

بهینه‌سازی فرایند احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI7* به روش سطح پاسخ در پساب صنعتی

راضیه قاسمی^۱، الهام راستخواه^۲، صابرہ نائیج^۳، توران ربیعی^۳، حمزه حسین پور^۳، سمانه نائیج^۳، جواد رفیعی^۳، فائزه فاطمی^{۴*}

۱. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، کدپستی: ۱۴۳۹۹۵۶۱۹۱، تهران- ایران

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

۳. ENTC، مرکز تحقیقات هسته‌ای اصفهان، اصفهان- ایران

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

*Email: fatemi81@yahoo.com

مقاله‌ای پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۷/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸

چکیده

تمام ترکیبات اورانیم، سمی و رادیواکتیو هستند. سمی بودن این عنصر می‌تواند کشنده باشد. با توجه به سمیت شیمیایی و رادیواکتیویته اورانیم، ضروری است از ورود آن به طبیعت جلوگیری شود. پسماندهای خروجی از مراکز صنعتی- هسته‌ای نیز دارای مقادیر مختلفی از اورانیم می‌باشد و لذا حذف این عنصر از پساب این مراکز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از سویی دیگر، نظر به اهمیت این عنصر و محدودیت منابع آن، پارسایی اورانیم از پسماندها، دارای ارزش اقتصادی نیز می‌باشد. در پژوهش حاضر، از روش سطح پاسخ (RSM) بر اساس طرح مرکب مرکزی به منظور بررسی و بهینه‌سازی پارامترهای مختلف بر فرایند احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI7* در پساب واقعی استفاده گردید. معادله درجه دوم پیشنهاد شده با ضریب همبستگی $R^2 = 0.94$ از کفايت مناسبی برخوردار بوده و حداقل راندمان احیای اورانیم توسط *Shewanella RCRI7* در شرایط بهینه (pH = 5.7-6.5، دما = 26.63 °C و زمان = 117 ساعت)، ۹۸٪ براورد شده است. در گام بعدی به منظور تعامل بین متغیرها، روابه‌های سه‌بعدی با تقابل pH و دما؛ pH و زمان؛ دما و زمان؛ در پایان بر اساس بهینه‌های پیشنهادی احیای اورانیم در پساب واقعی توسط دو روش XRD و اسپکتروفوتومتری مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج بهدست آمده، باکتری *Shewanella RCRI7* می‌تواند، به عنوان باکتری با ارزش در احیای زیستی اورانیم از پساب خروجی مراکز صنعتی معرفی گردد. از سوی دیگر استفاده از روش سطح پاسخ می‌تواند درک جامعی از فرایند و مکانیسم احیای زیستی اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI7* و پشتیبانی نظری برای انجام این فرایند ارایه دهد.

کلیدواژه‌ها: احیای زیستی، اورانیم، طراحی آزمایش RSM، باکتری *RCRI7*, *Shewanella RCRI7*

Optimization of uranium bioreduction by *shewanella RCRI7* using Response Surface Design Method (RSM) in industrial waste

R. Ghasemi¹, E. Rastkhah², S. Naij², T. Rabiee Samani³, H. Hosseinpour³, S. Naeij², J. Rafiei⁴, F. Fatemi^{*4}

1. Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Postal code: 1439956191, Tehran – Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, P.O.Box: 14515-775, Tehran – Iran

3. ENTC, Isfahan Nuclear Research Center, Isfahan – Iran

4. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box:11365-8486, Tehran-Iran

Research Article

Received 28.9.2021, Accepted 8.1.2022

Abstract

Uranium compounds are toxic and radioactive. Its poisonous properties can be fatal. So, it is necessary to prevent its excessive entry into nature due to uranium's chemical toxicity and radioactivity. Waste from industrial-nuclear centers also has different amounts of uranium; therefore, the removal of this element from the effluent of these centers is essential. On the other hand, due to the importance and limited resources, uranium recovery from waste has economic value. In the present study, the Response Surface Method (RSM) based on the central composite design was used to evaluate and optimize different parameters affecting the bioremediation process of *Shewanella RCRI7* in real waste. The proposed second-order model with a correlation coefficient $R^2 = 0.94$ appropriately predicted the experimental data and the maximum uranium reduction efficiency by *Shewanella RCRI7* under optimal conditions (pH = 5.7-6.5, Temperature 26.63 °C and Time 117 hours) was estimated to be about 98%. In the next step to interact between the variables, three-dimensional procedures with pH and temperature; temperature and time; pH and time interactions were obtained; finally, the uranium reduction in real effluent was investigated by XRD and spectrophotometric methods. Based on the results, *Shewanella RCRI7* is determined as a valuable candidate for uranium bioreduction processes in the determined industrial wastewater. On the other hand, using the response surface methodology can provide a comprehensive understanding of the process, the mechanism of uranium bioremediation by *Shewanella RCRI7*, and the theoretical support for this process.

Keywords: Bioremediation, Uranium, Response surface design method (RSM), *Shewanella RCRI7*

Journal of Nuclear Science and Technology

Vol. 44 (2), Serial Number 103, 2023, P 15-23

مجله علوم و فنون هسته‌ای

دوره ۴۴، شماره ۱، جلد ۱۰۳، بهار ۱۴۰۲، ص ۱۵-۲۳



مقرن به صرفه بوده، کمترین اختلال را در محیط‌زیست ایجاد می‌کند. علاوه بر این، کارآمدی میکروارگانیسم‌ها برای جداسازی اورانیم از محل‌های آلوده، به دفعات در مجموعه‌ای از محیط‌ها از جمله رسوبات آبرفتی اشبع، بهسازی محیط‌های متأثر از استخراج اورانیم از طریق بازیابی در محل و ... تأیید شده است [۱۳، ۱۴]. بر این اساس و به منظور شناسایی و جداسازی باکتری بومی- ایرانی در سال ۲۰۱۱ بر روی آب دریاچه قوری گل تبریز آزمایشات مختلفی صورت گرفت که منجر به شناسایی گونه *S. RCRI۷* گردید. درخت فیلوژنی آن با بررسی توالی زن RNA ۱۶srRNA رسم و مشخص گردید که گونه مورد نظر از لحاظ فیلوژنی به سایر سویه‌های مطالعه شده این گونه نظیر *S. xiamenensis*, *S. putrefaciens* و *S. oneidensis* داشته [۱۵] و بیشترین شباهت را تا بیش از ۹۹/۱ درصد به سویه‌ی ۱ *S. oneidensis* MR-۱ دارد. از سوی دیگر، طبق پژوهش‌های ظاهری و همکاران در سال ۲۰۱۷، سویه‌ی ۱، سویه‌ی MR-۱ عملکرد مناسبی در احیا و رسوب‌دهی اورانیم دارد [۶]. پژوهش حاضر به منظور طراحی و بهینه‌سازی فرایند احیای اورانیم در پساب خروجی مؤسسه تبدیلات اورانیم اصفهان (UCF) به روش سطح پاسخ انجام گرفته است.

۲. مواد و روش

۱.۲ تهیه باکتری

باکتری *Shewanella RCRI۷* استفاده شده در پژوهش حاضر سویه بومی- ایرانی است که شباهت بسیار بالایی به باکتری *S. oneidensis* MR-۱ دارد لذا گزینه‌ای مناسب جهت زیست پالایی اورانیم معرفی شده است [۱۶، ۱۷]. جنس‌شونالا باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای‌شکل، دارای یک تازه قطبی و متحرك هستند. اغلب بی‌هوای اختیاری‌اند و در رسوبات دریایی یافت می‌شوند [۱۸].

۲.۲ آنالیز بافت پساب

به منظور بازفراوری اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI۷*، از پساب خروجی مؤسسه تبدیلات اورانیم اصفهان (UCF) همراه با آنالیز مشخص شده ترکیبات (جدول ۱) استفاده گردید.

۱. مقدمه

حضور اورانیم در رسوبات و آب‌های زیرزمینی در اطراف بسیاری از سایتها فراوری اورانیم مشکل جدی جهت مدیریت پسماندهای هسته‌ای بوده که در آن رادیونوکلیدهای باقی‌مانده به سطح زیرین شسته شده و تهدیدی جدی برای سلامتی انسان و محیط طبیعی است [۱، ۲]. میزان آلودگی، ناکارآمدی و روش‌های تصفیه پرهزینه، تلاش برای تعریف روش‌های کم‌هزینه به منظور ارزیابی و اصلاح بسیاری از مکان‌های آلوده به اورانیم را افزایش داده است [۳، ۴، ۵]، از این‌رو کاهش میکروبی U محلول (VI) به U نامحلول (IV) نویدبخش یک استراتژی قابل توجه جهت تصفیه زیستمحیطی در محیط‌های آلوده به اورانیم می‌باشد [۲]. باکتری‌های به کار رفته در احیای زیستی، با ساختار دیواره و آنزیمهای ویژه در مسیر انتقال الکترون خود، قادر به حذف هم‌زمان فلزات مختلف از محیط اطراف هستند [۶]. برخی از میکروارگانیسم‌ها و یا آنزیم ترشح شده از آن‌ها، در حذف اورانیم مؤثر بوده و در نتیجه در بهبود وضعیت زیستمحیطی پساب‌ها، نقش مهمی دارند [۵]. بررسی مقالات مختلف علمی نشان می‌دهد که بسته به نوع میکروارگانیسم و شرایط انجام آزمایش، فرایند ترسیب میکروبی اورانیم دارای این قابلیت می‌باشد که در محدوده وسیعی از انواع محلول‌های آبی شامل محلول فروشوابی، پساب‌ها، آب‌های آلوده شده به اورانیم و آب دریا به کار گرفته شود [۶].

طیف گستردگی از جنس‌های باکتریایی شامل *Pyrobaculum*, *Geobacter*, *Shewanella*, *Clostridium* و *Desulfotomaculum* و *Desulfoviboro* را می‌توان در فرایند احیا و رسوب‌دهی اورانیم مورد استفاده قرار داد. در این میان در بسیاری از مقالات علمی *S. oneidensis* در مبارزه با نشت زباله‌های هسته‌ای مورد استفاده قرار گرفته است [۹، ۱۰، ۱۱]. این باکتری می‌تواند اورانیم را به عنوان گیرنده الکترون جدید، در زنجیره انتقال الکترون، احیا کند و این فرایند سبب ترسیب اورانیم می‌گردد. اورانیم جامد را می‌توان به راحتی جمع‌آوری نمود و به محل دفن زباله‌های هسته‌ای منتقل کرد [۱۲]. از سوی دیگر، راهکار استفاده از سویه‌های میکروبی بومی در جهت حذف فلزات، در دهه گذشته به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. این شیوه، علاوه بر این‌که

جدول ۱. آنالیز پساب سایت فراوری اورانیم و تولید سوخت هسته‌ای

کد پادمانی	کد نمونه	U (mg/l)	Fe (mg/l)	Pb (mg/l)	Na (mg/l)	F (g/l)	Cl ⁻ (mg/l)	NO ₃ ⁻ (g/l)	*PO ₄ ³⁻ (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	HCO ₃ ⁻ (mg/l)	CO ₃ ²⁻ (mg/l)
+ ۵QLN/۳۲۸	۱	۲۷,۵	< ۰,۵	< ۰,۵	۳۴۲۹	۱,۴	۴۰	۱۸,۷	-	۹۴	۵۸۰	۲۰۱۹
۵QLN/۳۰۴	۲	۲۶,۵	< ۰,۵	< ۰,۵	۳۴۶۵	۱,۱	۳۶	۱۶,۰	-	۸۶	۸۶۱	۱۸۸۸
pH=۸	۳	۲۸,۵	< ۰,۵	< ۰,۵	۳۲۵۰	۱,۱	۳۸	۱۶,۱	-	۷۵	۹۰,۹	۱۸۹۴



۱۰.۴.۲ پیش کشت از باکتری *Shewanella RCRI* ۷ نگهداری شده در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد، جهت تهیه پیش کشت به منظور انجام آزمایش احیای اورانیم استفاده شد. بدین منظور، باکتری ها در زیر هود و شرایط استریل کامل، به محیط کشت TSB به نسبت ۱ به ۱۰۰ اضافه گردیده و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm، انکوبه شدند.

۱۰.۴.۲ اجرای آزمایش احیا

کلیه مراحل انجام فرایند احیا در پژوهش حاضر بر اساس پژوهش ظاهری و همکاران (۲۰۱۷) می باشد. محلول احیا به کار رفته شامل ویتامین، مواد معدنی، نمک های محلول، الکترون دهنده و الکترون گیرنده (جدول ۳) است که ۲۴ ساعت پیش از تلقیح باکتری، تهیه و سپس بی هوازی گردید. انجام فرایند احیای اورانیم در شرایط کاملاً بی هوازی و در داخل گلابوگ با استفاده از مخلوط گاز نیتروژن و دی اکسید کربن انجام شده است [۱۶، ۱۷].

پس از انجام واکنش احیا در شرایط بی هوازی، یک رسوب (حاوی باکتری و اورانیم) در قسمت کف ویال ۱۰۰ میلی لیتری، تنه شین گردید. جهت اندازه گیری غلظت اورانیم پس از انکوباسیون، محلول و رسوب به کمک کاغذ صافی از هم جدا شدند. آنالیز ICP به منظور تعیین غلظت اورانیم باقیمانده در محلول بر روی نمونه برداشت شده از سطح محلول احیا، پس از سانتریفیوژ (۵۵۰۰ دور در دقیقه rpm)، در دمای ۴°C و به مدت ۱۵ دقیقه، انجام شد. رسوب جهت بررسی احیا اورانیم (VI) به اورانیم (IV) به وسیله اسپکتروفوتومتری^۱ و XRD با هدف اثبات احیا اورانیم توسط باکتری شوانلا RCRI ۷ مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۳. ترکیبات مختلف محلول احیا به کار رفته در آزمایش

ویتامین (۱۰۰۰) (در ۱۰۰ سی سی)		الکترون دهنده	
مقدار (g/L)	ماده	مقدار (mL/L)	ماده
۰.۰۵	p-amino benzoic acid	۵۵	لاکتات سدیم (٪۵۰)
۰.۰۲	Thiamine-HCl		
۰.۱	B _۶		
۰.۰۱	B _{۱۲}		

1. Spectrophotometry

Journal of Nuclear Science and Technology

Vol. 44 (2), Serial Number 103, 2023, P 15-23

۳۰.۲ طراحی و بهینه سازی آزمایش به منظور ارزیابی فاکتورهای مؤثر بر فرایند احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI* ۷ به منظور تعیین فاکتورهای مؤثر در شرایط عملیاتی فرایند احیای اورانیم توسط باکتری مورد نظر، مطالعه برهمنش متغیرها و همچنین تعیین میزان بهینه آنها، اثر سه متغیر دما، pH و زمان در ۵ سطح با پاسخ میزان حذف اورانیم بررسی گردید. بررسی پارامترهای مؤثر در فرایند احیای زیستی و رسوب اورانیم، بر اساس نتایج حاصل از مقالات مرجع و پژوهش های صورت گرفته در زمینه احیای زیستی توسط محققین انجام گرفته است [۱۸، ۶]. ظاهری و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی پارامترهای مختلف عملیاتی شامل دما، pH، چگالی سلولی اولیه و غلظت اولیه اورانیم، حذف آن را توسط باکتری *Shewanella RCRI* ۷ مورد مطالعه قرار دادند. در بررسی های صورت گفته، فاکتورهای دما، pH و زمان، جزو مهم ترین عوامل مؤثر در این روند می باشند [۶]. در ادامه، در این پژوهش با استفاده از نتایج به دست آمده، طراحی و بهینه سازی پارامترهای مؤثر در پساب واقعی بررسی گردیده است. شایان ذکر است که در پژوهش حاضر میزان غلظت اولیه اورانیم پساب ثابت بوده (جدول ۱) و چگالی سلولی بهینه شده، ۱۰^۹ می باشد.

به منظور تحلیل فرایند از روش سطح پاسخ که یکی از کاربردی ترین روش های تحلیل فرایندهای چند متغیره است [۱۹، ۲۰، ۲۱] استفاده شده است. سطوح مختلف متغیرهای مستقل طراحی آزمایش در جدول ۲ نشان داده شده است:

۴.۲ احیای اورانیم توسط باکتری *Shewanella RCRI* ۷

منظور از احیای میکروبی اورانیم، تغییر حالت اکسایشن اورانیم از U(VI) به U(IV) با استفاده از باکتری می باشد. در این فرایند، باکتری الکترون ها را از یک الکترون دهنده (مانند استات، هیدروژن مولکولی یا . . .) گرفته و در نهایت به یک گیرنده نهایی الکترون می دهد [۲۲، ۲۳].

جدول ۲. سطوح متغیرهای مستقل در طراحی آزمایش به روش طراحی مرکب مرکزی

متغیر مستقل	تعداد	سطح ها				
		-α	-۱	۰	+۱	+α
pH	A	۳.۹۸	۵	۶.۵	۸	۹.۰۲
مدت زمان (ساعت)	B	۲.۸۲	۲۶	۶۰	۹۴	۱۱۷/۱۸
دما	C	۴.۸۲	۱۳	۲۵	۳۷	۴۵/۱۸



جدول ۴. آزمایشات پیشنهاد شده توسط نرمافزار دیزاین اکسپرت به همراه طرفیت جذب تجربی

درصد حذف اورانیم	دما (C)	مدت زمان (ساعت) (B)	pH (A)	آزمایش
۲۴.۵	۳۷	۲۶	۵	۱
۳۰	۳۷	۲۶	۸	۲
۷۰	۴۵/۱۸	۶۰	۶.۵	۳
۸۰	۱۲	۹۴	۵	۴
۴۰	۲۵	۶۰	۳.۹۸	۵
۷۷	۳۷	۹۴	۵	۶
۳۶	۳۷	۹۴	۸	۷
۴۲	۱۲	۹۴	۸	۸
.	۲۵	۶۰	۹.۰۲	۹
۹۴.۸	۲۵	۶۰	۶.۵	۱۰
۹۴.۲	۲۵	۶۰	۶.۵	۱۱
۹۳.۶	۲۵	۶۰	۶.۵	۱۲
۹۳.۲	۲۵	۶۰	۶.۵	۱۳
۲۳	۴.۸۲	۶۰	۶.۵	۱۴
۶۵.۶	۲۵	۲.۸۲	۶.۵	۱۵
۳۴.۲	۱۲	۲۶	۸	۱۶
۳۰.۵	۱۲	۲۶	۵	۱۷
۹۸	۲۵	۱۱۷/۱۸	۶.۵	۱۸

از آنالیز شبکه طراحی آزمایش (جدول ۴) با توجه به سه متغیر عملیاتی و یک متغیر پاسخ درصد تبدیل (R) و انجام ۱۸ آزمایش پیشنهادی، معادله درجه دوم پیشنهادی زیر به دست می‌آید:

$$\begin{aligned} Removal (\%) = & -569.78450 + 160.62417 * pH + \\ & 2,263.86 * Time + 6,4071.0 * Temp - 0,21618 * \\ & pH * Time - 8,33332 * 10^{-3} pH * Temp + \\ & 3,67647 * 10^{-4} * Time * Temp - 11.85665 * \\ & pH^2 - 4,17636 * 10^{-5} * Time^2 - 0,1202.0 * Temp \end{aligned}$$

بر اساس نتایج حاصل از جدول ۴، آزمایشات پیشنهادی نشان می‌دهند که باکتری مذکور در محیط‌های به شدت بازی و اسیدی دارای راندمان درصد حذف مطلوب و حداقلی نیست. همچنین بهمنظور ارزیابی کفايت مدل از تحلیل واریانس استفاده شد. مقدارهای p-value کمتر از ۰.۰۵ و مقدار F بالاتر در تحلیل واریانس، بیان‌گر مناسب‌تر بودن مدل برآش شده می‌باشد. با توجه به مقادیر p-value و F، مدل ارایه شده که به ترتیب ۰.۰۰۰۶ و ۱۳.۶۱ می‌باشد، می‌توان گفت که مدل پیشنهادی از کفايت مناسبی برخوردار است. علاوه بر این، مقادیر R² و R² تعديل شده^۱ به ترتیب برابر ۰.۹۴ و ۰.۸۷ است

1. Adjusted R²
Journal of Nuclear Science and Technology

Vol. 44 (2), Serial Number 103, 2023, P 15-23

۵.۰.۲ تحلیل آماری

به منظور تحلیل آماری داده‌ها از نرمافزار دیزاین اکسپرت ۷ (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) استفاده شده است [۲۵, ۲۴].

۳. نتایج و بحث

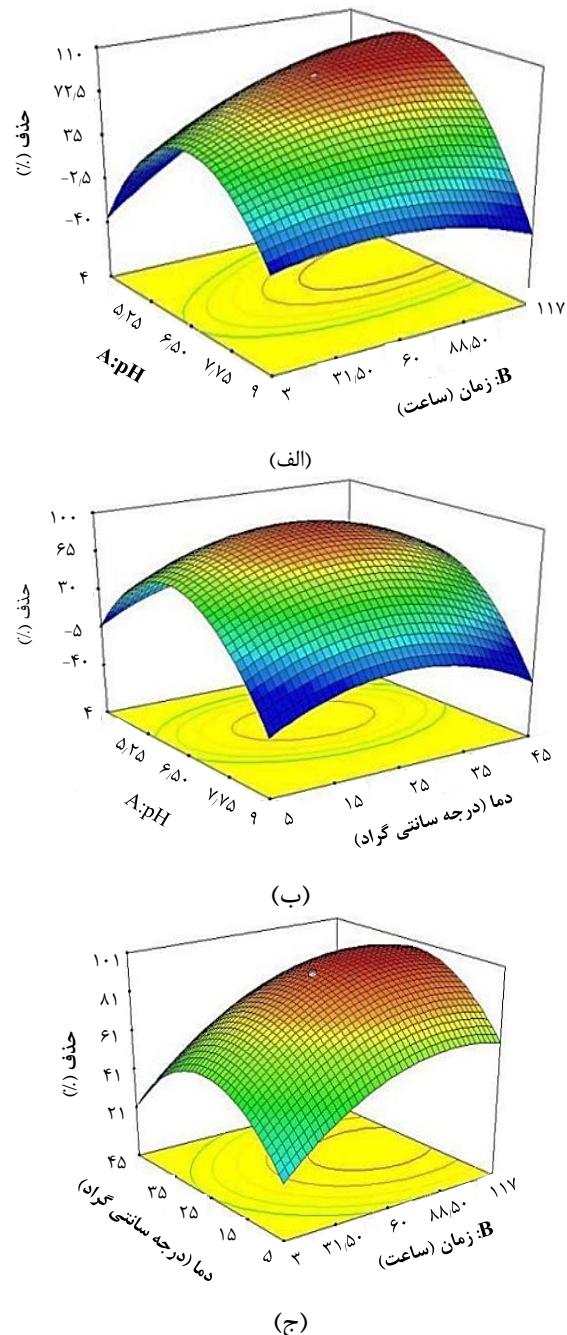
استفاده از روش‌های زیست‌پالایی در حذف فلزات از پساب‌ها، می‌تواند برخی از محدودیت‌ها و مشکلات مربوط به روش‌های فیزیکو‌شیمیایی را برطرف نماید و راه حل اقتصادی‌تری محسوب می‌شود. بر این اساس در سال‌های اخیر، استفاده از توده‌های زیستی مختلف برای حذف فلزات سنگین از پساب‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۲۶, ۲۷]. باکتری Shewanella RCRI7 سویه *S. oneidensis* MR-1 گزینه‌ای مناسب جهت زیست‌پالایی اورانیم معرفی شده است [۱۶, ۱۷]. با این وجود لازم است تا آزمایشات مختلفی جهت استفاده‌ی بهینه از این باکتری طراحی و اجرا گردد. از سوی دیگر، انجام آزمایشات کمتر با راندمان بالا، از لحاظ اقتصادی مقرن به صرفه می‌باشد، لذا روش‌های مختلفی برای این منظور معرفی شده است.

نتایج آنالیز نشان داد که pH پساب ۸ و حاوی فلزات سنگین نظیر اورانیم، سرب و سایر فلزات نظیر آهن و سدیم می‌باشد. برخی از محققین نیز بیان داشته‌اند که پساب واقعی رادیواکتیو، حاوی اورانیم، فلزات سنگین نظیر Ba, Cr, Fe, Mn, Pb, Ca, Mg می‌باشد [۲۸, ۲۹]. علاوه بر این، حضور یون‌های CO₃²⁻, HCO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ نشان‌دهنده‌ی این است که لجن از نظر شیمیایی فعال است [۳۰].

۱.۰ بهینه‌سازی متغیرهای عملیاتی بر اساس طراحی آزمایش با طرح مرکزی به روش متدولوژی سطح پاسخ (RSM) طراحی آزمایش با استفاده از یک طرح مرکزی تحت روش سطح پاسخ، یکی از قدرتمندترین روش‌ها برای مدل‌سازی آماری با استفاده از کمترین تعداد آزمایش‌های تجربی می‌باشد [۲۰]. روش سطح سطح پاسخ در بهینه‌سازی رویه‌های تحلیلی، امروزه به دلیل مزیت‌های آن به منظور بهینه‌سازی کلاسیک یک متغیر در هر زمان، مانند دستیابی به مقادیر زیادی اطلاعات از تعداد کمی آزمایش و امکان ارزیابی اثر متقابل بین متغیرها، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۱]. به منظور حصول نتایج منطقی در این مطالعه از روش طراحی مرکزی Composite Central Design (CCD) در پنج سطح استفاده شده است. بر اساس روش CCD بهمنظور بررسی اثر سه متغیر مندرج در جدول ۲، ۱۸ آزمایش طبق جدول ۴ انجام شد.



مرجع	DF	مدل درجه دوم		
		Sum of squares	F-value	p-value
مدل	۹	۱۵۶۰۰.۵	۱۲۶۱	.۰۰۰۶
A	۱	۱۳۷۵.۷۷	۱۰.۷۶	.۰۰۱۲
B	۱	۲۱۲۳.۳۸	۱۶.۶۱	.۰۰۳۶
C	۱	۴۶۲.۴۴	۲.۰۵	.۱۹
AB	۱	۹۷۲.۴۱	۷.۶۱	.۰۰۲۵
AC	۱	.۱۸	.۰۰۱۴	.۹۷
BC	۱	.۱۸	.۰۰۱۴	.۹۷
A ^r	۱	۹۰۰.۲۵	۷.۴۱	<.۰۰۰۱
B ^r	۱	۲۹۴.۸۳	۲.۳۱	.۰۱۶۷۴
C ^r	۱	۳۷۸.۹۴	۲۹.۶۴	.۰۰۰۶
		R ^۲ = .۹۴	R ^۲ _{adj} = .۸۷	



شکل ۱. رویه‌های سبعدی احیازیستی اورانیم: A: اثر متقابل زمان و اسیدیته ($T=25^{\circ}\text{C}$), B: اثر متقابل دما و اسیدیته (ساعت = زمان), C: اثر متقابل زمان و دما (pH = ۶.۵).

(جدول ۵). هر چه این مقدار به ۱ نزدیک‌تر باشد ارتباط بهتری بین نتیجه‌های آزمایشگاهی و محاسبه شده وجود دارد [۳۲]. نتایج نشان می‌دهد که مدل ارایه شده به خوبی داده‌های تجربی را پیش‌بینی کرده است.

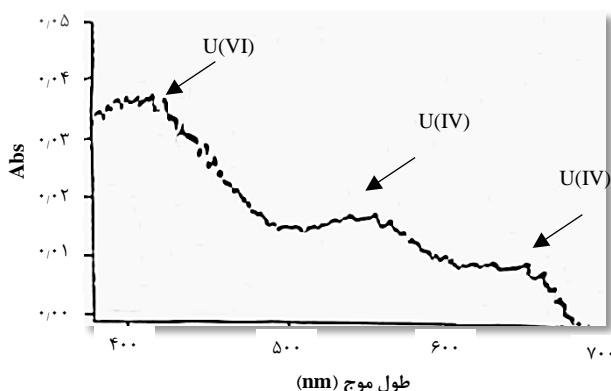
نتایج تحلیل واریانس (جدول ۵) نشان داده است که متغیرهای A و B (اسیدیته و مدت زمان) از نظر آماری با p-value کمتر از ۰.۰۵ و F-value با p-value C (دما) با F-value بالاتر از ۰.۰۵ پایین، مؤثرترین عوامل و مختلف ۱ (A تا C) اثر فاكتورهای اصلی و برهمنکش بین فاكتورها را نشان داده است.

شکل ۱ الف تأثیر زمان تماش، اسیدیته و برهمنکش این دو فاكتور را بر روی حذف زیستی اورانیم نشان می‌دهد. با توجه به شکل می‌توان گفت که اسیدیته تأثیر بسیار زیادی بر فرایند دارد، به گونه‌ای که در اسیدیته‌های نزدیک به ۶، ظرفیت حذف زیستی به حدکثر مقدار خود می‌رسد. این موضوع به این دلیل است که میکرووارگانیسم‌های زنده، شرایط اسیدی نزدیک به خنثی را بیشتر ترجیح می‌دهند و فعالیت آن‌ها در این محدوده بالاتر است [۳۳]. تأثیر مثبت زمان بر ظرفیت حذف زیستی اورانیم به دلیل فراهم نمودن زمان کافی برای فعل و افعالات میکرووارگانیسم‌ها و تبدیل کردن اورانیم +۶ ظرفیتی به +۴ ظرفیتی می‌باشد. در واقع، با افزایش زمان تماش، میکرووارگانیسم زمان بیشتری برای حذف اورانیم در اختیار دارند و به همین دلیل عملکرد بهتری در زمان‌های بالا حاصل می‌شود. شکل ۱ ب تأثیر دما، اسیدیته و برهمنکش این دو فاكتور را بر روی حذف زیستی اورانیم نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌کنید، شکل حاصل مشابه چتر شده است. در واقع از این شکل برداشت می‌شود که در شرایط میانی پارامترهای اسیدیته (۶) و دما (۲۵ درجه)، میکرووارگانیسم عملکرد مناسب‌تری دارد. به دلیل مشابه می‌توان گفت که میکرووارگانیسم شرایط دمایی محبطی را ترجیح می‌دهد و در این دما فعالیت بالاتری برای حذف اورانیم از خود نشان می‌دهد. شکل ۱ ج تأثیر دما، زمان تماش و برهمنکش این دو فاكتور را بر روی حذف زیستی اورانیم نشان می‌دهد. با توجه به شکل، افزایش زمان تماش به دلیل فراهم نمودن زمان کافی برای حذف یون‌های اورانیم توسط میکرووارگانیسم‌ها باعث افزایش ظرفیت حذف زیستی می‌شود. همچنین، ظرفیت حذف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دلیل فعالیت بهتر میکرووارگانیسم‌ها بالاتر است. بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و پاسخ تجربی به دست آمده از آزمایش در جدول ۶ آمده است.

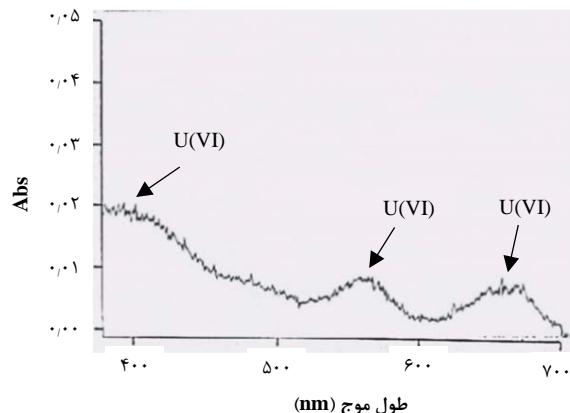


۲.۳ بررسی مکانیسم احیای اورانیم توسط باکتری Shewanella RCRI7 در پساب به روش XRD و اسپکتروفوتومتری

به منظور اثبات احیای اورانیم در پساب توسط باکتری و با اطلاع از امکان عدم سنجش کمی و دقیق آن در غلظت و زمان پایین، بررسی به دو روش XRD و اسپکتروفوتومتری صورت گرفت. آزمایشات در پساب واقعی با غلظت اورانیم ۶۵ ppm، با دو روش اسپکتروفوتومتری (در زمان‌های بهینه ۱۱۷ و ۲۴ ساعت) و XRD (زمان انکوباسیون یک ماهه)، مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در این غلظت، پیک اورانیم چهار ظرفیتی هم در نمونه ۲۴ و هم در نمونه ۱۱۷ ساعته به وجود نشان داده شده است (شکل ۲ و ۳). هم‌چنین نتایج XRD (زمان انکوباسیون یک ماهه)، پیک‌های اورانیم را به خوبی نشان می‌دهد (شکل ۴). این نتایج تأییدی دیگر بر این نکته می‌باشد که باکتری شوانلا RCRI7 به صورت غیروابسته به نیترات، به خوبی قادر به احیای اورانیم می‌باشد و فرایند احیا را در همان ۲۴ ساعت اولیه آغاز می‌کند.



شکل ۲. اسپکتروم محلول احیا در پساب واقعی حاوی ۶۵ ppm اورانیم در مدت زمان ۱۱۷ ساعت.



شکل ۳. اسپکتروم محلول احیا در پساب واقعی حاوی ۶۵ ppm اورانیم در مدت زمان ۲۴ ساعت.

جدول ۶. بهینه‌سازی فرایند احیای اورانیم توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و پاسخ تجربی

فاکتور	مقادیر بهینه	پیش‌بینی شده	تجربی	خطای نسبی	درصد پاسخ
اسیدیت	۶.۵-۵.۷	۱۰۰	۹۷	۳	۶۵.۶۳
دما					۲۶.۶۳
زمان تماس (ساعت)					۱۱۷

پس از حصول بهینه پیشنهادی توسط نرم‌افزار (جدول ۶)، به منظور بررسی کاربرد باکتری شوانلا RCRI7 در شرایط عدم بهینه، فرایند حذف، در pH پساب و دمای بهینه و زمان ۲۴ ساعت در مقیاس آزمایشگاهی نیز انجام پذیرفت. نتایج تجربی به دست آمده در شرایط مختلف پساب (جدول ۷) را دندان ۹۹-۹۸ درصد را ارایه داده است.

باکتری شوانلا RCRI7 قادر است اورانیم را ابتدا جذب و سپس احیا نماید، در غلظت پایین اورانیم و زمان کوتاه‌تر، ابتدا جذب و پس از تکمیل ظرفیت آن، احیا صورت می‌گیرد. بنابراین، فرایند غالب، جذب زیستی می‌باشد. از آن‌جا که شرایط هوایی و یا بی‌هوایی بر فرایند جذب مؤثر نمی‌باشد، میزان درصد حذف اورانیم نیز تفاوت چشمگیری را نشان نمی‌دهد. با توجه به پژوهش‌های مختلفی که با استفاده از روش سطح پاسخ در بررسی فرایند احیا و حذف اورانیم از محلول‌های آبی انجام گرفته است [۳۴، ۳۵، ۳۶] و نیز نتایج حاصل از پژوهش حاضر، می‌توان بیان داشت که استفاده از RSM برای بهینه‌سازی پارامترهای دخیل در فرایند قابل اعتماد و مناسب است.

جدول ۷. بررسی تأثیر پارامترهای مختلف بر درصد حذف اورانیم

گروههای مورد مطالعه	موارد مورد بررسی	درصد حذف
گروه یک (بی‌هوایی)	پساب و باکتری	۹۸.۶
گروه دو (بی‌هوایی)	پساب، باکتری و الکترون‌دهنده	۹۹.۲
گروه سه (بی‌هوایی)	پساب، باکتری، الکترون‌دهنده و ویتامین	۹۸.۷
گروه یک (هوایی)	پساب و باکتری	۹۸.۳
گروه دو (هوایی)	پساب، باکتری و الکترون‌دهنده	۹۹
گروه سه (هوایی)	پساب، باکتری، الکترون‌دهنده و ویتامین	۹۸.۷

گروه یک بی‌هوایی: شامل پساب و باکتری است که بررسی در عدم حضور عوامل الکترون‌دهنده و ویتامین مورد ارزیابی قرار گرفته است.

گروه دو بی‌هوایی: شامل پساب، باکتری و عوامل الکترون‌دهنده است که بررسی در عدم حضور ویتامین در دو تکرار مورد ارزیابی قرار گرفته است.

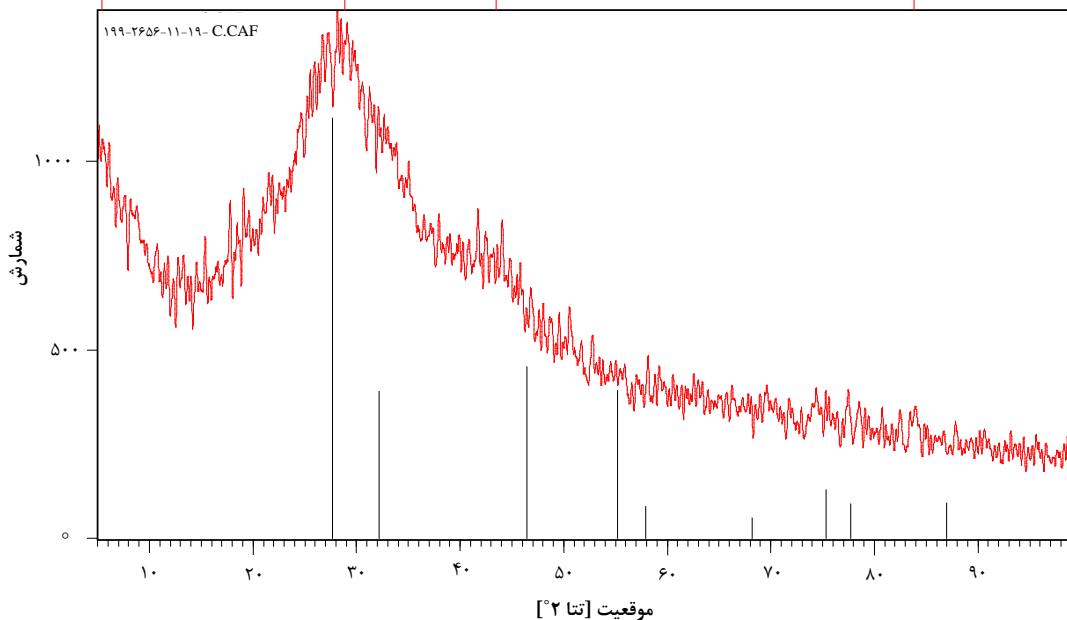
گروه سه بی‌هوایی: شامل تمامی عوامل تأثیرگذار از قبیل پساب، باکتری و عوامل الکترون‌دهنده و ویتامین است.

گروه یک هوایی: شامل پساب و باکتری است که بررسی در عدم حضور عوامل الکترون‌دهنده و ویتامین مورد ارزیابی قرار گرفته است.

گروه دو هوایی: شامل پساب، باکتری و عوامل الکترون‌دهنده است که بررسی در عدم حضور ویتامین مورد ارزیابی قرار گرفته است.

گروه سه هوایی: شامل تمامی عوامل تأثیرگذار از قبیل پساب، باکتری و عوامل الکترون‌دهنده و ویتامین است.





شکل ۴. بررسی حضور یا عدم حضور اورانیت در نمونه‌های پسپار واقعی حاوی ۶۵PPM اورانیم در شرایط بهینه به روش پراش پرتو ایکس. جایگاه پیک‌های استاندارد اورانیت (IV) (U) نیز با رنگ مشکی مشخص شده است.

اثبات رسانده‌اند. آن‌ها همچنین در pH‌های مختلف، این بررسی را انجام داده و دریافتند که اورانیم در pH‌های نزدیک به خنثی پیک بلندتری نشان داده و در نتیجه احیا در این شرایط بهتر صورت گرفته است. همچنین، آن‌ها احیا اورانیم توسط این باکتری‌ها را در چند غلظت متفاوت انجام داده و دریافتند که این باکتری در غلظت ۰.۶ میلی‌مolar نسبت به غلظت‌های پایین‌تر احیا مناسب‌تری دارد [۴۰]. قاسمی و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی روند حذف اورانیم توسط *Shewanella RCRI* در غلظت‌های مختلف اورانیم، انجام پذیرفتن عمل احیا را در باکتری‌های زنده و غیرزنده تأیید نمودند [۱۶]. از طرفی نیز اثبات گردیده است که فرایند جذب بر احیا مقدم بوده و سریع‌تر از آن رخ می‌دهد و از سویی تسهیل‌کننده احیا است [۴۱]. براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر باکتری *Shewanella RCRI* گزینه مناسبی جهت انجام فرایند احیا و جذب اورانیم می‌باشد که با استفاده از روش‌های مختلف مدل-سازی آماری از جمله روش سطح پاسخ می‌توان هزینه‌های اقتصادی طرح را کاهش داد.

۴. نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، می‌توان بیان داشت که روش سطح پاسخ، روشنی کارآمد برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی فرایند احیای زیستی اورانیم می‌باشد و با استفاده از این روش، امکان بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر بر

مطالعات مختلف، جهت اثبات احیای اورانیم با استفاده از آنالیز XRD و اسپکتروفوتومتری به منظور بررسی وجود اورانیت انجام شده است. مطالعات خیجنیاک^۱ و همکاران (۲۰۰۵)، بر روی یک باکتری ترموفیل به نام *Thermoterrabacterium* به فریدوسیس^۲ [۳۷] و نیز پژوهش روه^۳ و همکاران (۲۰۰۲)، احیای زیستی اورانیم را اثبات می‌کند. از طرفی دیگر، در پژوهش وانگ^۴ و همکاران (۲۰۱۸)، احیای اورانیم توسط باکتری *Clostridium* پوترفانسیس در حضور ریبوفلاوین و AQS به عنوان شاتل‌های الکترونی مورد بررسی قرار گرفته است. این پژوهش به کمک XRD احیای اورانیم را به صورت اورانیت در عدم حضور این شاتل‌ها توسط باکتری نشان داده و بیان می‌کند که باکتری در حضور این شاتل‌ها قادر است اورانیم را به صورت U(IV) غیراورانیتی رسوب دهد، چرا که اورانیت دارای کریستال‌های مکعبی و مشخص بوده، اما اورانیم (IV) مشاهده شده، آمورف است. این موضوع می‌تواند امکان وجود اورانیم احیا شده غیراورانیتی را در رسوبات حاصل از احیای اورانیم نشان دهد [۳۹]. فرانسیس و همکاران (۲۰۰۸)، احیای اورانیم توسط چند سویه از جنس کلستریدیوم^۵ را با روش اسپکتروفوتومتری به

1. Khijniak

2. *Thermoterrabacterium Ferrireducens*

3. Roh

4. *Thermoanaerobacter*

5. Wang

6. *Clostridium*



14. S.G. Mirlahiji, K. Eisazadeh, *Bioremediation of Uranium via Geobacter spp.*, *J. Res. Dev.*, **187(1477)**, 1-7 (2014).
15. V. Tarhriz, et al, *Isolation and characterization of some aquatic bacteria from Qurugol Lake in Azerbaijan under aerobic conditions*, *Adv. Environ. Biol.*, **5(10)**, 3173-3179 (2011).
16. R. Ghasemi, et al, *Evaluation of mtr cluster expression in Shewanella RCRI7 during uranium removal*, *Arch. Microbiol.*, **202(10)**, 2711-2726 (2020).
17. M. Zarei, et al, *U (VI) tolerance affects Shewanella sp. RCRI7 biological responses: growth, morphology and bioreduction ability*, *Arch. Microbiol.*, **204(81)**, 1-13 (2021).
18. K.R. Czerwinski, M.F. Polz, *Uranium enrichment using microorganisms*, Ed: Google Patents (2008).
19. C. Cojocaru, G. Zakrzewska-Trznadel, *Response Surface Modeling and Optimization of Copper Removal from Aqua Solutions Using Polymer Assisted Ultrafiltration*, *J. Membrane Sci.*, **298**, 56-70 (2007).
20. A. Ozer, et al, *Biosorption of Copper(II) Ions on Enteromorpha Prolifera: Application of Response Surface Methodology (RSM)*, *Chem. Eng. J.*, **146**, 377-387 (2009).
21. J.I. Khattar, S. Shailza, *Optimization of Cd²⁺ Removal by the Cyanobacterium Synechocystis Pevalekii Using the Response Surface Methodology*, *Process Biochem.*, **44**, 118-121 (2009).
22. D.R. Lovley, et al, *Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria*, *Marine Geology*, **113(1-2)**, 41-53 (1993).
23. D.R. Lovley, et al, *Microbial reduction of uranium*, *Nature*, **350(6317)**, 413-416 (1991).
24. H. Sohbatzadeh Lonbar, *Experimental investigation of operational parameters involved in uranium biosorption in fixed-bed columns using composite biosorbent of Pseudomonas-chitosan*, PhD thesis, Amirkabir University of Technology & Nuclear Science and Technology Research Institute (2016).
25. A. Witek-Krowiak, et al, *Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process*, *Bioresour. Technol.*, **160**, 150-160 (2014).
26. R. Boopathy, *Factors limiting bioremediation technologies*, *Bioresour. Technol.*, **74**, 63-67 (2000).
27. T.A. Kurniawan, et al, *Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals*, *Chem. Eng. J.*, **118**, 83-98 (2006).
28. J.R. Silva, A.C. De Melo Ferreira, A.C.A. Da Costa, *Uranium biosorption under dynamic conditions: Preliminary tests with Sargassum filipendula in real radioactive wastewater containing Ba, Cr, Fe, Mn, Pb, Ca and Mg*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **279(3)**, 909-914 (2009).
29. S. Pal, et al, *Bioleaching of low-grade uranium ore using Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Indian J. Microbiol.*, **50(1)**, 70-75 (2010).

فرایند با تعداد کمتری آزمایش به طور کارامد وجود دارد. نتایج نشان داده است که درصد حذف اورانیم توسط باکتری در غلظت ۹۹-۹۸ مورد نظر پساب، در تمامی شرایط در حداکثر راندمان (درصد) می‌باشد که این امر، تأییدی بر این نکته است که باکتری Shewanella RCRI7 دارای ارزش بالایی در حذف اورانیم از پساب با مکانیسم احیا می‌باشد و می‌توان آنرا به عنوان مدلی بومی و کارامد برای پالایش اورانیم از محیط‌زیست معرفی نمود.

مراجع

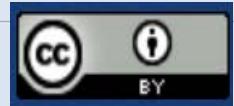
1. U.S. Department of Energy, *Final site observational work plan for the UMTRA project Old Rifle site GJO-99-88-TAR*. U.S. Department of Energy, Grand Junction, Colo (1999).
2. H.A. Vrionis, et al, *Microbiological and geochemical heterogeneity in an in situ uranium bioremediation field site*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71(10)**, 6308 (2005).
3. R.T. Anderson, et al, *Stimulating the in situ activity of Geobacter species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5884-5891 (2003).
4. J.D. Istok, *In situ bioreduction of technetium and uranium in a nitrate-contaminated aquifer*, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 468-475 (2004).
5. J.M. Senko, et al, *In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization*, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1491-1496 (2002).
6. A. Zaheri Abdehvand, et al, *Removal of U (VI) from aqueous solutions using Shewanella sp. RCRI7, isolated from Qurugöl Lake in Iran*, *Radiochim. Acta*, **105(2)**, 109-120 (2017).
7. A. Abdelouas, et al, *Biological reduction of uranium in groundwater and subsurface soil*, *Sci. Total. Environ.*, **250(1-3)**, 21-35 (2000).
8. J.D. Wall, L.R. Krumholz, *Uranium reduction*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**, 149-166 (2006).
9. R.K. Sani, B.M. Peyton, A. Dohnalkova, *Comparison of uranium (VI) removal by Shewanella oneidensis MR-1 in flow and batch reactors*, *Water Res.*, **42(12)**, 2993-3002 (2008).
10. L. Sheng, J. Szymanowski, J.B. Fein, *The effects of uranium speciation on the rate of U (VI) reduction by Shewanella oneidensis MR-1*, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **75(12)**, 3558-3567 (2011).
11. L. Sheng, J.B. Fein, *Uranium reduction by Shewanella oneidensis MR-1 as a function of NaHCO₃ concentration: surface complexation control of reduction kinetics*, *Environ. Sci. Technol.*, **48(7)**, 3768-3775 (2014).
12. K. Venkateswaran, *Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensis sp.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **49(2)**, 705-724 (1999).
13. K.H. Williams, et al, *Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: a systems approach to subsurface biogeochemistry*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **24(3)**, 489-497 (2013).



30. A.M. Soliman, et al, *Selective removal of uranium from wastewater using sludge collected from refinery wastewater treatment: Equilibrium, thermodynamic and kinetics studies*, *J. Water. Process. Eng.*, **19**, 267-276 (2017).
31. M.A. Bezerra, et al, *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*, *Talanta.*, **76(5)**, 965-977 (2008).
32. M. Pourkhalil, et al, *Optimization of the Catalytic Oxidation of Carbon Monoxide by Response Surface Method*, *J. Petroleum Res.*, **29(3-98)**, 131-144 (2019).
33. C. Kim, E. Ndegwa, *Influence of pH and temperature on growth characteristics of leading foodborne pathogens in a laboratory medium and select food beverages*, *Austin Food Sci.*, **3(1)**, 1-8 (2018).
34. H. Sohbatzadeh, et al, *U (VI) biosorption by bi-functionalized Pseudomonas putida@ chitosan bead: Modeling and optimization using RSM*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 647-658 (2016).
35. N. Hashemi, et al, *Optimization of uranium biosorption in solutions by Sargassum boveanum using RSM method*, *Adv. Environ. Res. (AER)*, **9(1)**, 65-84 (2020).
36. Ş. Sert, M. Eral, *Uranium adsorption studies on aminopropyl modified mesoporous sorbent (NH₂-MCM-41) using statistical design method*, *J. Nucl. Mater.*, **406(3)**, 285-292 (2010).
37. T. Khijniak, et al, *Reduction of uranium (VI) phosphate during growth of the thermophilic bacterium Thermoterrabacterium ferrireducens*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71(10)**, 6423-6426 (2005).
38. Y. Roh, et al, *Isolation and characterization of metal-reducing Thermoanaerobacter strains from deep subsurface environments of the Piceance Basin, Colorado*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68(12)**, 6013-6020 (2002).
39. P. Wang, et al, *Effects of riboflavin and AQS as electron shuttles on U (vi) reduction and precipitation by Shewanella putrefaciens*, *RSC Adv.*, **8**, 30692-30700 (2018).
40. A. Francis, C. Dodge, *Bioreduction of uranium (VI) complexed with citric acid by Clostridia affects its structure and solubility*, *Environ. Sci. Technol.*, **42(22)**, 8277-8282 (2008).
41. A. Korenevsky, T.J. Beveridge, *The surface physicochemistry and adhesiveness of Shewanella are affected by their surface polysaccharides*, *Microbiol.*, **153(6)**, 1872-1883 (2007).

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

راضیه قاسمی، الهام راستخواه، صابرہ نائیج، توران ربیعی، حمزه حسین پور، سمانه نائیج، جواد رفیعی، فائزه فاطمی (۱۴۰۱)، بهینه‌سازی فرایند احیای اورانیم توسط باکتری Shewanella RCRI۷ به روش سطح پاسخ در پساب صنعتی، ۱۰۳، ۱۵-۲۳

DOI: [10.24200/NST.2023.1329](https://doi.org/10.24200/NST.2023.1329)Url: https://jonsat.nstri.ir/article_1329.html