سلول‌های باکتریایی *Pseudomonas putida* تثبیت‌شده درون ماتریس کیتوزان: یک بیوجاذب ترکیبی مناسب برای جذب‌زیستی اورانیم از محلول‌های آبی

صحبت‌زاده، هژبر- کشتکار، علیرضا*- صفدری، سیدجابر - فاطمی، فائزه- قاسمی ترک‌آباد، مرتضی

سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای

چکیده:

در مطالعه حاضر، تاثیر درصد وزنی باکتری Pseudomonas putida تثبیت‌شده درون کیتوزان بر ظرفیت جذب‌زیستی اورانیم (VI) از محلول‌های آبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ظرفیت بالای بیوجاذب ترکیبی از کیتوزان خالص بیشتر است که نتیجه یک هم‌افزایی میان کیتوزان بعنوان بیوجاذب حامل و سلولهای باکتریایی می‌باشد. همچنین مشخص شد که ۱۵٪ وزنی از سلول‌های باکتریایی درون بیوجاذب، ترکیبی بهینه برای جذب فراهم می‌کند. بیوجاذب ترکیبی بهینه در غلظت‌های اولیه مختلف اورانیم نیز مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که این بیوجاذب در محدوده وسیعی از غلظت‌ها دارای عملکرد مناسبی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *سلول‌های باکتریایی، Pseudomonas putida، تثبیت، کیتوزان، جذب‌زیستی، اورانیم*

مقدمه:

استفاده از سلول‌های میکروبی مرده/غیرفعال‌شده در جذب‌زیستی بدلیل این واقعیت که این نوع میکروارگانیسم‌ها توسط آلاینده‌های سمی موجود در محیط‌های آبی واقعی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند، دارای مزایای زیادی در جداسازی و بازیابی عناصر سنگین از محلول‌های آبی و یا آمایش پساب می‌باشد [۱].

حذف فلزات با استفاده از باکتری‌های جداشده از سایت‌های آلوده به فلزات بدلیل مقاومت بالای آنها به فلزات سنگین و تمایل پیوندی بالا در حال توسعه می‌باشد. این زیست توده‌ها توانایی خود را بعنوان یک زیست‌جاذب موثر و دارای پتانسیل بالا برای حذف فلزات نشان داده‌اند [۲].

علیرغم این که زیست‌توده‌ها در حالت آزاد دارای مزایایی مانند ظرفیت جذب بالا، دستیابی سریع به حالت پایدار، هزینه پایین عملیات و انتقال جرم خوب ذره‌ای می‌باشند. ولی بطور معمول، دارای اندازه ذرات کوچک، دانسیته کم، مقاومت مکانیکی ضعیف و صلبیت پایین هستند که موجب دشواری عملیات جداسازی جامد-مایع پس از جذب‌زیستی، امکان تورم و ناتوانی در احیا/بازمصرف آنها و در نهایت غیرکاربردی بودن جاذب‌های میکروبی آزاد در مقوله تجاری‌سازی

می‌شود [۳-۶]. تثبیت میکروارگانیسم‌ها درون یک ماتریس مناسب به عنوان حامل، راه حلی مناسب برای حل مشکلات فوق‌الذکر می‌باشد [۷]. از میان روش‌های مختلف تثبیت، متداول‌ترین روش بدام‌اندازی می‌باشد. بدام‌اندازی میکروارگانیسم‌ها درون حامل‌های پلیمری متخلخل معمولا بمنظور دربرگیری میکروارگانیسم‌ها درون یک شبکه صلب جهت جلوگیری از پخش آنها به محیط بیرونی صورت می‌گیرد در حالیکه کماکان اجازه نفوذ ماده مورد نظر (جذب‌شونده) بدرون ماتریس را فراهم می‌نماید در عین حال موجب تقویت مکانیکی نیز می‌شود [۸].

در این پژوهش، تاثیر میزان (درصد وزنی) باکتری تثبیت شده درون بیوجاذب و تغییرات غلظت اولیه اورانیم درون محلول آبی بر ظرفیت جذب بیوجاذب باکتریایی *Pseudomonas putida* تثبیت‌شده درون کیتوزان (بیوجاذب ترکیبی) و مقایسه آن با کیتوزان خالص مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار:

میکروارگانیسم و مواد

باکتری *Pseudomonas putida* بشکل لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) و پودر کیتوزان از محصولات شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. محلول مادر ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورانیم از انحلال نمک نیترات اورانیل $UO_2(NO_3)_2.6H_2O$ (شرکت مرک) در آب بدون یون تهیه شد. همچنین محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از طریق رقیق کردن مقادیر مشخصی از محلول مادر تهیه شد. مقادیر pH محلول‌ها با استفاده از H_2SO_4 و NaOH یک مولار و به وسیله یک pH متر (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) تنظیم شد.

محیط کشت

برای احیای باکتری از حالت لیوفیلیزه وکشت آن از محیط کشت نوترینت براث: پپتون، ۵ گرم در لیتر؛ بیف اکسترکت، ۳ گرم در لیتر؛ و آب مقطر، ۱ لیتر؛ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دور همزن ۱۵۰ rpm بمدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به فاز ساکن استفاده شد. ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد بمدت ۱۵ دقیقه و دور ۷۰۰۰ 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 آمایش و درنهایت ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی درون آب مقطر به منظور اضافه کردن به محلول کیتوزان تهیه شد [۹].

آماده‌سازی جاذب

برای تهیه بیوجاذب ترکیبی، ۲ گرم پودر کیتوزان درون ۶۰ میلی‌لیتر محلول 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، سوسپانسیون حاوی جرم مشخصی از سلول‌ها به محلول اضافه گردید و تا دستیابی به یک محلول کاملا همگن اختلاط ادامه پیدا کرد. سپس محلول با یک سرنگ بصورت قطره‌ای درون محلول ۰/۵ مولار NaOH چکانده شد. برای جلوگیری از چسبیدن ژل‌بیدها، درون محلول اختلاط اعمال گردید. همچنین برای استحکام مکانیکی ژل‌بیدها اجازه داده شد تا آن‌ها حداقل نیم‌ساعت درون محلول بازی باقی بمانند. ژل‌بیدها سپس از محلول بازی خارج و با آب مقطر شستشو داده شد تا تمام هیدروکسیدسدیم آن حذف گردد. سپس ژل‌بیدها در دمای اتاق خشک شدند. برای تهیه ژل‌بید کیتوزان خالص (صفر درصد وزنی باکتری)، مرحله افزودن سوسپانسیون باکتریایی حذف گردید [۱۰]. قطر ژل‌بیدهای بدست آمده حدود ۱ میلی‌متر بوده و برای خردایش ژل‌بیدها و رسیدن به اندازه ۲۰۰ میکرومتر از یک آسیاب گلوله‌ای و الک استفاده شد.

ارزیابی عملکرد جذب‌زیستی

توانایی جذب‌زیستی بیوجاذب به و سیله آزمایش‌های حالت ناپیو سته مورد برر سی قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها درون ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اورانیم‌دار انجام شد. مخلوط تا ر سیدن به تعادل، درون شیکر-انکوباتور با دور همزن ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مقدار یون‌های فلزی جذب شده توسط جاذب یا همان ظرفیت جذب (q_e) از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{S} \qquad (۱)$$

که در این رابطه، پارامترهای C_0 و C_e به ترتیب غلظت اولیه و نهایی اورانیم درون محلول (میلی‌گرم بر لیتر)، V حجم محلول، S جرم جاذب خشک می‌باشد. اندازه‌گیری غلظت اورانیم درون محلول با دستگاه طیف‌سنج نشری اتمی-پلاسمای جفت شده‌ی القایی (مدل Liberty 150 AX Turbo، شرکت Varian) صورت گرفت.

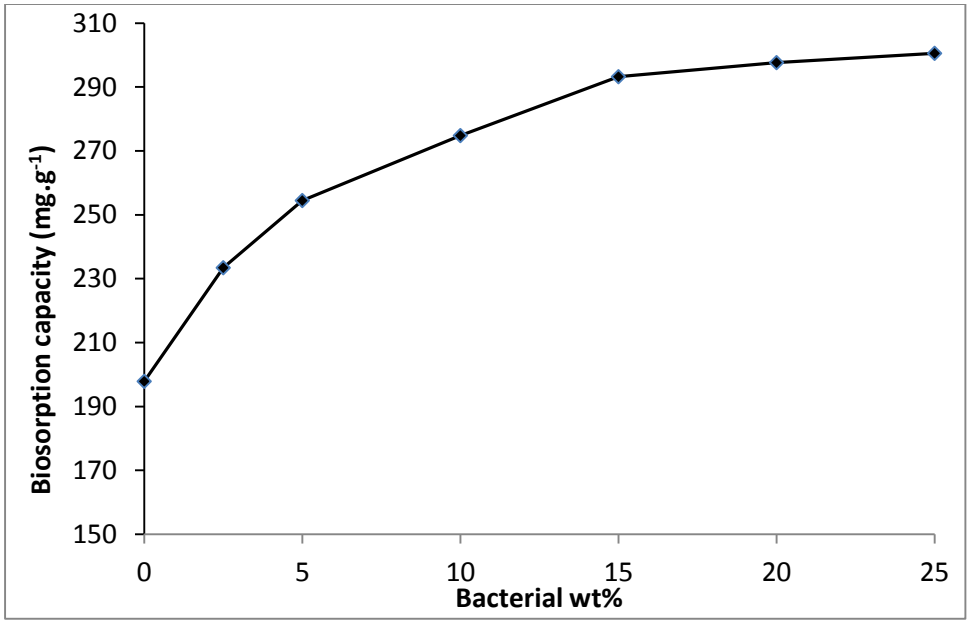
نتایج:

مقایسه میزان ظرفیت جذب‌زیستی اورانیم توسط جاذب‌های ترکیبی با درصدهای وزنی مختلف باکتری و جاذب کیتوزان خالص در شکل (۱) نشان داده شده است. در این سری از آزمایشات، محلول آبی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اورانیم اولیه در pH برابر ۵ با g/L ۱ از جاذب‌های مختلف با درصدهای وزنی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد در تماس بوده است.

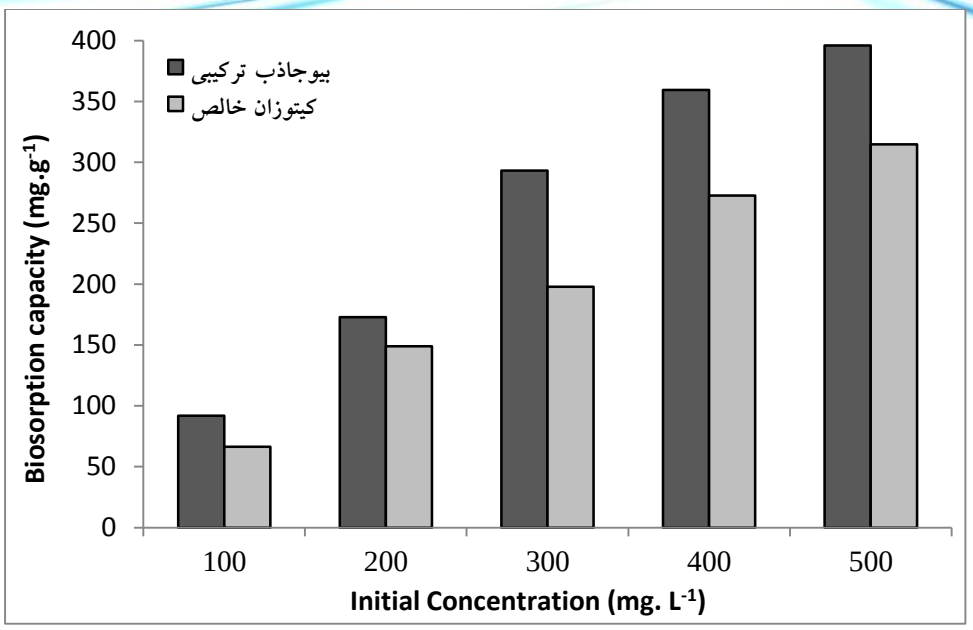
در شکل (۲)، تاثیر تغییر غلظت اولیه اورانیم درون محلول آبی بر میزان ظرفیت جذب‌زیستی بیوجاذب ترکیبی و کیتوزان خالص آورده شده است. در این سری از آزمایشات، محلول‌های آبی حاوی اورانیم با غلظت‌های اولیه ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در pH برابر ۵ با g/L ۱ از جاذب ترکیبی ۱۵٪ وزنی باکتری و کیتوزان خالص در تماس بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری:

همان‌طور که در شکل (۱) مشخص می‌باشد، تمامی بیوجاذب‌های ترکیبی دارای ظرفیت جذب بالاتری نسبت به کیتوزان خالص می‌باشند. افزایش ظرفیت جذب در درصدهای وزنی پایین‌تر باکتری دارای شیب تندتری می‌باشد، در حالی‌که در درصدهای وزنی بیشتر از ۱۵، عملا افزایش قابل‌توجهی رخ نداده و به‌نظر می‌رسد با در نظر گرفتن همزمان میزان افزایش ظرفیت جذب محقق شده و میزان جرم باکتریایی تثبیت‌شده درون بیوجاذب‌های ترکیبی، بیوجاذب ترکیبی با ۱۵ درصد وزنی باکتری می‌تواند در آزمایشات بعدی بعنوان جاذب بهینه مورد استفاده قرار گیرد. میزان افزایش ظرفیت جذب برای جاذب ترکیبی بهینه در مقایسه با کیتوزان خالص ۵۲٪ می‌باشد.



شکل شماره (۱): تاثیر درصد وزنی باکتری تثبیت‌شده درون کیتوزان بر ظرفیت جذب‌زیستی



شکل شماره (۲): تاثیر غلظت اولیه محلول بر ظرفیت جذب‌زیستی

ظرفیت جذب مناسب بیوجاذب کیتوزان خالص نشان می‌دهد که این بیوپلیمر از پتانسیل مناسبی برای استفاده بعنوان یک بیوجاذب برخوردار می‌باشد. این قابلیت ناشی از حضور گروه‌های عاملی آمینو و هیدروکسیل در این بیوجاذب می‌باشد که برخورداری از برخی خواص ویژه دیگر مانند آبدوستی، تخلخل، زیست‌سازگاری و غیرسمی بودن قبلا آنرا بعنوان یک زیست‌حامل ایده‌آل شناسانده است [۱۱]. بنابراین بکارگیری کیتوزان بعنوان زیست‌حامل می‌تواند به تقویت ظرفیت جذب بیوجاذب ترکیبی کمک نماید.

همچنین نتایج ارائه شده در شکل (۱) نشان می‌دهد که حضور باکتری *Pseudomonas putida* موجب بهبود عملکرد بیوجاذب ترکیبی شده است. از آنجایی‌که توانایی این باکتری در جذب اورانیم قبلا ثابت شده است [۹]، ثتبیت آن درون کیتوزان نیز منجر به تقویت ظرفیت جذب بیوجاذب ترکیبی شده است. بنابراین ظرفیت بالای بیوجاذب ترکیبی ناشی از هم‌افزایی میان باکتری *Pseudomonas putida* و کیتوزان می‌باشد. به این ترتیب، با توجه به امکان تهیه بیوجاذب در سایزهای مختلف، امکان بکارگیری آنها در ستون‌های بسترثابت نیز امکان‌پذیر خواهد بود.

زیرا از یک طرف، مشکل غیرقابل استفاده بودن میکروارگانیسم‌های آزاد بعنوان جاذبی بسیار مناسب در مقیاس‌های تجاری مرتفع می‌گردد [۱۲]. و از طرف دیگر، چون بکارگیری بیوپلیمرهایی مانند کیتوزان به شکل ژل‌بیدها، موجب محدودیت

دسترسی به سایت‌های فعال واقع در درون ژل‌بید و متعاقبا کاهش ظرفیت جذب آنها نسبت به حالت پودری شکل می‌شود. بنابراین بکارگیری باکتری‌ها با مساحت سطح بسیار بالا و غنی از گروه‌های عاملی موجب تقویت تعداد گروه‌های عاملی جاذب ترکیبی و رفع مشکل افت ظرفیت بیوپلیمر در حالت ژل‌بید می‌گردد.

روند تغییرات میزان ظرفیت جذب برحسب تغییرات غلظت اولیه اورانیم برای هر دو بیوجاذب روند مشابهی را نشان می‌دهد. پایین‌ترین میزان ظرفیت جذب در غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شده در حالی‌که با افزایش غلظت اولیه، میزان ظرفیت جذب همواره افزایش پیدا کرده است. همچنین قابل ذکر می‌باشد که میزان ظرفیت جذب‌زیستی اورانیم بر روی بیوجاذب ترکیبی در تمامی غلظت‌ها بیشتر از کیتوزان خالص بوده که تایید کننده نتایج ارائه شده در شکل (۱) می‌باشد.

همچنین در بررسی اثر غلظت‌های اولیه اورانیم بر عملکرد جاذب مشخص شده است که در غلظت‌های اولیه پایین، با افزایش میزان غلظت عملا تعداد یون‌های فلزی بیشتری جاذب را احاطه می‌کند و لذا راندمان تبادل بهبود پیدا می‌کند. از نظر دینامیکی در این حالت، نسبت مول‌های اولیه یون فلزی به مساحت سطح در دسترس جاذب پایین می‌باشد، در نتیجه تمامی یون‌ها امکان جذب را دارا می‌باشند. در حالی‌که در غلظت‌های بالاتر، مسیر نفوذ متراکمی برای انتقال یون‌ها از فاز مایع تا روی سطح جاذب ایجاد می‌شود که منجر به افزایش رقابت بین یون‌های مختلف می‌گردد. همچنین سایت‌های در دسترس برای جذب در مقایسه با مول‌های حاضر در محلول کمتر می‌باشد. بعنوان یک قاعده، افزایش غلظت اولیه یون فلزی بدلیل فراهم کردن نیروی محرکه غلبه بر مقاومت انتقال جرمی بین محلول آبی و فاز جامد، در یک محدوده مشخص موجب افزایش ظرفیت جذب جاذب می‌گردد [۴, ۱۳, ۱۴].

در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، به نظر می‌رسد که تحقیق و پژوهش دقیق‌تر در زمینه بیوجاذب‌های ترکیبی امکان تهیه بیوجاذب‌هایی با قابلیت استفاده در حوزه جداسازی یا حذف فلزات سنگین، به ویژه در چرخه سوخت هسته‌ای برای فلزاتی مانند اورانیم را دارا باشد.

مراجع:

1. Colak, F., et al., Biosorption of lead from aqueous solutions by Bacillus strains possessing heavy-metal resistance. Chemical Engineering Journal, 173: p. 422-428 (2011).
2. Huang, W. and Z.-m. Liu, Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 105: p. 113-119 (2013).

3. Pacheco, P.H., et al., Biosorption: A new rise for elemental solid phase extraction methods. Talanta, 85: p. 2290-2300 (2011).
4. Vijayaraghavan, K. and Y.-S. Yun, Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology Advances, 26: p. 266-291 (2008).
5. Xiao, G., et al., Plate column biosorption of Cu(II) on membrane-type biosorbent (MBS) of Penicillium biomass: Optimization using statistical design methods. Bioresource Technology, 143: p. 490-498 (2013).
6. Zhang, X., et al., Study of thermodynamics and dynamics of removing Cu(II) by biosorption membrane of Penicillium biomass. Journal of Hazardous Materials, 193: p. 1-9 (2011).
7. 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): p. 68-77 (2013).
8. Martins, S.C.S., et al., Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. African Journal of Biotechnology, 12(28): p. 4412-4418 (2013).
9. 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: p. 157-162 (2009).
10. 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: p. 18-24 (2008).
11. Wan Ngah, W.S., L.C. Teong, and M.A.K.M. Hanafiah, Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. Carbohydrate Polymers, 83: p. 1446-1456 (2011).
12. 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): p. 45-53 (2013).
13. Abdel-Ghani, N.T. and G.A. El-Chaghaby, Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: a review of recent studies. International Journal of Latest Research in Science and Technology, 3(1): p. 24-42 (2014).
14. Wang, W., M. Li, and Q. Zeng, Adsorption of chromium (VI) by strong alkaline anion exchange fiber in a fixed-bed column: Experiments and models fitting and evaluating. Separation and Purification Technology, 149: p. 16-23 (2015).