تامین شده از سلول‌های باکتریایی بود. علاوه بر این، داده‌های به دست آمده از به کارگیری مدل، دارای توافق مناسبی با نتایج برنامه ProtoFit بود.



شکل (۲): نتایج تیتراسیون جاذب ترکیبی؛ منحنی مشکی نشان‌دهنده منحنی مدل برای داده‌های تجربی، منحنی خط چین سبز نشان‌دهنده مشتق اول مدل و منحنی خط چین قرمز نشان‌دهنده مشتق دوم مدل

مقایسه اندازه‌گیری‌های مختلف ثابت کرد که جاذب ترکیبی نه تنها از نظر تنوع گروه‌های عاملی، بلکه از نظر دانسیته گروه‌های عاملی نیز بهتر از کیتوزان می‌باشد که سبب می‌شود تا جاذب ترکیبی به توان نسبت به کیتوزان، جاذب زیستی موثرتری باشد.

در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، به نظر می‌رسد که می‌توان افت ظرفیت جذب زیستی جاذب‌های ناشی از تغییر هندسه آنها از شکل پودری به ژل‌دانه‌ای بمنظور بهبود قابلیت بکارگیری در ستون‌های بستر ثابت را می‌توان از طریق تثبیت میکروارگانیزم‌ها و تقویت دانسیته گروه‌های عاملی درون جاذب‌های ترکیبی مرتفع نمود.

#### مراجع:

1. Wang, J. and C. Chen, Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27: 195–226 (2009).
2. Vijayaraghavan, K. and Y.-S. Yun, Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26: 266-291 (2008).
3. Yelebe, Z.R., B.Z. Yelebe, and R.J. Samuel, design of fixed bed column for the removal of metal contaminants from industrial wastewater. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 5(2): 68-77 (2013).
4. Wang, J. and C. Chen, Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. *Bioresource Technology*, 160: 129-141 (2014).
5. Seo, H., M. Lee, and S. Wang, Equilibrium and Kinetic Studies of the Biosorption of Dissolved Metals on *Bacillus drentensis* Immobilized in Biocarrier Beads. *Environmental Engineering Research*, 18(1): 45-53 (2013).
6. Chen, Y.-M., et al., Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 148: 660-670 (2007).
7. Chojnacka, K., A. Chojnacki, and H. Gorecka, Biosorption of Cr<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*, 59: 75-84 (2005).
8. Choi, J., J.Y. Lee, and J.-S. Yang, Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 161: 157-162 (2009).
9. Wan Ngah, W.S., M.A.K.M. Hanafiah, and S.S. Yong, Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan–epichlorohydrin beads: Kinetics and isotherm studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65: 18-24 (2008).
10. Wang, Q.Z., et al., Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 65: 194-201 (2006).
11. Kotrba, P., M. Mackova, and T. Macek, *Microbial Biosorption of Metals*.: Springer Science+Business Media B.V.(2011).
12. Zhao, W., et al., Bacterial cell surface properties: Role of loosely bound extracellularpolymeric substances (LB-EPS). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128: 600-607 (2015).
13. Dmytryk, A., A. Saeid, and K. Chojnacka, Biosorption of Microelements by *Spirulina*: Towards Technology of Mineral Feed Supplements. *The Scientific World Journal*, 201 :1-15 (2014).