



بررسی تاثیر کاهش زیستی هماتیت بر افزایش آزادسازی آرسنات جذب سطحی شده در شرایط بی‌هوایی

نسرين قربانزاده^۱، امير لکزيان^۲

۱- استادیار گروه علوم خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان، ۲- استاد گروه علوم خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی آزادسازی آرسنات جذب سطحی شده بر روی هماتیت بر اثر کاهش زیستی در حضور باکتری شونلا انجام گرفت. نتایج نشان داد که باکتری شونلا قادر به کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده و تبدیل آن به آرسنیت بود که منجر به افزایش مقدار آرسنیت در فاز محلول شد. نتایج همچنین مشخص کرد که باکتری شونلا توانایی کاهش زیستی آهن فریک موجود در ساختمان کانی هماتیت را نیز دارا بود. کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده با ارجحیت بیشتری نسبت به آهن فریک در ساختمان کانی هماتیت در حضور باکتری شونلا انجام گرفت. طبق نتایج حاصل از آنالیز پراش اشعه ایکس تغییری در ساختمان کریستالی هماتیت قبل و بعد از فرایند کاهش زیستی مشاهده نشد. لذا جذب و به دنبال آن کاهش زیستی آرسنات بر روی کانی هماتیت به طور معنی داری بر تحرک آرسنات در محیط‌های زیرسطحی تاثیرگذار است.

واژه های کلیدی: آرسنیک، آهن، کاهش زیستی، شونلا، هماتیت.

مقدمه

آرسنیک (As) متداول ترین عنصر سمی موجود در طبیعت است که اثرات سرطان‌زایی آن به خوبی شناخته شده است. افزایش غلظت آرسنیک محلول در خاک‌ها و آب‌های زیرزمینی، سلامتی انسان‌ها را در تعداد زیادی از مناطق جهان به خصوص جنوب شرق آسیا در معرض خطر قرار داده است (Muehe et al., ۲۰۱۳). آرسنیک غالباً به شکل پنج (آرسنات) و سه (آرسنیت) ظرفیتی با توجه به پتانسیل اکسایش و کاهش آن در اکوسیستم‌ها حضور دارد (Smith et al., ۱۹۹۸). فرایندهای ژئوشیمیایی و بیولوژیکی آرسنیک شامل جذب سطحی - واجدبی و اکسایش - کاهش غالباً در طبیعت اتفاق می‌افتند و از عوامل مهم تاثیرگذار بر سرنوشت و انتقال آرسنیک در اکوسیستم‌های مختلف می‌باشند (Lin and Puls ۲۰۰۰). در شرایط طبیعی اکسی هیدروکسیدهای آهن از جمله هماتیت، گنوتیت و فری‌هیدرات‌های جذب‌های مهمی برای آرسنیک محسوب می‌شوند (Zhang et al., ۲۰۱۲). در اغلب موارد، افزایش غلظت آرسنیک در ارتباط با شرایط کاهشی (بی‌هوایی) در خاک‌های غرقابی و یا سفره‌های آب زیرزمینی مورد توجه قرار گرفته است (Fendorf and Kocar ۲۰۰۹). باکتری‌های غیرجذب‌ی کاهنده آرسنات (DARBs)^{۱۵} توانایی استفاده از آرسنات را به عنوان ترمینال پذیرنده الکترون دارا می‌باشند و کاهش آرسنات را به آرسنیت در شرایط بی‌هوایی انجام می‌دهند (Kocar et al., ۲۰۰۸, ۲۰۱۰). علاوه بر این باکتری‌های کاهنده آهن^{۱۶} (IRB) به وسیله کاهش دادن آهن فریک در کانی‌های آهن‌دار دارای آرسنیک نیز به شدت بر تحرک آرسنیک در شرایط بی‌هوایی اثرگذارند و آزادسازی آن به درون فاز محلول را تسهیل می‌کنند (Herbel and Fendorf ۲۰۰۶). هدف این مطالعه بررسی رفتار آرسنات جذب سطحی شده بر روی اکسید آهن هماتیت در طول فرایند کاهش زیستی در حضور باکتری شونلا در شرایط بی‌هوایی بود که بر سرنوشت و انتقال گونه‌های آرسنیک بسیار تاثیرگذار است.

مواد و روش‌ها

تهیه کانی هماتیت^{۱۷} و باکتری شونلا^{۱۸}: کانی هماتیت از شرکت (Philipsburg, NJ J.T. Baker) و باکتری شونلا از (ATCC BAA-۱۰۹۷) در کشور آمریکا تهیه شدند. به منظور استفاده از باکتری در آزمایش‌های کاهش زیستی، ابتدا باکتری به‌طور هوایی در محیط کشت مایع^{۱۹} (TSB) بدون دکستروز کشت داده شد و از طریق شمارش بر روی پلیت^{۱۱} (CFU) زمان رسیدن تعداد سلول‌های باکتری به حدود 10^8 سلول در میلی‌لیتر تعیین شد. سلول‌ها سه بار در بافر ۱۰ میلی مولار PIPES با pH ۷ شسته و پس از سوسپانسیون مجدد در بخش آزمایش‌های کاهش زیستی مورد استفاده قرار گرفتند (Huang et al., ۲۰۱۱). کانی هماتیت نیز پس از اتوکلاوشدن در آزمایش‌های کاهش زیستی مورد استفاده قرار گرفت.

^{۱۵}. Dissimilatory Arsenate Reduction Bacteria

^{۱۶}. Iron Reduction Bacteria

^{۱۷}. $-Fe_2O_3$

^{۱۸}. *Shewanella Putrefaciens* strain CN-۳۲

^{۱۹}. Tryptic Soy Broth

^{۱۱}. Colony Forming Unit

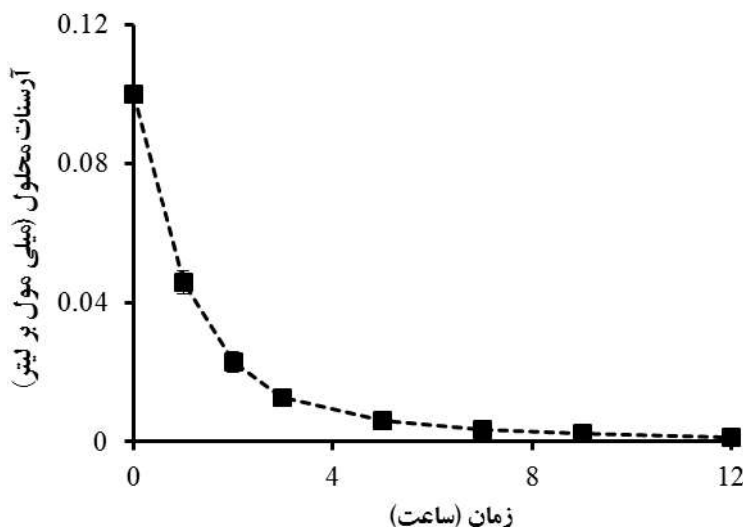
آزمایش جذب سطحی: آزمایش جذب سطحی در ترکیب بافر ۱۰ میلی مولار PIPES با پهاش ۷ انجام شد. غلظت هماتیت در این آزمایش ۲ گرم بر لیتر و غلظت آرسنات ۱/۰ میلی مولار از نمک آرسنات سدیم ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) بود. آزمایش‌های کاهش زیستی آرسنات: آزمایش‌های کاهش زیستی آرسنات در ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی لیتری و در بافر ۱۰ میلی مولار PIPES با پهاش ۷ و شرایط بی‌هوازی انجام گرفت. در آزمایش کاهش زیستی به ظروف شیشه‌ای دارای آرسنات جذب سطحی شده بر روی هماتیت از بخش (آزمایش جذب سطحی)، لاکتات (۱/۰ میلی مولار- دهنده الکترون) و سلول‌های باکتری (10^8 سلول در میلی لیتر) افزوده شد و نمونه برداری در زمان‌های مورد نظر با سرنگ سترون انجام گرفت. به منظور بررسی تأثیر باکتری شونلا در کاهش زیستی، آزمایش‌های کنترل در عدم حضور باکتری شونلا نیز صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمامی مراحل انجام آزمایش در اتاقک بی‌هوازی دارای به دام اندازنده اکسیژن^{۱۱۱} انجام گرفت که منجر شد غلظت اکسیژن در این اتاقک به کمتر از $5/7 \times 10^{-9}$ اتمسفر برسد (Jeon et al., ۲۰۰۴).

اندازه گیری آهن و آرسنیک: به منظور اندازه گیری آهن فرو محلول و قابل استخراج با اسید (اسید کلریدریک ۵/۰ مولار) از فروزین (یک گرم بر لیتر در ۵۰ میلی مولار بافر HEPES در پهاش ۷) در طول موج ۵۶۲ نانومتر اسپکتروفتومتر استفاده شد (Stookey ۱۹۷۰). برای اندازه گیری آرسنات و آرسنیت، جداسازی آرسنات و آرسنیت به وسیله عبور دادن مستقیم نمونه‌ها از کارتریج‌های LC-SAXTM (SPE cartridges) صورت گرفت. غلظت‌های آرسنیک کل و آرسنیت به وسیله (ICP-OES) آنالیز و غلظت آرسنات از تفاوت بین آرسنیک کل و آرسنیت محاسبه شد.

آنالیز اشعه ایکس: به منظور بررسی تغییر ساختمان کریستالی هماتیت از آنالیز اشعه ایکس با تابش CuK استفاده شد.

نتایج و بحث

جذب سطحی آرسنات بر روی هماتیت: جذب سطحی آرسنات بر روی هماتیت در طول ۱۲ ساعت کامل شد و از ۱/۰ میلی مولار اولیه به صفر میلی مولار در فاز محلول رسید (شکل ۱) که به منظور ادامه آزمایش‌های کاهش زیستی از این کانی استفاده شد.

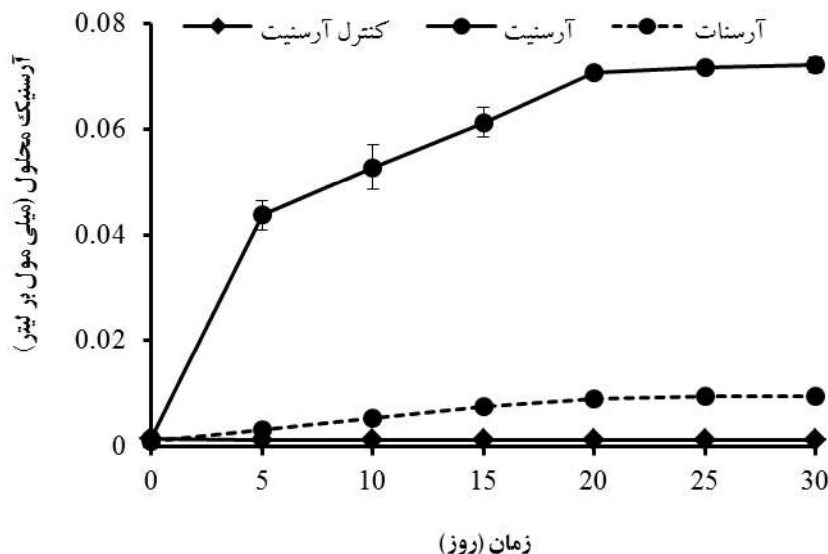


شکل ۱- جذب سطحی آرسنات بر روی سطح هماتیت (غلظت اولیه آرسنات: ۱/۰ میلی مول بر لیتر و هماتیت: ۲ گرم بر لیتر در مدت زمان ۱۲ ساعت)

کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده: کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده با اندازه گیری مقدار آرسنات و آرسنیت فاز محلول در طول زمان مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). مقدار آرسنیت در طول زمان تا مدت ۲۰ روز روند افزایشی معنی داری را نشان داد و پس از آن ثابت شد. مقدار آرسنات موجود در فاز محلول نیز در طول زمان روند افزایشی نشان داد (شکل ۲). (Herbel and Fendorf ۲۰۰۵) نیز بیان نمودند که باکتری‌های تنفس کننده آرسنات نه تنها قادر به کاهش آرسنات محلول هستند بلکه توانایی کاهش آرسنات جذب سطحی شده را نیز دارا می‌باشند. (Huang et al, ۲۰۱۱) نیز کاهش آرسنات جذب سطحی شده بر روی اکسی هیدروکسیدهای جاذب آرسنات را به وسیله باکتری شونلا گزارش نمودند.

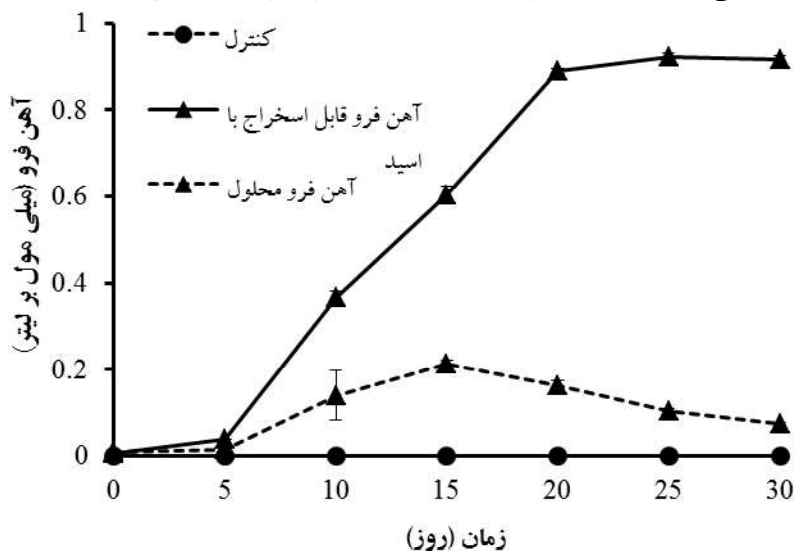
^{۱۱۱}. Oxygen Trap

چهاردهمین کنگره علوم خاک ایران - بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک



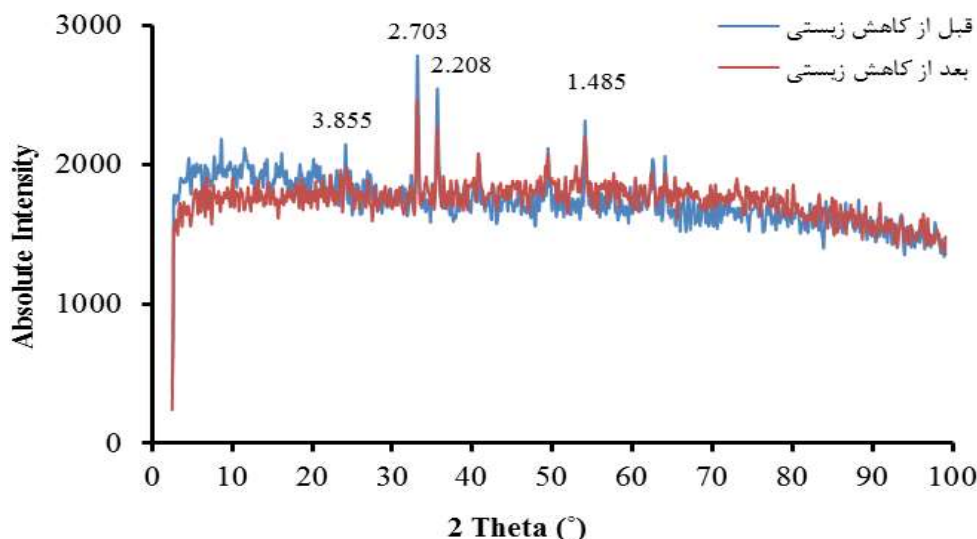
شکل ۲- تغییرات غلظت آرسنات و آرسنیت در فاز محلول در طول فرایند کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده

کاهش زیستی آهن فریک در ساختمان هماتیت: مقدار آهن فرو محلول و آهن فرو قابل استخراج با اسید نیز در طول فرایند کاهش زیستی مورد بررسی قرار گرفت. مقدار آهن فرو محلول تا ۱۵ روز روند افزایشی داشت و پس از آن کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۳) که این فرایند احتمالاً به دلیل جذب سطحی مجدد آهن فرو محلول و تشکیل رسوب $Fe_2(AsO_4)_3$ می باشد (Jiang et al., ۲۰۱۳). مقدار آهن فرو قابل استخراج با اسید نیز تا ۲۰ روز روند افزایشی داشت و پس از آن ثابت شد (شکل ۳). در این مطالعه کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده قبل از کاهش آهن فریک در ساختمان هماتیت در حضور باکتری شونلا انجام گرفت و تا مدت زمان ۵ روز از انجام آزمایش هیچ افزایش معنی داری در مقدار آهن در فاز محلول مشاهده نشد. (Zhang et al., ۲۰۱۲) بیان نمودند که در آزمایش های کاهش زیستی آرسنات با ارجحیت بیشتری نسبت به آهن فریک تحت فعالیت باکتری های کاهنده کاهش می یابد. بنابراین کاهش آرسنات در ارتباط با کاهش آهن نبوده و کاهش آرسنات و آهن می تواند به گونه های باکتریایی، محیط واکنش و نسبت آهن فریک به آرسنات وابسته باشد. (Masscheleyn et al., ۱۹۹۱) نیز گزارش نمودند که در خاک های غرقاب شده در شرایط آزمایشگاهی کاهش زیستی آرسنات و آزادسازی آرسنیت قبل از کاهش آهن فریک اتفاق افتاد.



شکل ۳- تغییرات غلظت آهن فرو محلول و آهن فرو قابل استخراج با اسید در طول فرایند کاهش زیستی

آنالیز اشعه ایکس: نتایج حاصل از آنالیز اشعه ایکس مشخص کرد که در ساختمان کریستالی هماتیت قبل و بعد از فرایند کاهش زیستی تغییری ایجاد نشد (شکل ۴). ساختمان به شدت کریستالی و راندمان پایین فرایند کاهش زیستی در کانی هماتیت به دلیل سطح ویژه اندک این کانی که در حدود $0.4/9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ توسط (Jeon et al., ۲۰۰۳) گزارش شده می‌تواند دلیلی بر این عدم تغییر باشد (Li et al., ۲۰۱۲).



شکل ۴- نتایج آنالیز اشعه ایکس قبل و بعد از فرایند کاهش زیستی کانی هماتیت در حضور باکتری شونلا

نتیجه‌گیری

متحرک شدن آرسنیک به شکل آرسنیت تحت شرایط بی‌هوازی یک نگرانی بسیار مهم در خاک‌ها و تهنشست‌های آلوده شده می‌باشد. در اغلب شرایط طبیعی، آرسنیت نسبت به آرسنات با قدرت کمتری بر روی سطوح اکسیدها و کانی‌های رسی جذب سطحی شده و وارد فاز محلول می‌شود و از آن‌جا که شکل کاهش یافته آرسنیک یعنی آرسنیت نسبت به آرسنات سمیت بیشتری را دارا می‌باشد لذا این فرایند در اکوسیستم‌های طبیعی از اهمیت بسیاری برخوردار است و بایستی مورد توجه متخصصین علوم زیست محیطی قرار گیرد.

منابع

- Fendorf S. and Kocar B.D. ۲۰۰۹. Biogeochemical processes controlling the fate and transport of arsenic: Implications for South and Southeast Asia. *Advances in Agronomy*, ۱۰۴: ۱۳۷-۱۶۴.
- Herbel M.J. and Fendorf S. ۲۰۰۵. Transformation and transport of arsenic within ferric hydroxide coated sands upon dissimilatory reducing bacterial activity. In: O'Day P., Vlassopoulos D., Meng X. and Benning L. (Eds.), *Advances in Arsenic Research: Integration of Experimental and Observational Studies and Implications for Mitigation*. ACS Symposium Series, vol. ۹۱۵. American Chemical Society, Washington, DC, pp. ۷۷-۹۰.
- Herbel M.J. and Fendorf S. ۲۰۰۶. Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands, *Chemical Geology*. ۲۲۸: ۱۶-۳۲.
- Huang J.H., Voegelin A., Pombo S.A., Lazzaro A., Zeyer J. and Kretzschmar R. ۲۰۱۱. Influence of Arsenate Adsorption to Ferrihydrite, Goethite, and Boehmite on the Kinetics of Arsenate Reduction by *Shewanella putrefaciens* strain CN-۳۲. *Environmental Science and Technology*, ۴۵: ۷۷۰-۷۷۰۹.
- Jeon B.H., Dempsey B.A., Burgos W.D. and Royer R.A. ۲۰۰۳. Sorption kinetics of Fe(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Cd(II), and Fe(II)/Me(II) onto hematite. *Water Research*, ۳۷: ۴۱۳۵-۴۱۴۲.
- Jeon B.H., Dempsey B.A., Royer R.A. and Burgos W.D. ۲۰۰۴. Low-temperature oxygen trap for maintaining strict anoxic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, ۱۳۰: ۱۴۰۷-۱۴۱۰.
- Jiang s., Lee J.H., Kim D., Kanaly R.A., Kim M.G. and Hur H.G. ۲۰۱۳. Differential Arsenic Mobilization from As-Bearing Ferrihydrite by Iron-Respiring *Shewanella* Strains with Different Arsenic-Reducing Activities. *Environmental Science and Technology*, ۴۷: ۸۶۱۶-۸۶۲۳.



- Kocar B.D., Polizzotto M.L., Benner S.G., Ying S.C., Ung M., Ouch K., Samreth S., Suy B., Phan K., Sampson M. and Fendorf S. ۲۰۰۸. Integrated biogeochemical and hydrologic processes driving arsenic release from shallow sediments to groundwaters of the Mekong delta. *Applied Geochemistry*, ۲۳: ۳۰۵۹-۳۰۷۱.
- Kocar B.D., Borch T. and Fendorf S. ۲۰۱۰. Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, ۷۴: ۹۸۰-۹۹۴.
- Li X., Liu T., Li F., Zhang W., Zhou S. and Li Y. ۲۰۱۲. Reduction of structural Fe(III) in oxyhydroxides by *Shewanella decolorationis* S۱۲ and characterization of the surface properties of iron minerals. *Journal of Soil and Sediment*, ۱۲: ۲۱۷-۲۲۷.
- Lin Z. and Puls R.W. ۲۰۰۰. Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging process. *Environmental Geology*, ۳۹: ۷۵۳-۷۵۹.
- Masscheleyn P.H., Delaune R.D. and Patrick W.H. ۱۹۹۱. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environmental Science and Technology*, ۲۵: ۱۴۱۴-۱۴۱۹.
- Muehe E.M., Scheer L., Daus B. and Kappler A. ۲۰۱۳. Fate of Arsenic during Microbial Reduction of Biogenic versus Abiogenic As-Fe(III)-Mineral Coprecipitates. *Environmental Science and Technology*, ۴۷: ۸۲۹۷-۸۳۰۷.
- Smith E., Naidu R. and Alston A.M. ۱۹۹۸. Arsenic in the soil environment: a review. *Advances in Agronomy*, ۶۴: ۱۴۹-۱۹۵.
- Stookey L.L. ۱۹۷۰. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, ۴۲: ۷۷۹-۷۸۱.
- Zhang X., Jia Y., Wang S., Pan R. and Zhang X. ۲۰۱۲. Bacterial reduction and release of adsorbed arsenate on Fe(III)-, Al- and coprecipitated Fe(III)/Al-hydroxides. *Journal of Environmental Sciences*, ۲۴: ۴۴۰-۴۴۸.

Abstract

The objective of this study was to determine the bioreduction of adsorbed As(V) on hematite in the presence of *shewanella* sp. The results showed that *shewanella* sp. had the ability to reduce adsorbed As(V) and caused the concentration of As(III) increased in solution phase. *shewanella* sp. also was able to reduce Fe(III) in the structure of hematite. Bioreduction of adsorbed As(V) occurred with priority compared to Fe(III) in the structure of hematite. XRD results of the unreduced and bioreduced hematite did not show any change in the structure of this mineral. Therefore the sorption and subsequent bioreduction of As(V) on hematite can significantly influence the mobility of As(V) in subsurface environment.

Key words : Arsenic, Iron, Bioreduction, *Shewanella* sp, hematite.