نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران
شماره ۱۷، صفحات ۵۶ - ۴۴، ۱۳۷۷

بررسی سازوکارها و بهینه سازی جذب اورانیوم توسط باکتری MGF-48

حسین غفوریان، علی محمدلطیفی، مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران
فریدون ملک زاده، دانشکده علوم ، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سازوکار و توان جذب اورانیوم، در باکتری MGF-48، که قبلا" ازپساب کارخانهٔ ذوب فلزات جنوب تهران جدا شده و قابلیت نسبتا" خوبی برای جذب اورانیوم و سرب از خود نشان داده است، همچنین اثر عاملهای مختلف بر جذب اورانیوم در این باکتری مورد ارزیابی گسترده‌تری قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که در pH اسیدی ۶/۵ بیشترین مقدار جذب صورت می‌گیرد و حدود ۸۰٪ جذب در ۵ دقیقه اول رخ می‌دهد، پس از آن، میزان جذب با گذشت زمان به کندی افزایش می یابد. جذبی که در چند دقیقهٔ اول صورت می گیرد عمدتا" جذب سطحی است و به فاز وابسته به سوخت و ساز باکتری بستگی ندارد.

قندهای گزیلوز، آرابینوز، مانّوز، مالتوز و گلوکز به عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد باکتری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اثر گزیلوز بر جذب اورانیوم بیشتر از قندهای دیگر مورد آزمایش بوده است و کاهش نسبی اثر بقیه قندها بر این جذب، به ترتیبی است که در اینجا بیان شده است. گرسنه نگهداشتن باکتری به مدت ۱۶ ساعت، بدون اضافه کردن بعدی منبع انرژی ، منجر به افزایش جذب اورانیوم حداکثر مقدار ۱۹۸/۲ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن خشک، شد.

نتایج حاصل از اثر گلیسرول ۲ -فسفات بر باکتری و آزمونهای اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در آن نشان می‌دهند که اولا" این باکتری دارای آنزیم فسفاتاز است، ثانیا" این آنزیم در جذب اورانیوم مؤثر است.

سازگار کردن باکتری MGF-48 با غلظتهای مختلف اورانیوم نه تنها باعث افزایش جذب نشد ، بلکه اثر کاهنده بر میزان جذب داشت بطوریکه با افزایش غلظت اورانیوم میزان جذب کاهش می‌یافت.

در بررسی سازوکار جذب اورانیوم به توسط باکتری MGF-48 اثر تعدادی از عوامل کاهش‌دهندهٔ جذب مانند: پرتو فرابنفش، جداکننده‌ها[1] و مهارکننده‌های سنتز ATP و زنجیرهٔ انتقال الکترون، و همچنین اثر بعضی از عوامل افزایش‌دهندهٔ جذب مانند قندها و آنزیم فسفاتاز مطالعه شد. همهٔ این اثرها حاکی از وجود سیستم جذب دو فازی، یعنی جذب غیر وابسته به سوخت و ساز و وابستهٔ به آن در این باکتری می‌باشند.

مقدمه

یکی از عواقب زیان‌بار ناشی از فرایندهای صنعتی،پخش تعدادی از فلزات سمّی و سنگین و رادیوآکتیو در محیط زیست است که منجربه ایجاد آلودگیهای زیست‌محیطی شده در نهایت سبب ایجاد اختلال در سیستمهای زیست‌شناختی و تغییر اِکوسیستم طبیعی می‌گردد.

منابع آلوده کننده عمدتا" پسابهای صنعتی، به ویژه پسابهای کارخانه‌هایی هستند که به نحوی با این نوع فلزات سروکار دارند.

---

1 - uncouplers

چنانچه منشاء آلودگیها عناصر رادیوآکتیو (خانواده آکتینیدها) باشند، به سبب داشتن نیمه عمر زیاد و خاصیت پرتوزائی، مسأله آلودگی و راههای پیشگیری از آن اهمیت بیشتری پیدا می‌کند.

رفع آلودگی فلزات از محیط زیست معمولاً" به دو روش صورت می‌گیرد:

۱- رفع آلودگی به روش شیمیائی، که به کمک فرآیندهای شیمیائی انجام می‌گیرد و اغلب پرهزینه است.

۲- رفع آلودگی به وسیلهٔ باکتری، که در آن از موجودهای زندهٔ ریزبینی[۲] دارای توان جذب بالا برای این نوع فلزات استفاده می‌شود.

فرایندهای باکتریایی حذف فلزات متنوعند، ولی برای پاکسازی پسابهای آلوده از سه فرایند اصلی استفاده می‌شود که عبارتند از:

۱- زیست‌جذبی یا جذب سطحی

۲- زی-ته‌نشینی یا ته‌نشین ساختن به طریقه زیستی[۳]

۳- جذب به وسیله پلیمرهای جداشده از سلولهای میکروبی [۴].

توان جذب انواع باکتریها، قارچها، مخمرها و جلبکها به توسط پژوهشگران مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شده است که قارچها در مقایسه با موجودهای زنده ریزبینی، می‌توانند مقادیر زیادتری از فلزات سنگین را تحمّل نمایند و این قدرت تحمّل ممکن است مربوط به خواص ذاتی موجودات زنده و یا ناشی از سازگاری فیزیولوژیکی و ژنتیکی آنها باشد (Gadd 1986). جذب فلز به توسط قارچها به شدت متاثر از pH بوده و معمولاً" حداکثر جذب در pH اسیدی صورت می‌گیرد. قارچ ها و مخمرها دارای لیگاندهای اتصال فلز متنوعی هستند که مهمترین آنها عبارتند از گلیکان، سلولز، کیتین، کیتوزن پولی‌یورؤنید، متالوتیونین‌ها، پلی‌فسفاتها، واکوئلها و .... در این لیگاندها انواعی از گروهها هستند که در اتصال به فلز دخالت دارند، از جمله: گروههای کربوکسیل، آمین، هیدروکسیل، فسفات، پیروفسفات، سولفیدریل و ... [۱۲].

بطورکلی، اتصال فلز به قارچ‌ها و مخمرها ممکن است به صورت فرآیند مبادلهٔ یونی، جذب سطحی، تشکیل کمپلکس‌های فلزی، رسوب و بلوری شدن در ساختار چند لایهٔ جدار یاخته‌ای ریزرشته‌ها انجام گیرد [۳، ۱۱، ۱۳].

باکتریها نیز به بعضی از فلزات مانند:

Co ، Zn ، Ni ، Cu ، Fe ، Mn ، Mg ، K ، Na ،

به عنوان مواد غذائی معدنی نیاز دارند، ولی مقادیر زیاد این فلزات ممکن است برای موجود زنده اثر سمی داشته باشد. بنابراین، باکتریها، همانند موجودات زنده دیگر قاعدتاً" دارای سیستمهایی برای جذب و کنترل و سازگار شدن با غلظتهای فلزات در محیط خود می‌باشند که یکی از مهمترین این سازوکارها اتصال فلز به سطح سلول است [۱، ۳، ۱۲].

سطح یاختهٔ باکتری از لحاظ خواص آنیونی همانند اسفنج عمل می‌کند و قادر است یونهای فلزی را بخود جذب کند. این خاصیت از نفوذ فلزات سمی به داخل پروتوپلاست جلوگیری نموده و مانع مرگ موجود زنده می‌شود [۳].

تثبیت فلزات بوسیله باکتریها بطور فعال و غیرفعال انجام‌پذیر است و سازوکارهای مورد استفادهٔ باکتریها برای تثبیت فعّال فلزات عبارتند از: رسوب دادن، ایجاد کمپلکس‌های برون‌یاخته‌ای، متراکم ساختن فلز درون‌یاخته، اکسیدکردن و احیاء فلز، متیله و دمتیله کردن فلز و جذب

۲- microorganisms

۳- biopercipitation

آنزیمی، به ویژه از طریق آنزیم فسفاتاز [۳ ، ۹]. لیگاندهای اتصال به فلز در باکتریها، همانند قارچها متنوع هستند. عمده ترین آنها عبارتند از: پلیمرهای برون‌یاخته‌ای (کپسول و لایه چسبناک)، دیواره یاخته‌ای، غشاء یاخته‌ای و انواع ترکیبات درون یاخته‌ای مانند پروتئین ها و اسید های نوکلئیک [۳]. یکی از مکانهای اصلی و اساسی، به ویژه در جذب غیروابسته به سوخت و ساز، پلیمرهای برون‌یاخته‌ای مانند کپسول و لایه چسبناک هستند که دارای گروهها و لیگاندهای اتصال فراوان برای فلزات می‌باشند. جنس این پلیمرها اکثرا" پلی ساکارید است، و پلی ساکاریدها واجد گروههای هیدروکسیل ، آمین و ... هستند که در اتصال به فلزات نقش دارند [۳ ، ۹].

دیواره یاخته‌ای باکتریها نیز یکی از محلهای اصلی اتصال فلز به سطح باکتری است. چون که ساختار و ترکیب جدار یاخته‌ای در گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها فرق می‌کند، توان جذب در آنها نیز ممکن است متفاوت باشد. همچنین مشخص شده است که گرم مثبت‌ها در مقایسه با گرم منفی‌ها، برای جذب فلزات قابلیت بیشتری از خود نشان می دهند. این کیفیت به علت وجود شبکه ضخیم پپتید و گلایکان و وجود اسید تیکوئیک و اسید تیکورونیک در باکتریهای گرم مثبت می‌باشد. پل‌پپتیدی در پپتید و گلایکان واجد عامل اسید گلوتامیک است که لیگاند کربوکسیلات آن در اتصال به فلز، نقش اصلی را ایفا می‌کند [۳، ۱۰].

لیگاندهای اصلی اتصال به فلز در جدار گرم منفی‌ها، پپتید و گلایکان و لیپوپلی ساکارید می‌باشند. میزان اتصال فلزات به پپتید و گلایکان بیشتراز غشاء خارجی است و این احتمالا" به علت وجود لیگاندهای کربوکسیلات در پل‌پپتید است [۳، ۱۰، ۱۱].

بخوبی مشخص شده است که در اکثر موجودات زنده، جذب فلزات فرایندی دوفازی است: یعنی فازهای غیروابسته و وابسته به سوخت و ساز که ذیلا" به اختصار شرح داده می‌شوند [۱، ۳، ۹].

۱ـ فاز غیروابسته به سوخت و ساز (زیست جذبی)

این نوع جذب که در یاخته‌های زنده و غیرزنده رخ می‌دهد فرایندی سریع است که فقط چند دقیقه طول می‌کشد و مستقل از اثر دما، منبع انرژی، جداگرها و باز دارنده‌های ساخت و سازی می‌باشد.

این نوع جذب تقریبا" همیشه در ارتباط با جدار یاخته و پلیمرهای برون‌یاخته‌ای است و در واقع نوعی جذب سطحی می‌باشد که به وسیلهٔ نیروهای الکتریکی، جاذبه‌های شیمیایی و نیروهای و اندروالسی قابل انجام است .

۲ ـ فاز وابسته به سوخت و ساز (زیست انباشت)[۴]

این نوع جذب یک مرحلهٔ آرام وابسته به انرژی است که فقط در یاخته‌های زنده و فعّال از لحاظ سوخت وساز انجام پذیر است و تحت تاثیر عاملهایی از قبیل دما، pH، جداگرها و مهارکننده های سوخت و ساز می‌باشد.

این فاز نوعی انباشت درون‌یاخته‌ای است و سازوکار آن پیچیده بوده و بطور کامل مشخص نشده است (Erlich 1990).

نخستین بخشی که در جذب درون‌یاخته‌ای نقش دارد غشاء سیتوپلاسمی است، بطوری که هرگونه تغییر در غشاء و واقطبیدن آن روی این نوع جذب اثر می گذارد .

بررسیها نشان داده است که در یاخته‌های فاز لگاریتمی نسبت به یاخته‌های دیگر فازها، جذب درون یاخته‌ای بیشتر

۴- bioaccumulation

است (Okarokoy 1979).

موجودهای زندهٔ ریزبینی مختلف با سازوکارهای متفاوتی فلزات سمّی و رادیوآکتیو، مانند اورانیوم، را جذب می نمایند. سازوکار جذب آنزیمی اورانیوم از طریق آنزیم فسفاتاز باکتری احتمالاً" یکی از بهترین و موثرترین سازوکارها است که این فلز در حضور منبع آلی فسفات، مانند گلیسرول ۲-فسفات به شکل ترکیب بلوری HUO_2PO_4 روی سطح باکتری رسوب می‌کند. Macaskie و همکارانش بدین‌طریق میزان جذب باکتری مورد مطالعه خود را، که یک گونه سیتروباکتری[۵] است، تا ۹۰۰% یعنی ۹ گرم اورانیوم در هر گرم وزن خشک باکتری، رسانده‌اند [۵،۶،۷،۱۴،۱۵،۱۶].

واکنشهایی که برای این منظور در نظر گرفته شده‌اند بشرح زیر است:

$$E + S^{*} \longrightarrow E+P \longrightarrow MP$$

سوبسترا آنزیم — فسفات — فلز

$$E+G_2P \longrightarrow E\text{-}G_2P \longrightarrow Phosphate+Enzyme$$

$$Phosphate(HPO_4^{2-}) + Uranylion(UO_2^{2+}) \longrightarrow Uranylphosphate(HUO_2PO_4)$$

در صورت وجود یون آمونیوم (NH_4^+) ترکیب $NH_4UO_2PO_4$ به جای HUO_2PO_4 تشکیل می‌گردد که قابلیت انحلال آن نسبت به HUO_2PO_4 پائین‌تر است [۱۳].

مواد و روشها

باکتری: باکتری مورد استفاده سویهٔ MGF-48 جدا شده از پساب کارخانه فلزکاری جنوب تهران بود که در رابطه با اورانیوم و سرب جذب نسبتاً" خوبی از خود نشان داده است. این باکتری، یک باسیل گرم منفی متحرک با تاژهای قطبی و هوازی است که در دمای ۴۲°C قادر به رشد می‌باشد ولی در ۴°C فاقد رشد است.

محیط های کشت :

۱- محیط نوترینت آگار (NA) تهیه شده در شرکت مرک ؛ از این محیط برای کشت باکتریها و نگهداری آنها استفاده شد.

۲- آبگوشت GMS[۶]، حاوی مواد زیر برحسب گرم‌درلیتر: (Na_2HPO_4(۵/۳۵)، (NH_4Cl(۲/۶۷) و گلوکز (۱۰) و ۶ میلی لیتر از محلول نمکهای معدنی: $MgSO_4.7H_2O$، $MnSO_4.7H_2O$، $FeSO_4.7H_2O$ و $CaCl_2$ است. گلوکز جداگانه سترون (استریل) می‌شود و pH با استفاده از محلول ۰/۱ مول HCl روی ۷ تنظیم می‌شود.

روش کلی کار:

ابتدا باکتری درون آبگوشت GMS تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C روی به همزن (۱۰۰ دور در دقیقه) قرار گرفت. در پایان این مدت، محیط کشت سانتریفوژ شد.

رسوب بیوماس حاصل، با آب مقطر سترون شدهٔ بدون یون شستشو، و سوسپانسیون باکتری به صورت زیر تهیه شد: ۰/۱۰ گرم وزن تر باکتری با آب مقطر سترون شده، به حجم ۱ml رسانده شد، بطوری که چگالی یاخته‌ای باکتریها برابر ۲/۵ میلی گرم وزن خشک در هر میلی‌لیتر باشد [۸، ۱۷].

۵- citrobacter SP.

*- S(substra) ترکیبی که کاتالیزور تغییرات شیمیایی آن یک آنزیم است.

۶- Glucose Mineral Salts

۱۰ml سوسپانسیون باکتری را به ۳۵ml محلول آب مقطر سترون شده افزوده و ۵ml از محلول ppm ۱۰۰۰ نیترات اورانیل هگزاهیدراته نیز به آن اضافه شد. pH محیط با HCl و NaOH روی ۶/۵ تنظیم و سوسپانسیون بمدت ۲ ساعت در ۳۰°C روی به همزن قرار داده شد و پس از آن سانتریفوژ گردید.

رسوب بیوماس حاصل، پس از شستشو با آب مقطر، به مدت یک شب در ۱۰۰°C حرارت خشک قرار گرفت. از بیوماس خشک شده مقدار مشخصی در اسید نیتریک غلیظ ریخته شد و به مدت یکساعت در حمام بخار آب ۱۰۰°C به منظور هضم اسیدی بیوماس خشک شده، قرار گرفت. پس از آن با آب مقطر به حجم معینی رساند شد تا برای آنالیز آماده شود. مقدار اورانیوم جذب شده توسط بخش آنالیز واحد سوخت سازمان انرژی اتمی ایران، با استفاده از دستگاه «FIA-1 Autoanalyzer» اندازه‌گیری شد.

ارزیابی وابستگی و عدم وابستگی جذب اورانیوم به سوخت و ساز

الف ـ اثبات جذب غیر وابسته به سوخت و ساز:

یک نمونه از سوسپانسیون باکتری قبل از اضافه کردن نیترات اورانیل، به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت خشک ۱۰۰°C درون کوره و نمونه دیگر به مدت ۲ ساعت در معرض پرتوفرابنفش (۲۶۳ nm) قرار داده شد. نتایج کشت روی پلیت[۷] مبین مرگ کامل باکتری در اثر حرارت و مرگ حدود ۸۰-۷۰% یاخته‌ها در اثر پرتو فرابنفش بود.

ب ـ اثبات جذب وابسته به سوخت وساز:

در این مرحله، از ۲، ۴ دی‌نیتروفنل (DNP) به عنوان جداگر و از آزیدسدیوم به عنوان مهارکنندهٔ فرآیند «فسفریلاسیون ـ اکسیداتیو» استفاده شد.

اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری و بررسی نقش آن در جذب اورانیوم

در این مورد آزمایشهایی به دو روش انجام گرفت:

الف ـ استفاده از منابع آلی فسفات:

همزمان با اضافه کردن محلول اورانیل، G_2p به غلظتهای مختلف (برحسب گرم‌درلیتر) نیز به محلول اضافه شد.

ب ـ ارزیابی آزاد شدن فسفات معدنی pi از گلیسرول ۲ـفسفات درحضور آنزیم [۶۵، ۶۶]

برای انجام دادن این آزمایش ابتدا سه محلول زیر تهیه شد:

۱ - محلول A حاوی بافر MOPs، گلیسرول۲ـفسفات، بافرسیترات و یاختهٔ باکتری،

۲ - محلول B حاوی مولیبدات‌سدیم ۲/۵% رقیق شده با اسیدسولفوریک،

۳ - محلول C یا محلول $SnCl_2$ تازه تهیه شده.

روش کار

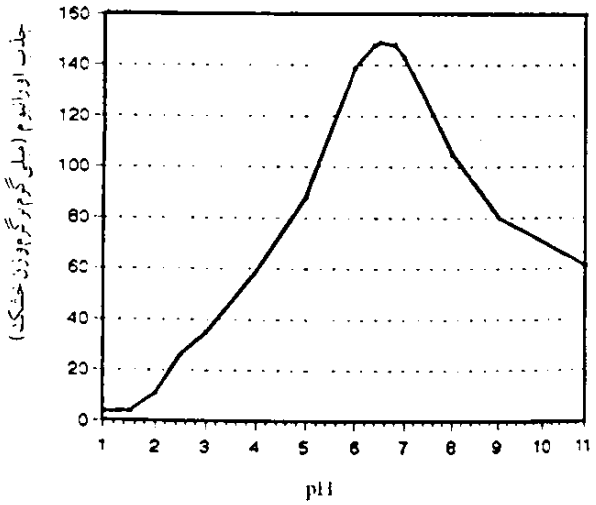
ابتدا در ویالهای ۲۰ میلی‌لیتری، ۱/۸ml از محلول B ریخته می‌شد، سپس ۰/۹ml از محلول A به آن اضافه می‌گردید و در دمای ۳۰°C قرار می‌گرفت. پس از گذشت زمان معین، به آنها ۱/۲ml از محلول C اضافه می‌شد که بی‌درنگ کمپلکس های رنگی تشکیل می‌گردید. جذب این کمپلکس به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری Shimadzu UV-160 A در طول موج OD-720nm اندازه‌گیری شد.

۷- Plate

نتایج (یافته‌ها) و بحث

اثر pH

اثر pHهای ۱ تا ۱۱ بر جذب اورانیوم به توسط باکتری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در تمام pHها، باکتری قادر به جذب اورانیوم است. کمترین مقدار جذب در pH یک که شدیداً" اسیدی است، برابر ۳/۷۵ میلی گرم اورانیوم در هر گرم وزن خشک باکتری بود. با افزایش pH، مقدار جذب نیز افزایش می یابد بطوری که در pH بالاتر از ۳ میزان جذب افزایش بیشتر یافته و در pH اسیدی ۶/۵ به حداکثر مقدار خود، یعنی ۱۴۹ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن خشک می‌رسد، ولی در pHهای قلیائی دوباره کاهش می یابد (شکل ۱).



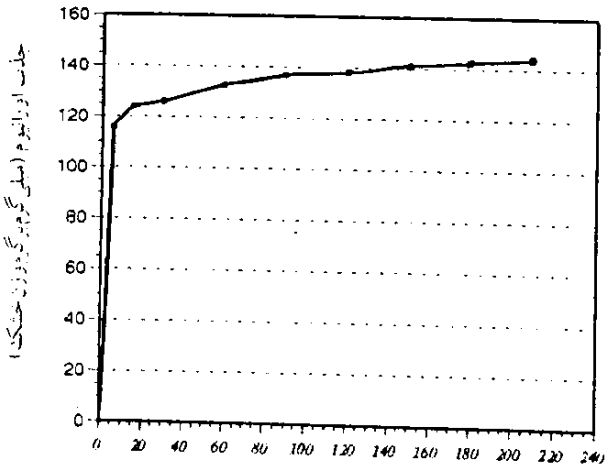
شکل ۱- اثر pH بر جذب اورانیوم در MGF-48

علت اختلاف جذب در pH های اسیدی و قلیائی ممکن است تغییر بار سطحی یاخته و تفاوت در نوع لیگاندهای متصل به یاخته باشد، بطوری که در pHهای مختلف می‌توانند روی درجه پروتوناسیون گروههایی که در اتصال به فلز نقش دارند موثر باشند [۱، ۳] از طرفی گزارش شده است که در pH قلیائی بیشتر گروههای کربوکسیل در اتصال به فلز نقش دارند [۳].

اثر زمان

برای این منظور سوسپانسیون باکتری در زمانهای مختلف (۵، ۱۵، ۳۰، ...، ۲۴۰ دقیقه) با محلول نیترات اورانیل در تماس قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که قسمت اعظم جذب (تقریباً" ۸۵ - ۷۵٪) در همان ۵ دقیقه اول صورت می‌گیرد که برابر ۱۱۶ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک است. پس از آن، میزان جذب به کندی و بتدیج افزایش می یابد (شکل ۲)

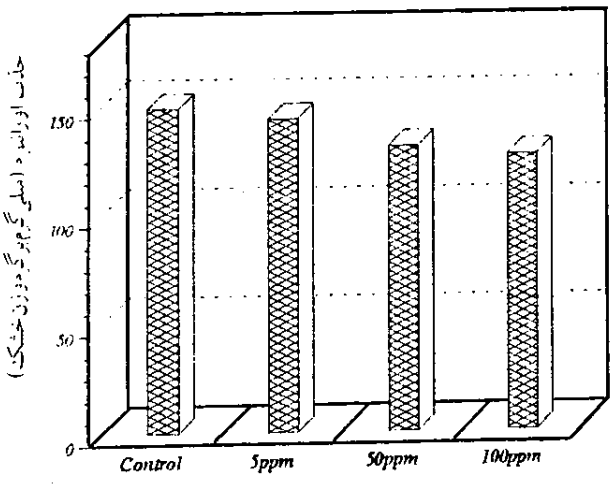
قسمت بیشتر جذبی که در ۵ دقیقه اول رخ می‌دهد در واقع همان جذب غیر وابسته به سوخت و ساز است که سریعاً" به حد اشباع می‌رسد و بیشتر درارتباط با دیوارهٔ یاخته و پلیمرهای برون‌یاخته‌ای باکتری است. بقیه جذب وابسته به سوخت و ساخت است که نیازمند اعمال سوخت و ساختی یاخته بوده و معمولاً" جذب درون یاخته‌ای است.



شکل ۲- اثر زمان بر جذب اورانیوم

اثر سازگارکردن باکتری

برای سازگارکردن اثر جذب باکتری با غلظت اورانیوم باکتری را ابتدا با غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۰۰ «ppm» نیترات اورانیل مجاور کرده وسپس به بررسی میزان جذب اورانیوم توسط باکتری پرداختیم . نتایج حاصل نشان داد که سازگار کردن نه تنها باعث افزایش جذب نشد بلکه منجربه کاهش آن گردید (شکل ۳). این کاهش احتمالاً" بدین علت است که باکتری در حضور عنصر رادیوآکتیو اورانیوم قسمتی از توانائیهای خود را از دست می‌دهد و یا اینکه به نحوی نسبت به جذب اورانیوم مقاوم می‌شود.

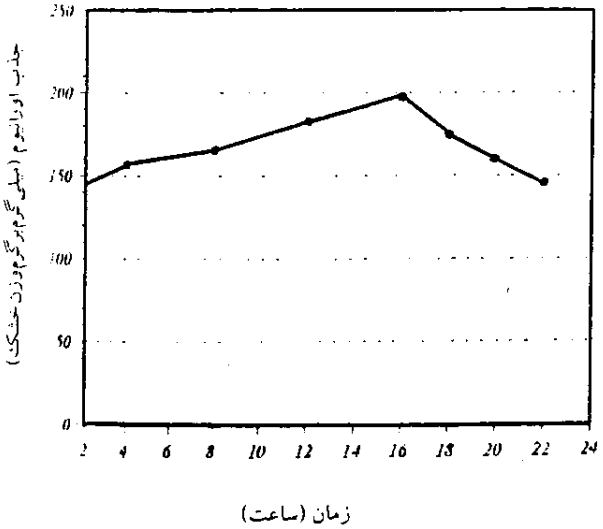


شکل ۳- اثر سازگارکردن بر جذب اورانیوم

اثر گرسنگی یاخته بر جذب

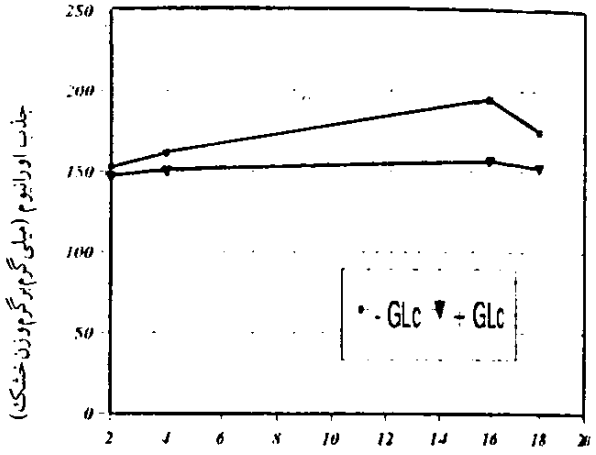
مطالعه اثر گرسنه نگهداشتن یاخته بر جذب اورانیوم به سه روش انجام گرفت:

ابتدا باکتری داخل آب مقطر سترون شده در زمانهای مختلف (۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۲۰ ساعت) بدون افزودن مواد غذائی، گرسنه نگهداشته شد. پس از گذشت زمان معین با اضافه کردن نیتراتاورانیل، مقدار جذب اورانیوم توسط یاخته‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل (شکل ۴) بیانگر این است که گرسنگی باکتری بر مقدار جذب اورانیوم توسط آن مؤثر است، بطوری که گرسنگی به مدت ۱۶ ساعت باعث افزایش مقدار جذب تا حداکثر مقدار خود، یعنی ۱۹۸/۲ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک گردید. بیش از ۱۶ ساعت گرسنه نگهداشتن، مقدار جذب کاهش یافت که احتمالاً" به علت ضعیف شدن باکتری در اثر گرسنگی بیش از حد است. در تمام آزمایشهابیشینهٔ مقدار جذب در همین حالت بدست آمد.



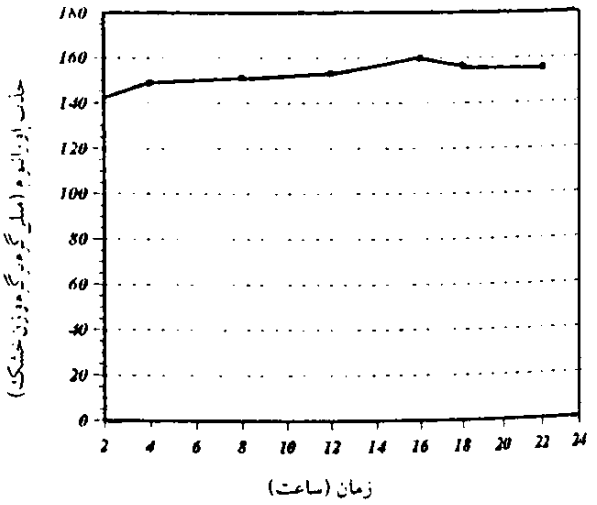
شکل ۴- اثر گرسنگی یاخته بر جذب اورانیوم (بدون اضافه‌کردن منبع انرژی)

در روش دوم، آزمایش قبلی تکرار شد با این تفاوت که این بار، همزمان با اضافه کردن اورانیوم، گلوکز به عنوان منبع انرژی اضافه شد. نتایج در این حالت نیز افزایش جذب را نشان داد، ولی میزان آن نسبت به حالت قبل کمتر بود و حداکثر جذب اورانیوم در همان ۱۶ ساعت مدت گرسنگی بدست آمد که برابر ۱۵۶/۵ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک است (شکل ۵).



شکل ۵- اثر گرسنگی یاخته بر جذب اورانیوم (بااضافه‌کردن منبع انرژی)

آزمایش سوم، در واقع انجام دو آزمایش قبل در شرایط یکسان است و نتایج حاصل از آن مؤید نتایج دو آزمایش قبل است (شکل ٦).



شکل ٦- مقایسه اثر گرسنگی یاخته باو بدون اضافه‌کردن منبع انرژی)

افزایش چشمگیر جذب اورانیوم در حالت گرسنگی (بدون منبع انرژی) احتمالاً به این علت است که چون یاخته فقط در آب مقطر خالص قرار دارد در اثر نبود عناصر غذائی و یونهای فلزی (به ویژه کاتیونها)، مکانهای اتصالی بیشتری روی اجزاء سلول برای جذب اورانیوم ایجاد می‌شود. از طرفی غشاء یاخته‌ای نیز در این حالت ممکن است نفوذ پذیری بیشتری برای فلز داشته باشد، بعنوان مثال اورانیوم ممکن است از طریق مسیرهای جذب عناصر ضروری مانند پتاسیوم و منیزیوم، در غیاب این عناصر، به مقدار بیشتری وارد یاخته می‌شود.

ارزیابی جذب وابسته و غیروابسته به سوخت و ساز

الف ـ بررسی میزان جذب اورانیوم به توسط یاخته‌های کشته شده در اثر حرارت و پرتوهای فرابنفش (اثبات فازغیر وابسته به سوخت و ساز):

شکل ۷ نشان می‌دهد که حرارت باعث مرگ کامل یاخته‌ها می‌شود و میزان جذب اورانیوم کاهش می‌یابد ۹۹/۸۵ میلی‌گرم‌در هرگرم وزن خشک باکتری). اما در مورد اثر پرتوهای فرابنفش، با اینکه ۳۰ - ۲۰% یاخته‌ها زنده بودند انتظار می‌رفت که مقدار جذب بیشتر از مورد اثر حرارت باشد، ولی در مقدار جذب کاهش بیشتری مشاهده شد (۷۵/۵ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک).

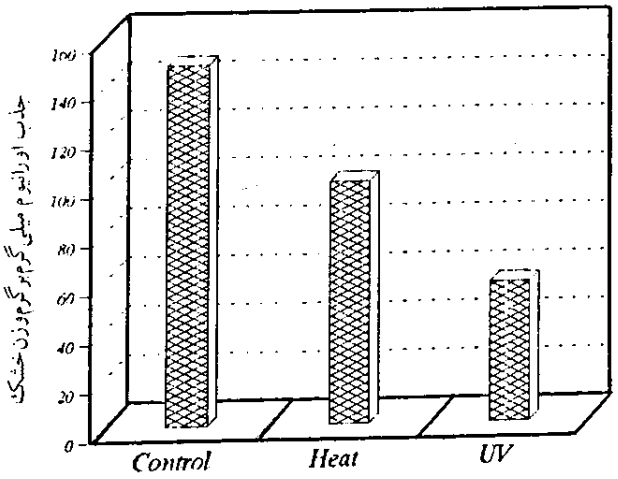
مقدار جذبی که توسط یاخته‌های کشته شده در اثر حرارت صورت می‌گیرد بطور کامل مربوط به فاز غیر وابسته به سوخت و ساز است، زیرا فقط به توسط یاخته‌های غیر زنده انجام می‌پذیرد. می‌توان چنین استدلال کرد که مقدار جذب غیر وابسته به سوخت و ساز بیش از این است زیرا در اثر حرارت ممکن است بعضی از عوامل جذب کننده فلزی مثل چربیهاو پروتئین‌ها نابهنجار شوند.

ب ـ اثر جداگرها (DNP) و *مهارکننده‌ها* (NaN_3) *بر جذب اورانیوم (اثبات فاز وابسته به سوخت و ساز):*

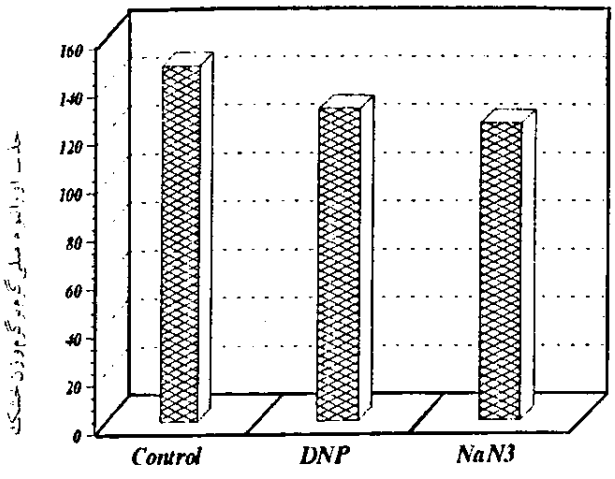
در این آزمایش از «۲، ۴ دی‌نیتروفنل» به عنوان

جداگرواز «آزیدسدیوم» به عنوان مهارکننده سنتز ATP و زنجیره انتقال الکترون استفاده شد.

شکل ۸ نشان می‌دهد که این عاملها باعث کاهش جزئی (نسبت به اثرهای حرارت و پرتوهای فرابنفش) در جذب‌می‌شوند. و آزیدسدیم در مقایسه با DNP، اثر کاهندگی بیشتری دارد. این اختلاف جزئی، با توجه به نوع اثر آنها، منطقی به نظر می‌رسد زیرا جداگرها (DNP) قادر به توقف سنتز ATP بدون مهار زنجیرهٔ انتقال الکترون هستند، در صورتی که مهارکننده‌ها، مانند آزیدسدیم، سیانید، مونوکسیدکربن و آنتی بیوتیک مایسین، علاوه بر توقف سنتز ATP، سیستم انتقال الکترون را از طریق اختلال در ناقلهای الکترون مهار می سازند. با بدست آمدن نتایج فرق مسلم می‌شود که جذب اورانیوم توسط باکتری MGF-48 یک فرآیند دوفازی غیروابسته و وابسته به سوخت و ساز می‌باشد [۲].



شکل ۷- ارزیابی مقدار جذب در یاخته‌های غیرزنده (جذب غیروابسته به سوخت و ساز)



شکل ۸- اثر جداگرها (DNP) و مهارکننده‌ها (NaN_3) بر مقدار جذب (اثبات جذب وابسته به سوخت و ساز)

اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری MGF-48 و بررسی نقش آن در جذب اورانیوم

برای ارزیابی نقش آنزیم فسفاتاز باکتری بر جذب اورانیوم دو نوع آزمایش انجام گرفت:

الف ـ اثر منابع آلی فسفات

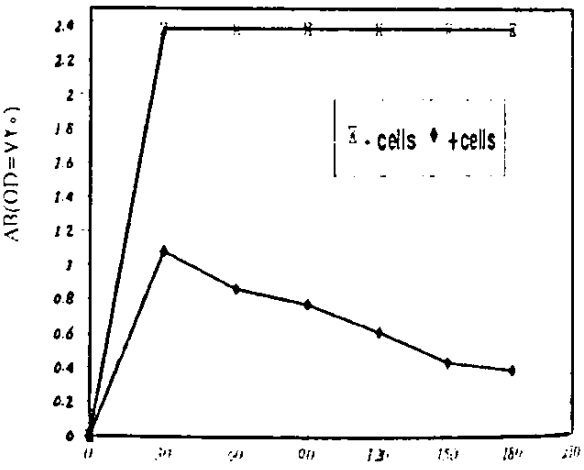
برای این منظور ابتدا نخستین آزمایش با اضافه کردن گلیسرول ۲-فسفات (به عنوان منبع آلی فسفات) و سوبسترای آنزیم فسفاتاز به باکتری انجام گرفت. نتایج حاصل حاکی از مؤثر بودن G_2P در جذب اورانیوم توسط باکتری بود و بیشترین جذب در غلظت ۰/۹ گرم‌برلیتر بدست آمد که معادل ۱۸۲/۵ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک است. در غلظتهای بالاتر مقدار جذب کاهش یافت.

این نتیجه گیری نشان می‌داد که افزایش جذب ممکن است به علت وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری باشد. برای اطمینان بیشتر آزمایش بعدی انجام گرفت:

ب ـ آزمون اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری

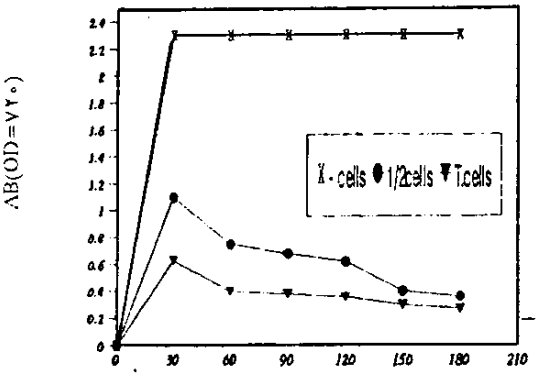
در این آزمایش طبق روش پیش‌گفته، پس از تهیه محلولهای A, B, C، ابتدا در ویالهای ۲۰ میلی‌لیتری،

محلول B و سپس محلول A ریخته شد و ویالها در دمای ۳۰°C قرار گرفت. پس از گذشت زمانهای موردنظر، به ویالها محلول C اضافه شد که بی‌درنگ کمپلکس های آبی رنگ تشکیل گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (shimadzu UV-160A) در طول موج ۷۲۰nm میزان جذب اندازه گیری شد. نتیجه آزمایش این بود که با گذشت زمان از شدت رنگ کاسته شده و میزان جذب نیز کاهش می‌یابد. در حالیکه در نمونه شاهد فاقد یاخته، میزان جذب ثابت باقی می ماند نتایج در شکل ۹ نشان داده شده است.



شکل ۹- آزمون اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری

برای اطمینان از اینکه این تغییرات ناشی از فعالیت یاخته‌ای و آنزیم فسفاتاز بوده است، در آزمایش دیگر تعداد یاخته‌ها به نصف تقلیل داده شد. در این حالت میزان جذب، نسبت به حالت بدون یاخته و حالت استفاده از کل یاخته‌ها به ترتیب کمتر و بیشتر بود که دالّ بر وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری و نقش آن در جذب اورانیوم است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- آزمون اثبات وجود آنزیم فسفاتاز در باکتری

مطالعه اثر قندها بر جذب اورانیوم به توسط باکتری

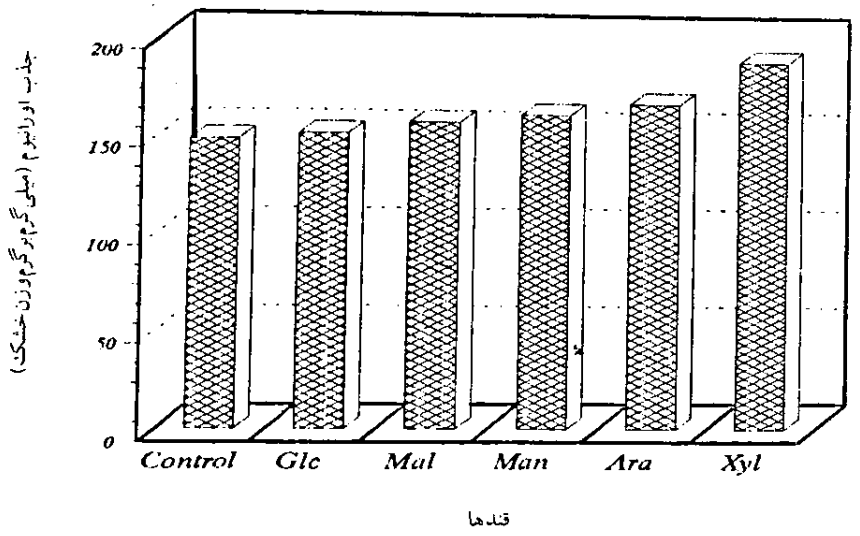
اثر قندهای گلوگز، گزیلور، مالتوز، مانوز و آرابینوز بر جذب اورانیوم به توسط باکتری MGF-48 حداکثر جذب‌در حضور گزیلوز بدست آمد که برابر ۱۸۹ میلی‌گرم‌برگرم‌وزن‌خشک است و حداقل جذب در حضور گلوکز صورت گرفت. اثر افزایشی قندهای مورد آزمایش به ترتیب زیر بود:

گزیلوز > آرابینوز > مانوز > مالتوز > گلوکز (شکل ۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه برروی جذب اورانیوم به توسط باکتری MGF-48 به منظور بررسی سازوکار جذب نشان داد که عمل جذب در این باکتری یک فرایند دوفازی (فاز غیروابسته به سوخت و ساز و فاز وابسته به سوخت و ساز) است.

قسمت اعظم جذبی که در ۵ دقیقه اول صورت میگیرد، مقدار جذب در pHهای خیلی اسیدی و قلیائی و کل میزان جذب انجام گرفته توسط یاخته‌های کشته شده با حرارت همگی مربوط به فاز غیر وابسته به سوخت و ساز هستند که بیشتر در ارتباط با پلیمرهای برون‌یاخته‌ای و دیواره یاخته



شکل ۱۱- اثر قندهای مختلف بر جذب اورانیوم به توسط باکتری MGF-48)

باکتری می‌باشد. بقیه جذب که فقط در سلولهای زنده و فعال از لحاظ سوخت و ساخت و در حضور منبع انرژی صورت می‌گیرد مربوط به فاز وابسته به سوخت و ساز است. علاوه‌براین، مشخص شد که آنزیم فسفاتاز در باکتری در جذب اورانیوم دخالت دارد و باعث افزایش میزان جذب می‌گردد.

در رابطه با بهینه‌سازی جذب اورانیوم نیز معلوم شد که گرسنه نگه داشتن سلول تا ۱۶ ساعت بدون اضافه کردن منبع انرژی باعث افزایش جذب تا حداکثر مقدار خودگشته و انواع قندها نیز باعث افزایش در مقدار جذب می‌شوند و در این میان گزیلور بیشترین اثر را نشان داد. سازگارکردن باکتری با اورانیوم نه تنها باعث افزایش جذب نمی‌شود بلکه روی جذب اثر کاهشی نشان میدهد.

با این وجود جهت کاربردهای عملی این باکتری هنوز فاصله زیادی وجود دارد و نیاز به کارپژوهشی بیشتری بوده و انجام مطالعات جدی تر بالاخص در مورد بیوشیمی و فیزیولوژی جذب، شناسایی و تعیین هویت باکتری ضروری به نظر میرسد .

References

1. K.J.I Blackwell Singleton and J.M. Tobin Metal cation uptake by yeast:areview Appl. Microbiol Biotechnol. 43:579-584, (1995).
2. T.D. Brcck, and M.T. Madigan Biology of Microorganisms (1991).
3. H.L. Ehrlich Microbial Mineral Recovery (1990).
4. G.M. Gadd, et al Microbiol treatment of pollution - a working biotechnology? TIBTECH. 11:353-359 (1993).
5. L.E. Macaskie An Immobilized cell Bioprocess for the removal of Heavy Metals from Aqueous flows.J.chem. Tech. Biotecnol, 49:357-379 (1990).
6. Macaskie the application of Biotechnology to the treatment of wastes produced from the Nuclear Fuel cycle: Biodegradation and Bioaccumulation as a means of treating radionuclide-containing streams. Critical Reviews in Biotechnology 11(1) 41-112 (1991).
7. L.E. Macaskie, P.J.Clark, J.D.Gilbert and M.R. Tolley the effect of ageing on the accumulation of uranium by biofilmbioreactor, and promotion of uranium deposition in stored biofilms. Biotechnology letters: volume 14.No.6 PP. 525-530 (1992).
8. A.M. Marques, and et al uranium accumulation by pseudomonas SP. Eps.5028. Appl Microbial Biotechnol 133: 406-10 (1991).
9. D. Pillai, veena, V.M. Shinde spectrophotometric determination of uranium (VI) using a synegic mixture of ethyl acetoacetate and pyridine. J.Radioanl. Nucl. Chem. Letters. 212 (1) 23-30 (1996).
10. M.E. Pullman. Methode in Enzymology Vol.X (1967).
11. S.E. Shumate, and G.W Strandberg Accumulation of metals by Microbiol Comprehensive Biotechnology edited by Murray. Moo-young (1985).
12. S.M, Siegel. M. Galun and B.Z.siegel Filamentous fungi as metal biosorbents: a riview. water: Air and soil Pollution 53:335-344 (1990).
13. Silver. Simon Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu. Rev. Microbiol. 50: 753-89 (1996).
14. Yong. Ping & L.E. Macaskie Enhancement of uranium Bioaccumulation by a Citrobacter SP. Via enzymically-mediated growth of polycrystalline NH4UO2PO4.J.Chem. Tech. Biotechnol. 63: 101-108 (1995).
15. Young, Ping and L.E.Macaskie Removal of the tetravalent actinide thorium from solution by a biocatalytic system. J.Chem. Tech.Biotechnol. 64: 87-95 (1995).
16. Yound. Ping and L.E.Macaskie Removal of lanthanum, uranium and thorium from the citrate complexes by immobilized cells of citrobacter SP. in a flow-throagh reactor: implications for the decontamination of solutions containing plutonium. Biotechnology letters, Vol 19, NO.3 March. PP. 251-255 (1997).

۱۷- فرازمند، عباس، پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکدهٔ علوم (۱۳۷۴).

AEOI Scientific Bulletin

No. 17, pp.44-56, 1998

STUDY FOR OPTIMIZATION OF URANIUM ABSORPTION BY NEW BACTERIUM MGF-48

H. Ghafourian, A.M. Latifi, Nuclear Research Center, AEOI
P.O. Box 14155-1339, Tehran, Iran
F. Malekzadeh, University of Tehran, Faculty of Science
P.O. Box 14176, Tehran, Iran

Abstract

The aim of this work was to study the mechanisms of uranium uptake from aqueous solution by pseudomonas sp. MGF-48 which was isolated from electroplating effuent of a metal factory in the south of Tehran (8,9) and the effects of growth conditions, media, concentration of uranium and the effect of metabolic inhibitoes were studied. A maximum of 198 mg/g (dry weight) of uranium was taken up from a solution of 150 ppm, under starvation conditions (16 h, no energy source), indicating metabolism-independent adsorption. The uranium was released from the cells by addition of sodium carbonate. Uptake was reduced by pretreatment with UV (263.7 nm, 2 h), and by heat (100°C, 15 min) to 99.8 and 57.5 mg/g respectively.

The relationship of uptake to metabolic activity was examined. Presence of 2,4-dinitrophenol (10 mM) or sodium azide (0.1%) resulted in decreased uptake (129, and 123 mg/g respectively). Also addition of G-2-p (glycerol 2-phosphate) and uranium simultaneously resulted in phosphatase activity and deposition of uranium crystals on the surface. Maximum uptake was observed at pH 6.5-6.8. Uranium uptake in the presence of various sugars decreased in order Xulose> Arabinose > Mannose > Maltose > Glucose.

When the bacteria was exposed to lower concentrations of uranium (5,50 or 100 ppm) in advance, 8uranium uptake from the solution of 150 ppm decreased to 127 mg/g dry weight which mean that no adaptation has occurred. Immobilization of the cells in Ca-alginate reduced the removal efficiency and only 60% of uranium was taken up from the above solution. The results indicate that uranium accumulation involves metabolism dependent aborption, the former being more efficient. Immobilized cells in Ca-alginate showed significant decrease in uranium removal efficiency compared to free cells.