

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
 سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۵۸-۱۴۱
 تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

بررسی معدنی شدن زیستی در نهشته‌های تراورتنی چشمه بادآب سورت، کیاسر، مازنداران

جواد خنشا: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، javad_kh85@yahoo.com
محمد علی آموزگار*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir
محسن رنجبران: استادیار زمین‌شناسی، دانشگاه تهران، ایران، ranjbaran@khayam.ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: نهشته‌های تراورتنی حاصل تجمع کربنات کلسیم در چشمه‌های کارستی، چشمه‌های آب گرم، رودخانه‌های کوچک و باتلاق‌هاست. چشمه تراورتن ساز بادآب سورت در استان مازندران واقع شده و دومین اثر طبیعی ایران است. این چشمه دارای دو سرچشمه با ویژگی‌های متفاوت است و وجود رنگ‌های متنوع به علت رسوبات مختلف زیبایی منحصر به فردی به چشمه می‌دهد. تراورتن‌ها مدل مناسبی برای بررسی رابطه محیط- میکروارگانیسم‌ها هستند، این مطالعه تمرکز روی بررسی تاثیرگذاری میکروارگانیسم‌ها در رسوب‌گذاری کربنات کلسیم و جداسازی باکتری‌های دارنده پتانسیل رسوب‌گذاری داشت.

مواد و روش‌ها: برای بررسی تأثیر میکروارگانیسم‌ها بر رسوب‌گذاری در این جا از روش‌های میکروسکوپی و کشت استفاده شد، از نمونه‌های سنگی تصاویر میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و پلاریزان تهیه شد و باکتری‌ها از طریق روش‌های کشت از نمونه آب جداسازی شدند. فعالیت رسوب‌گذاری باکتری‌ها از طریق کشت روی محیط B₄ بررسی شد و تأیید رسوب‌گذاری با میکروسکوپ پلاریزان انجام شد.

نتایج: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌ها در رسوب‌گذاری تأثیر گذار هستند؛ به شکلی که می‌تواند به عنوان هسته اولیه عمل کنند. در نهایت، ۵ سویه Bsw-3، Bsw-28d، Bss-11a، Bsw-1c1 و Bsw-39b جداسازی شدند که توانایی رسوب کربنات کلسیم را داشتند. در این بین، سویه Bss-3 که شباهت ۹۹/۶ با تاکسون *Labrenzia aggregate* IAM 12614^T را داشت. این توانایی برای نخستین بار برای این جنس گزارش شده است و در بین سویه‌ها، سویه Bsw-28d با رسوب دادن ۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر کربنات کلسیم بهترین سویه بود.

بحث و نتیجه‌گیری: میکروارگانیسم‌ها در تشکیل و تکامل محیط اطرافشان اهمیت دارند؛ در نتیجه برای حفظ و احیای یک محیط باید به میکروب‌های بومی آن توجه کرد.

واژه‌های کلیدی: تراورتن، معدنی شدن زیستی، چشمه بادآب سورت، جداسازی، میکروسکوپ الکترونی نگاره

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

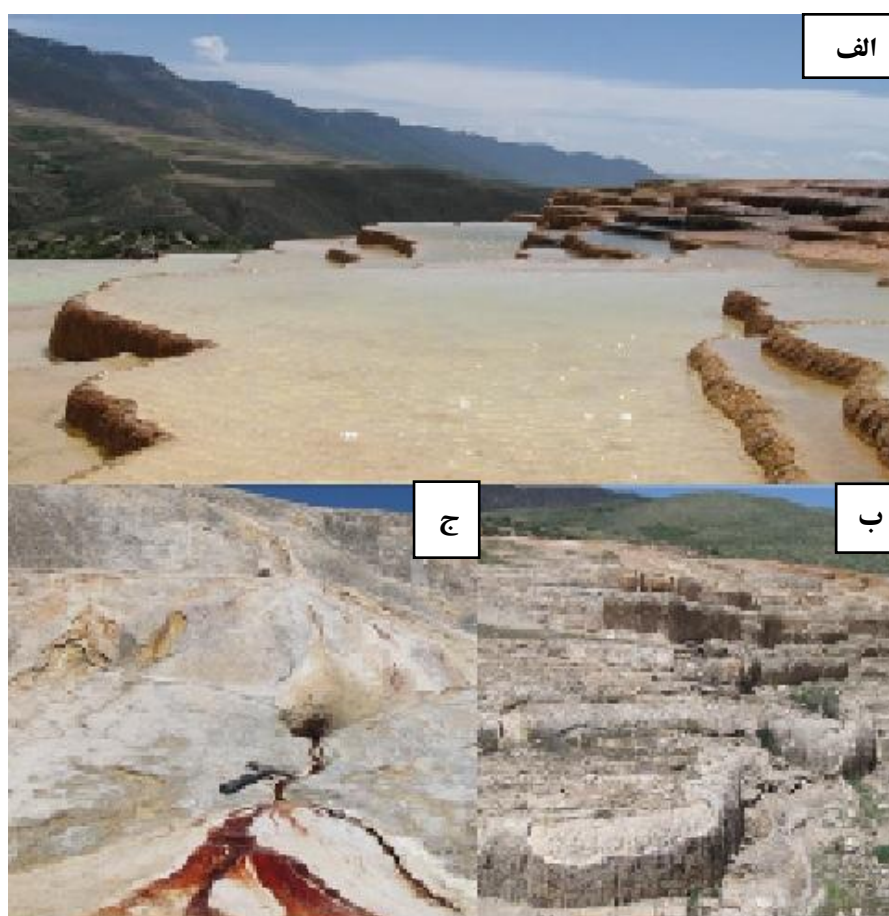
واژه تراورتن برگرفته شده از واژه ایتالیایی تیورتیون^۱ و نام محلی است که تراورتن به شکل رسوب بیرونی تشکیل شده است (۱). تراورتن حاصل تجمع کربنات کلسیم در چشمه‌های کارستی، چشمه‌های آب گرم، رودخانه‌های کوچک و باتلاق‌هاست. مهم‌ترین عامل رسوب‌گذاری در تراورتن‌ها عوامل شیمیایی مانند تبخیر، خارج شدن CO₂، افت فشار و ... است و میکروارگانیسم‌ها در کنار عوامل شیمیایی در رسوب‌گذاری تاثیرگذار هستند (۲). سیمونز در سال ۱۹۵۱ تراورتن‌های چشمه‌ای که در محل خروج چشمه‌ها تشکیل می‌شود را معرفی کرد، که تراورتن‌های چشمه بادآب سورت در کیاسر مازندران از این نوع هستند (۳). در حقیقت، تراورتن نوعی سنگ رسوبی کربناته است که در محل چشمه‌های آهک ساز تشکیل می‌شود. یک چشمه کربناته معمولاً در کف حوضچه‌های کم عمق تشکیل می‌شود و می‌توان گفت تراورتن معمولاً حاصل رسوب مواد آهکی در آب‌های روان است (۳).

چشمه تراورتن ساز بادآب سورت اورست در استان مازندران، شهرستان ساری و یک کیلومتری شرق روستای اورست در ارتفاع ۱۸۴۰ متری از سطح دریا واقع شده است (شکل ۱). چشمه سورت شامل دو سرچشمه با فاصله اندک بین هم است که از لحاظ ترکیب شیمیایی، رنگ و مزه از هم متفاوت هستند (جدول ۱). یکی از سرچشمه‌های اصلی سرچشمه شرقی (شکل ۱، الف) است که دارای آب‌دهی بیشتر است و شوری بالاتری را نشان می‌دهد و در انتهای آن لجن سیاه رنگ دیده می‌شود که خاصیت درمانی دارد، در حالی که سرچشمه غربی (شکل ۱، ج) دارای آبی ترش مزه با رنگ قرمز- نارنجی است؛ رنگ قرمز آن به علت وجود ترکیبات آهن اکسید است.

این چشمه هم اکنون فعال است و قسمت‌های قدیمی هم در حومه آن دیده می‌شود (شکل ۱، ب). چشمه بادآب سورت با ایجاد شکل‌های ژئومورفولوژی منحصر به فرد همراه با رنگ‌های گوناگون و به ویژه رنگ‌های قرمز، یکی از جاذبه‌های زمین‌شناختی استان مازندران محسوب می‌شود. مجموعه تراورتنی بادآب سورت هم زمان با آخرین چین‌خوردگی البرز در پلیوسن و پلیستوسن (دوران چهارم زمین‌شناسی) شکل گرفته است. این چشمه در سال ۱۳۸۷ دومین اثر طبیعی ملی بعد از قله دماوند توسط سازمان میراث فرهنگی و گردشگری تعیین شد.

در شکل ۳ موقعیت قرارگیری و خروج سرچشمه‌های بادآب سورت و رابطه سن آن با واحدهای زیرین خود نشان داده شده است.

چشمه‌های تراورتن ساز به علت وجود فعالیت میکروارگانیسم‌ها در رسوب‌گذاری مدل مناسبی برای بررسی رابطه میکروب‌ها و محیط است. کربنات‌های میکروبی و توده‌های میکروبی مهم‌ترین مدل بررسی رابطه میکروب-محیط هستند (۴). زمان آغاز حیات میکروبی حدود ۴/۱ میلیارد سال پیش در نظر گرفته می‌شود (۵) که محیط آن دارای شرایط با ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد، قلیایی و حاوی بی‌سولفید و آهن است و نخستین نشانه‌های توده‌های میکروبی در حدود ۳/۵ میلیارد سال پیش در آفریقای جنوبی و استرالیا گزارش شده است (۶). همان‌طور که دیده می‌شود موجودات اولیه در زیستگاه‌های پلی‌اکستریم حیات داشته‌اند (۷) که گفته شده ابتدا در حباب‌هایی نزدیک به سطح آب حیات شکل گرفته و سپس، تکامل جمعیت‌های میکروبی و تولید فرآیندها و متابولیسم‌های متنوع میکروبی در توده‌های میکروبی شکل گرفته است. برای نمونه نخستین فتوسنتزکننده‌ها در توده‌های میکروبی وجود داشته‌اند (۴).



شکل ۱- چشمه بادآب سورت. الف) چشمه شرقی، ب) سرچشمه های قدیمی که در حال حاضر فعالیتی ندارند، ج) چشمه غربی

تحمیل شرایط سخت محیطی برای آنها افزایش می یافته در نتیجه شانس ادامه حیات افزایش می یافته است. معدنی شدنی که توسط مرجان ها انجام می شود فرآیند معدنی شدن زیستی نام دارد. دو فرآیند دیگر به نام معدنی شدن تحریک شونده زیستی^۲ و معدنی شدن تحت تاثیر زیستی^۳ وجود دارند (۱۰) که باکتری ها در کنار فرآیندهای فیزیکی رسوب گذاری مثل انتشار، بخار شدن و آزاد شده گاز روی رسوب گذاری تأثیر می گذارند. مشخص شده است که در محیط های دریایی دو عامل درونی و بیرونی (۱۱) در رسوب گذاری تاثیر گذار هستند (۱۲). عوامل درونی مانند برهم کنش های اکولوژیکی، تولید و مصرف مواد آلی و

معدنی شدن به واسطه میکروب ها در آغاز حیات میکروبی وجود داشته که با رسوب یافتن کربنات کلسیم، استروماتولیت های لایه ای بی شکل گرفته اند که جمعیت ها کلسیت را رسوب می داده یا اینکه به دام می انداخته اند (۸). به این شکل میکروارگانیسم هایی که در زیستگاه های کربناته تکامل یافته اند توانایی رسوب کربنات کلسیم را دارند، حتی یوکاریوتی مثل مرجان ها که به شکل فعال توسط فرآیندی آنزیمی کلسیت را روی خود رسوب می دهند (۹). این کار سبب شده نیچ های مناسب برای ادامه حیات ایجاد شود مثل کاری که در بیوفیلم ها رخ می دهد. با تشکیل توده های میکروبی ارگانیسم های مختلف در کنار هم قرار گرفته و

و استحکام به ساخت‌های سیمانی (۱۸) و حفاظت از سنگ‌های ساختمانی (۱۹) دارند که هر یک از نظر اقتصادی مهم هستند.

مواد و روش‌ها

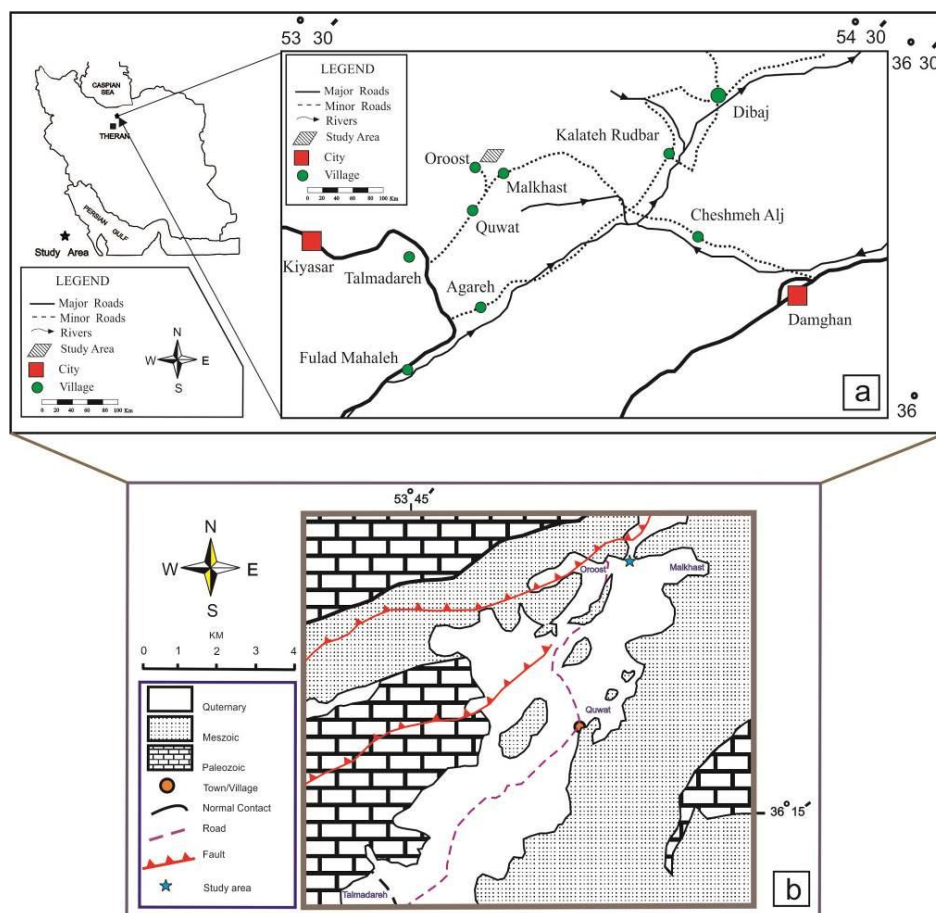
نمونه‌برداری: نمونه‌های سنگی برای بررسی میکروسکوپی و نمونه آب برای جداسازی باکتری‌ها در مهرماه سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری، به آزمایشگاه در دانشگاه تهران منتقل و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه عکس‌های میکروسکوپی و رسم نقشه‌های زمین‌شناسی: از نمونه‌های سنگی ابتدا برش نازک به قطر ۳۰ میکرون تهیه شد و با میکروسکوپ پلاریزان مدل المپوس^۵ با عدسی‌های ۲/۵، ۴ و ۱۰ مشاهده و بررسی شدند (۲۰ و ۲۱). سپس، قطعات کوچکی از آنها برای تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی تهیه شد (۲۲ و ۲۳). تصاویر SEM از طریق دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره مدل KYKY-EM3200 تهیه شد.

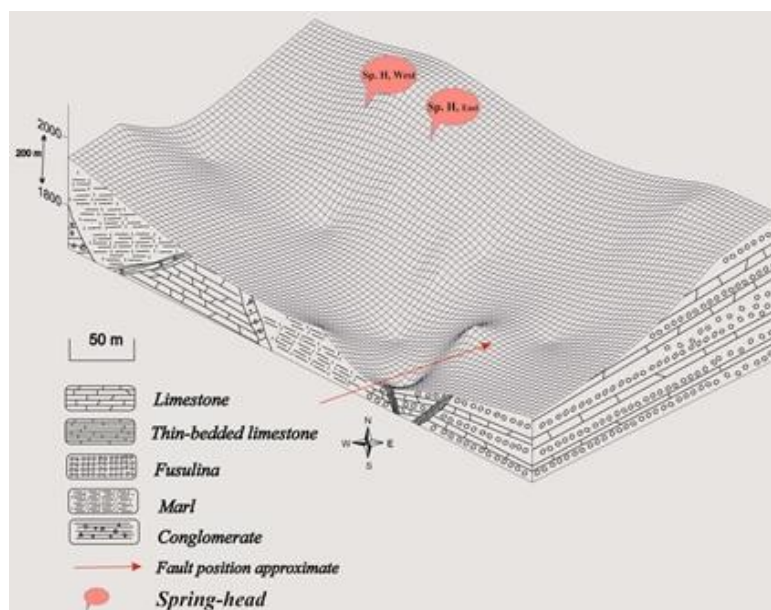
موقعیت چشمه بادآب سورت در ایران و لایه‌های سنگی منطقه کیاسر (شکل ۲) از روی نقشه زمین‌شناسی منطقه کیاسر (مقیاس ۱/۲۰۰۰۰) با استفاده از نرم افزار کورل درا ایکس^۶ رسم شد و نقشه توپوگرافی و لایه‌های محدوده چشمه از طریق نرم افزارهای گوگل ارث^۷، سرفر^۸ و کورل درا ایکس^۶ و با استفاده از نقشه زمین‌شناسی منطقه کیاسر با مقیاس ۱/۲۰۰۰۰ رسم شد.

غیرآلی است که دو مکانیسم کلی آن یکی تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی است که در نتیجه آن میکروارگانیسم‌ها به عنوان هسته اولیه هنگام آغاز رسوب گذاری عمل می‌کنند و مکانیسم بعدی موتور قلیالیت^۴ نام دارد (۹) که به فعالیت‌های متابولیکی سلول‌ها اشاره دارد تغییرات اسیدیته می‌تواند از ۶ تا ۱۰ باشد، با این تغییر میکرومحیط‌هایی برای تولید رسوب فراهم آورده می‌شود (۹). با توجه به اینکه فعالیت‌های میکروب‌ها متنوع است، تاثیر آن‌ها بر رسوب گذاری می‌تواند یا منفی باشد. برای نمونه سیانوباکترها با گرفتن کربن دی‌اکسید از آب، سبب تسهیل رسوب یافتن کربنات کلسیم می‌شوند در حالی که اکسیداسیون سولفید سبب اسیدی شدن محیط می‌شود که اثر منفی بر رسوب گذاری دارد (۱۳). عوامل بیرونی مانند نور، مواد غذایی، فضا، هیدرودینامیک و لایه گذاری هستند (۱۴). همان‌طور که دیده می‌شود این دو عامل بیرونی و درونی را باید در کنار هم در نظر گرفت زیرا در محیط‌های مختلف ممکن است یک عامل اصلی در رسوب گذاری کلسیت وجود داشته باشد.

در پژوهش حاضر تلاش شد در درجه اول تنوع میکروبی و رابطه بین میکروب و محیط با روش‌های میکروسکوپی و کشت بررسی شود و در مرحله بعد میکروارگانیسم‌های رسوب دهنده کربنات کلسیم جداسازی شوند. این میکروارگانیسم‌ها کابردهای مختلفی مانند کاهش آلودگی‌های فلزی خاک و آب‌های زیرزمینی (۱۵)، افزایش استحکام خاک (۱۶)، کاهش حفرات ساخت‌های زمین‌شناسی (۱۷)، حفاظت



شکل ۱- موقعیت چشمه بادآب سورت در (a) مکان چشمه در ایران و نقشه راه های دسترسی به چشمه و (b) نقشه زمین شناسی و موقعیت چشمه بادآب سورت نمایش داده شده است. (رسم شده با استفاده از نقشه زمین شناسی منطقه کیاسر با مقیاس ۱/۲۰۰۰۰ و نرم افزار Corel Draw X6)



شکل ۲- نقشه توپوگرافی و توالی لایه های تشکیل شده در محدوده چشمه بادآب سورت (رسم شده با نرم افزار Surfer 10 و Corel Draw X6)

پژوهش حاضر از این نوع محیط استفاده شد. زیرا در محیط‌های طبیعی ماده غذایی به وفور دیده نمی‌شود و جمعیت‌ها در محیط طبیعی در حالت متابولیسمی نیمه فعال وجود دارند (۲۴). محتوی نمکی از تغییر میزان نمک استفاده شده در محیط هالوفیلیک نسبی $MH^{1'}$ به دست آمد (۲۵).

طراحی محیط کشت و کشت باکتری‌ها: نمونه‌های آب ابتدا توسط دستگاه جذب اتمی مدل پرکین المر 100^9 برای کاتیون‌ها و تیتراسیون برای آنیون‌ها تحلیل شیمیایی شد (جدول ۱). با توجه به نوع و مقدار نمک‌ها محیط کشت متناسب با محیط طراحی شد (جدول ۲). با توجه به اینکه مشخص شده استفاده از محیط کشت فقیر غذایی سبب افزایش میزان جداسازی می‌شود، در

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و میزان عناصر سرچشمه‌های چشمه بادآب سورت

نقطه	شوری	اسیدیته	دما (محیط)	دما (آب)	غلظت یون‌ها (گرم بر لیتر)								رنگ
					Fe ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	
A شرقی	۵۶/۲	۷/۳۹	۲۴	۱۹	۰/۰۰۱۲	۱۲	۰/۰۱۴	۱۶/۵	۰/۲۵	۳۶/۵	۳/۱	<۰/۷	قرمز، خاکستری، سیاه
B غربی	۳/۴۲	۷/۱۵	۲۴	۱۸	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۱۱	۱/۷	<۰/۹۶	<۱/۶۸	قرمز

پس از تلقیح، محیط‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ماه گرماگذاری شدند و جداسازی و خالص‌سازی به روش کشت خطی انجام شد.

کشت سویه‌های جدا شده روی محیط B₄ و تایید رسوب‌گذاری: برای بررسی تأثیر باکتری‌ها بر رسوب‌گذاری، باکتری‌های خالص شده روی محیط کشت B₄ (کلسیم استات ۰/۲۵ درصد، گلوکز ۱ درصد، عصاره مخمر ۰/۴ درصد، نمک به میزان مورد نیاز سویه‌ها و آگار ۱/۵ درصد برای محیط جامد) کشت داده شدند (۲۶). به محیط چند قطره از فنل رد به عنوان شناساگر اضافه شد (مقدار ۰/۰۰۲۵ درصد حل شده در سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال) و با توجه به اینکه مشخص شده رسوب‌گذاری کربنات کلسیم در اسیدیته‌های بالاتر از ۸ رخ می‌دهد، اسیدیته محیط روی ۸ تنظیم شد (۲۷)، سویه‌ها در دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته تا یک ماه گرمخانه‌گذاری شدند.

جدول ۲- محیط کشت و شرایط گرماگذاری استفاده شده برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها

	محیط A ^۱	محیط B ^۲
آب مقطر (میلی لیتر)	۱۰۰۰	۱۰۰۰
نوترینت برات	۰/۸	۰/۸
MgSO ₄ 7H ₂ O	۴/۸	-
MgCl ₂ 6H ₂ O	۳/۲	-
KCl	۱	-
NaCl	۴۰/۵	-
NaHCO ₃	۰/۰۱۵	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	۰/۰۹	-
آگار	۱۵	۱۵
دما (درجه سانتی‌گراد)	۳۴**	۳۴
اسیدیته	۷/۵	۷

* مقادیر بر حسب گرم بر لیتر

** استفاده از دمای بین ۳۰ تا ۳۴ درجه سانتی‌گراد گستره جداسازی

باکتری‌ها را افزایش می‌دهد.

^۱ محیط طراحی شده برای سرچشمه شرقی ۱

^۲ محیط طراحی شده برای سرچشمه غربی ۲

1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3') با برنامه (دنا تورا سیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه، دنا تورا سیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ چرخه، اتصال ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه در ۳۰ چرخه، گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه در ۳۰ چرخه و گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در یک چرخه) انجام شد. محصول PCR برای تعیین توالی از طریق شرکت ژن فن آوران به شرکت ماکروژن^{۱۳} تحویل داده شد و توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار کرماس پرو^{۱۴} اصلاح شد. سپس، با استفاده از ابزار بلاست^{۱۵} توالی با توالی های ثبت شده در پایگاه های داده اطلاعات ژنوم NCBI و Eztaxon مقایسه و میزان شباهت آن با سویه های مختلف ثبت شده تعیین شد (۳۱).

تحلیل فیلوژنتیک سویه های منتخب و سویه های مشابه آن با استفاده از نرم افزارهای Clustal X2، Bioedit و Mega 6 انجام شد و شکل ۶ فیلوژنتیک با استفاده از روش های Neighbor-joining انجام گرفت (۳۲). بررسی میزان اعتبار شاخه ها در درخت رسم شده با استفاده از الگوریتم Bootstrap Analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه گیری انجام شد (۳۳ و ۳۴).

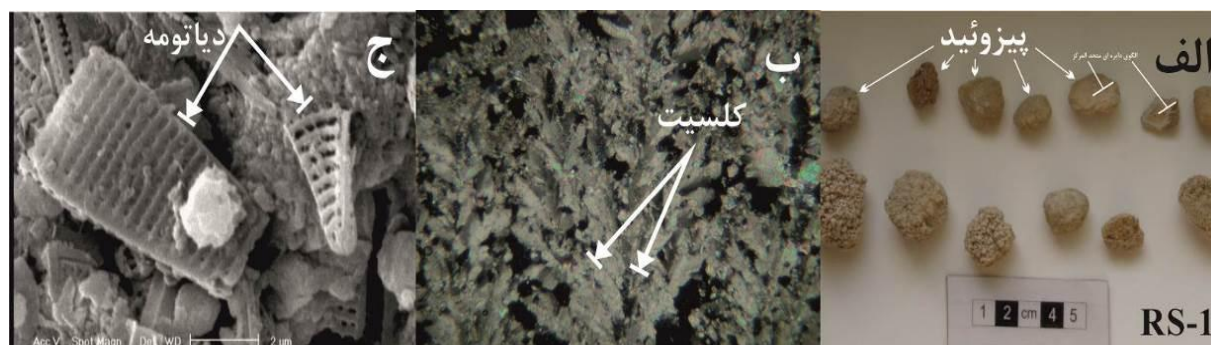
نتایج

مقاطع تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان بررسی شدند و سپس، تصویر SEM از نمونه های مناسب گرفته شد (شکل ۴ تا ۹).

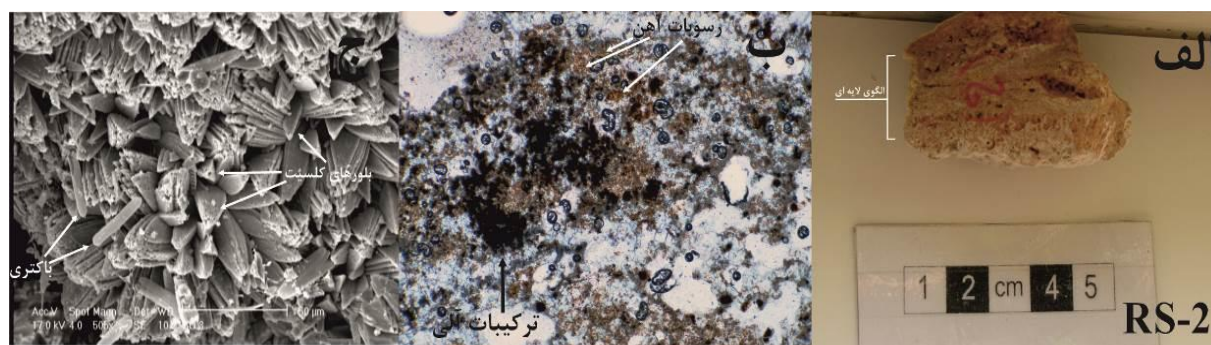
تأیید رسوب گذاری کلسیت توسط میکروسکوپ پلاریزان انجام شد، بدین صورت که بلورهای کلسیت در زیر نور پلاریزه به رنگ بژ تا خاکستری دیده می شوند، در حالی که بلورهای نمک یا هالیت^{۱۱} به علت اینکه زاویه بلور ۹۰ درجه دارند به اصطلاح خاموش می شوند یعنی تیره هستند و دیده نمی شوند. زاویه بلور کلسیت ۱۲۰ درجه است به همین علت زیر نور پلاریزه به رنگ بژ یا خاکستری دیده می شوند زیرا می توانند نور را از خود عبور دهند (شکل ۵).

تحلیل سویه های رسوب دهنده کربنات کلسیم: پس از تأیید وجود رسوب کلسیت دمای مناسب رسوب گذاری برای یک سویه در بین دماهای ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. میزان کربنات کلسیم از طریق فیلتراسیون با کاغذ صافی ۱۲/۵ سانتی متری با اندازه حفره ۴۲ میکرون و اتمن به دست آمد. تفاوت وزن فیلتر قبل و پس از فیلتراسیون نشان دهنده مقدار کربنات کلسیم است (۲۸) که میزان به شکل میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد^{۱۲} و در نهایت، میزان تولید رسوب با استفاده از روش یاد شده در بالا و میزان تغییرات اسیدیته با استفاده از اسیدیته متر مدل Multi7 برای سویه های طی ۲۱ روز و در دمای مناسب به دست آمده در آزمایش قبلی محاسبه شد (۲۹).

شناسایی مولکولی و رسم درخت فیلوژنتیکی: برای شناسایی مولکولی جدایه ها، ابتدا از آن ها بیومس گرفته شد. استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد و واکنش PCR با پرایمرهای عمومی 27F و (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و



شکل ۴- تصاویر نمونه سنگ RS-1 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) پیژوئیدها دارای الگوی رسوبی دایره‌ای متحد‌المركز هستند، ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که بلورهای کلسیت به شکل گنبدی‌هایی به رنگ بژ دیده می‌شود و ج) تصویر SEM از نمونه سنگی که دیاتومه‌ها به خوبی دیده می‌شوند.



شکل ۵- تصاویر نمونه سنگ RS-2 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) نمونه دارای الگوی رسوبی لایه‌ای است ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که ترکیبات آهن به رنگ قرمز و ترکیبات آلی به رنگ قهوه‌ای و سیاه دیده می‌شود و ج) تصویر SEM از نمونه سنگ که باکتری‌های باسیلی شکل به وضوح دیده می‌شود.



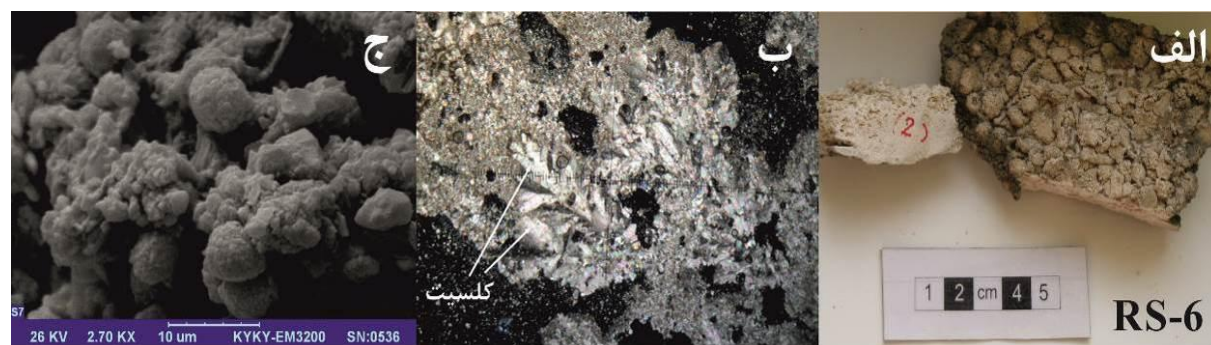
شکل ۶- تصاویر نمونه سنگ RS-3 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) الگوی رسوبی لایه‌ای در نمونه دیده می‌شود و همچنین رسوبات آهن دار که به رنگ قرمز دیده می‌شوند، ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که ترکیبات آهن دار به رنگ قرمز در کنار بلورهای کلسیت به رنگ بژ دیده می‌شوند و ج) تصویر SEM از نمونه سنگی که بلورهای کلسیت دیده شده و همچنین باکتری‌های کوکسی شکل دیده می‌شوند.



شکل ۷- تصاویر نمونه سنگ RS-4 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) نمونه دارای الگوی رسوبی لایه‌ای بوده و روی سنگ نشانه‌هایی از رسوبات ثانویه و همچنین فعالیت ارگانیک دیده می‌شود، ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که بلورهای کلسیت به رنگ بزرگ، رسوبات آهن به رنگ قرمز دیده می‌شوند، زمینه سیاه رنگ به علت استفاده از چسب اپوکسی است.

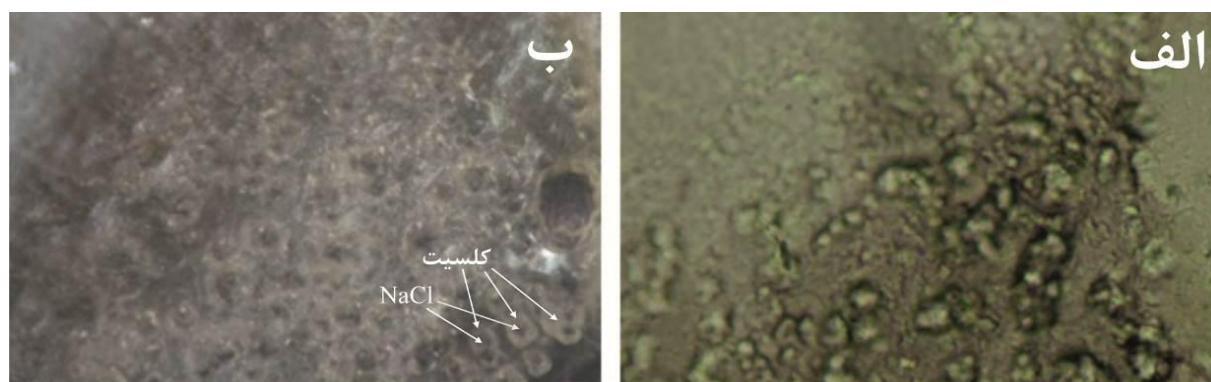


شکل ۸- تصاویر نمونه سنگ RS-5 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) پیروئیدها دارای الگوی رسوبی دایره‌ای متحد المکز هستند، ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که بلورهای کلسیت به شکل گنبدی به رنگ بزرگ دیده می‌شود و ج) تصویر SEM از نمونه سنگی که باکتری کوکسی شکل در نمونه دیده می‌شود.



شکل ۹- تصاویر نمونه سنگ RS-6 تهیه شده از چشمه بادآب سورت، الف) نمونه الگوی رسوبی لایه‌ای داشته و روی آن رنگ‌های سیاه دیده می‌شود که به علت فعالیت ارگانیک‌هایی مثل جلبک‌ها و گل‌سنگ‌ها است، ب) تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ پلاریزان که بلورهای کلسیت به رنگ بزرگ دیده می‌شود و ج) تصویر SEM از نمونه سنگی.

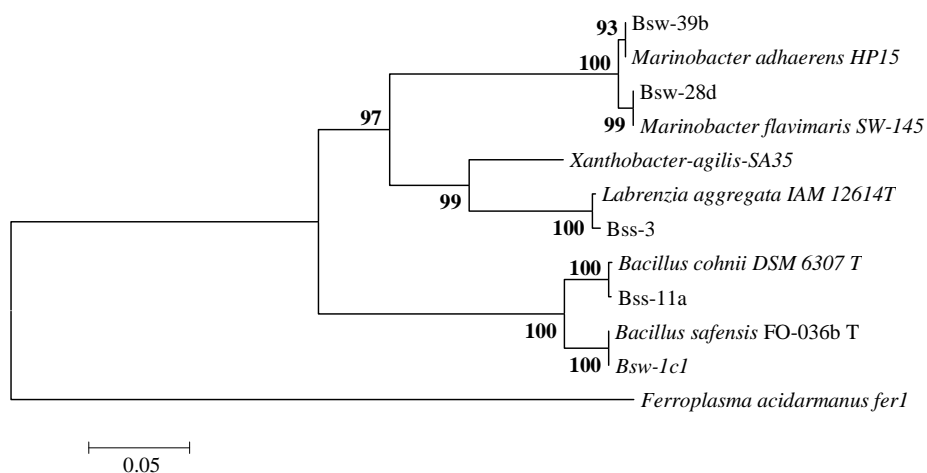
۱۴۶ جدایه‌ای که در مرحله جداسازی به دست آمده بود بر روی محیط B₄ کشت داده و پس از یک ماه بررسی شدند. مشاهده شد که ۵ جدایه Bsw-39b و Bsw-1c1، Bss-11a، Bsw-28d، Bss-3 توانایی رسوب کربنات کلسیم را دارند (شکل ۱۰). میزان شباهت آن‌ها به نزدیک‌ترین تاکسون در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۵- مشاهده بیومس میکروبی با میکروسکوپ نوری (شکل الف) و میکروسکوپ پلاریزان (شکل ب)، در شکل ب مکعب‌های نمک در نور پلاریزه به رنگ تیره دیده می‌شوند. رسوب کربنات کلسیم در زیر میکروسکوپ پلاریزان به رنگ بژ و خاکستری دیده می‌شود که شکل ب نمایان است و با فلش نشان داده شده است. در مرکز آن مکعب‌های مشکی رنگی حالت نمایان است.

جدول ۳- ویژگی‌های سویه‌هایی که توانایی رسوب کلسیت در محیط B₄ را داشتند

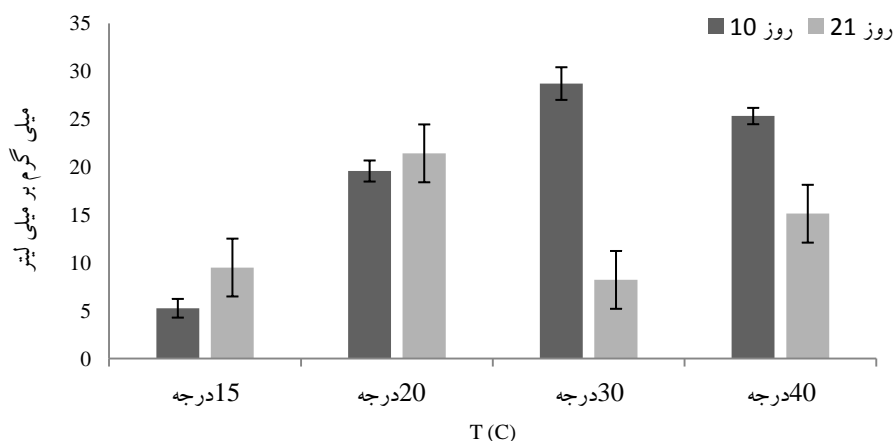
نام سویه	تاکسون مشابه	درصد شباهت	واکنش گرم	مورفولوژی
Bss-3	<i>Labrenzia aggregate</i> IAM 12614 ^T	۹۹/۶	منفی	باسیل
Bss-11a	<i>Bacillus cohnii</i> DSM 6307 ^T	۹۹/۷	مثبت	باسیل
Bsw-1c1	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b ^T	۹۹/۹	مثبت	باسیل
Bsw-28d	<i>Marinobacter flavimaris</i> SW-145 ^T	۱۰۰	منفی	باسیل
Bsw-39b	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15 ^T	۱۰۰	منفی	باسیل



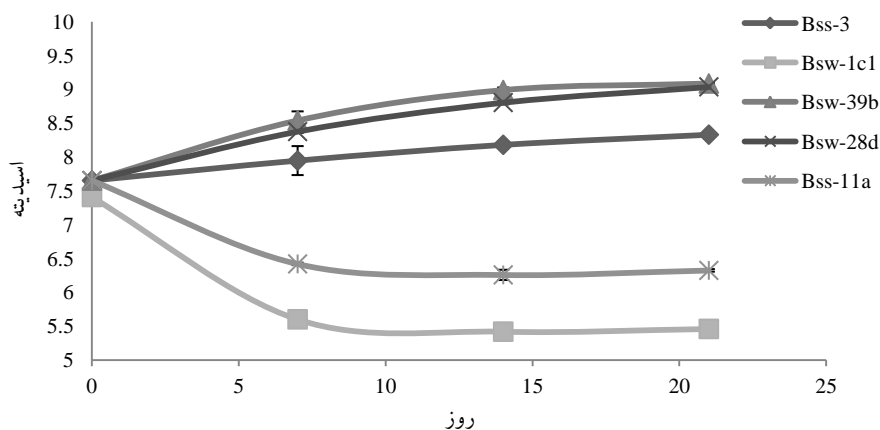
شکل ۶- درخت فیلوژنتیک مربوط به سویه‌های رسوب دهنده کربنات کلسیم با استفاده از روش Neighbor-joining. ضریب بوت استرپ ۱۰۰۰ و *Ferropasma acidarmanus fer1* به عنوان برون گروه استفاده شده است.

سویه Bss-3 برای انتخاب دمای مناسب رسوب گذاری انتخاب شد و آزمایش نشان داد که دمای مناسب ۳۰ درجه سانتی گراد است (شکل ۱۲). سپس، میزان رسوب و تغییرات اسیدیته برای ۵ سویه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در ۲۱ روز به دست آورده شد (شکل ۱۳ و ۱۴).

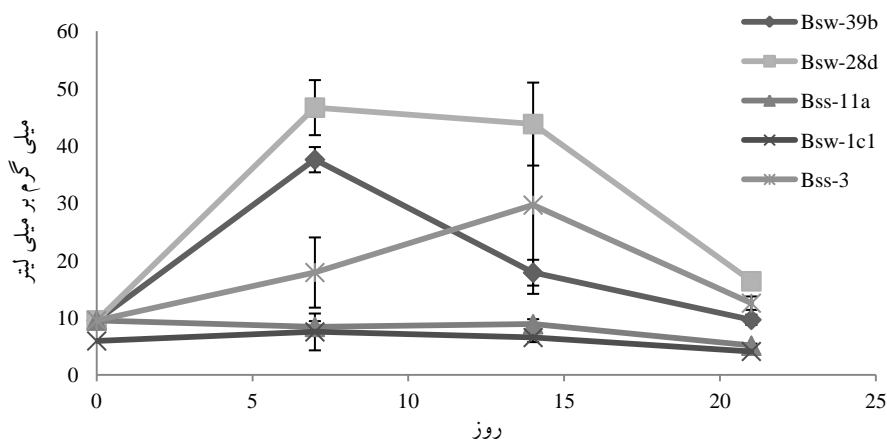
در بین این سویه ها، این توانایی برای نخستین بار است که برای Bss-3 گزارش شده است. درخت فیلوژنی سویه ها با روش نیبر جویینگ^{۱۶} و ضریب بوت استرپ^{۱۷} ۱۰۰۰ رسم شد. *Ferroplasma acidarmanus fer1* به عنوان برون گروه انتخاب شد و در شکل ۱۱ آورده شده است.



شکل ۷- میزان رسوب کربنات کلسیم در ۴ دمای ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی گراد برای سویه Bss-3، نتایج نشان می دهد که مناسب ترین دما ۳۰ درجه سانتی گراد است که برای انجام آزمایش های بعدی استفاده شد، ضریب خطا، خطاهای استاندارد در نسبت با میانگین است.



شکل ۸- تغییرات اسیدیته محیط کشت B₄ مایع برای سویه های رسوب دهنده کربنات کلسیم، ضریب خطا، خطاهای استاندارد در نسبت با میانگین است.



شکل ۹- تغییرات رسوب کربنات کلسیم در محیط کشت B₄ مایع برای سویه‌های رسوب دهنده کربنات کلسیم ضریب خطا، خطاهای استاندارد در نسبت با میانگین است.

بحث و نتیجه‌گیری

در ابتدا توالی لایه‌های سنگ‌های رسوبی منطقه بررسی شد (شکل ۲)، لایه‌های سنگی مربوط به دوران سوم زمین‌شناسی، دوره کواترنری و سری پلیوستوسن و پلیوسن هستند که مربوط به ۱/۶ میلیون سال پیش است. بیشتر تراورتن‌ها در این دوره شکل گرفته‌اند که با داده‌های قبلی مطابقت دارد (۱). سپس، موقعیت مکانی و زمانی چشمه بادآب سورت مشخص شد (شکل ۳). همان‌طور که مشاهده می‌شود، چشمه محدوده کوچکی دارد و سرچشمه‌های قدیمی هم در کنار آن دیده می‌شوند. زمانی که تشکیل رسوبات مانع از خارج شدن آب نشود چشمه به فعالیت خود ادامه می‌دهد و در نهایت، با مسدود شدن راه خروج آب چشمه از فعالیت می‌افتد (شکل ۱، ب) در شکل‌های ۲ و ۳ گسل‌ها و شکستگی‌هایی دیده می‌شود. این نشان دهنده آن است این منطقه از نظر فعالیت تکنونیک منطقه فعالی است به همین علت ترتیب لایه‌ها در منطقه یکسان نیست (۱).

سرچشمه‌ها می‌توانند از دو منشا باشند. یا از لایه‌های آهکی و دولومیتی باشند و یا از توده‌های تخریبی^{۱۸} منشا

گرفته باشند. بر همین اساس ترکیب یونی متفاوت خواهد شد. سرچشمه‌هایی که منشا دولومیتی و آهکی داشته باشند، غنی از کلسیم و منیزیم هستند و اسیدیته قلیایی دارند که پتانسیل رسوب کربنات کلسیم در این حالت بیشتر است. چشمه‌هایی سنگ‌های میزبان آن‌ها از نوع ماسه سنگی و شیلی است، غنی از گوگرد، ذغال، آهن و سیلیس هستند و به علت وجود گوگرد اسیدی می‌شود. سرچشمه غربی این شرایط را دارد، البته اسیدی بودن می‌تواند به علت CO₂ باشد که می‌تواند منشا کربناتی داشته باشد. داده‌های تحلیل یونی (جدول ۱) این موضوع را تأیید می‌کند. این داده‌ها نشان می‌دهد که سرچشمه شرقی از سنگ منشأهای آهکی، و سرچشمه غربی از سنگ میزبان شیلی سرچشمه گرفته‌اند. رنگ قرمز چشمه به علت وجود ترکیبات آهن است که منشا تخریبی دارد و رنگ سیاه ناشی از حضور سولفید آهن FeS است که در شرایط بی‌هوازی توسط فعالیت باکتری‌هایی مثل SRBها تولید می‌شوند. نتایج تحلیل نشان می‌دهد که هر دو سرچشمه حاوی آهن هستند که رنگ قرمز چشمه را تأیید می‌کند. در سرچشمه غربی

به رنگ بژ دیده می شود. هرچه این ها شفاف تر باشند نشان می دهد جنس رسوبات و سیمان شباهت بیشتری به هم داشته اند. رسوبات کلسیت را می توان در شکل ۸ و ۹ (RS-5 و RS-6) نیز مشاهده کرد. در تصویر پلاریزان شکل ۷ (RS-4) بلورهای کلسیت در کنار رسوبات دیگر دیده می شود این رسوبات با رنگ های مختلف نیلی، قرمز دیده می شود، رسوبات قرمز رنگ به علت وجود آهن در ترکیبات آن هاست.

در تصویر پلاریزان شکل ۵ و ۶ (RS-2 و RS-3) دایره های قرمز رنگ دیده می شود، این ها رسوبات آهن هستند. البته نواحی قهوه ای رنگ می تواند به علت وجود ترکیبات آلی (سیانوباکترها و جلبک ها) باشد. در مقاطع نازک میکروسکوپی در نور پلاریزان دایره های سیاه رنگ هم دیده می شود که این به علت حضور کارباندوم است. این پودر زمان ساییدن لایه نازک سنگ استفاده می شود. در لام ممکن است فضاهای خالی به رنگ سیاه دیده شود (RS-3,4، شکل ۶ و ۷) که این به علت استفاده از چسب است، به طور معمول برخی از سنگ های کربناته جنس سستی دارند که برای جدا نشدن و از هم پاشیده نشدن بافت سنگ با چسب اپوکسی اشباع می شوند. قطر لایه ها کمتر از ۲ میلی متر است (RS-1، شکل ۴) که نشان از سرعت بالای رسوب گذاری در این چشمه است.

در شکل ۷ (RS-4) دیده می شود که لایه های تشکیل شده دارای رسوبات آهن هستند که می تواند به علت وجود باکتری های اکسید کننده آهن باشد. عکس SEM نیز وجود باکتری های کروی را تایید می کند (۲۰).

در بررسی تاثیر گذاری میکروارگانیسم ها در رسوب گذاری با توجه به عکس های گرفته شده از

ابتدا آهن رسوب کرده و رسوبات بعدی خاکستری رنگ دیده می شوند، به این علت که ترکیبات آهن زودتر رسوب می کنند. با توجه به اینکه فاصله کمی بین دو سرچشمه است می توان نتیجه گرفت که منشا آب سرچشمه ها متفاوت بوده و اینکه لایه های سنگی مسیر عبوری آب های زیرزمینی سبب شده تا ترکیب یونی تغییر کند.

بررسی رابطه میکروب- محیط در ابتدا با روش میکروسکوپی انجام شد نتایج در شکل ۴ تا ۹ آمده است. الگوی رسوبی سنگ ها به شکل لایه ای (RS-2,3,4) و دایره ای متحدالمرکز (RS-1,5) بودند که به (RS-1,5) پیروئید گفته می شود. این ها در حوضچه ها تشکیل می شوند و نیاز به یک هسته اولیه برای تشکیل گسترش دارند (۲) که میکروارگانیسم ها ممکن است این نقش را ایفا کنند. در شکل ۶ (RS-3) لایه هایی به طور هماهنگ وجود دارد که نشان دهنده تغییرات روزانه بوده است (۳۵)، این در شکل ۴ هم دیده می شود که این به علت فعالیت سیانوباکترهاست. آن ها با جذب کربن دی اکسید شرایط را برای رسوب یافتن کلسیت فراهم می آورند (۳۶). همان طور که مشاهده می شود لایه های رسوبی می توانند به شکل دایره ای متحدالمرکز و لایه های روی هم باشد (شکل ۴ و ۶)، این نشان از شرایط تشکیل می دهد به این شکل که اگر به صورت لایه های متحدالمرکز باشد، نشان می دهد هسته اولیه وجود داشته و این هسته دارای حرکتی روبه جلو و عقب بوده. ولی زمانی که لایه ها روی هم باشد و حلقه ای نباشد، به این معناست که سطحی برای رسوب وجود داشته و این سطح ثابت بوده است.

در شکل ۴ و تصویر پلاریزان (RS-1) رسوبات گنبدی (هرمی) شکل کربنات کلسیم دیده می شود، که

رشد دارد و اینکه دمای آب و چشمه هم بین ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود که تایید کننده دمای مناسب رشد است.

سپس، میزان تولید رسوب و تغییرات اسیدیته توسط سویه‌ها در دمای ۳۰ درجه محاسبه شد. با توجه به داده‌های به دست آمده مشاهده شد که در همان هفته اول به بالاترین میزان تولید کلسیت می‌رسد و پس از آن میزان آن کم می‌شود که این می‌تواند با متابولیسم سلول ربط داشته باشد به همین علت باید تغییرات سلول‌های زنده و دارای فعالیت با این داده‌ها همراه شود.

داده‌های تغییرات اسیدیته (شکل ۱۳) نشان می‌دهد که در نسبت با اسیدیته اولیه تغییرات متفاوت بوده است (اسیدیته قبل از اتوکلاو روی ۸ تنظیم شد که پس از اتوکلاو روی ۷/۴ برای نمک ۳ درصد و ۷/۶ برای نمک ۵ درصد مشاهده شد). سویه Bss-3 پس از یک هفته اسیدیته را روی ۸ برده و این افزایش تا اسیدیته حدود ۸/۴ ادامه پیدا می‌کند. در صورتی که دو سویه Bsw-28d و Bsw-39b، اسیدیته محیط‌شان قلیایی‌تر شده و حتی اسیدیته ۹ هم برای روز ۲۱ مشاهده شد. این در حالی است که اسیدیته محیط دو سویه Bsw-1c1 و Bss-11a به سمت اسیدی شدن حرکت کرده و تا حدود ۵/۵ برای سویه Bsw-1c1 مشاهده و گزارش شد، این نتایج با داده‌های زامارنو^{۱۹} مطابقت دارد. در این مطالعه تغییرات اسیدیته هم افزایش و هم کاهش را نشان می‌دهد ولی میزان تغییرات کمتر از داده‌های این پژوهش است (۲۹). با توجه به اینکه رسوب کلسیت با تغییرات اسیدیته که توسط متابولیسم باکتریایی انجام می‌شود ربط دارد (۹)، می‌توان نتیجه گرفت که سه سویه Bss-3، Bsw-28d و Bsw-39b با تغییر اسیدیته سبب رسوب کلسیت می‌شوند، ولی دو سویه Bss-11a

میکروسکوپ الکترونی، باکتری‌ها و دیاتومه‌ها در بلورهای کلسیت مشاهده می‌شوند، این نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به عنوان هسته اولیه تشکیل بلور عمل کنند و با تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی سبب پیشرفت بلور شوند که در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۲۲).

در پژوهش حاضر، در بررسی با استفاده از کشت میکروبی روی تأثیر باکتری‌های هتروتروف در رسوب گذاری کلسیت، مشخص شد که ۵ سویه Bss-3، Bsw-28d و Bss-11a، Bsw-39b و Bsw-1c1 توانایی رسوب کربنات کلسیم را دارند. این ۵ سویه بیش‌ترین شباهت را به تاکسون‌های *Labrenzia aggregate* *Marinobacter flavimaris* SW- JAM 12614^T *Bacillus* *Marinobater adhaerens* HP15^T، 145^T *Bacillus safensis* FO- *cohenii* DSM 6307^T 036b^T داشتند. در مطالعات پیشین مشخص شده که باکتری‌های *Pseudomonas*، *Shewanella*، *Bacillus* و *Micrococcus* در رسوب گذاری تأثیر دارند (۳۷) (۳۸) ولی در مورد سویه Bss-3، نخستین بار است که این توانایی برای آن گزارش شده است. ویژگی‌های ریخت‌شناختی و درخت فیلوژنی سویه‌های رسوب دهنده کربنات کلسیم در جدول ۳ و شکل ۱۱ نشان می‌دهد که سویه‌های جداشده، همگی شکل باسیلی داشته و ۳ سویه گرم منفی بوده‌اند.

پس از تایید وجود رسوب کربنات کلسیم (شکل ۱۰) ابتدا دمای مناسب تولید رسوب برای سویه Bss-3 به دست آمد که دمای ۳۰ درجه بود (شکل ۱۱)، میزان تولید بلور در دمای پایین کم است که این را می‌توان به واکنش‌های رشد ربط داد. بیش‌ترین میزان تولید بین دماهای ۲۰ و ۳۰ درجه است که اشاره به دمای مناسب

داده‌های به دست آمده از پژوهش نشان می‌دهد محیط و میکروب‌ها در کنار هم تکامل می‌یابند. محیط و میکروارگانیسم‌ها از ابتدای حیات در کنار هم بوده‌اند و سبب تکامل یکدیگر شده‌اند و برای ثبات و ماندگاری هر دو باید در کنار هم وجود داشته باشند. بنابراین، برای حفظ زیستگاه‌های طبیعی باید این نکته را در نظر داشته باشیم. با افزایش فعالیت‌های بشری و دست‌ورزی زیستگاه‌ها که سبب تغییر شرایط محیطی زیستگاه‌ها و متعاقب آن تغییر جامعه میکروبی می‌شود در آینده نه چندان دور میکروارگانیسم‌های سازگار یافته با محیط از بین رفته و میکروارگانیسم‌های دیگر جایگزین می‌شوند که این حفاظت زیستگاه را به خطر می‌اندازد. البته حیات انسان هم وابستگی شدیدی به حیات اکوسیستم اطراف دارد. در انتها باید بیان کرد که باکتری‌های رسوب دهنده کلسیت کاربردهای بیوتکنولوژیک زیادی دارند (۱۵-۱۹) و از آن‌ها می‌توان در احیای محیط‌های کربناته از فعالیت افتاده استفاده کرد (۲۲).

تشکر و قدردانی

نگارندگان از همکاران خود در آزمایشگاه دانشگاه تهران و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران بخش میکروبی تشکر و قدردانی می‌کنند.

و Bsw-1c1 از راه دیگری سبب رسوب کلسیت می‌شوند. با توجه به اینکه پس از ۲۱ روز سلول‌ها وارد فاز سکون و مرگ می‌شوند احتمالاً این تغییرات متابولیکی سلول‌ها سبب کاهش میزان رسوب کلسیت می‌شوند به طوری که اندازه بلورهای کلسیت را تغییر می‌دهند (۲۹). در مطالعه زامارنو در تمام سویه‌ها مقدار سلول‌های فعال از روز اول تا هفته اول افزایش یافته بود و سپس، تا هفته سوم کاهش را نشان می‌داد (۲۹).

نمودار تغییرات رسوب کربنات کلسیم در طول ۲۱ روز (شکل ۱۴) نشان می‌دهد که دو سویه Bss-11a و Bsw-1c1 مقدار کمی تولید می‌کنند که این می‌تواند به علت اسیدی شدن محیط باشد. دو سویه Bsw-28d و Bsw-39b بیش‌ترین میزان رسوب را داشته، ۴۵/۶ و ۳۷/۵ میلی گرم که این مقادیر در همان هفته اول بوده و در روزهای بعد میزان رسوب کاهش می‌یابد. سویه Bss-3 بیش‌ترین میزان رسوب را در هفته دوم داشته، ۲۹/۶ میلی گرم که باز هم در هفته آخر این میزان کاهش می‌یابد. این داده‌ها در ابتدا نشان می‌دهد که میزان تولید رسوب رابطه مستقیم با فعالیت متابولیکی سلول‌ها دارد زیرا سلول‌ها با گذشت زمان از فاز لگاریتمی رشد خارج شده و وارد فاز سکون و مرگ می‌شوند. البته اسیدیته محیط باز هم افزایش می‌یابد که این نشان دهنده تمام شدن ماده غذایی و استفاده سلول‌ها از ذخیره‌های پروتئینی است که این سبب افزایش اسیدیته شده ولی سبب کاهش رسوب می‌شود که علت آن نامشخص است. البته این داده‌ها برای تایید بیشتر باید با آزمایش‌های دیگر مانند تحلیل XRD و SEM تایید و میزان تغییرات سلول‌های دارای فعالیت (سلول‌های زنده) و تغییرات فاز رشد انجام شود. همچنین، آزمایش می‌تواند در کشت ثابت و مداوم مقایسه شود.

References

- (1) Pentecost A. *Travertine*. Netherlands: Springer; 2005.
- (2) lak R., Mohammadi A., RAhimi E. Introducing Travertine Sour Spring, kiasar, Mazandaran as a geopark. First national conference: *Applied research on water resource of Iran*; Kermanshah 2011.
- (3) Fouke BW. Depositional Facies and Aqueous- Solid Geochemistry of Travertine-Depositing Hot Springs (Angel Terrace, Mammoth Hot Springs, Yellowstone National Park, USA): Reply. *Journal of Sedimentary Research* 2001; 71 (3): 497-500.
- (4) Riding R. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 2000; 47 (s1): 179- 214.
- (5) Russell MJ., Hall A. The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front. *Journal of the Geological Society* 1997; 154 (3): 377- 402.
- (6) Westall F., de Wit MJ., Dann J., van der Gaast S., de Ronde CE., Gerneke D. Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally- influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research* 2001; 106 (1): 93-116.
- (7) Allwood AC., Grotzinger JP., Knoll AH., Burch IW., Anderson MS., Coleman ML., et al. Controls on development and diversity of Early Archean stromatolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106 (24): 9548- 55.
- (8) Semikhatov M., Gebelein C., Cloud P., Awramik S., Benmore W. Stromatolite morphogenesis- progress and problems. *Canadian Journal of Earth Sciences* 1979; 16 (5): 992- 1015.
- (9) Dupraz C., Reid RP., Braissant O., Decho AW., Norman RS., Visscher PT. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth- Science Reviews* 2009; 96 (3): 141- 62.
- (10) Weiner S., Dove PM. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 2003; 54 (1): 1- 29.
- (11) Nealson KH. Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 1997; 25 (1): 403- 34.
- (12) Andres MS., Pamela Reid R. Growth morphologies of modern marine stromatolites: a case study from Highborne Cay, Bahamas. *Sedimentary Geology* 2006; 185 (3): 319- 28.
- (13) Konhauser K., Riding R. Bacterial biomineralization. *Fundamentals of geobiology Blackwell Publ* 2012: 105- 30.
- (14) Reid P., Dupraz C., Visscher P., Sumner D. Microbial processes forming marine stromatolites. In: *Fossil and Recent Biofilms*. Netherlands: Springer; 2003. p. 103- 18.
- (15) Warren LA., Maurice PA., Parmar N., Ferris FG. Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid- phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal* 2001; 18 (1): 93- 115.
- (16) DeJong JT., Fritzes MB., Nüsslein K. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* 2006; 132 (11): 1381- 92.
- (17) Gollapudi U., Knutson C., Bang S., Islam M. A new method for controlling leaching through permeable channels. *Chemosphere* 1995; 30 (4): 695- 705.
- (18) De Muynck W., Debrouwer D., De Belie N., Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and concrete Research* 2008; 38 (7): 1005- 14.
- (19) Le Metayer- Levrel G., Castanier S., Oriol G., Loubiere J- F., Perthuisot J- P.

- Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary geology* 1999; 126 (1): 25- 34.
- (20) Takashima C., Kano A., Naganuma T., Tazaki K. Laminated iron texture by iron-oxidizing bacteria in a calcite travertine. *Geomicrobiology Journal* 2008; 25 (3- 4): 193- 202.
- (21) Wright DT., Oren A. Nonphotosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporites through time. *Geomicrobiology Journal* 2005; 22 (1- 2): 27- 53.
- (22) Rodriguez- Navarro C., Jroundi F., Schiro M., Ruiz- Agudo E., González- Muñoz MT. Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation. *Applied and environmental microbiology* 2012; 78 (11): 4017- 29.
- (23) Cacchio P., Contento R., Ercole C., Cappuccio G., Martinez MP., Lepidi A. Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (L'Aquila- Italy). *Geomicrobiology Journal* 2004; 21 (8): 497- 509.
- (24) Sangwan P., Kovac S., Davis KE., Sait M., Janssen PH. Detection and cultivation of soil Verrucomicrobia. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71 (12): 8402- 10.
- (25) Mehrshad M., Amoozegar MA., Yakhchali B. Diversity of aerobic heterotrophic moderately halophilic and halotolerant bacteria from western coastal line of Urmia Lake with culture-dependent and culture-independent methods [Dissertation]. Iran: University of Tehran; 2011.
- (26) Boquet E., Boronat A., Ramos-Cormenzana A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 1973; 246: 527- 9.
- (27) Marvasi M., Visscher PT., Perito B., Mastromei G., Casillas-Martínez L. Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* etfA mutant. *FEMS microbiology ecology* 2010; 71 (3): 341- 50.
- (28) Zamarreño DV., Inkpen R., May E. Carbonate crystals precipitated by freshwater bacteria and their use as a limestone consolidant. *Applied and environmental microbiology* 2009; 75 (18): 5981- 90.
- (29) Zamarreño DV., May E., Inkpen R. Influence of environmental temperature on biocalcification by non- spring freshwater bacteria. *Geomicrobiology Journal* 2009; 26 (4): 298- 309.
- (30) Spencer JF., de Spencer ALR. *Public health microbiology: methods and protocols*. New York: Springer; 2004.
- (31) Chun J., Lee J- H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim BK., et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57 (10): 2259- 61.
- (32) Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics* 2004; 5 (2): 150- 63.
- (33) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39 (4): 783- 91.
- (34) Mehrshad M., Amoozegar M A., Yakhchali B., Shahzede Fazeli A. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (2): 49- 70.
- (35) Pentecost A. Formation of laminate travertines at Bagno Vignone, Italy. *Geomicrobiology Journal* 1994; 12 (4): 239- 51.

- (36) Pentecost A., Bayari S., Yesertener C. Phototrophic microorganisms of the Pamukkale travertine, Turkey: their distribution and influence on travertine deposition. *Geomicrobiology Journal* 1997; 14 (4): 269- 83.
- (37) Bundeleva IA., Shirokova LS., Bénézeth P., Pokrovsky OS., Kompantseva EI., Balor S. Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology* 2012; 291: 116- 31.
- (38) López- García P., Kazmierczak J., Benzerara K., Kempe S., Guyot F., Moreira D. Bacterial diversity and carbonate precipitation in the giant microbialites from the highly alkaline Lake Van, Turkey. *Extremophiles* 2005; 9 (4): 263- 74.

¹- Tivertion

²- Biologically-induced mineralization

³- Biologically-influenced mineralization

⁴- Alkanity engine

⁵- Olympus

⁶-Corel Draw X6

⁷- Google earth

⁸- Surfer 10

⁹- Perkin Elmer 100

¹⁰- Moderate halophilic medium

¹¹- Halite (NaCl)

^{۱۲}- در مقاله‌های بررسی شده واحد اندازه‌گیری کلسیت به شکل

میلی‌گرم بود که به علت نامشخص بودن در این پژوهش از واحد

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. به علت مناسب نبودن روش ممکن است

در محاسبه کلسیت اشتباهی رخ دهد که اجتناب‌ناپذیر است، البته این

روش بیشتر برای مقایسه کرنات کلسیم در بین سویه‌هاست و ضریب خطا

برای همه محاسبه می‌شود.

¹³- Macrogene

¹⁴- Chromas Pro 1.4

¹⁵- BLAST

¹⁶- Neighbor-joining

¹⁷- Boot Strap

¹⁸- Shale

¹⁹- Zamarreño

Studying of Biomineralization on Badab Sourt travertine deposit spring, Kiasar, Mazandaran Province

Javad Khansha

M.Sc. of Microbiology, Tehran University, Tehran, Iran, javad_kh85@yahoo.com

Mohammad Ali Amoozegar*

Associate Professor of Microbiology, Tehran University, Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

Mohsen Ranjbaran

Assistant Professor of Geology, Tehran University, Tehran, Iran, ranjbaran@khayam.ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Travertine results in the accumulation of calcium carbonate on karst springs, hot springs, small rivers and marshes. Badab Sourt is the travertine-maker spring that located in Mazandaran province and is the second natural place in Iran. It has two springheads with different characteristics and different colors and different sediments that give unique beauty to spring. Travertine is a good model to study the relationship between environment and microorganisms. This study centered on the influence of microorganisms on precipitation of calcium carbonate and isolation of microorganisms that have precipitation potential.

Materials and methods: Here, to assess effects of microorganisms on mineralization were used microscopic and culture methods; from stone samples, photos have gotten with SEM and polarizing microscope and from water sample bacteria were isolated. Mineralization function of bacteria was investigated with culturing them on B₄ medium and mineralization potential was approved by polarizing microscope.

Results: SEM photos showed microorganisms have effect on mineralization and can act as a nucleus in beginning of crystal production. Finally, five strains Bss-3, Bsw-28d, Bss-11a, Bsw-1c1, and Bsw-39b were isolated, which have ability to precipitate calcium carbonate. In between strain Bss-3 that has 99.6% similarity with taxon *Labrenzia aggregate* IAM 12614^T was the first report that has the ability to precipitate calcium carbonate and among the strains, strain Bsw-28d with precipitation of 45.6 mg / ml CaCO₃ was the best strain.

Discussion and conclusion: Microorganisms are important in the formation and evolution of their surrounding environments, thereby native microbes must be concerned for conserving and restoring the environments.

Key words: Travertine, Biomineralization, Badab Sourt Spring, Isolation, Scanning electron microscopy

* Corresponding author

Received: August 13, 2014 / **Accepted:** March 16, 2015