مطالعه اثر pH و غلظت بر احیا و رسوب‌دهی میکروبی اورانیوم توسط باکتری بی‌هوازی *Shewanella* sp RCRI7

ظاهری عبده‌وند، ادیب [۱] ، کشتکار، علیرضا * [۱]، فاطمی، فائزه [۱]، طرح‌ریز، وحیده [۲]، محمد سعید حجازی [۲]

[۱] سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده‌ی چرخه‌ی سوخت هسته‌ای

[۲] دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده‌ی علوم دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی

چکیده

در این تحقیق، اثر دو پارامتر مهم و موثر pH و غلظت بر حذف اورانیوم طی فرایند احیا و رسوب‌دهی میکروبی توسط سویه‌ی بومی Shewanella sp RCRI7 مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در pHهای ۵/۲ تا ۸ و غلظت‌های اولیه‌ی اورانیوم در بازه‌ی ۰/۱ تا ۱/۵ میلی مولار انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین شرایط pH و غلظت اولیه‌ی اورانیوم برای احیای میکروبی اورانیوم توسط سویه‌ی RCRI7 به ترتیب برابر با ٦/٤ و ۰/۲۵ میلی مولار بود؛ درصد حذف اورانیوم در این شرایط بیش از ۹۹ درصد مشاهده شد. آزمایش روی سه نوع پساب نشان داد که باکتری RCRI7 می‌تواند اورانیوم را از محلول‌های واقعی نیز حذف نماید.

کلمات کلیدی: *اورانیوم، احیای میکروبی، باکتری، Shewanella sp RCRI7، پساب*

مقدمه:

احیای میکروبی اورانیوم یکی از راهکارهای موثری است که از بیش از دو دهه‌ی پیش تا کنون به عنوان یک روش رفع آلودگی از محیط زیست مورد توجه قرار گرفته است [۱, ۲]. اورانیوم شش ظرفیتی، U(VI)، که در آب محلول است طی فرایند احیای میکروبی به اورانیوم نامحلول چهار ظرفیتی، U(IV)، تبدیل می‌شود [۳]. جنس‌های باکتریایی *Geobacter*، *Shewanella*، *Desulfovibrio* و *Clostridium* مهمترین باکتری‌های احیا کننده‌ی اورنیوم به شمار می‌روند [٤]. در این تحقیق، یک سویه‌ی بومی از جنس *Shewanella* به منظور احیا و رسوب‌دهی میکروبی اورانیوم مورد استفاده قرار گرفته و اثر دو پارامتر مهم pH و غلظت اورانیوم در محلول اولیه بر میزان حذف اورانیوم بررسی شده است. همچنین امکان حذف اورانیوم از سه نوع پساب واقعی نیز بررسی شده است.

روش کار:

میکروارگانیسم و محیط کشت

سویه‌ی باکتریایی بی‌هوازی اختیاری گرم منفی *Shewanella* sp. RCRI7 توسط طرح ریز و همکارانش از دریاچه‌ی قوری گل تبریز جداسازی شده است [۵]. سویه‌ی RCRI7 در شرایط هوازی و در محیط کشت مایع TSB، دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، تکان دادن ۱۵۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شد. پس از کشت، محیط مایع حاوی باکتری سانتریفیوژ شده و باکتری‌ها با استفاده از محلول بی‌کربنات سدیم شستشو شدند. جهت تهیه‌ی مایه تلقیح، باکتری‌های شسته شده مجددا در محلول بی‌کربنات سدیم سوسپانسیون و pH آن مشابه با pH محلول احیا تنظیم شد. شمارش باکتری با استفاده از کدورت سنجی انجام شد.

محلول احیا

محلول احیا حاوی نمک استات اورانیل و همچنین برخی ترکیبات جهت فعالیت باکتری‌های زنده است. این ترکیبات شامل برخی نمک‌ها، ویتامین‌ها و مقدار جزیی از مواد معدنی بود. مقدار آنها مشابه با مقادیر استفاده شده توسط چروینسکی و همکارانش بود [٤]. از لاکتات سدیم نیز تا غلظت ۱۰ میلی مولار به عنوان الکترون دهنده استفاده شد. بی کربنات سدیم برای تنظیم pH محلول احیا مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط بی‌هوازی

نمونه‌ها در حجم‌های ۱۰ میلی لیتری (۹ میلی لیتر محلول احیا و یک میلی لیتر مایه‌ی تلقیح) در ویال‌های نوع بالچ قرار داده شد. جهت تامین شرایط بی‌هوازی از روش جایگزینی گاز استفاده شد. در این روش، ابتدا ویال‌های حاوی (۹ میلی لیتر) محلول احیا توسط یک نازل متصل به یک کپسول حاوی گاز مخلوط عاری از اکسیژن (۹۰ درصد نیتروژن و ۱۰ درصد دی اکسید کربن) گازدهی شد. سپس بلافاصله پس از خروج نازل، درب ویال پلمپ شد. جهت اطمینان از بی‌هوازی شدن و بی‌هوازی ماندن فضای داخل ویال، گاز هیدروژن نیز از یک منبع هیدروژن تا فشار ۰/٦ بار به ویال‌ها تزریق شد.

آنالیز

برای تعیین غلظت اورانیوم در محلول از روش ICP-AES استفاده شد. همچنین، جهت اثبات رخداد فرایند احیا، از طیف UV استفاده شد. این روش پیش از این نیز به همین منظور توسط فرانسیس و همکارانش مورد استفاده قرار گرفته بود [٦].

تعیین کمپلکس‌های اورانیوم

در این تحقیق، جهت تعیین کمپلکس‌های اورانیوم در محلول احیا در pHهای مختلف، از نرم افزار Visual MINTEQ استفاده شده است.

شرایط آزمایش

برای شروع واکنش احیا، به هر ویال (حاوی ۹ میلی لیتر محلول احیا) یک میلی لیتر مایه‌ی تلقیح تازه (که به روشی مشابه بی‌هوازی شده بود) تزریق شد. دمای انکوباسیون در تمام آزمایش‌ها ۳۰ درجه‌ی سلسیوس بود. چگالی سلولی در آزمایش‌های بررسی اثر pH و غلظت اولیه‌ی اورانیوم، $۲/۵\times۱۰^{۸}$ سلول بر میلی لیتر ولی در آزمایش تغییر درصد حذف با زمان و آزمایش پساب‌های واقعی $۱۰^{۹}$ سلول بر میلی لیتر بود.

روابط

برای تبیین حذف اورانیوم از محلول‌ها، از دو پارامتر درصد حذف اورانیوم (R) و میزان مطلق حذف اورانیوم به شرح ذیل استفاده شد.

$$R = \frac{C_{U0} - C_{UF}}{C_{U0}} \times 100 \quad (۱)$$

$$\text{میزان مطلق حذف اورانیوم} = (C_{U0} - C_{UF}) \times V \quad (۲)$$

که در این روابط C_{U0}، C_{UF} و V به ترتیب نشان دهنده‌ی غلظت اولیه‌ی اورانیوم در محلول، غلظت نهایی اورانیوم در محلول و حجم محلول هستند. همچنین، برای مواردی که تغییر غلظت اورانیوم در محلول از واکنش سینتیکی درجه‌ی اول تبعیت می‌کند از روابط زیر استفاده می‌شود.

$$\frac{dC_U}{dt} = -kC_U \quad (۳)$$

$$ln\frac{C_{U0}}{C_U} = kt \quad (٤)$$

که در این روابط C_U، k و t به ترتیب نشان دهنده‌ی غلظت اورانیوم در محلول در هر لحظه، زمان و ثابت سرعت واکنش هستند.

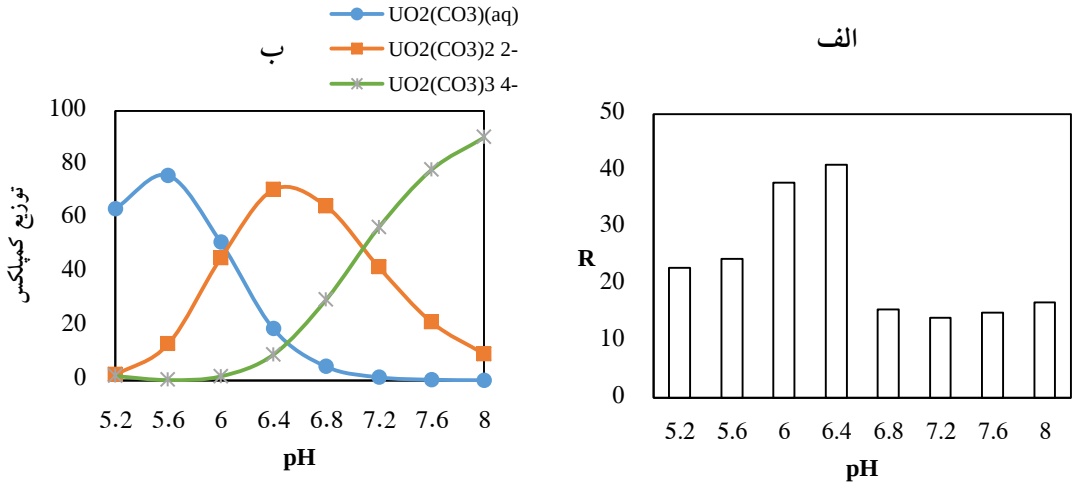
نتایج:

با انجام آزمایش در شرایط یاد شده در قسمت روش کار، یک رسوب تیره در کف ویال‌ها تشکیل شد. طیف UV محلول حاصل از انحلال رسوب در اسید سیتریک، حاوی یک پیک در حوالی ٦٦٥ نانومتر بود. اثر pH بر میزان جداسازی اورانیوم در بازه‌ی ۵/۲ تا ۸ بررسی شد. نتایج آزمایش احیای میکروبی اورانیوم توسط سویه‌ی RCRI7 در pHهای مختلف و همچنین توزیع کمپلکس‌های اورانیوم در محلول احیا در شکل ۱ نشان داده شده است. برای دو pH ٦ و ٦/٤، آزمایش احیا در زمان‌های مختلف انجام شد. داده‌های آزمایش در روز اول با معادله‌ی واکنش درجه‌ی اول تطبیق داده شد که شکل ۲ نتایج آن را نشان می‌دهد. اثر غلظت اولیه‌ی اورانیوم از ۰/۱ تا ۱/۵ میلی مولار بر درصد حذف اورانیوم از محلول طی واکنش احیا بررسی شد (شکل ۳–الف). علاوه بر درصد حذف اورانیوم، میزان مطلق حذف اورانیوم نیز در غلظت‌های اولیه‌ی مختلف اورانیوم مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳–ب). یک آزمایش در شرایط بهینه (pH ٦/٤، غلظت ۰/۲۵

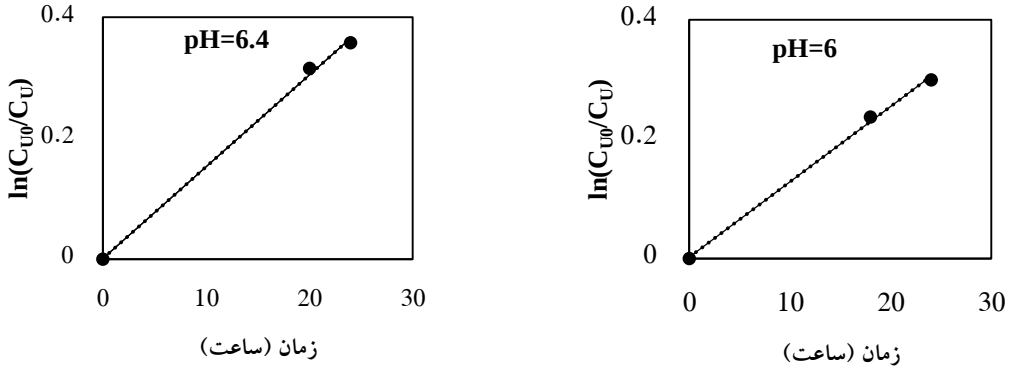
میلی مولار و چگالی سلولی تا 10^9) انجام شد که طی آن بیش از ۹۹ درصد اورانیوم موجود در محلول حذف شد (شکل ٤). جهت بررسی حذف اورانیوم در محلول‌های واقعی، سه نمونه پساب از پساب‌های تاسیسات فراوری اورانیوم حاوی غلظت‌های مختلف اورانیوم مورد آزمایش قرار گرفت (شکل ٥).

بحث و نتیجه‌گیری

وجود یک پیک تیز در ٦٦٥ نانومتر در طیف UV محلول حاصل از انحلال رسوب در اسید سیتریک ثابت نمود که اورانیوم موجود در رسوب بدست آمده، به فرم احیا شده‌ی U(IV) است. بنابراین، حذف اورانیوم از محلول توسط باکتری RCRI7 طی مکانیسم احیا بوده است. از آنجایی که این پیک در نمونه‌های کنترل منفی (حاوی باکتری‌های کشته شده) وجود نداشت، احیا فقط در نمونه‌های حاوی میکروب‌های زنده رخ داد. بنابراین، فرایند احیا توسط RCRI7 ناشی از فعالیت آنزیمی سلول‌های زنده بوده است. همانطور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود بیشترین میزان جداسازی در pHهای ٦ و ٦/٤ رخ داده است. شکل ۱-ب، کمپلکس-های اورانیوم در محلول را نشان می‌دهد. مقایسه‌ی شکل‌های ۱-الف و ۱-ب، بیانگر این مطلب است که بهترین کمپلکس برای احیا اورانیوم، کمپلکس دو کربناتی $UO_2(CO_3)_2^{2-}$ است. نحوه‌ی تغییر غلظت اورانیوم با زمان در این دو pH (شکل ۲) حاکی از صحت فرض واکنش درجه‌ی اول (روابط ۳ و ٤) برای واکنش احیا است؛ معادله‌ی $y \approx 0.0126x$ و $y \approx 0.0152x$ به ترتیب برای pHهای ٦ و ٦/٤. با توجه به شکل ۲، شیب خط برابر با ثابت سرعت واکنش است. از مجموع شکل‌های ۱ و ۲ می‌توان دریافت ٦/٤ بهترین pH است.

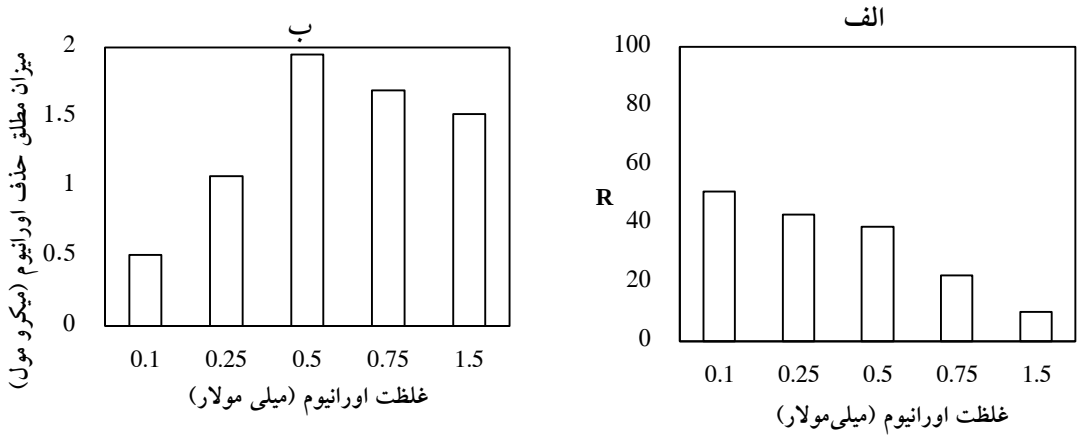


شکل ۱: اثر pH بر درصد حذف اورانیوم از محلول (الف) و نوع کمپلکس‌های اورانیوم در محلول (ب)



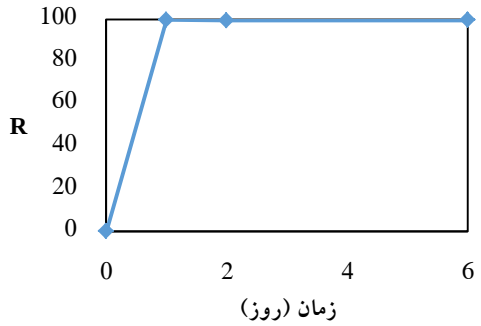
شکل ۲: تطبیق تغییر غلظت اورانیوم نسبت به زمان با معادله‌ی واکنش درجه‌ی اول در دو pH ٦ و ٦/٤

با توجه به شکل ۳-الف، با افزایش غلظت اورانیوم در محلول اولیه از ۰/۱ به ۱/۵ میلی مولار، درصد حذف اورانیوم از ۵۰٪ به ۱۰٪ کاهش یافت. این کاهش احتمالا به دلیل کاهش نسبت تعداد سلول‌ها به تعداد یون-های اورانیوم در محلول باشد. به عبارت دیگر، تعداد باکتری‌های کاهنده‌ی در اختیار اورانیوم، در محلول‌های با غلظت بالاتر اورانیوم، کمتر است. همانطور که در شکل ۳-ب مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت اورانیوم در محلول اولیه از ۰/۱ تا ۰/۵ میلی مولار، میزان مطلق حذف اورانیوم در هر ویال از ۰/۵۱ به ۱/۹۵ میلی مول افزایش یافت. با افزایش بیشتر غلظت اورانیوم در محلول اولیه از ۰/۵ به ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار، میزان مطلق اورانیوم حذف شده در هر ویال از ۱/۹۵ به ترتیب به ۱/٦۹ و ۱/۵۲ میکرومول کاهش یافت.

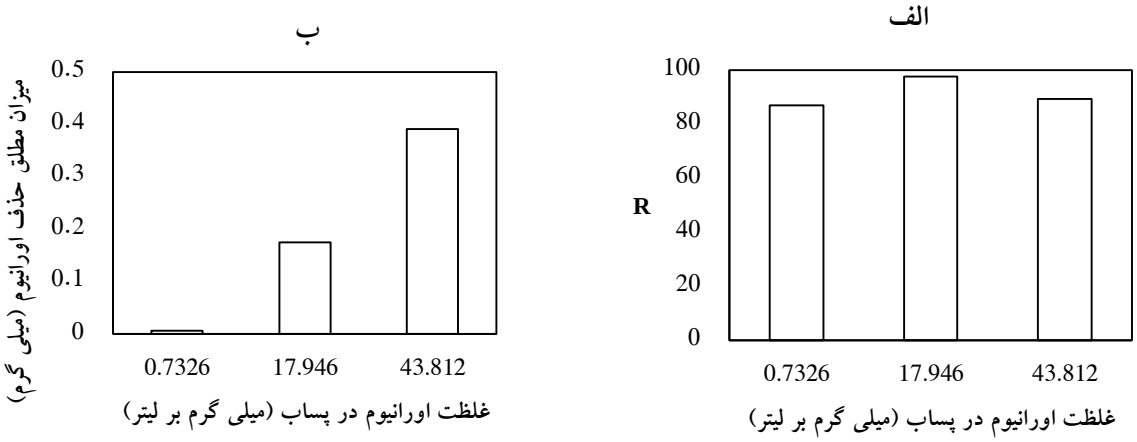


شکل ۳: اثر غلظت اولیه‌ی اورانیوم بر درصد حذف اورانیوم (الف) و میزان مطلق حذف اورانیوم (ب)

در آزمایش شرایط بهینه (شکل ٤)، تقریبا تمام حذف اورانیوم در روز اول رخ داده است. شکل ٤ نشان می-دهد که امکان حذف کامل اورانیوم (بیش از ۹۹/۵ درصد) توسط سویه‌ی RCRI7 در شرایط مناسب وجود دارد. جهت بررسی عملکرد باکتری در پساب‌های واقعی، از سه نوع پساب با غلظت‌های اولیه‌ی اورانیوم (۰/۷۳، ۱۷/۹۵ و ٤۳/۸۱ میلی گرم بر لیتر) استفاده شد. شکل ۵-الف نیز نشان می‌دهد که سویه‌ی RCRI7 علاوه بر محلول‌های آبی مصنوعی، قادر به حذف اورانیوم از محلول‌های واقعی نیز هست. غلظت نهایی اورانیوم در محلول پس از تلقیح باکتری و انکوباسیون برای پساب‌های مذکور به ترتیب برابر با ۰/۱۰، ۰/٤۱ و ٤/٦۹ میلی گرم بر لیتر شد. هر چه غلظت اورانیوم در پساب بیشتر باشد، مقدار اورانیوم جدا شده به ازای هر سلول و در نتیجه بهره‌وری سلول‌ها بیشتر است (شکل ۵-ب).



شکل ٤: درصد حذف اورانیوم نسبت به زمان انکوباسیون برای غلظت ۰/۲۵ میلی مولار و چگالی سلولی ۱۰۹ سلول بر میلی لیتر



شکل ۵: درصد حذف اورانیوم (الف) و میزان مطلق حذف اورانیوم (الف) از سه نوع پساب واقعی تاسیسات فراوری اورانیوم اصفهان

مراجع

1. Lovley, D.R., et al., *Microbial reduction of uranium.* Nature, 1991. **350**(6317): p. 413-416.
2. Wall, J.D. and L.R. Krumholz, *Uranium reduction.* Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 149-166.
3. Gorby, Y.A. and D.R. Lovley, *Enzymatic uranium precipitation.* Environ Sci Technol, 1992. **26**(1): p. 205-207.
4. Czerwinski, K.R. and M.F. Polz, *Uranium enrichment using microorganisms*, in *US Patent 7,452,703 B1*. 2008, Massachusetts Institute of Technology: Boston, MA.
5. Tarhriz, V., et al., *Isolation and characterization of some aquatic bacteria from Qurugöl Lake in Azerbaijan under aerobic conditions.* Advances in Environmental Biology, 2011. **5**(10): p. 3173-3178.
6. Gao, W. and A.J. Francis, *Reduction of uranium (VI) to uranium (IV) by Clostridia.* Appl Environ Microb :(١٤)٧٤ .٢٠٠٨ ,p. 4580-4584.