



بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ

پریسا تاجرمحمد قزوینی^۱، زهرا شیرینی یکتا^{۲*}، شقایق نصر^۳، نرگس اسلامی^۴، منصوره‌السادات حسینی^۵

چکیده

مقدمه: اورانیوم به عنوان یکی از فلزات سنگین، یک رادیونوکلئید طبیعی است که به دلیل سمیت جدی و خاصیت پرتوایی دارای اثرات مخرب بر روی سلامت انسان و محیط زیست است. جذب زیستی یک فناوری ساده و مقرون به صرفه است که می‌تواند برای حذف فلزات سنگین و رادیونوکلئیدها از پساب‌ها به کار گرفته شود. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، زیست توده میکروکوکوس لوتئوس پیش تیمار شده با حرارت اتوکلاو استفاده گردید. سپس پارامترهای فیزیکی‌شیمیایی موثر بر جذب زیستی اورانیوم شامل دما، pH، غلظت اولیه اورانیوم و غلظت جاذب با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شدند. **نتایج:** نتایج نشان داد که پارامترهای غلظت اولیه اورانیوم، مقدار جاذب و pH از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0.05$) بر روی فرآیند جذب زیستی اورانیوم تأثیرگذار هستند. در مقابل، پارامتر دما از لحاظ آماری ($p\text{-value} > 0.05$) بر روی فرآیند حذف اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس بدون تأثیر است. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج مشخص کردند که زیست توده پیش تیمار شده در شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (۱۹/۷۵ گرم بر لیتر زیست توده، دمای $32/14^\circ\text{C}$ و pH ۳/۳۳) قادر به حذف تقریباً ۹۹/۹۸ درصد اورانیوم از محیط آلوده به ۲۶/۱۱ میلی گرم بر لیتر اورانیوم است که نشان دهنده پتانسیل ارزشمند آن در کاربردهای زیست پالایی اورانیوم از پساب‌های اسیدی آلوده با غلظت های پایین اورانیوم است.

واژه‌های کلیدی: اورانیوم، جاذب زیستی، رادیونوکلئید، زیست پالایی، طراحی آزمایش

۱. دانشیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
- ۲*. استادیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران (*نویسنده مسئول، zshiri@aeoi.org.ir)
۳. استادیار، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
۴. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
۵. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء(س)، ونک، تهران، ایران

مقدمه

افزایش انتشار فلزات سنگین به واسطه گسترش فعالیت‌های صنعتی و تخلیه فاضلاب‌های حاوی سطوح بالای فلزات مختلف به یکی از مهم‌ترین معضلات محیطی تبدیل شده است (Shroff & Vaidya, 2011). برای مثال توسعه فعالیت‌های صنعتی انسان در زمینه معدن کاری و غیره منجر به انتشار آلودگی‌های رادیواکتیو به محلول‌های آبی شده است و در این زمینه مشکلاتی را ایجاد کرده است. ورود فلزات رادیواکتیو به محیط زیست و انباشت آن‌ها در بافت‌های زنده، می‌تواند در نهایت به بالاترین زنجیره غذایی، یعنی انسان رسیده و باعث مشکلات کلیوی و ریوی، انواع سرطان‌ها و ناهنجاری‌های مادرزادی متعدد شود (Khani *et al*, 2006; Li *et al*, 2014). حذف اورانیوم و فلزات سنگین دیگر از پساب‌ها می‌تواند به وسیله روش‌های شیمیایی (مانند خنثی‌سازی و رسوب) و روش‌های فیزیکی (مانند تبخیر، تعویض یونی و تکنولوژی‌های غشایی) انجام شود، اما این روش‌های مرسوم نه تنها نیاز به سرمایه‌گذاری بسیار دارند بلکه هزینه‌های جاری آن‌ها نیز بالا است. علاوه بر این، روش‌های مرسوم غیر زیستی در غلظت‌های پایین آلاینده از کارایی کافی برخوردار نیستند. بنابراین، از یک سو افزایش نگرانی‌ها از گسترش انتشار آلاینده‌ها و تخلیه پساب‌های بیمار نشده به محیط زیست و از سوی دیگر فشارهای مالی مربوط به روش‌های مرسوم آلودگی‌زدایی بر صنایع، موجب شده است تا مهندسان و دانشمندان محیط زیست به دنبال روش‌هایی مناسب، محیط دوستانه و به صرفه برای حذف فلزات سنگین و رادیونوکلیدها از محلول‌های آبی باشند. امروزه فرایندهای جذب زیستی به عنوان جایگزینی برای حذف این آلاینده‌ها مطرح هستند (Ahmad *et al*, 2018; Bayramoğlu *et al*, 2006; Idris *et al*, 2012).

برای تیمار فاضلاب‌های صنعتی، جاذب‌های طبیعی زیادی شامل جلبک‌های دریایی، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و پسماندهای صنعتی و کشاورزی استفاده شده‌اند (Farhan & Khadom, 2015). میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای حذف فلزات می‌توانند به صورت زنده یا غیرزنده مورد استفاده قرار گیرند. کاربرد جذب زیستی در مقیاس بالا مشخص کرده است که زیست توده غیرزنده نسبت به نوع زنده می‌تواند از مزایایی چون عدم حساسیت به غلظت یون‌های فلزات سمی، عدم نیاز به محیط کشت و مواد غذایی، سهولت واجذب و بازیابی فلزات و سهولت مدلسازی ریاضی برای افزایش مقیاس برخوردار باشد (Ayangbenro & Babalola, 2017; Shroff & Vaidya, 2011). بسیاری از این مواد زیستی، ظرفیت جذب خوبی را نسبت به انواع یون‌های فلزی از خود نشان داده‌اند. از جاذب‌های قوی برای فلزات در میان باکتری‌ها می‌توان به *باسیلوس‌ها*، *سودوموناس‌ها*، *استریپتومایسس* و مانند آن اشاره کرد (Vijayaraghavan & Yun, 2008). *باسیلوس‌ها* از شناخته شده‌ترین باکتری‌های گرم مثبت هستند که از گونه‌های مختلف آن‌ها مانند *cereus* در حذف کادمیوم، سرب، مس، روی، وانادیوم (Cheah *et al*, 2023;)، *amyloliquefaciens* و *megaterium* (Dong *et al.*, 2023) در حذف وانادیوم، *Streptomyces* نیز در حذف روی، سرب، نیکل استفاده شده است (Roşca *et al*, 2023) استفاده شده است. از باکتری *Streptomyces* نیز در حذف روی، سرب، نیکل استفاده شده است (Long *et al*, 2018; Sedlakova-Kadukova *et al*, 2019; Ziouane *et al*, 2019). علاوه بر این، حذف اورانیوم و توریم

توسط باکتری‌های گرم مثبت متعدد شامل *Micrococcus luteus*، *Corynebacterium glutamicum*، *Corynebacterium equi* توسط Nakajima & Tsuruta (۲۰۰۴) گزارش شده است (Nakajima & Tsuruta, 2004).

بررسی مکانیزم جذب زیستی توسط محققان مختلف نشان داده است که برهمکنش بین فلزات و گروه‌های عملکردی موجود در پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌های موجود در دیواره سلولی، نقش اصلی را در حذف فلزات از محیط ایفا می‌کنند (Farhan & Khadom, 2015; Sana et al, 2015). بنابراین با توجه به نقش اساسی دیواره سلول در عمل جذب و حذف فلزات، تلاش‌های بسیاری با هدف تغییر دیواره سلولی زیست توده میکروبی به منظور اصلاح جذب زیستی صورت گرفته است. به عنوان مثال روش‌های فیزیکی متفاوتی مانند جوشاندن، حرارت دادن، اتوکلاو و یا تیمارهای شیمیایی متفاوت مانند تیمار کردن زیست توده با انواع بازها و اسیدهای ضعیف و قوی، انواع شوینده‌ها، مواد شیمیایی آلی و غیرآلی یا ترکیبی از هر دو روش فیزیکی و شیمیایی به کار گرفته شده‌اند (Ahalya et al, 2003; Liu et al, 2004; Sun et al, 2011; Vijayaraghavan et al, 2008).

همچنین مطالعات متعدد نشان داده است که ویژگی‌های جذب زیستی می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند شرایط محیطی که در آن جذب اتفاق می‌افتد مانند pH، دما، غلظت یون‌های جذب شونده، غلظت اولیه جاذب و غیره قرار گیرند و از سوی دیگر مشخص شده است که ویژگی جذب تا حدی اختصاصی سویه است و بعد از تیمار یا اعمال تغییرات در همان سویه، ویژگی‌های جذب آن متفاوت خواهد شد (Volesky, 1987). در نتیجه بهینه‌سازی پارامترهای محیطی و پیش تیمار جاذب زیستی می‌تواند در افزایش میزان ظرفیت جذب زیستی تاثیر به‌سزایی داشته باشد. بنابراین در این پژوهش از باکتری میکروکوکوس لوتئوس پیش تیمار شده با حرارت به عنوان یک جاذب جدید زیستی در زمینه جذب اورانیوم استفاده شد که پارامترهای موثر بر فرایند جذب زیستی مانند غلظت اورانیوم، دما، pH و مقدار جاذب با استفاده از نرم افزار دیزان اکسپرت و روش سطح پاسخ بهینه شدند.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه، محیط کشت و مواد مورد استفاده: باکتری میکروکوکوس لوتئوس استفاده شده در این پژوهش با PTCC No. 1408 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شده است. نمک نیترات اورانیل ($UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) با درصد خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک تهیه شده است. محیط کشت نوترینت آگار، اسید سولفوریک و سدیم هیدروکسید و سایر مواد استفاده شده در این پژوهش از برند مرک تهیه گردیده است.

تهیه محلول ذخیره اورانیوم: از نمک نیترات اورانیل ($UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) محلول ذخیره با غلظت 1000 mg/l با استفاده از آب دیونیزه تهیه شد. در سایر مراحل، محلول‌های لازم با استفاده از رقیق کردن این محلول تهیه شدند. تنظیم pH

۱۰/ بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ

محلول‌های اورانیوم با استفاده از اسید سولفوریک و سدیم هیدروکسید ۱ نرمال صورت گرفت. پس از تهیه محلول ذخیره، غلظت نهایی محلول با استفاده از دستگاه ICP (Perkin Elmer-Optima 7300DV) مشخص شد.

آماده‌سازی زیست توده: از محیط کشت باکتری میکروکوکوس لوتئوس، در محیط نوترینت براث (۲، ۷± pH)

کشت داده شد و پیش کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای °C ۳۰ با ۱۵۰ دور بر دقیقه (گرمخانه شیکردار Multitron-HT iNFORS) قرار گرفت. سپس از محیط کشت حاصل به میزان ۱۰ درصد با غلظت نیم مک فارلند در محیط کشت براث جدید، با همان شرایط تلقیح شد و همزنی صورت گرفت. سپس زیست توده کشت داده شده در حجم‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله سانتریفیوژ برداشته شد و با آب دیونیزه، در همین شرایط سه مرتبه شست و شو داده شد.

تیمار حرارتی زیست توده با اتوکلاو: زیست توده به دست آمده از مرحله آماده‌سازی زیست توده درون فالكون

ریخته شد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۱۲۱، با فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو گردید.

بهینه‌سازی فرایند جذب اورانیوم با استفاده از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ: در این پژوهش روش

سطح پاسخ برای ارزیابی تاثیر پارامترهای موثر بر فرایند جذب اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس و بهینه‌سازی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت 7.0.0 انجام شد. چهار متغیر شامل غلظت اورانیوم (mg/l)، دما (°C)، pH و مقدار جاذب (g/l)، در پنج سطح -α، -۱، ۰، +۱، +α، به صورت جدول ۱، جهت طراحی آزمایش استفاده شد. براین اساس، یک سری شامل ۲۷ آزمایش با استفاده از طراحی مرکب مرکزی ارائه گردید (جدول ۲).

جدول ۱- متغیرها و سطوح روش طراحی مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی جذب اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس.

Table 1. Variables and levels of central composite design method for optimization of uranium biosorption by autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria.

Variable	Symbol	levels				
		-α	-1	0	+1	+α
Initial concentration (mg/l)	A	10	32.5	55	77.5	100
pH	B	2	2.75	3.5	4.25	5
Temperature (°C)	C	25	36.25	32.5	28.75	40
biosorbent dose(g/l)	D	5	10	15	20	25

آزمایش‌های جذب زیستی اورانیوم با افزودن مقادیر مشخص شده از زیست توده باکتری، درون ارلن‌های ۲۰ ml حاوی

محلول اورانیوم با غلظت و pH مربوط به هر آزمایش، با دمای مشخص شده داخل گرمخانه شیکر انجام گرفت. پس از طی مدت

زمان ۹۰ دقیقه (مدت زمان تکمیل فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده)، هر نمونه با ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت

۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ سانتیفریوژ گردیده و میزان اورانیوم باقیمانده در محلول که زیست توده موفق به جذب آن نشده است با استفاده از روش ICP-OES با دستگاه شرکت Perkin Elmer مدل Optima 7300DV سنجیده شده است. میزان درصد حذف یا برداشت اورانیوم (R) با استفاده از رابطه شماره ۱ محاسبه شده است:

$$R(\text{درصد}) = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} * 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه C_0 و C_f به ترتیب غلظت اولیه و غلظت نهایی فلز پس از جذب توسط جاذب است.

نتایج و بحث

جذب زیستی به عنوان فرایند فیزیکوشیمیایی غیروابسته به متابولیسم سلول تعریف می‌شود که یون‌های فلزات به سطح جاذب متصل می‌شود. با توجه به اهمیت بالای سطح سلولی در فرایند جذب زیستی، استفاده از تیمارهای فیزیکی و شیمیایی مختلف می‌تواند با تغییر گروه‌های عملکردی سطح سلول، باعث تغییر ظرفیت جذب زیستی شود (Hadiani et al., 2019; Long et al., 2018; Shroff & Vaidya, 2011). برای مثال Ziouane و همکارانش (۲۰۱۹) مشاهده کردند جذب زیستی سرب با زیست توده *Streptomyces rimosus* بعد از تیمار با سودسوزآور افزایش می‌یابد (Ziouane et al., 2019). Chaeh و همکارانش (۲۰۲۳)، حذف فلزات مس، سرب، روی، کادمیوم و کروم با استفاده از *Bacillus cereus* تیمار شده با اتوکلاو، جوشانده شدن و عوامل شیمیایی شامل اسید سولفوریک، سدیم هیدروکسید و متانول بررسی کردند و مشخص شد که تیمار باعث افزایش ظرفیت جذب زیستی جاذب شده است (Cheah et al., 2023). کوتاه بودن مدت زمان جذب زیستی، تولید پسماندهای ثانویه کم و هزینه‌های پایین افزایش مقیاس (صنعتی شدن)، کارایی بالا و امکان تولید مجدد جاذب زیستی از مواردی است که باعث جذابیت بیشتر جذب زیستی نسبت به سایر روش‌های زیست پالایی شده است (Kasra-Kermanshahi, 2019; Javanbakht et al., 2014; Yi & Yao, 2012; Yi & Lian, 2012). مطالعات متعدد نشان داده است که برخلاف روندهای مرسوم جذب که در غلظت‌های پایین آلاینده چندان موثر نیستند، جذب زیستی حتی در غلظت‌های پایین آلاینده نیز به خوبی عمل کرده و سطح فلزات سنگین را می‌تواند از ppm به ppb برساند (Hadiani et al., 2019).

در این پژوهش روش سطح پاسخ برای ارزیابی چهار متغیر شامل غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)، دما (°C)، pH و مقدار جاذب (g/l) بر میزان جذب اورانیوم و بهینه‌سازی آن توسط باکتری میکروکوکوس/لوتئوس پیش تیمار شده، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی جذب اورانیوم توسط زیست‌توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس.

Table 2. Values of variables and experimental responses of the central composite design in the response surface methodology for optimization of uranium biosorption by autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria.

Test	Initial concentration (mg/l)	pH	Temperature (°C)	Biosorbent dose (g/l)	Removal (%)
1	55	3.5	32.5	5	89.29
2	100	3.5	32.5	15	99.55
3	55	3.5	32.5	25	96.82
4	32.5	2.75	36.25	20	93.31
5	77.5	2.75	28.75	10	74.75
6	77.5	2.75	36.25	20	99.1
7	55	3.5	32.5	15	90.9
8	32.5	4.25	36.25	10	93.18
9	32.5	4.25	28.75	10	94.1
10	32.5	4.25	28.75	20	98.34
11	32.5	2.75	28.75	20	94.07
12	55	3.5	40	15	94.11
13	10	3.5	32.5	15	98.81
14	77.5	2.75	36.25	10	80.76
15	77.5	4.25	36.25	20	91.87
16	55	3.5	25	15	92.04
17	55	5	32.5	15	95.93
18	32.5	4.25	36.25	20	97.8
19	77.5	2.75	28.75	20	99.03
20	32.5	2.75	28.75	10	98.1
21	77.5	4.25	36.25	10	95.6
22	55	2	32.5	15	45.46
23	32.5	2.75	36.25	10	98.46
24	55	3.5	32.5	15	91.59
25	77.5	4.25	28.75	10	92.39
26	55	3.5	32.5	15	90.65
27	77.5	4.25	28.75	20	92.81

مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

$$\text{Biosorption of uranium} = +381.00267 - 15.47727 * C \text{ (ppm)} - 45.12825 * \text{pH} + 0.62243 * T \text{ (}^\circ\text{C)} - 7.08198 * M \text{ (g/l)} + 4.10347 * C \text{ (ppm)} * \text{pH} + 7.56296E-003 * C \text{ (ppm)} * T \text{ (}^\circ\text{C)} + 0.18786 * C \text{ (ppm)} * M \text{ (g/l)} - 0.10822 * \text{pH} * T \text{ (}^\circ\text{C)} + 2.14135 * \text{pH} * M \text{ (g/l)} - 0.036100 * T \text{ (}^\circ\text{C)} * M \text{ (g/l)} + 0.10988 * C \text{ (ppm)}^2 - 8.84880 * \text{pH}^2 - 0.047385 * C \text{ (ppm)} * \text{pH} * M \text{ (g/l)} - 0.030184 * C \text{ (ppm)}^2 * \text{pH}$$

به طور کلی، در جدول تحلیل واریانس مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ و F بیشتر نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح

اطمینان ۹۵ درصد است. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۰۰۱ و ۱۲/۱۹ است که نشان دهنده صحت مدل

پیشنهادی است. مقدار R^2 برابر با ۰/۹۳ نشان می‌دهد مدل پیشنهادی به خوبی می‌تواند مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند.

در جدول ۳ تحلیل واریانس مدل، پارامترهای اصلی و برهم‌کنش پارامترهای میزان حذف اورانیوم آورده شده است.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که پارامترهای غلظت اولیه اورانیوم، مقدار جاذب و pH از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0.05$) بر روی

فرآیند حذف اورانیوم تأثیرگذار هستند. سطح‌های سه‌بعدی پاسخ‌ها که ناشی از برهمکنش چهار متغیر غلظت اورانیوم، دما، pH و مقدار جاذب است، در اشکال ۱ تا ۶ مشاهده می‌گردد.

نتایج نمودارهای اشکال ۱ و ۲ و ۳ نشان دادند که با افزایش غلظت اورانیوم از ۱۰ mg/l تا ۱۰۰ mg/l میزان حذف از ۱۰۰ به ۹۹/۶ درصد کاهش می‌یابد. در بسیاری از تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که ظرفیت جذب زیستی فلزات مختلف می‌تواند تحت تأثیر غلظت اولیه جذب شونده قرار گیرد. در برخی غلظت‌ها، میزان جذب شونده پایین‌تر از مقداری است که بتواند با تمام جایگاه‌های اتصالی در دسترس برهم کنش کرده و جاذب به حد اشباع برسد. به همین دلیل با افزایش غلظت اولیه جذب شونده می‌توان ظرفیت جذب زیستی فلزات را افزایش داد (Yi & Yao, 2012). اما در این پژوهش، نتیجه افزایش بازده جذب در غلظت‌های پایین اورانیوم نشان دهنده این حقیقت است که جاذب باکتریایی مورد استفاده در محلول‌های فلزی رقیق کارآمد است.

نتایج نمودارهای اشکال ۱ و ۴ و ۵ نشان دادند که با افزایش pH از ۲ تا ۴/۲۵ میزان حذف از ۴۹/۱۸ به ۱۰۰ درصد افزایش یافته است، اما با افزایش pH به ۵ میزان حذف به ۹۹/۶۵ درصد کاهش می‌یابد. یکی از مهم‌ترین پارامترهای موثر در جذب زیستی pH محلول است. به طور کلی مشخص شده است که پارامتر pH، نقش اساسی در فرآیند جذب زیستی ایفا می‌کند. Yi و همکارانش جذب اورانیوم توسط *Elodea canadensis* را بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که مقدار pH محلول بیشترین تأثیر را در کنترل جذب اورانیوم دارد و مقدار بهینه آن برای حذف اورانیوم ۶ می‌باشد (Yi & Yao, 2016). Pang و همکارانش نیز در پژوهشی دیگر جذب زیستی اورانیوم را از محلول‌های آبی به وسیله زیست توده قارچ پنی سیلیوم سیترینوم (*Penicillium citrinum*) مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نیز نشان داد که با افزایش pH از ۳ تا ۶، میزان جذب افزایش یافته و در pH ۶ به بیشینه مقدار خود رسیده است (Pang et al, 2011). حذف اورانیوم توسط زیست توده *Ceratophyllum demersum* توسط Yi و همکارانش نیز نتایج مشابهی را نشان داد. آن‌ها گزارش کردند که مقدار مطلوب pH برای حذف اورانیوم از محلول‌های آبی ۵ است (Yi et al, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که pH بهینه برای جذب معمولاً بین ۴ تا ۷ قرار دارد به گونه‌ای که ظرفیت جذب یون‌های فلزات سنگین معمولاً با افزایش مقدار pH، افزایش می‌یابد، اما ارتباط میان ظرفیت جذب فلزات و pH یک روند خطی نیست (Vijayaraghavan & Yun 2008; Yi & Yao 2012). در pH‌های اسیدی، رقابت بین یون‌های هیدروژن و اورانیوم برای برهمکنش با جایگاه‌های اتصالی موجود در سطح جاذب بالا است و به این ترتیب میزان جذب اورانیوم کاهش می‌یابد. با افزایش pH گروه‌های عملکردی سطح جاذب به تدریج دپروتونه شده و بار منفی پیدا می‌کنند و به این ترتیب میزان جذب افزایش می‌یابد، اما در pH‌های بالاتر، با تشکیل کمپلکس‌های اورانیل مانند $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})^{5+}$ ، $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ و $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ ، جذب اورانیوم کاهش می‌یابد (Embaby et al, 2022; Pang et al, 2011; Wang & Chen 2006). در این بررسی نیز با افزایش pH از ۲ تا ۴/۲۵ میزان حذف از ۴۹/۱۸ به ۱۰۰ درصد افزایش یافته است، اما

با افزایش pH به ۵ میزان حذف به ۹۹/۶۵ درصد کاهش یافته است.

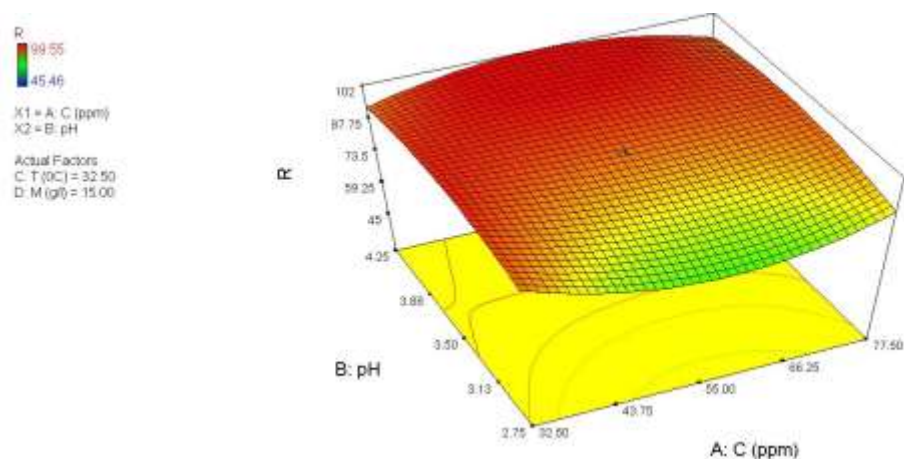
نتایج نمودارهای اشکال ۳ و ۵ و ۶ نشان دادند نشان داد که میزان حذف اورانیوم با افزایش مقدار جاذب از ۵ g/l تا ۵ g/l ۲۵ از ۸۹/۸۲ به ۹۸/۸۳ درصد افزایش پیدا می‌کند. پارامتر میزان جاذب به شدت بر روی میزان جذب تاثیرگذار است. به طور کلی افزایش تراکم بیومس به دلیل افزایش سطح برای جذب و همچنین افزایش محل‌های متصل شونده فعال باعث افزایش جذب می‌شود (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

از دیگر پارامتر مورد بررسی در این پژوهش پارامتر دما بود. نتایج نشان می‌دهد که پارامتر دما از لحاظ آماری (p-Value) > 0.05 بر روی فرآیند حذف اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس بدون تاثیر است (جدول ۳ و نمودارهای اشکال ۲ و ۴ و ۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در محدوده دمایی ۲۰°C تا ۳۵°C میزان تاثیر دما در جذب بسیار اندک است، هرچند با افزایش دما تا ۵۰°C احتمال افزایش جذب در مورد برخی جاذب‌ها وجود دارد اما باید امکان تخریب ساختار جاذب و عدم امکان استفاده مجدد از آن را نیز در نظر گرفت (Mustafa et al, 2016). در سال ۲۰۲۲، Embaby و همکارانش، جذب زیستی اورانیوم از محلول‌های آبی با استفاده از میکروجلبک *Chlorella sorokiniana* را مطالعه کردند. آنها تاثیر دماهای بین ۲۵°C تا ۶۵°C را بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده مناسب‌ترین دما برای حذف اورانیوم از محلول‌های آبی با استفاده از این میکروجلبک ۲۵°C گزارش شد و مشاهدات نشان داد که افزایش دما، سبب کاهش کارایی حذف می‌شود. آن‌ها علت این پدیده را غیرفعال کردن سطح جاذب زیستی یا تخریب برخی جایگاه‌های فعال سطح جاذب دانسته‌اند (Embaby et al, 2022).

جدول ۳- تحلیل واریانس مدل پیشنهادی برای میزان جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس (R).

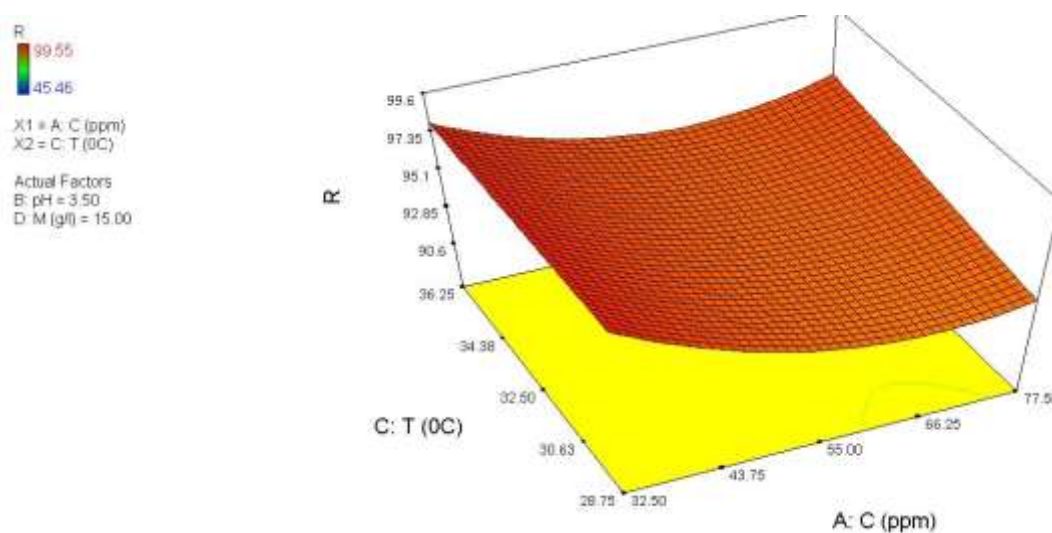
Table 3. Variance analysis of the proposed model for the amount of uranium biosorption by the autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria (R).

Reference	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	2825.492	14	201.8209	12.19238	<0.0001
A-C (ppm)	65.24104	1	65.24104	3.941335	0.0704
B-pH	1273.61	1	1273.61	76.94122	<0.0001
C-T (OC)	4.708204	1	4.708204	0.284432	0.6035
D-M (g/l)	121.7251	1	121.7251	7.353645	0.0189
AB	23.88766	1	23.88766	1.443099	0.2528
AC	6.515256	1	6.515256	0.393599	0.5422
AD	98.15856	1	98.15856	5.929945	0.0314
BC	1.482306	1	1.482306	0.089549	0.7699
BD	48.61576	1	48.61576	2.93697	0.1123
CD	7.330556	1	7.330556	0.442853	0.5183
A ²	117.6547	1	117.6547	7.107745	0.0206
B ²	634.2397	1	634.2397	38.31562	<0.0001
ABD	255.7601	1	255.7601	15.45095	0.0020
A ² B	700.5116	1	700.5116	42.31924	<0.0001



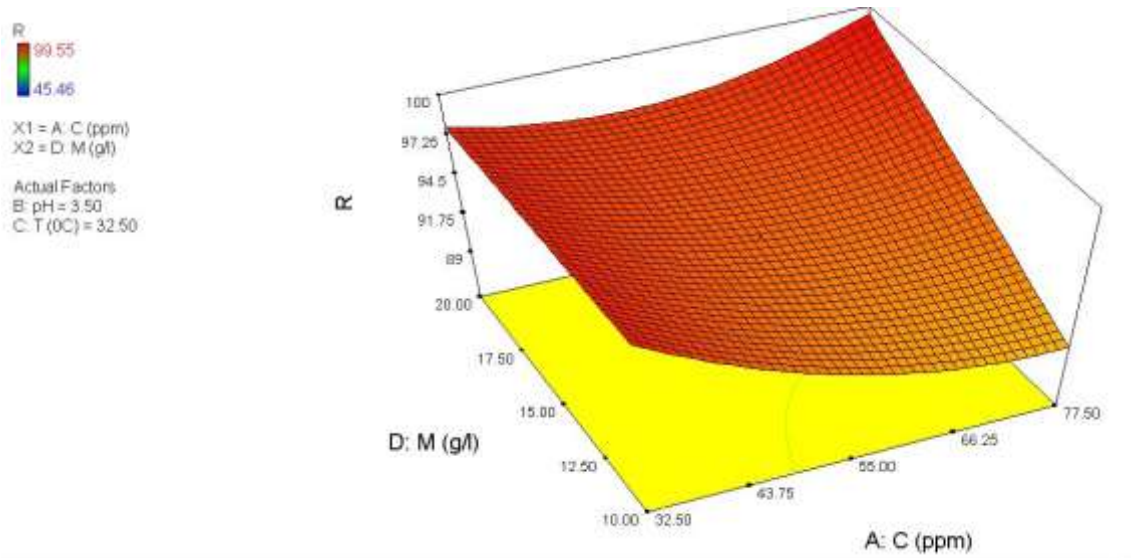
شکل ۱- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و pH بر میزان R

Figure 1. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and pH on R.



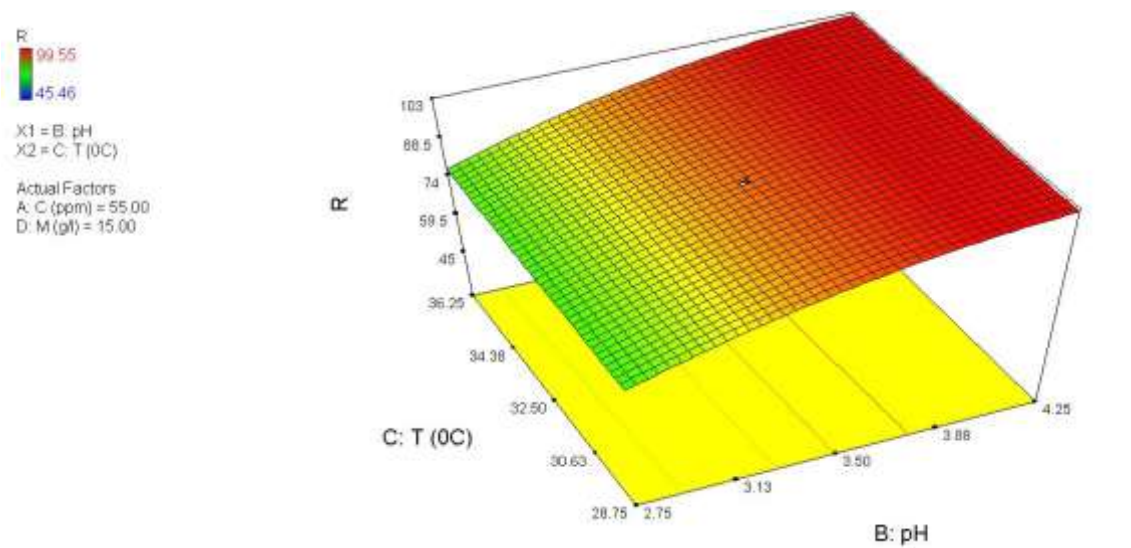
شکل ۲- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و دما (°C) بر میزان R

Figure 2. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and temperature (°C) on R.



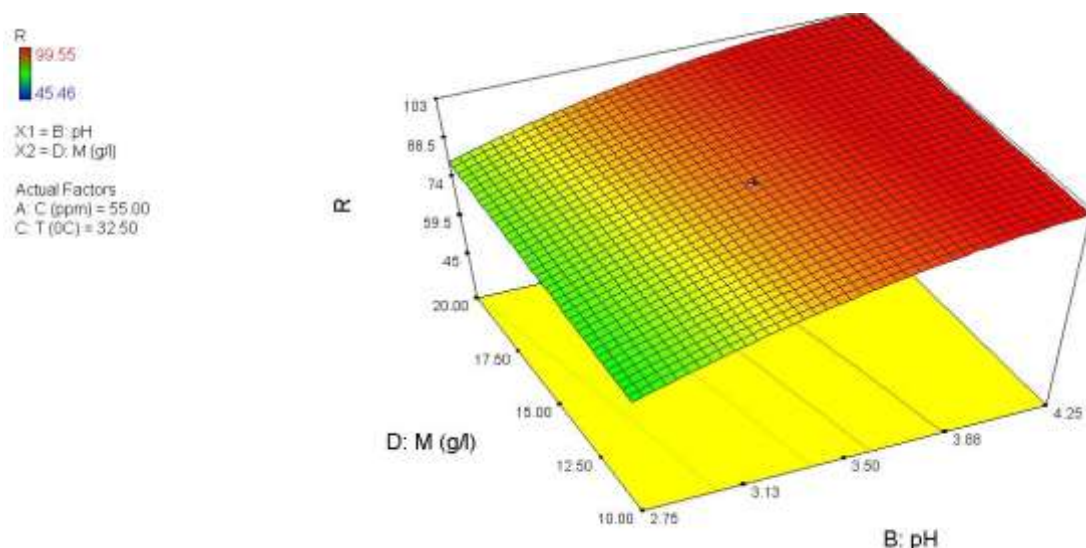
شکل ۳- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R.

Figure 3. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and the amount of biosorbent (g/l) on R.



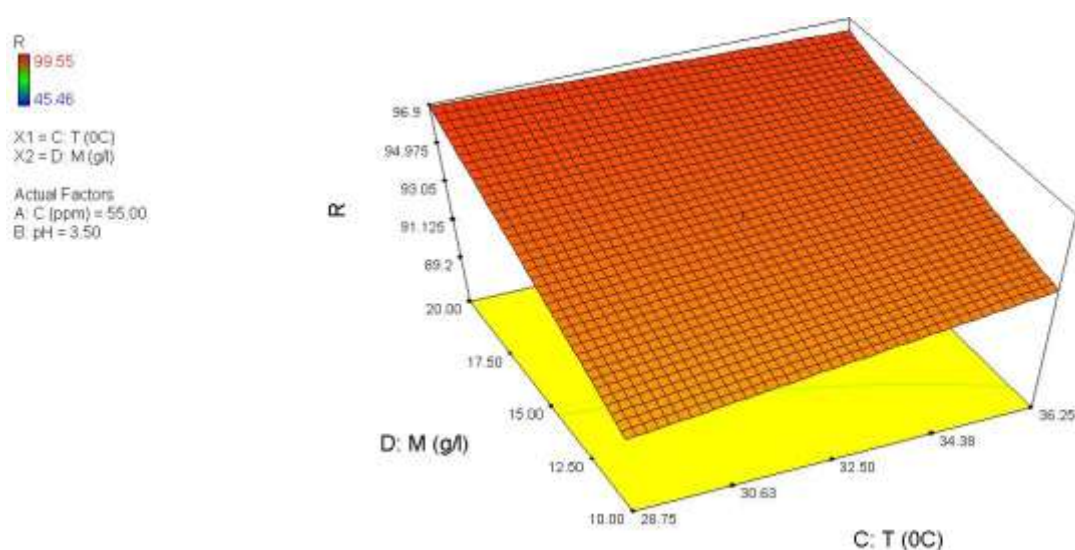
شکل ۴- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار دما (°C) و pH بر میزان R.

Figure 4. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of temperature (°C) and pH on R.



شکل ۵- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهمکنش مقدار pH و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R

Figure 5. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of pH value and the amount of biosorbent (g/l) on R.



شکل ۶- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهمکنش مقدار دما (°C) و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R

Figure 6. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of temperature (°C) and the amount of biosorbent (g/l) on R.

نتیجه گیری

با توجه به گسترش انتشار فلزات سنگین در محیط زیست و مخاطراتی که گسترش آن‌ها به همراه دارد، استفاده از تکنیک‌های ساده و مقرون به صرفه در حذف فلزات به ویژه اورانیوم و بازیابی آن‌ها امری گریز ناپذیر است. با توجه به نقش اساسی سطح سلول در جذب و حذف فلزات، تغییر گروه‌های عاملی سطح سلول با تیمارهای فیزیکوشیمیایی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر در جذب زیستی، می‌تواند ظرفیت و کارایی جذب زیستی اورانیوم را بهبود ببخشد. در این پژوهش نتایج مشخص

کردند که باکتری میکروکوکوس لوتئوس تیمار شده در شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت با سطح اطمینان ۹۵ درصد (۱۹/۷۵ گرم بر لیتر زیست توده، دمای °C ۳۲/۱۴ و pH ۳/۳۳) قادر به حذف تقریباً ۹۹/۹۸ درصد اورانیوم از محیط آلوده به ۲۶/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر اورانیوم است که نشان دهنده پتانسیل ارزشمند باکتری میکروکوکوس لوتئوس تیمار شده در کاربردهای زیست پالایی اورانیوم از پساب‌های اسیدی آلوده با غلظت‌های پایین اورانیوم به عنوان یک جاذب جدید زیستی است. همچنین کوتاه بودن مدت زمان جذب زیستی و تولید پسماندهای ثانویه کم که قابلیت سوزاندن و خاکسترسازی در قسمت پسمانداری را دارند، از مزایای این جاذب زیستی در فرایندهای زیست پالایی اورانیوم محسوب می‌شود.

سیاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای انجام شده‌است. لذا نویسندگان جهت حمایت‌های مالی و معنوی آن مرکز صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

- Ahalya, N. Ramachandra, T.V. and Kanamadi, R.D. (2003). Biosorption of heavy metals. *Research Journal of Chemistry and Environment* 7: 71-79
- Ahmad, A. Bhat, A.H. and Buang, A. (2018). Biosorption of transition metals by freely suspended and Ca-alginate immobilised with *Chlorella vulgaris*: Kinetic and equilibrium modeling. *Journal of Cleaner Production* 171: 1361-1375
- Ayangbenro, A.S. and Babalola, O.O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International journal of environmental research public health* 14: 94
- Bayramoğlu, G. Tuzun, I. Celik, G. Yilmaz, M. and Arica, M.Y. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing* 81: 35-43
- Cheah, C., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2023). Pre-Treatment of Exopolymeric Substances from *Bacillus cereus* for Metal Removal as a Novel Strategy to Enhance Metal Biosorption. *Water, Air, and Soil Pollution*, 234(2). doi:10.1007/s11270-023-06150-w
- Dong, Y., Chong, S., & Lin, H. (2023). Bioleaching and biosorption behavior of vanadium-bearing stone coal by *Bacillus mucilaginosus*. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, 30(2), 283-292. doi:10.1007/s12613-021-2344-9
- Embaby, M.A. Haggag, E.S.A. El-Sheikh, A.S. and Marrez, D.A. (2022). Biosorption of Uranium from aqueous solution by green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Environmental Science and Pollution Research* 29: 58388-58404
- Farhan, S.N. and Khadom, A.A. (2015). Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. *International journal of industrial chemistry* 6: 119-130
- Hadiani, M.R. Khosravi-Darani, K. and Rahimifard, N. (2019). Optimization of As (III) and As (V) removal by *Saccharomyces cerevisiae* biomass for biosorption of critical levels in the food and water resources. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7: 9

- Idris, A. Ismail, N.S.M. Hassan, N. Misran, E. and Ngomsik, A.F. (2012). Synthesis of magnetic alginate beads based on maghemite nanoparticles for Pb(II) removal in aqueous solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18: 1582-1589
- Javanbakht, V. Alavi, S.A. and Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Science Technology* 69: 1775-1787
- Kasra-Kermanshahi, R. Bahrami-Bavani, M. and Tajer-Mohammad-Ghazvini, P. (2019). Microbial clean-up of uranium in the presence of molybdenum using pretreated *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 322: 1139-1149
- Khani, M.H. Keshtkar, A.R. Meysami, B. Zarea, M.F. and Jalali, R. (2006). Biosorption of uranium from aqueous solutions by nonliving biomass of marinealgae *Cystoseira indica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 100-106
- Li, X. Ding, C. Liao, J. Lan, T. Li, F. Zhang, D. Yang, J. Yang, Y. Luo, S. Tang, J. and Liu, N. (2014). Biosorption of uranium on *Bacillus* sp. dwc-2: Preliminary investigation on mechanism. *Journal of Environmental Radioactivity* 135: 6-12
- Liu, H.-L. Chen, B.-Y. Lan, Y.-W. and Cheng, Y.-C. (2004). Biosorption of Zn (II) and Cu (II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal* 97: 195-201
- Long, J., Gao, X., Su, M., Li, H., Chen, D., & Zhou, S. (2018). Performance and mechanism of biosorption of nickel(II) from aqueous solution by non-living *Streptomyces roseorubens* SY. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 548, 125-133. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.03.040
- Mathivanan, K., Uthaya Chandirika, J., Srinivasan, R., Emmanuel Charles, P., Rajaram, R., & Zhang, R. (2023). Exopolymeric substances production by *Bacillus cereus* KMS3-1 enhanced its biosorption efficiency in removing Cd²⁺ and Pb²⁺ in single and binary metal mixtures. *Environmental Research*, 228. doi:10.1016/j.envres.2023.115917
- Mustafa, J. Kausar, A. Bhatti, H.N. and Ilyas, S. (2016). Sequestering of uranium (VI) onto eucalyptus bark: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Desalination and Water Treatment* 57: 14578-14589
- Nakajima, A., & Tsuruta, T. (2004). Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260(1), 13-18. doi:10.1023/B:JRNC.0000027055.16768.1e
- Pang, C. Liu, Y.H. Cao, X.H. Li, M. Huang, G.L. Hua, R. Wang, C.X. Liu, Y.T. and An, X.F. (2011). Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution by dead fungal biomass of *Penicillium citrinum*. *Chemical Engineering Journal* 170: 1-6
- Roşca, M., Silva, B., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2023). Biosorption of Hexavalent Chromium by *Bacillus megaterium* and *Rhodotorula* sp. Inactivated Biomass. *Processes*, 11(1). doi:10.3390/pr11010179
- Sana, S. Roostaazad, R. and Yaghmaei, S. (2015). Biosorption of uranium (VI) from aqueous solution by pretreated *Aspergillus niger* using sodium hydroxide. *Iranian journal of chemistry chemical engineering* 34: 65-74
- Sedlakova-Kadukova, J., Kopcakova, A., Gresakova, L., Godany, A., & Pristas, P. (2019). Bioaccumulation and biosorption of zinc by a novel *Streptomyces* K11 strain isolated from highly alkaline aluminium brown mud disposal site. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 204-211. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.09.123
- Shroff, K.A. and Vaidya, V.K. (2011). Effect of pre-treatments on biosorption of Ni (II) by dead biomass of *Mucor hiemalis*. *Iranian journal of chemistry chemical engineering* 11: 588-597
- Sun, F. Wu, F. Liao, H. and Xing, B. (2011). Biosorption of antimony(V) by freshwater cyanobacteria *Microcystis* biomass: Chemical modification and biosorption mechanisms. *Chemical Engineering Journal* 171: 1082-1090
- Vijayaraghavan, K. Won, S.W. Mao, J. and Yun, Y.S. (2008). Chemical modification of *Corynebacterium glutamicum* to improve methylene blue biosorption. *Chemical Engineering Journal* 145: 1-6
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26: 266-291
- Volesky, B. (1987). Biosorbents for metal recovery. *Trends in Biotechnology* 5: 96-101
- Wang, J. and Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* 24: 427-451
- Yi, Z.-J. and Yao, J. (2012). Kinetic and equilibrium study of uranium (VI) adsorption by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 293: 907-914
- Yi, Z. and Lian, B. (2012). Adsorption of U (VI) by *Bacillus mucilaginosus*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 293: 321-329
- Yi, Z.J. Yao, J. Zhu, M.J. Chen, H.L. Wang, F. and Liu, X. (2017). Biosorption characteristics of *Ceratophyllum demersum* biomass for removal of uranium(VI) from an aqueous solution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 313: 19-27

- Yi, Z.J. Yao, J. Zhu, M.J. Chen, H.L. Wang, F. Yuan, Z.M. and Liu, X. (2016). Batch study of uranium biosorption by *Elodea canadensis* biomass. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 310: 505-513
- Ziouane, A., Iddou, A., Aguedal, H., & Aziz, A. (2019) Biosorption of Lead(II) from Aqueous Solution by Raw and Treated *Streptomyces rimosus*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. In: *Vol. 800 KEM. 59th International Scientific Conference of Riga Technical University (RTU) Section of Materials Science and Applied Chemistry, MSAC 2018* (pp. 145-150): Trans Tech Publications Ltd.

Optimization of uranium biosorption process by autoclaved *Micrococcus Luteus* biomass using response surface methodology

Parisa Tajer-Mohammad-Ghazvini¹, Zahra Shiri-Yekta^{2*}, Shaghayegh Nasr³, Narges Eslami⁴, Mansoureh Hosseini⁵

Received: 2023.03.10

Accepted: 2023.06.12

Abstract

Introduction: Uranium, as one of the heavy metals, is a natural radionuclide that has harmful effects on human health and the environment due to its serious toxicity and radiation properties. Biosorption is a simple and cost-effective technique that can be used for removal of heavy metals and Radionuclides from waste waters.

Material and methods: In this study, *Micrococcus luteus* biomass pretreated with autoclave heat was used. Then, physicochemical factor affecting the biosorption including biosorbent dose, initial uranium concentration, temperature and pH were investigated by Response Surface Methodology. **Results:** The results showed that the factor of initial uranium concentration, sorbent dose and pH statistically ($p\text{-value} < 0.05$) affect the uranium biosorption process. In contrast, temperature factor ($p\text{-value} > 0.05$) statistically have no effect on uranium removal by *M. luteus*. **Discussion and conclusion:** The results indicated that the pre-treated biomass under the conditions suggested by Design Expert software (19.75 g/liter of biomass, temperature 32.14 °C and pH 3.33) is able to remove approximately 99.98 percent of uranium from the contaminated area is 26.11 mg/liter of uranium, which shows its valuable potential in bioremediation applications of uranium from acidic wastewaters contaminated with low concentrations of uranium.

Keywords: Uranium, Biosorbent, Radionuclide, Bioremediation, Design-Expert

1. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

2*. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran (*Corresponding Author: zshiri@aeoi.org.ir).

3. Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.

4. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

5. Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran