



تأثیر گئوتیت بر جذب سطحی و احیاء زیستی آرسنات در شرایط بی‌هوایی

*نسرین قربان‌زاده^۱، امیر لکزیان^۲ و اکرم حلاج‌نیا^۳

^۱استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه گیلان، ^۲استاد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد،

^۳استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۳

چکیده

سابقه و هدف: آرسنیک یک آلاینده شبه‌فلزی است که به دلیل به خطر انداختن سلامت گیاهان، حیوانات و بشر از نگرانی‌های عمده در محیط زیست محسوب می‌شود. بخش غالب مشکلات زیست‌محیطی ایجاد شده در نتیجه متحرک شدن آرسنیک تحت شرایط احیاء است. در این شرایط باکتری‌های احیاء‌کننده قادر به احیاء زیستی آرسنات و تبدیل آن به آرسنیت و افزایش تحرک آن می‌باشند. این مطالعه با هدف بررسی احیاء زیستی آرسنات محلول و آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت در حضور باکتری *Shewanella sp.* در دو بخش مجزا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در بخش اول کاهش زیستی آرسنات در فاز محلول و در بخش دوم کاهش زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت با غلظت یکسان در حضور باکتری *Shewanella sp.* مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری قابلیت زنده ماندن سلول‌های باکتری در محیط آزمایشی نیز به روش شمارش سلول زنده انجام گرفت. **یافته‌ها:** نتایج بخش اول آزمایش نشان داد که باکتری *Shewanella sp.* قادر به احیاء زیستی آرسنات فاز محلول با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار بود. نتایج همچنین مشخص کرد که کانی گئوتیت در طول مدت ۶ روز قادر به جذب سطحی کامل آرسنات با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار بود و باکتری *Shewanella sp.* همچنین قادر به احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت بود. سرعت احیاء زیستی در آرسنات موجود در فاز محلول بیش‌تر از سرعت احیاء زیستی در آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت بود. نتایج همچنین نشان داد که باکتری *Shewanella sp.* توانایی احیاء زیستی آهن سه‌ظرفیتی در ساختمان گئوتیت و تبدیل آن به آهن دوظرفیتی را دارا بود. بنابراین باکتری *Shewanella sp.* قادر به احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده و آهن سه‌ظرفیتی در ساختمان کانی گئوتیت در شرایط بی‌هوایی را دارا بود. اما احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت با برتری بیشتری نسبت به آهن سه‌ظرفیتی موجود در ساختمان کانی گئوتیت در حضور باکتری *Shewanella sp.* صورت گرفت. غلظت آرسنیت در فاز محلول پس از گذشت ۳۰ روز از فرایند کاهش زیستی به ۰/۰۴ میلی‌مولار رسید که بیانگر آن بود که ۸۰٪ از آرسنات جذب سطحی شده در فرایند احیاء زیستی به آرسنیت تبدیل و وارد فاز محلول شده بود. مقدار آهن دوظرفیتی در فاز محلول تا مدت ده روز روند افزایشی داشت و پس از

* مسئول مکاتبه: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com

آن کاهش معنی‌داری را نشان داد. مقدار آهن دوزظرفیتی کل نیز تا مدت ۲۰ روز روند افزایشی نشان داد و پس از آن ثابت شد. نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری قابلیت زنده ماندن سلول‌های باکتری نیز تداوم رشد سلول‌های باکتری *Shewanella sp.* را در آزمایش‌های کاهش زیستی نشان داد.

نتیجه‌گیری: فرایند احیاء زیستی در اکوسیستم‌های بی‌هوازی می‌تواند منجر به آلودگی منابع آبی شده و بنابراین باید مورد توجه ویژه متخصصین علوم زیست‌محیطی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آرسنیت، آرسنیک، آهن فریک، *Shewanella sp.*

مقدمه

آرسنیک یک شبه‌فلز سمی است که در محیط‌های مختلف مانند خاک‌ها، ته‌نشست‌ها و آب‌های زیرزمینی شایع است و بر کیفیت خاک و آب تأثیر سوء دارد (۱۸). در مقایسه با دیگر عناصری که قادر به تشکیل اکسی‌آنیون‌ها می‌باشند، آرسنیک به‌دلیل تحرک بالایی که در گستره وسیعی از حالت‌های مختلف اکسایش و احیاء خود دارد مشکلات عمده‌ای را در محیط زیست ایجاد نموده است (۲۲). افزایش غلظت آرسنیک محلول در خاک‌ها و آب‌های زیرزمینی، سلامتی انسان‌ها را در مناطق زیادی از جهان به‌خصوص جنوب‌شرق آسیا در معرض خطر قرار داده است (۱۷). هوادیدگی اکسایشی و انحلال کانی‌های دارای آرسنیک و همچنین فعالیت‌های انسانی مختلف مانند کاربرد کودهای شیمیایی و فعالیت‌های مربوط به استخراج معادن و ذوب فلزات منجر به انتقال این عنصر در آب‌های زیرزمینی شده و همچنین امکان جذب سطحی این عنصر را بر روی ذرات خاک‌ها یا ته‌نشست‌ها فراهم می‌کند (۱۴). آرسنیک با توجه به پتانسیل اکسایش و احیاء آن غالباً به شکل پنج (آرسنات) و سه (آرسنیت) ظرفیتی در اکوسیستم‌ها حضور دارد (۲۳). تحت شرایط اکسایشی، آرسنات گونه غالب می‌باشد که به شکل اکسی‌آنیون‌هایی از اسید آرسنیک که پروتن از دست داده‌اند مانند H_2AsO_4^- ، HAsO_4^{2-} و AsO_4^{3-} موجود می‌باشد و

تحت شرایط احیاء، آرسنیت از نظر ترمودینامیکی پایدار است و به شکل HAsO_3^{2-} ، H_2AsO_3^- و H_3AsO_3^0 حضور دارد.

مطالعات نشان داده که آرسنیت نسبت به آرسنات در اکوسیستم‌های مختلف به مقدار فراوان‌تری حضور داشته و سمیت بیش‌تری را نیز نسبت به آرسنات دارا می‌باشد (۱۴، ۲۳). به همین دلیل، افزایش غلظت آرسنیت در شرایط احیاء (بی‌هوازی) و در خاک‌های غرقابی و یا سفره‌های آب زیرزمینی مورد توجه بیش‌تری قرار گرفته است (۲).

فرایندهای ژئوشیمیایی و زیستی آرسنیک شامل جذب سطحی- واجذبی و اکسایش- کاهش غالباً در طبیعت اتفاق می‌افتند و از عوامل مهم تأثیرگذار بر سرنوشت و انتقال آرسنیک در اکوسیستم‌های مختلف می‌باشند (۱۳). جذب سطحی- واجذبی و هم‌رسوبی آرسنیک بر روی سطوح اکسی‌هیدروکسیدهای آهن که از مهم‌ترین اجزاء محیط‌های بی‌هوازی فاقد اکسیژن هستند در حذف طبیعی آرسنیک در شرایط بی‌هوازی بسیار دارای اهمیت می‌باشند (۲۰). علاوه بر این، گستره وسیعی از ریزجانداران نیز با فرایندهای متابولیکی شامل اکسایش و کاهش بر تحرک و ژئوشیمی آرسنیک در محیط زیست اثرگذارند (۱). باکتری‌های غیرجذبی احیاءکننده آرسنات (DARBs)^۱

1- Dissimilatory Arsenate Reduction Bacteria

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و شرایط کشت آن: باکتری *Shewanella sp.* از بانک میکروبی ایران (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) تهیه شد. به منظور استفاده از باکتری در آزمایش‌های احیاء زیستی، ابتدا باکتری به‌طور هوازی در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB)^۲ بدون دکستروز کشت داده شد و بر روی شیکر (۱۱۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت تا به مرحله فاز رشدی لگاریتمی متوسط تا نهایی برسد. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، $4900 \times g$) برداشت و سپس سلول‌ها سه بار در بافر ۱۰ میلی‌مولار PIPES با pH ۷ در محفظه حاوی گاز نیتروژن شسته و با ایجاد سوسپانسیون مجدد برای آزمایش‌های احیاء زیستی با غلظت تقریباً 10^8 سلول در میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفتند (۵).

آماده‌سازی کانی گئوتیت: به منظور تهیه کانی گئوتیت مقدار ۱۸۰ میلی‌لیتر سود ۵ مولار به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3$ یک مولار افزوده و سوسپانسیون به دست آمده با آب دی‌یونیزه تا حجم ۲ لیتر رقیق شد و سپس در دمای $70^\circ C$ به مدت ۷۲ ساعت باقی ماند. پس از سرد شدن، سوسپانسیون در دمای اتاق سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه، $2100 \times g$) و برای خروج نمک‌های اضافی سه بار با آب دی‌یونیزه شسته شد. پس از آن گئوتیت تولیدشده در دمای $80^\circ C$ - خشک^۳ و برای استفاده در مراحل بعدی در دمای $4^\circ C$ نگهداری شد (۶). به منظور اطمینان از خلوص کانی گئوتیت تهیه شده، نمونه با آنالیز پراش‌نگاشت اشعه ایکس^۴ مورد مطالعه قرار گرفت. سطح ویژه و متوسط ضخامت منفذ کانی نیز از طریق ایزوترم جذب گاز نیتروژن و تجزیه و تحلیل داده‌ها با معادله ایزوترم BET انجام شد.

توانایی استفاده از آرسنات را به عنوان ترمینال پذیرنده الکترون دارا می‌باشند و احیاء آرسنات را به آرسنیت در شرایط بی‌هوازی انجام می‌دهند (۹، ۱۰). علاوه بر این باکتری‌های احیاء‌کننده آهن (IRB)^۱ نیز به وسیله احیاء آهن سه‌ظرفیتی در کانی‌های آهن‌دار دارای آرسنیک به شدت بر تحرک آرسنیک در شرایط بی‌هوازی اثرگذارند (۴). احیاء زیستی آرسنات (پنج‌ظرفیتی) توسط باکتری‌های احیاء‌کننده منجر به تبدیل آن به آرسنیت (سه‌ظرفیتی) و آزادسازی آن به درون فاز محلول می‌شود (۲۵).

علاوه بر این، احیاء آهن سه‌ظرفیتی در ساختار کانی‌های آهن‌دار همراه با آرسنات جذب سطحی شده منجر به تغییر ساختار کریستالی آن‌ها و واجدبی آرسنات شده و آزادسازی آن به درون فاز محلول را تسهیل می‌کند (۴). بنابراین با توجه به نقش باکتری‌ها بر رفتار آرسنیک و تحرک و قابلیت دسترسی زیستی آن در شرایط طبیعی، مطالعه احیاء زیستی آرسنیک ضروری به نظر می‌رسد. در میان باکتری‌های احیاء‌کننده، باکتری *Shewanella sp.* یک باکتری بی‌هوازی اختیاری (میل‌های شکل و گرم منفی) است که توانایی احیاء زیستی پذیرنده‌های الکترون متفاوت شامل اکسیژن، آهن، آرسنیک، منگنز و دیگر عناصر را دارا می‌باشد و در مطالعات احیاء زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۵).

بنابراین با توجه به این‌که فرایند احیاء زیستی بر سرنوشت و انتقال گونه‌های آرسنیک و آلودگی منابع آبی بسیار تأثیرگذار است، این مطالعه با هدف بررسی احیاء زیستی آرسنات محلول و جذب سطحی شده بر روی اکسید آهن گئوتیت در شرایط بی‌هوازی و در حضور باکتری *Shewanella sp.* انجام گرفت.

2- Tryptic Soy Broth
3- Freeze drying
4- X-ray Diffraction

1- Iron Reduction Bacteria

بر روی گنوتیت (بخش ۲-۳)، لاکتات (۰/۱ میلی مولار) و دو میلی لیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتری (تقریباً 10^8 سلول در میلی لیتر) افزوده شد و نمونه برداری از ظروف با سرنگ سترون در مدت زمان یک ماه و با فواصل زمانی ۵ روز انجام گرفت (۷).

اندازه‌گیری قابلیت زنده ماندن سلول‌های باکتری در محیط آزمایشی نیز به روش شمارش سلول زنده (CFU)^۱ انجام گرفت. در حدود ۱ میلی لیتر از محلول موجود در ظروف شیشه‌ای آزمایش توسط یک سرنگ سترون نمونه برداری و تا ۱۰ برابر با بافر PIPES رقیق شدند. رقت‌های انتخابی بر روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA)^۲ پخش و کشت انجام گرفت و تعداد واحدهای کلونی تشکیل شده قابل شمارش با چشم بعد از گذشت مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شمارش شدند (۲۱).

اندازه‌گیری آهن و آرسنیک: به منظور اندازه‌گیری آهن دوظرفیتی محلول، نمونه‌ها فیلتر شدند (۰/۲ میکرومتر) و بخشی (۰/۱ میلی لیتر) از نمونه فیلتر شده به ۵ میلی لیتر از فروزین (یک گرم بر لیتر در ۵۰ میلی مولار بافر HEPES در pH ۷) اضافه و پس از ۱۵ دقیقه نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قرائت شدند (۲۴). اندازه‌گیری آهن دوظرفیتی کل با افزودن یک میلی لیتر از اسید کلریدریک یک نرمال به یک میلی لیتر از نمونه انجام شد و پس از ۲۰ ساعت نمونه‌ها فیلتر و غلظت آهن دوظرفیتی در نمونه‌های فیلتر شده مشابه آهن دوظرفیتی محلول قرائت شد. نمونه‌ها برای اندازه‌گیری آرسنات و آرسنیت نیز فیلتر شدند و یک میلی لیتر از نمونه فیلتر شده به ۹ میلی لیتر آب دی‌یونیزه اضافه شد. جداسازی آرسنات و آرسنیت به وسیله عبور دادن مستقیم نمونه‌ها از کارتریج‌های (LC-SAXTM SPE cartridges) صورت گرفت (۱۶). کارتریج به‌طور انتخابی آرسنات را از محلول در

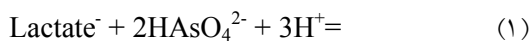
آزمایش جذب سطحی: آزمایش جذب سطحی در ترکیب بافر PIPES ده میلی مولار با pH ۷ انجام شد (۵). غلظت گنوتیت در این آزمایش ۱ گرم بر لیتر و غلظت آرسنات ۰/۰۵ میلی مولار از نمک آرسنات سدیم ($Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) بود. نمونه برداری از سوسپانسیون به‌منظور بررسی زمان مورد نیاز برای جذب سطحی کامل آرسنات بر روی گنوتیت با سرنگ سترون در مدت ۶ ساعت و با فواصل زمانی ۲ ساعت انجام شد و نمونه‌ها پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر) برای اندازه‌گیری غلظت آرسنیک آنالیز شدند. سوسپانسیون به‌دست آمده در این مرحله برای آزمایش‌های احیاء زیستی در دمای $121^\circ C$ به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد (۵).

آزمایش‌های احیاء زیستی آرسنات: آزمایش‌های احیاء زیستی آرسنات در دو حالت محلول و جذب سطحی شده بر روی گنوتیت در ظروف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی لیتری و در بافر ۱۰ میلی مولار PIPES با pH ۷ انجام گرفت. در آزمایش احیاء زیستی آرسنات محلول، تمامی ظروف دارای آرسنات (پذیرنده الکترون) و لاکتات (دهنده الکترون) به‌ترتیب با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی مولار و دو میلی لیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتری با غلظت تقریباً 10^8 سلول در میلی لیتر ($OD_{600} = 2$) بودند. تیمارهای بدون تلقیح باکتری نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. تمامی مراحل آزمایش با سه تکرار انجام گرفت. ظروف تحت فشار گاز نیتروژن به‌طور کامل از اکسیژن تخلیه و سپس بر روی شیکر (۱۰۰ rpm) قرار گرفتند. در طول دوره انکوباسیون در زمان‌های مشخص، یک میلی لیتر از سوسپانسیون با یک سرنگ سترون زیر محفظه گاز نیتروژن خارج شد و برای آنالیز آرسنات و آرسنیت مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده، به ظروف شیشه‌ای دارای آرسنات جذب سطحی شده

1- Colony Forming Unit

2- Tryptic Soy Agar

افزایش یافت. غلظت آرسنیک کل نیز که نشان‌دهنده مجموع آرسنات و آرسنیت بود در طول زمان آزمایش ثابت ماند (شکل ۱). هیوانگ و همکاران (۲۰۱۱) بیان نمودند که باکتری *Shewanella sp.* توانایی احیاء آرسنات را به آرسنیت با اکسایش هم‌زمان لاکتات به استات طبق رابطه ۱ را دارا می‌باشد.

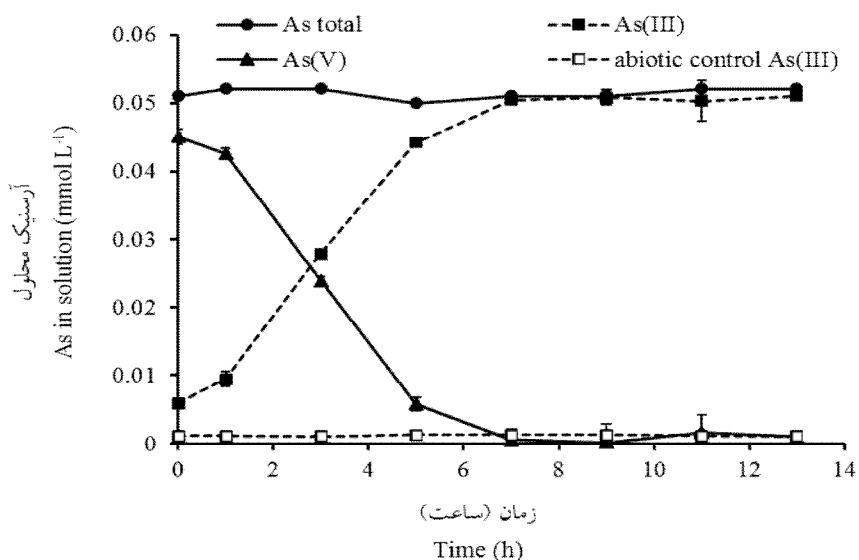


احیاء زیستی آرسنات در فاز محلول در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۵، ۲۱).

گستره pH ۴ تا ۹ حذف می‌کند. غلظت‌های آرسنیک کل و آرسنیت به‌وسیله (ICP-OES) آنالیز و غلظت آرسنات از تفاوت بین آرسنیک کل و آرسنیت محاسبه شد.

نتایج و بحث

احیاء زیستی آرسنات محلول: نتایج نشان داد که در تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) با غلظت اولیه آرسنات ۰/۰۵ میلی‌مولار، غلظت آرسنیت محلول در طول زمان آزمایش ثابت ماند و هیچ تغییر معنی‌داری پیدا نکرد (شکل ۱). در حضور باکتری، غلظت آرسنات در طول زمان کاهش و غلظت آرسنیت

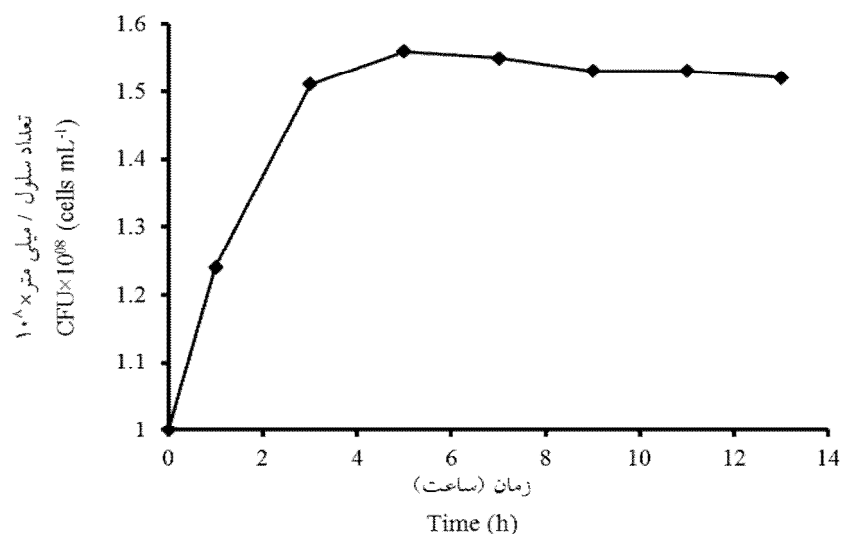


شکل ۱- غلظت‌های آرسنات و آرسنیت و آرسنیک کل محلول در طول فرایند احیاء زیستی آرسنات.

Figure 1. Concentrations of dissolved As(V), As(III) and total As during bioreduction of arsenate.

پس از ۵ ساعت به بیش‌ترین مقدار رسید و پس از آن روند نسبتاً ثابتی داشت. فرایند احیاء آرسنات به آرسنیت که توسط سلول‌های باکتری انجام گرفته منجر به تأمین انرژی مورد نیاز برای این سلول‌های باکتری‌ها در فرایند احیاء زیستی شده است (۲۱).

تغییرات تعداد سلول‌های باکتری در احیاء زیستی آرسنات محلول: نتایج به‌دست آمده از بررسی زنده ماندن سلول‌های باکتری در احیاء زیستی آرسنات محلول، تداوم رشد سلول‌های باکتری *Shewanella sp.* را در این محیط نشان داد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است رشد سلول‌ها در مراحل اولیه آزمایش

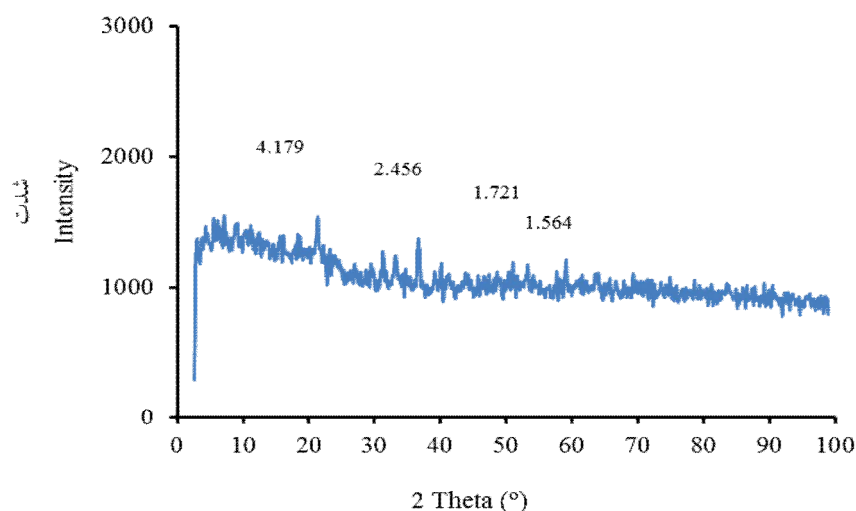


شکل ۲- تغییرات رشد سلول باکتری در آزمایش‌های احیاء زیستی آرسنات محلول در مدت زمان ۱۳ ساعت.

Figure 2. Changes in bacterium cell growth in soluble arsenate bioreduction experiments during 13 hours.

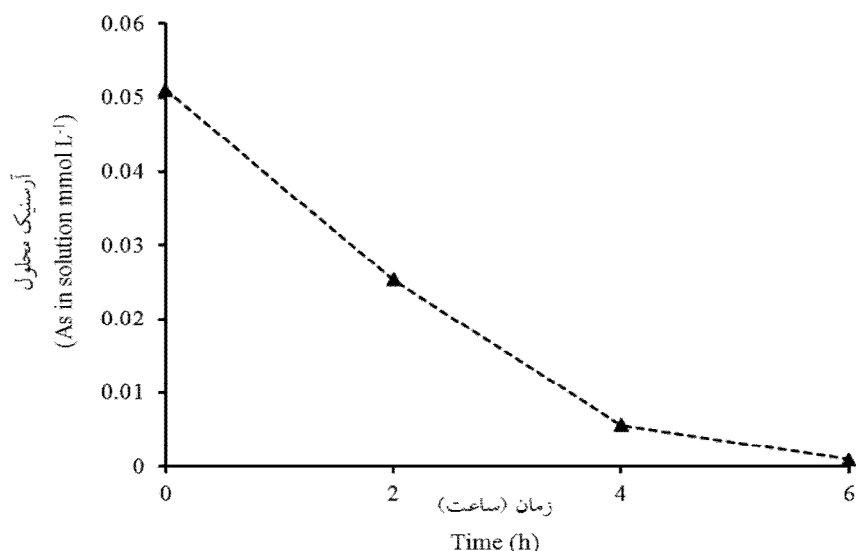
۶ روز کامل شد و غلظت آرسنات پس از گذشت ۶ روز از ۰/۰۵ میلی مولار اولیه در فاز محلول به کم‌تر از حد تشخیص دستگاه ICP رسید که بیانگر جذب سطحی کامل آرسنات بر روی سطوح گئوتیت بود (شکل ۴). به‌منظور ادامه آزمایش‌های احیاء زیستی از این کانی استفاده شد.

جذب سطحی آرسنات بر روی گئوتیت: نتایج به‌دست آمده از آنالیز پراش‌نگاشت اشعه ایکس نشان داد که گئوتیت تهیه شده کاملاً خالص بود (شکل ۳). سطح ویژه و متوسط ضخامت منفذ کانی به‌ترتیب ۲۰/۰۲۸ مترمربع بر گرم و ۴۸/۶۲ آنگستروم برآورد شد. جذب سطحی آرسنات بر روی گئوتیت در طول



شکل ۳- پراش‌نگاشت اشعه ایکس گئوتیت (اعداد بر روی قله پراش‌نگاشت‌ها بر حسب آنگستروم می‌باشند).

Figure 3. X-ray diffraction patterns of goethite (Numbers on pick of X-ray diffraction patterns are in terms of Angstrom).



شکل ۴- جذب سطحی آرسنات بر روی سطوح گنویت در مدت زمان ۶ روز.

Figure 4. Adsorption of arsenate on goethite during 6 days.

بنابراین نتایج بیانگر آن است که باکتری *Shewanella sp.* علاوه بر احیاء زیستی آرسنات محلول قادر به احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی سطوح گنویت نیز می‌باشد و اما احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده با سرعت کم‌تری نسبت به آرسنات محلول انجام گرفت. غلظت آرسنیت موجود در فاز محلول در فرایند احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی گنویت، پس از گذشت ۱۵ روز به ۰/۰۳ میلی‌مولار بر لیتر رسید در صورتی‌که در فرایند احیاء زیستی آرسنات محلول، مقدار آرسنیت پس از گذشت ۳ ساعت به این مقدار رسید. بنابراین نتایج بیانگر آن است که احیاء زیستی آرسنات به دو شکل محلول و جذب سطحی شده بر روی گنویت انجام می‌گیرد.

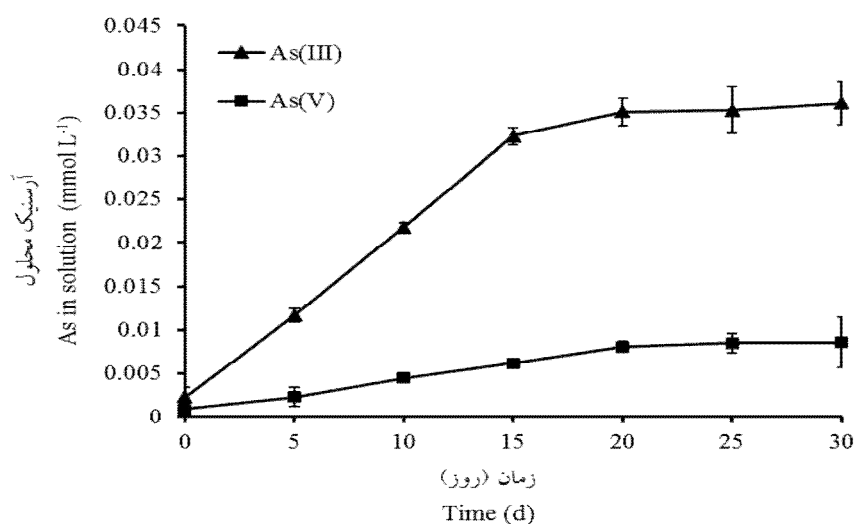
هربل و فندورف (۲۰۰۵) نیز گزارش نمودند که باکتری‌های احیاء‌کننده آرسنات نه تنها قادر به احیاء آرسنات محلول هستند بلکه توانایی احیاء آرسنات جذب سطحی شده بر روی اکسیدهای آهن را نیز دارا می‌باشند (۳). احیاء زیستی آرسنات موجود در

احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده: احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده با اندازه‌گیری مقدار آرسنات و آرسنیت فاز محلول در طول زمان مورد بررسی قرار گرفت. احیاء زیستی برای آرسنات جذب سطحی شده در تیمار شاهد (عدم حضور باکتری) مشاهده نشد و غلظت آرسنیت در فاز محلول بسیار ناچیز و کم‌تر از حد تشخیص دستگاه ICP بود. تغییرات غلظت آرسنات و آرسنیت در فاز محلول در احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی گنویت در حضور باکتری *Shewanella sp.* در شکل ۵ نشان داده شده است. مقدار آرسنیت در طول زمان تا مدت ۲۰ روز روند افزایشی معنی‌داری را نشان داد و پس از آن ثابت شد. مقدار آرسنات موجود در فاز محلول نیز در طول زمان روند افزایشی نشان داد (شکل ۵). بنابراین آرسنات جذب سطحی شده بر روی گنویت در طول فرایند احیاء زیستی می‌تواند به مقدار اندکی واجذب شود و به درون فاز محلول وارد شود.

هیوانگ و همکاران (۲۰۱۱) همچنین گزارش نمودند که افزودن ۲ گرم بر لیتر گئوتیت منجر به کاهش ۹۶ درصدی سرعت احیاء زیستی آرسنات شد در حالی که افزودن ۲۰ گرم بر لیتر فری هیدرات احیاء زیستی آرسنات را به طور کامل در طول ۱۰۰ ساعت اولیه آزمایش متوقف کرد که به سطح ویژه بالاتر و ساختار متخلخل تر فری هیدرات نسبت داده شد. این مطالعه همچنین مشخص کرد که احیاء زیستی آرسنات در حضور جاذب‌ها به وسیله باکتری *Shewanella sp.* غالباً از طریق واجذب آرسنات و احیاء متوالی آرسنات وارد شده به فاز محلول حاصل می‌شود (۵). زوبریست و همکاران (۲۰۰۰) نیز گزارش نمودند که احیاء آرسنات جذب سطحی شده بر روی هیدروکسیدهای آلومینیوم آمورف به وسیله باکتری *Sulfospirillum barnesii* در شرایط بی‌هوازی، غلظت آرسنیت را در فاز محلول افزایش می‌دهد.

ساختار کانی اسکورودیت^۱ نیز توسط نیومن و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شده است. هیوانگ و همکاران (۲۰۱۱) بیان داشتند که حضور اکسی هیدروکسیدهای جاذب آرسنات، به مقدار زیادی احیاء زیستی آرسنات را به وسیله باکتری *Shewanella sp.* کاهش دادند و احیاء آرسنات جذب سطحی شده با سرعت کمتری نسبت به آرسنات محلول صورت گرفت.

نتایج پژوهش‌های لانگنر و اینسکیپ (۲۰۰۰) بیانگر آن بود که احیاء زیستی آرسنات به وسیله باکتری *Clostridium sp.* در فاز محلول با pH ۶/۸ با سرعت انجام گرفت و اما آرسنات جذب سطحی شده بر روی فری هیدرات در مدت زمان طولانی‌تری توسط این باکتری احیاء زیستی یافت. جونز و همکاران (۲۰۰۰) همچنین گزارش نمودند که احیاء زیستی آرسنات به وسیله باکتری *Clostridium sp.* در حضور گئوتیت در حدود ۱۲۰۰ برابر آهسته‌تر از آرسنات موجود در فاز محلول صورت گرفت.

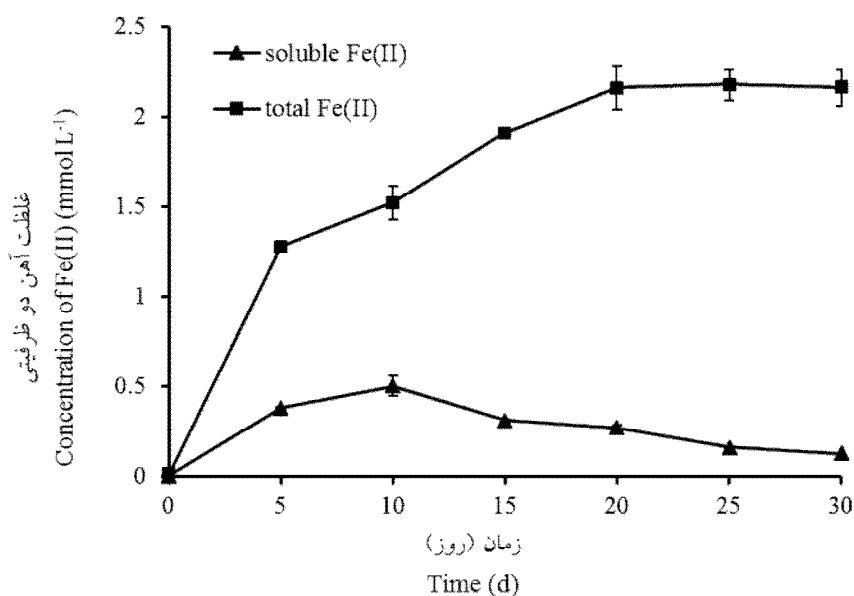


شکل ۵- تغییرات غلظت آرسنات و آرسنیت در فاز محلول در طول احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده.

Figure 5. Changes in concentration of arsenate and arsenite in aqueous phase during bioreduction of adsorbed arsenate.

آرسنات و آهن سه ظرفیتی موجود در ساختمان گئوتیت توسط باکتری *Shewanella sp.* صورت گرفت. بنابراین احیاء آرسنات و آهن می‌تواند به گونه‌های باکتریایی، محیط واکنش و نسبت آهن سه ظرفیتی به آرسنات وابسته باشد (۲۶). ماسچلین و همکاران (۱۹۹۱) نیز احیاء زیستی آرسنات و آزادسازی آرسنیت را قبل از احیاء آهن سه ظرفیتی در خاک‌های غرقاب شده در شرایط آزمایشگاهی گزارش نمودند (۱۵). گونه‌های *Shewanella sp.* لیوپلی ساکاریدهای کوتاه ضخیمی را با بار زیاد تولید می‌کنند که منجر به چسبندگی به سطوح کانی‌هایی مانند اکسی هیدروکسیدهای آهن سه ظرفیتی شده و احیاء زیستی آهن فریک و آرسنات جذب سطحی شده بر روی این اکسی هیدروکسیدها را به طور هم‌زمان ایجاد می‌کند (۱۱).

احیاء زیستی آهن سه ظرفیتی در ساختار گئوتیت: نتایج بیانگر آن بود که باکتری *Shewanella sp.* توانایی احیاء زیستی آهن فریک در ساختار گئوتیت و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی را دارا می‌باشد. مقدار آهن دو ظرفیتی محلول تا ده روز روند افزایشی داشت و پس از آن کاهش معنی‌داری را نشان داد که این فرایند احتمالاً به دلیل جذب سطحی مجدد آهن دو ظرفیتی بر روی گئوتیت و یا تشکیل رسوب آرسنات آهن دو ظرفیتی $[Fe_3(AsO_4)_2]$ با یون‌های آرسنات موجود در فاز محلول می‌باشد (۷). مقدار آهن دو ظرفیتی کل نیز تا ۲۰ روز روند افزایشی نشان داد و پس از آن ثابت شد (شکل ۶). بنابراین نتایج بیانگر آن است که احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده با برتری بیشتری نسبت به آهن سه ظرفیتی موجود در ساختمان گئوتیت صورت گرفت. در فرایند احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده، احیاء زیستی



شکل ۶- تغییرات غلظت آهن دو ظرفیتی محلول و کل در طول فرایند احیاء زیستی.

Figure 6. Changes in concentration of aqueous and total ferrous iron during bioreduction process.

نتیجه گیری کلی

بنابراین با توجه به این که ریزجانداران نقش مهمی را در واجدبی آرسنات از جاذبها و متحرک شدن این عنصر در آبهای زیرزمینی دارند و از آنجا که شکل احیاء یافته آرسنیک یعنی آرسنیت نسبت به آرسنات سمیت بیشتری را دارا می باشد، بنابراین این فرایند در سیستمهای طبیعی از اهمیت زیادی برخوردار است و تنها جذب سطحی آرسنیک بر روی جاذبها نمی تواند منجر به اطمینان از عدم حضور آن در منابع آبی باشد و باید مورد توجه متخصصین علوم زیست محیطی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از حمایت دانشگاه گیلان و دانشگاه فردوسی مشهد برای پیشبرد این پژوهش سپاسگزاری می نمایند.

متحرک شدن آرسنیک به شکل آرسنیت یک نگرانی بسیار مهم در خاکها و ته نشینت های آلوده شده تحت شرایط بی هوازی می باشد. در اغلب شرایط طبیعی (یعنی غلظت های کم تر از ۲۰ میکرومولار آرسنیک محلول)، آرسنیت نسبت به آرسنات با قدرت کمتری بر روی سطوح اکسی هیدروکسیدها و کانی های رسی جذب سطحی شده و وارد فاز محلول می شود. در این مطالعه مشخص شد که باکتری *Shewanella sp.* توانایی احیاء زیستی آرسنات به شکل محلول و همچنین آرسنات جذب سطحی شده بر روی گئوتیت را دارد. اما احیاء زیستی آرسنات محلول با سرعت بیشتری انجام می شود. نتایج مطالعه همچنین مشخص کرد که باکتری *Shewanella sp.* احیاء زیستی آرسنات جذب سطحی شده بر روی کانی گئوتیت را با برتری بیشتری نسبت به آهن سه ظرفیتی موجود در ساختمان گئوتیت انجام می دهد.

منابع

1. Cummings, D.E., Jr, F.C., Fendorf, S., and Rosenzweig, R.F. 1999. Arsenic Mobilization by the Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacterium *Shewanella alga* BrY. Environ. Sci. Technol. 33: 723-729.
2. Fendorf, S., and Kocar, B.D. 2009. Biogeochemical processes controlling the fate and transport of arsenic: Implications for South and Southeast Asia. Adv. Agron. 104: 137-164.
3. Herbel, M.J., and Fendorf, S. 2005. Transformation and transport of arsenic within ferric hydroxide coated sands upon dissimilatory reducing bacterial activity. P 77-90, In: P. O'Day, D, Vlassopoulos, X. Meng, and L. Benning (Eds.), Advances in Arsenic Research: Integration of Experimental and Observational Studies and Implications for Mitigation. ACS Symposium Series, vol. 915. American Chemical Society, Washington, DC.
4. Herbel, M.J., and Fendorf, S. 2006. Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands. Chem. Geol. 228: 16-32.
5. Huang, J.H., Voegelin, A., Pombo, S.A., Lazzaro, A., Zeyer, J., and Kretzschmar, R. 2011. Influence of Arsenate Adsorption to Ferrihydrite, Goethite, and Boehmite on the Kinetics of Arsenate Reduction by *Shewanella putrefaciens* strain CN-32. Environ. Sci. Technol. 45: 7701-7709.
6. Jeon, B.H., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Barnett, M.O., Burgos, W.D., Dempsey, B.A., and Roden, E.E. 2004. Microbial Reduction of U(VI) at the Solid-Water Interface. Environ. Sci. Technol. 38: 5649-5655.
7. Jiang, S., Lee, J.H., Kim, D., Kanaly, R.A., Kim, M.G., and Hur, H.G. 2013. Differential Arsenic Mobilization from As-Bearing Ferrihydrite by Iron-Respiring *Shewanella* Strains with Different Arsenic-Reducing Activities. Environ. Sci. Technol. 47: 8616-8623.

8. Jones, C.A., Langner, H.W., Anderson, K., McDermott, T.R., and Inskeep, W.P. 2000. Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64: 600-608.
9. 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. 2008. Integrated biogeochemical and hydrologic processes driving arsenic release from shallow sediments to ground waters of the Mekong delta. *Appl. Geochem.* 23: 3059-3071.
10. Kocar, B.D., Borch, T., and Fendorf, S. 2010. Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 74: 980-994.
11. Korenevsky, A.A., Vinogradov, E., Gorby, Y., and Beveridge, T.J. 2002. Characterization of the lipopolysaccharides and capsules of *Shewanella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4653-4657.
12. Langner, H.W., and Inskeep, W.P. 2000. Microbial Reduction of Arsenate in the Presence of Ferrihydrite. *Environ. Sci. Technol.* 34: 3131-3136.
13. Lin, Z., and Puls, R.W. 2000. Adsorption, desorption and oxidation of arsenic affected by clay minerals and aging process. *Environ. Geol.* 39: 753-759.
14. Manning, B., and Goldberg, S. 1997. Adsorption and Stability of Arsenic(III) at the Clay Mineral-Water Interface. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2005-2011.
15. Masscheleyn, P.H., Delaune, R.D., and Patrick, W.H. 1991. Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1414-1419.
16. Meng, X.G., and Wang, W. 1998. Speciation of arsenic by disposable cartridges. In Book of posters of the third international conference on arsenic exposure and health effects. Society of Environmental Geochemistry and Health, University of Colorado at Denver, Denver, CO.
17. Muehe, E.M., Scheer, L., Daus, B., and Kappler, A. 2013. Fate of Arsenic during Microbial Reduction of Biogenic versus Abiogenic As-Fe(III)-Mineral Coprecipitates. *Environ. Sci. Technol.* 47: 8297-8307.
18. Nickson, R., McArthur, J., Burgess, W., Ahmed, K.M., Ravenscroft, P., and Rahman, M. 1998. Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature.* 395: 338-338.
19. Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., and Lovley, D.R. 1997. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 168: 5. 380-388.
20. Nicholas, D.R., Ramamoorthy, S., Palace, V., Spring, S., Moore, J.N., and Rosenzweig, R.F. 2003. Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments. *Biodegradation.* 14: 123-137.
21. Ona-Nguema, G., Morin, G., Wang, Y., Menguy, N., Juillot, F., Olivi, L., Aquilanti, G., Abdelmoula, M., Ruby, C., Bargar, J.R., Guyot, F., Calas, G., and Brown Jr, G.E. 2009. Arsenite sequestration at the surface of nano-Fe(OH)₂, ferrous-carbonate hydroxide and green-rust after bioreduction of arsenic-sorbed lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 73: 1359-1381.
22. Smedley, P.L., and Kinniburgh, D.G. 2002. Review. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17: 517-568.
23. Smith, E., Naidu, R., and Alston, A.M. 1998. Arsenic in the soil environment: a review. *Adv. Agron.* 64: 149-195.
24. Stookey, L.L. 1970. Ferrozine- a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42: 779-781.
25. Vangeen, A., Rose, J., Thoral, S., Garnier, J.M., Zheng, Y., and Bottero, J.Y. 2004. Decoupling of As and Fe release to Bangladesh groundwater under reducing conditions. Part II: Evidence from sediment incubations. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 68: 17. 3475-3486.

26. Zhang, X., Jia, Y., Wang, S., Pan, R., and Zhang, X. 2012. Bacterial reduction and release of adsorbed arsenate on Fe(III)-, Al- and coprecipitated Fe(III)/Al-hydroxides. *J. Envir. Sci.* 24: 3. 440-448.
27. Zobrist, J., Dowdle, P.R., Davis, J.A., and Oremland, R.S. 2000. Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environ. Sci. Technol.* 34: 22. 4747-4753.



Influence of goethite on adsorption and bioreduction of arsenate under anoxic conditions

*N. Ghorbanzadeh¹, A. Lakzian² and A. Halajnia³

¹Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Guilan, ²Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, ³Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 08/12/2015; Accepted: 02/22/2016

Abstract

Background and Objectives: Arsenic is a metalloid contaminant that due to its risk to plants, animals and human health is of impressive concern in the environment. The most environmental problems are the result of mobilization of arsenic under anaerobic conditions. In these conditions, reducing bacteria have ability for bioreduction of arsenate to arsenic and increasing its mobilization. The objective of this study was to determine the bioreduction of arsenate in aqueous and adsorbed on goethite in the presence of *shewanella* sp. in two different sections.

Materials and Methods: In the first section, bioreduction of arsenate in aqueous phase and in the second section bioreduction of adsorbed arsenate on goethite were studied. The change in the number of viable cells over the course of the experiments was monitored by viable cell counts.

Results: The results of the first section revealed that *Shewanella* sp. bacterium is capable of bioreduction of arsenate in aqueous phase at a concentration of 0.05 mM. The results also showed that during 6 days, goethite is capable to adsorb arsenate at a concentration of 0.05 mM totally and *Shewanella* sp. reduced adsorbed arsenate on goethite. The rate of bioreduction of arsenate in aqueous phase was more than the adsorbed arsenate on goethite. The results also showed that *Shewanella* sp. was able to bioreduce ferric iron in the structure of goethite to ferrous iron. So, *Shewanella* sp. was able to reduce both adsorbed arsenate on goethite and ferric iron in anoxic condition and *Shewanella* sp. as an iron reducing bacterium (IRB) was able to reduce arsenate. But bioreduction of adsorbed arsenate on goethite was done with higher priority in comparison with ferric iron in the structure of goethite in the presence of *Shewanella* sp. The concentration of arsenite in aqueous phase after 30 days of bioreduction process was 0.04 mM that revealed 80% of adsorbed arsenate reduced to arsenite and entered to aqueous phase. The amount of aqueous ferrous iron increased up to 10 days and after that significantly decreased. The amount of total ferrous iron increased up to 20 days and after that became almost constant. The results of the change in the number of viable cells over the course of the experiments also showed continuation of bacterium cell growth of *Shewanella* sp. in the bioreduction experiments.

Conclusion: Bioreduction process in anaerobic ecosystems could create contamination in water sources and should be considered especially by the environmental specialists.

Keywords: Arsenite, Arsenic, Ferric iron, *Shewanella* sp

* Corresponding Authors; Email: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com

