مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره اول (پیاپی ۳۴) بهار ۱۳۹۷
صفحات ۶۰-۵۱

Original Article

پایش باکتری های تولید کننده سیمان زیستی و تثبیت کننده خاک در زیستگاه های کویری ایران

مهدی کارگر[۱]، محمد کارگر[۲*]

[۱]کارشناسی ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران،
[۲]استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم.

چکیده

سابقه و هدف: یکی از روش های پیشنهاد شده به منظور تثبیت و استحکام خاک رسوب کلسیت به واسطه تحریک میکروبی (MICP) است. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های تجزیه کننده اوره موثر در ایجاد سیمان زیستی از خاک های خشک و کویری انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۲۸۰ نمونه جمع آوری شده ازخاک های مناطق مختلف ایران انجام شد. کشت نمونه ها بر روی محیط اوره براث انجام شد. سپس سنجش فعالیت آنزیم اوره آز باکتری های تجزیه کننده اوره انجام شد. باکتری های فعال توسط آزمون های متداول بیوشیمیایی و روش *16S rRNA* تعیین هویت شدند. تولید سیمان زیستی در باکتری های اوره از مثبت جداسازی شده در pH و دما های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و با سویه استاندار *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC 11589 مقایسه گردید. در نهایت کریستال های کربنات کلسیم در شرایط بهینه دمای ۲۵ درجه سلسیوس و pH ۸/۵ با آزمون بلورشناسی پرتو ایکس (XRD) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: ۳۰٤ جدایه از ۵ جنس مختلف جداسازی گردید. جنس های *باسیلوس* و *اسپوراسارسینا* از مهم ترین باکتری های تجزیه کننده اوره جداسازی از مناطق خشک و کویری بودند. بیشترین میزان کربنات کلسیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و pH ۸/۵ تولید شد. ۱۰ جدایه برتر موثر در تولید آنزیم اوره آز و سیمان زیستی با استفاده از روش مولکولی تعیین هویت و در بانک ژنی ثبت گردیدند. همچنین تولید سیمان زیستی سویه های برتر با استفاده از آزمون XRD تایید گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که در تولید کریستال های کربنات کلسیم مقدار اوره و کلرید کلسیم نقش اساسی دارند. همچنین باکتری *اسپوروسارسینا پاستورویی* از مهم ترین باکتری های تولید کننده سیمان زیستی بود. از این رو بهینه سازی شرایط رشد در حد بالاتر به منظور استفاده کاربردی از این باکتری در تثبیت شن های روان، استحکام زمین و پل سازی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: سیمان زیستی، *اسپوروسارسینا پاستورویی*، اوره آز، ژن *16S rRNA*.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۶

مقدمه

تمایل به استفاده از فناوری های زیستی در مهندسی زمین شناسی در چند سال اخیر افزایش یافته است (۱). یکی ازاین تکنیک های ارزشمند، تولید سیمان زیستی رسوب کلسیت به واسطه تحریک میکروبی (Microbiologically Induced Calcite Precipitation=MICP) یا رسوب دادن باکتریایی کلسیت می باشد (۲). رایج ترین نوع MICP رسوب غیر مستقیم است. در این روش pH به واسطه فعالیت میکروبی (معمولا هیدرولیز اوره) تغییر می کند و یون های بی کربنات تولید می شود و در نهایت باعث رسوب دادن شیمیایی $CaCO_3$ در حضور یون های کلسیم در بین فضاهای

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۹۱۷۳۱٤۹۲۰۳ پست الکترونیک: mkargar@jia.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

خالی ذرات خاک می شود (۳). فسیل های استروماتولیت (stromatolites) به جامانده در طبیعت که قدمت شان به ۳ میلیارد سال می رسد، در واقع کربنات کلسیم های ناشی از میکروارگانیسم های محیطی هستند. امروزه نیز در طبیعت میکروارگانیسم های مولد کربنات کلسیم می توانند موجب بهم چسبیدن ذرات خاک شوند (٤).

برخی از گونه های باکتری ها به واسطه داشتن آنزیم اوره آز می توانند موجب افزایش pH سیستم و تولید یون های کربنات شوند (واکنش ۱-). در گستره pH بالاتر از ۸/۳ تا ۹، کربنات کلسیم شروع به رسوب می نماید. در این شرایط pH به سوی خنثی شدن به تدریج کاهش می یابد (واکنش ۲ و ۳). با این حال pH نهایی محلول به میزان واکنش و غلظت سوبسترا بستگی دارد (۵ و ٦).

$$1) CO(NH_2)_2 + 3H_2O \rightarrow 2HNH_4^+$$
$$2) HCO_3^- \rightarrow CO_3^{2-} + H^+$$
$$3) Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3$$

به طور طبیعی ۳ گروه از ارگانیسم ها فتوسنتز کننده هایی مانند سیانوباکترها و جلبک ها دارای توانایی تثبیت CO2، باکتری های احیا کننده سولفات، مسئول احیای چند مرحله ای (disassimilatory) سولفات و ارگانیسم هایی موثر در چرخه نیتروژن دارای توانایی آمونیفیکیشن اسید های آمینه/احیای نیترات/هیدرولیز توانایی القای رسوب میکروبی کربنات کلسیم (MCP) و ایجاد سیمانی زیستی (biocementation) به عنوان یک محصول جانبی و مفید را دارند (٦).

باکتری *اسپوروسارسینا پاستوریی* (*Sporosarcina pasteurii*) با نام قدیمی، *باسیلوس پاستوریی* (*Bacillus pasteurii*)، یکی از مهمترین باکتری های تولید کننده آنزیم اوره آز و هیدولیز کننده اوره است. گونه های *باسیلوس* به دلیل پراکندگی در طبیعت و مقاومت نسبت به عوامل شیمیایی و فیزیکی، نسبت به شرایط محیطی سازگاری مناسبی دارند (۷).

اولین گزارش در مورد نقش فعالیت میکروبی در رسوب کلسیت توسط استاکس فیشر (Stocks-Fischer) و همکاران در سال ۱۹۹۹ ارائه شده است (۵).

تکنیک MICP و سیمان زیستی میکروبی کاربرد های متنوعی در مهندسی زمین شناسی دارد. به عنوان نمونه می توان به افزایش مقاومت برشی خاک به منظور تقویت قدرت تحمل زیر ساخت، پایداری شیب، تسهیل حفاری و تونل و همچنین بهبود خاک در برابر نفوذ آب به درون خاک در هنگام زلزله و کاهش نشست زیر بنا (پی) اشاره نمود. با این حال استفاده موفقیت آمیز از MICP در کاربردهای مهندسی نیازمند تعیین موثرترین مواد شیمیایی لازم برای اجرای MICP و همچنین بهینه سازی فرایند برای استفاده در زمینه هایی با شرایط مختلف می باشد (٦ و ۸). این پژوهش با هدف تعیین هویت باکتری های بومی القا کننده سیمان زیستی و موثر در استحکام زیستی خاک جدا شده از مناطق کویری ایران انجام شد.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری و جداسازی باکتری ها: به صورت مقطعی، ۲۸۰ نمونه خاک از نقاط مختلف کویری ایران جمع‌آوری گردید. نمونه ها در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل و در محیط کشت اوره براث (شرکت مرک آلمان) حاوی ۱ مولار اوره به منظور غنی سازی باکتری های تولید کننده آنزیم اوره آز کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند (۸). سپس از محیط غنی کننده به محیط اوره آگار حاوی ۱ مولار اوره به صورت خطی کشت و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. خالص سازی نهایی جدایه ها در محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱ مولار اوره انجام شد (۹).

ب) سنجش فعالیت اوره آز: برای تعیین کیفیت و شناسایی آنزیم اوره آز از محیط کشت کریستینسن اوره آگار (Christensen's Urea Agar Base= UAB) (شرکت مرک آلمان) استفاده شد. در مورد تمامی جدایه ها به صورت مستمر تغییر رنگ محیط های شیب دار UAB به رنگ صورتی در دمای های ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۰). برای بررسی فعالیت آنزیم اوره آز از روش

Archive of SID

www.SID.ir

هدایت الکتریکی استفاده شد. برای این منظور، یک میلی لیتر از محیط براث باکتریایی (NB-U) به ۹ میلی لیتر محلول اوره ۱/۱۱ مولار افزوده شد. ثبت نهایی هدایت الکتریکی پس از ۵ دقیقه گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس به وسیله جریان سنج الکتریکی انجام شد. فعالیت اوره آز به واسطه میزان افزایش هدایت الکتریکی به صورت mS/min سنجش گردید (۱۱).

ج) بررسی تولید کربنات کلسیم: برای این منظور از محیط پایه شامل ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ مولار کلرید کلسیم و اوره، ۱/۲۵ گرم بی کربنات سدیم و ۷ گرم در لیتر کلرید آمونیوم و ۱۰ میلی لیتر از باکتری تکثیر یافته (به میزان 10^9 سلول در هر میلی لیتر) استفاده شد. میزان تولید کربنات کلسیم در محیط مایع و گستره pH ۵/۵، ۷، ۸/۵ و ۱۰ و دمای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلیسیوس با سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC 11589 به عنوان کنترل بررسی گردید. سپس رسوب حاصل توسط دستگاه XRD مورد ارزیابی قرار گرفت (۹).

د) محاسبه $CaCO_3$ در محیط کشت باکتری: با استفاده از نمودار استاندارد، مقدار آزمون نمونه باکتریایی، توسط تیتراسیون با EDTA به دست آمد که با بافر آمونیاک قلیایی شد. نقطه پایانی با استفاده از تغییر رنگ شناساگر اریو کروم بلک تی (EBT= Eriochrome Black T) از صورتی مایل به قرمز به رنگ آبی فلزی ارزیابی شد. تایید حضور رسوب کربنات کلسیم در محیط توسط اسپکتروسکوپی لیزری رامان (۱۲) و آزمون بیوشیمیایی کلسیم انجام شد. سپس با تهیه رقت متوالی منحنی رشد ترسیم گردید (۱۳).

د) تعیین هویت بیوشیمیایی: از آزمون های متداول مانند رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، اندول، حرکت، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، مصرف سیترات و آزمون های تخمیر قندها مطابق جداول کتاب سیستماتیک برگی به منظور تعیین هویت بیوشیمیایی جدایه استفاده شد (۱۱).

ه) شناسایی مولکولی: برای این منظور کشت جدایه های باکتری ها در محیط لوریل برتانی براث (شارلو، اسپانیا) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس انجام شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNP™ (سیناکلون، ایران)، انجام شد و غلظت‌های DNA به روش OD (Organizational development) اندازه‌گیری شد.

به منظور تکثیر ژن *16S rDNA* باکتری و دستیابی به طول تقریبی ۹۹۶ جفت بازی از پرایمر های U1F: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' و U2R:5'-ATCGG (C/T)TACCTTGTTACGACTTC-3' به ترتیب مربوط به نوکلئوتیدهای ۵۱۸ تا ۵۳۷ ژن *16S rDNA* و نوکلئوتیدهای ۱۵۱۳ تا ۱۴۹۱ استفاده گردید (۱۴). واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۵ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر 10X، ۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ میکرومول)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر DNA الگو و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (ABI, USA) با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، گسترس در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات به PCR به ژل آگاروز ۱/۲ درصد واجد اتیدیوم بروماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. محصولات PCR پس از خالص سازس از ژل توسط شرکت بیونیر کره جنوبی توالی یابی شد. توالی های مورد نظر بلاست و با ثبت در سایت NCBI کد رهگیری ثبت دریافت گردید.

ز) تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تحلیل داده ها از نسخه بیستم نرم افزار *SPSS* و آزمون های آماری مربع کای و دقیق استفاده شد. مرز معنی داری در $p<۰/۰۵$ قرار داده شد. همچنین از نرم افزار *Mega 6* و روش Neighbour-Joining به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد.

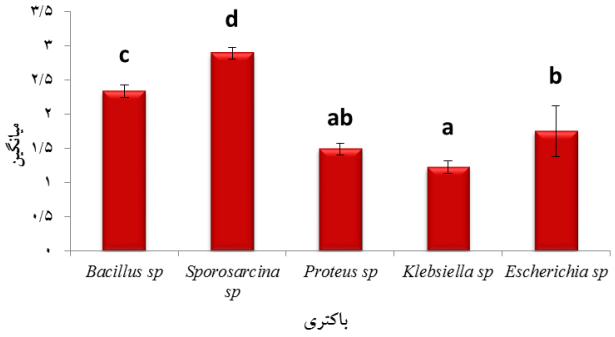
Archive of SID

www.SID.ir

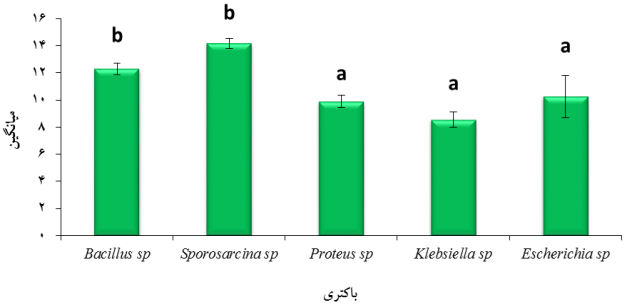
یافته ها

از مجموع نمونه های خاک مورد بررسی، تعداد ۳۰٤ باکتری اوره آز مثبت جداسازی گردید. ۱۲۲ (٤۰/۱۳٪) باکتری مربوط به جنس *باسیلوس*، ۸۳ (۲۷/۳۰٪) باکتری از جنس *اسپوروسارسینا*، ۵۰ (۱٦/٤۵٪) باکتری از جنس *پروتئوس*، ۳۷ (۱۲/۱۷٪) باکتری از جنس *کلبسیلا* و ۱۲ (۳/۹۵٪) باکتری از جنس *اشریشیا* بودند. شرایط بهینه فعالیت آنزیم اوره آز و تولید کربنات کلسیم در pH ۵/۵، ۷، ۸/۵ و ۱۰ و دمای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلیسیوس جدایه ها با سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC 11589 به عنوان کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین شرایط فعالیت آنزیم اوره آز و بیشترین ترشح کربنات کلسیم pH ۸/۵ و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس مشخص گردید. با ارزیابی قدرت تجزیه اوره جدایه ها مشخص گردید که در بین ۵ جنس شناسایی شده *اسپورسارسینا* قوی ترین قدرت تجزیه کنندگی را دارد. همچنین اختلاف معنی داری بین جنس *اسپورسارسینا*، نسبت به ۵ جنس دیگر در تجزیه اوره و فعالیت آنزیم اوره آز وجود داشت. اما جنس *کلبسیلا* کمترین میزان فعالیت آنزیم اوره آز نسبت به سایر جدایه ها را داشت (نمودار ۱). ارزیابی ترشح کربنات کلسیم جدایه ها در شرایط بهینه نشان داد که میزان ترشح کربنات کلسیم باکتری *اسپورسارسینا* اختلاف معنی داری با جنس های *پروتئوس*، *کلبسیلا* و *اشریشیا* دارد. اما با جنس *باسیلوس* در ترشح کربنات کلسیم اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۲).

از بین جدایه های تجزیه کننده اوره ۱۰ جدایه که بیشترین میزان تولید آنزیم اوره آز و ترشح کربنات کلسیم داشتند، تعیین



نمودار ۱: مقایسه میانگین قدرت آنزیم اوره آز جدایه ها.



نمودار ۲: مقایسه متوسط تولید کربنات کلسیم در جدایه ها.

هویت مولکولی شدند. سپس توالی های مورد نظر در بانک اطلاعات NCBI به وسیله ی نرم افزار بلاست نوکلئوتید هم تراز (جدول ۱) و پس از تایید ثبت ژن شدند (نمودار ۳).

تولید کربنات کلسیم از کلرید کلسیم در محیط مایع در جدایه های *اسپوروسارسینا پاستورویی* KT862894 و سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC 11589 که هر دو حداکثر توانایی ترشح آنزیم اوره آز داشتند، با آزمون XRD مورد ارزیابی قرار گرفت. تولید کربنات کلسیم در جدایه *اسپوروسارسینا پاستورویی* KT862894 پس از ۲٤ ساعت ۲۲ میلی گرم در میلی لیتر و میزان باقی مانده کلرید کلسیم پس از ۲٤ ساعت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر محیط کشت مایع بود (نمودار ٤).

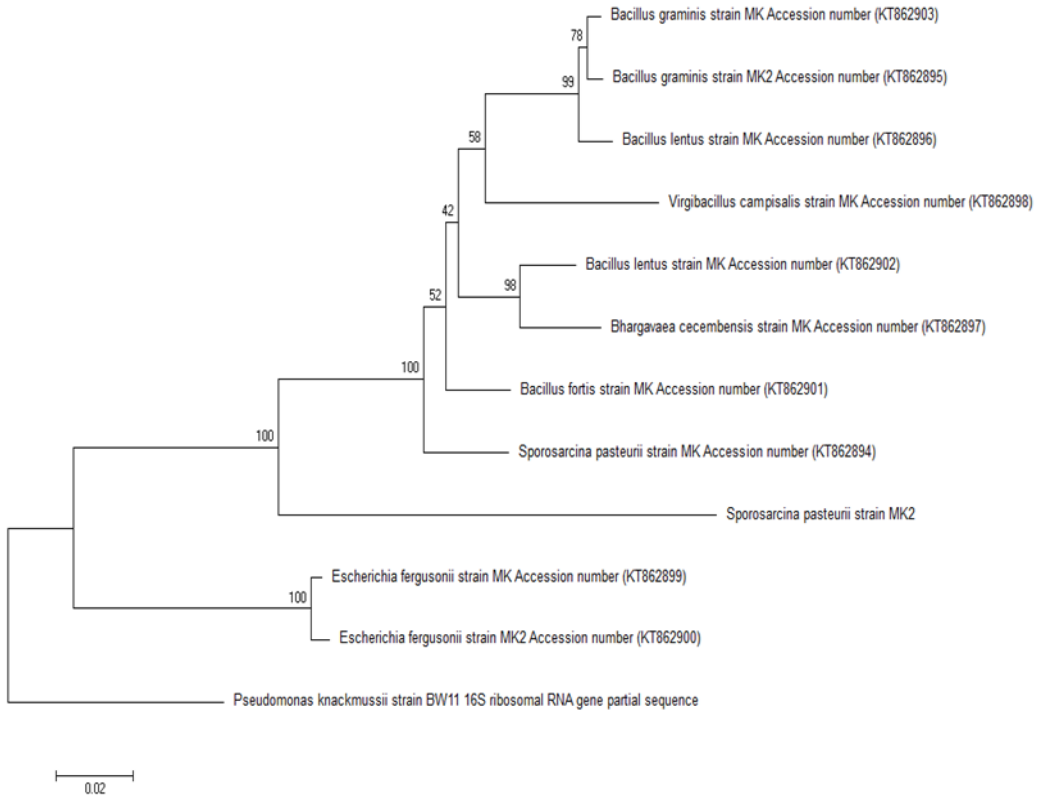
اما در سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC 11589، تولید کربنات کلسیم پس از ۲٤ ساعت ۳۰ میلی گرم در میلی لیتر و در کلرید کلسیم باقی مانده پس از ۲٤ ساعت

جدول ۱: باکتری های تعیین هویت شده مولکولی دارای آنزیم اوره آز قوی و تولیدکننده کربنات کلسیم.

ردیف	نام باکتری	شماره دسترسی (ثبت ژن)
۱	*Bacillus fortis strain*	KT862901
۲	*Bacillus lentus strain*	KT862902
۳	*Bacillus graminis*	KT862903
۴	*Sporosarcina pasteurii*	KT862894
۵	*Bacillus graminis*	KT862895
۶	*Bhargavaeace cembensis*	KT862897
۷	*Bacillus lentus*	KT862896
۸	*Virgibacillus campisalis*	KT862898
۹	*Escherichia fergusonii*	KT862899
۱۰	*Escherichia fergusonii*	KT862900

Archive of SID

www.SID.ir

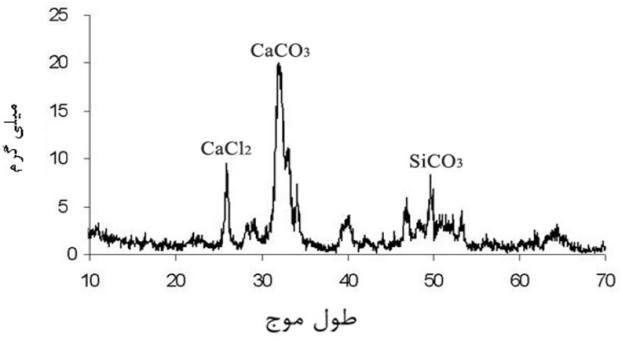


نمودار ۳: درخت فیلوژنتیکی و درصد تشابه باکتری های فعال در تولید سیمان زیستی، با استفاده از نرم افزار Neighbour-Joining و ضریب Boot Srap هـزار. باکتری *سودوموناس* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

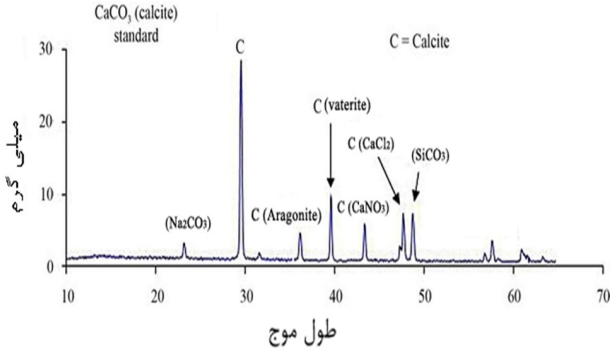
۲ میلی گرم در میلـی لیتـر محیـط کشـت مایـع مشـاهـــده گردید (نمودار ۵).

بحث

در تحقیق حاضر ۲۸۰ نمونه خاک های کویری از سراسر ایـران جمع آوری شد. پس از کشت بـرروی مـحـیـط اوره بـراث باکتری های تجزیه کننده اوره برروی محیط جامد اوره آگـار جداسازی و به منظور نگهداری برروی محیط نوترینـت آگـار حاوی ۱ درصد اوره نگهداری گردیدند. میزان فعالیت آنـزیـم اوره آز نیز مورد بررسی قرار گرفت و باکتری ها از لحاظ تولید کربنات کلسیم در محیط مایع بررسی شدند. بیشترین فعـالـیـت آنزیم اوره آز در باکتری های جنس *اسپوروسارسینا* و کمتـریـن



نمودار ٤: آزمون XRD تولید کربنات کلسیم در مـحـیـط مـایـع جـدایـه *اسپوروسارسینا پاستورویی* KT862894



نمودار ۵: آزمون XRD در محیط مایع باکتری *اسپوروسارسینا پاستـرویـی* ATCC 11589

Archive

www.SID.ir

فعالیت در جنس *کلبسیلا* مشاهده گردید. همچنین بیشترین میزان تولید کربنات کلسیم در جنس *اسپوروسارسینا* و *باسیلوس* مشاهده گردید. در ضمن ارتباط معنی داری بین فعالیت آنزیم اوره آز و تولید کربنات کلسیم مشاهده گردید.

در این پژوهش از کلرید کلسیم به عنوان منبع کلسیم برای تولید کربنات کلسیم استفاده شد. در تحقیق حاضر ترشح کربنات کلسیم در محیط مایع انجام گرفت. برای پرورش و تکثیر باکتری از محیط حاوی ۲۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱ مولار اوره و کلسیم طبق آزمایشات چوی (Choi) و همکاران در سال ۲۰۱۷ استفاده شد (۱۷).

وایفین (Whiffin) و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای سنجش تولید کربنات کلسیم از محیط پایه شامل ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۵/۰ مولار کلرید کلسیم و اوره ، ۱/۲۵ گرم بی کربنات سدیم و ۷ گرم در لیتر کلرید آمونیوم و ۱۰ میلی لیتر از باکتری تکثیر یافته به تعداد 10^9 سلول در هر میلی لیتر استفاده کردند (۱۵). در این پژوهش میزان تولید کربنات کلسیم در محیط مایع اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کربنات کلسیم (۲٤ میلی گرم در میلی لیتر) در شرایط pH ۸/۵ و دمای ۲۵ درجه سلیسیوس تولید می گردد. میزان ترشح کربنات کلسیم در سویه استاندارد برابر با ۳۰ میلی گرم در هر میلی لیتر محیط مایع در شرایط بهینه مشاهده گردید.

الطاوادی (Al-Thawadi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ و وان پاسین (Van Paassen) و همکاران در سال ۲۰۰۹ با ارزیابی عوامل موثر بر رسوب $CaCO_3$ توانستند ۱۳۰ میلی گرم کلسیت را در هر گرم شن درغلظت ۰/۵ مولار محلول سیمان زیستی تولید کنند. پژوهشگران یاد شده ثابت کردند تولید کربنات کلسیم در غلظت های بالاتر اوره و کلرید کلسیم اثر مهار کنندگی بر فعالیت اوره آز دارد و بطور چشمگیری از تولید کربنات کلسیم جلوگیری می شود (٦ و ۹).

تحقیقات بسیار کمی در مورد جداسازی باکتری های تجزیه کننده اوره صورت گرفته است. هدف اصلی ما در این پژوهش، پایش سویه های بومی مناطق مختلف کشور به منظور دست یابی به هدف کاربردی استفاده از آن ها به ویژه به منظور تثبیت شن های روان و کنترل ریزگرد ها در پژوهش های تکمیلی بود. الطاوادی (Al-Thawadi) و همکاران در سال ۲۰۰۸، با روش مشابه پژوهش حاضر پایش باکتری های دارای فعالیت اوره آز بالا را انجام دادند. محققین یاد شده موفق به جداسازی دو سویه MCP11 و MCP1 از خاک محلی شدند که آنزیم های اوره آز بسیار قوی داشتند. اگرچه در سایر پژوهش ها نیز ترشح کلسیت به واسطه تولید آنزیم اوره آز *اسپوروسارسینا پاستوریی* نیز گزارش شده است، اما با توجه به ترشح مقادیر قابل توجه کربنات کلسیم در جدایه های انتخابی مورد پژوهش، امکان بهینه سازی تولید در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی و با خوگیری امکان تولید صنعتی شان حتی در شرایط غیر استریل وجود دارد (۹).

در پژوهش یاد شده، سویه MCP11 متعلق به گروه *باسیلوس* بود که قرابت زیادی به *اسپوروسارسینا پاستوریی* دارد. در تحقیق حاضر نیز جنس های *اسپوروسارسینا* بیشترین فعالیت آنزیم اوره آز را داشتند. همچنین در پژوهش حاضر ۱۰ سویه برتر در تولید آنزیم اوره آز و ترشح کربنات کلسیم ژن تعیین توالی و در بانک ژن به ثبت رسیدند.

وایفین (Whiffin) و همکاران در سال ۲۰۰۷ و الطاوادی (Al-Thawadi) و همکاران در سال ۲۰۰۸، به منظور به منظور تولید سیمان زیستی از باکتری *اسپوروسارسینا پاستوریی* دارای فعالیت اوره آز بالا و مقاومت زیاد استفاده نمودند. محققین یاد شده پیشنهاد نمودند که یکی از دلایل عمده استحکام خاک در برخی از مناطق دنیا می تواند وجود *اسپوروسارسینا پاستوریی* باشد (۹ و ۱۵).

همچنین تحقیقات وان پاسین (Van Paassen) و همکاران در سال ۲۰۰۹ و الطاوادی (Al-Thawadi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده شد که یون سدیم در تشکیل کربنات کلسیم و نوع پایدار کلسیت اثر دارد. نتایج ما نیز در تحقیق حاضر نشان داد که وجود بی کربنات سدیم می تواند شرایط لازم به منظور تشکیل کلسیت را فراهم سازد. از این رو می توان فرض کرد که کربنات کلسیم در صورتی تشکیل می شود که یون های سدیم و کلسیم موجود باشند. به نظر می رسد که این فرایند تا

Archive of SID

www.SID.ir

زمان فراهم سازی کلرید کلسیم به میزان کافی ادامه خواهد یافت. با این حال ضرورت انجام مطالعات تکمیلی بیشتر به منظور بررسی اثرات کامل این فرایند وجود دارد (٦ و ٩).

وایفین (Whiffin) و همکاران در سال ۲۰۰۷، استفاده از نیترات کلسیم را به دلیل احتمال احیای آن توسط باکتری ها و فراهم سازی یون های کلسیم را پیشنهاد نمودند (۱۵). با این وجود در غلظت های زیاد این ترکیب امکان مهار فعالیت اوره آز وجود دارد. این مساله در پژوهش های وایفین و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز تایید شده است. به این ترتیب تحقیقات بیشتری به منظور بررسی اثرات آن در غلظت های پایین در شرایط سمنتاسیون وایجاد سیمان زیستی مورد نیاز است (۱).

در تحقیق حاضر اثر یون نیکل برروی آنزیم اوره آز سنجیده نشد. وایفین (Whiffin) و همکاران در سال ۲۰۰۷ و الطاوادی (Al-Thawadi) و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند، افزودن ۱۰ میکرو مولار از کلرید نیکل باعث افزایش فعالیت اوره آز تا ۳ برابر می شود. یکی از مهمترین مواد مورد استفاده در محیط کشت در این پژوهش، NH_4Cl بود. این ترکیب می تواند به عنوان سوبسترای اصلی برای ایجاد پروتئین مورد استفاده قرار گیرد. همچنین باکتری ها برای رشدشان به یون های نیکل ($NiCl_2$) و کلسیم ($CaCl_2$) به عنوان کاتالیزور به منظور بهبود در فعالیت اوره آز و اکسیژن به دلیل طبیعت هوازی نیاز دارند. از طرفی ضرورت انجام مطالعات بیشتر برای تعیین تاثر دما بر روی رشد باکتری ها و حضور هر گونه کاتالیزور اضافی وجود دارد (۹ و ۱۵).

در تحقیقاتی که لاگزامانا (Laxmana) و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی اثر pH و دما و میزان اوره و کلرید انجام دادند، نشان دادند که نوع و اندازه کریستال های تشکیل شده بستگی به دما، pH، سطوح اشباع شدگی و مواد موجود دیگر دارد (١٦). تولید آنزیم اوره آز تا دمای ۷۰ درجه سلیسیوس ادامه پیدا می کند اما دمای بالاتر از ۷۰ درجه سلیسیوس می تواند باعث تخریب سلول ها و دمای پایین موجب مهار کامل فعالیت اوره آز شود (۹). در این صورت نقطه دخالت برای کنترل کریستال های تولید شده هریک از سطوح اشباع شدگی سیستم از طریق کنترل سرعت هیدرولیز اوره و حضور مواد معدنی دیگر در محلول است که سبب ترجیح نوعی از رسوب نسبت به نوع دیگر می شود. اما مطالعات بیشتری برای بررسی اثر حضور این مواد معدنی بر فرآیند سمنتاسیون و غلظت های مورد نیاز باید انجام شود (۹). استفاده از سیمان زیستی برای بهبود وضعیت خاک و تثبیت شن های روان به دلیل سبز بودن تکنیک از اولویت های تحقیقاتی می باشد (۱۷).

نتیجه گیری

فعالیت آنزیم اوره آز عامل اصلی در کنترل تولید سیمان زیستی است. بدین صورت که بطور مستقیم با کنترل سرعت هیدرولیز اوره غلظت تولید کربنات کلسیم را کنترل می نماید. در نتیجه انواع کریستال های رسوب شده را تحت تاثیر قرار می دهد. استفاده از سویه های بومی در محیط طبیعی به دلیل سازگاری سویه ها با شرایط محیطی می تواند تولید سیمان زیستی را افزایش دهد. از این رو امکان استفاده از سیمان زیستی به منظور تثبیت شن های روان و به عنوان جایگزین مناسب روش های سنتی تثبیت شن و ریز گرد ها مانند مالچ پاشی وجود دارد. با توجه به مشکلات زیست محیطی ریز گردها در ایران، ارزیابی پتانسیل کاربردی باکتری تولید کننده سیمان زیستی به منظور تثبیت شن های روان و ترمیم آثار باستانی پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و شرکت دانش بنیان زیست فناوری یاخته صبا آرنا به دلیل حمایت های مادی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Whiffin VS, Lambert JWM, Van Ree CCD. Biogrout and biosealing–pore-space engineering

Archive of SID

www.SID.ir

with bacteria. Geostrata-Geo Institute for ASCE. 2005; 36: 13-16.

2. Rajesh KV, Leena Ch, Vishakha B, Manisha Th. Bio-mineralization and bacterial carbonate precipitation in mortar and concrete. Biosci Bioengin. 2015; 1: 5-11.

3. Dhami NK, Alsubhi WR, Watkin E, Mukherjee A. Bacterial community dynamics and biocement formation during stimulation and augmentation: implications for soil consolidation. Front Microbiol. 2017; 8(1267): 17.

4. Periasamy A, Chang-Ho K, Yu Jin Sh, Jae Seong So. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springer Plus. 2016; 2 (250): 1-26.

5. Bnuerlein E. Biomineralization of unicellular organisms: An unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. Angew Chem Int. 2003; 42: 614-641.

6. Van Paassen LA. Biogrout-ground improvement by microbially induced carbonate precipitation. Delft, the Netherlands, Delft University of Technology. 2009: 195.

7. Brennan EW, Lindsay WL. Reduction and oxidation effect on the solubility and transformation of iron oxides. Soil Sci Soc America J. 1998; 62: 930-937.

8. Torkzaban S, Tazehkand SS, Walker SL, Bradford SA. Transport and fate of bacteria in porous media: coupled effects of chemical conditions and pore space geometry. Water Resources Res. 2008; 44: 1-12.

9. Al-Thawadi SM. High strength *in situ* biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Ph.D. thesis. Perth Western Australia. Mudroch University. 2008; 264.

10. Qian C, Wang R, Cheng L, Wang J. Theory of microbial carbonate precipitation and its application in restoration of cement-based materials defects. Chin J Chem. 2010; 28: 847-857.

11. Rodriguez-Navarro C, Rodriguez-Gallego M, Ben Chekroun K, Gonzalez-Munoz MT. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralization. Appl Env Microbiol. 2003; 69: 2182-2193.

12. Wilson DC, Greenfield EM, Crenshaw MA. Ionotropic nucleation of calcium carbonate by molluscan matrix. Amer Zool. 1984; 24: 925-932.

13. Worrell E, Price L, Martin N, Hendriks C, Ozawa Meida L. Carbon dioxide emissions from the global cement industry. Ann Rev Energy Environ. 2001; 26: 303-329.

14. Rahmani S, Forozandeh M, Mosavp M, Rezaeej A. Detection of bacteria by amplifying the *16S rRNA* gene with universal primers and RFLP. Med J Islam Repub Iran. 2006; 19(4): 333-338.

15. Whiffin VS, van Paassen L, Harkes MP. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiol J. 2007; 24: 417-423.

16. Laxmana R, Sri R, Manjusha A, Arun Kumar M. Bio cement: An eco friendly construction material. Int J Curr Eng Technol. 2015; 5(4): 2880-2883.

17. Choi SG, Chu J, Brown RC, Wang K, Wen Zh. Correction to "sustainable biocement production via microbially induced calcium carbonate precipitation: Use of limestone and acetic

Archive of SID

www.SID.ir

acid derived from pyrolysis of lignocellulosic biomass". ACS Sustainable Chem Eng. 2017; 5 (6): 5183-5190.

18. Maleki M, Ebrahimi S, Asadzadeh F, Emami Tabrizi M. Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. Int JEnviron Sci Technol. 2016; 13(3): 937-944.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 1, April 2018

Original Article

Monitoring of biocement- and biogrout- producing bacteria in desert habitats of Iran

Mehdi Kargar[1], Mohammad Kargar[2]

[1]M.Sc., Young Researchers and Elite Club, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
[2]Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Microbially induced carbonate precipitation (MICP) is one of the proposed methods for soil stabilization and strengthening. The aim of this study was to isolate and characterize biocement-producing ureolytic bacteria from arid soils.

Materials & Methods: In this cross-sectional descriptive study, 280 soil samples were collected from different areas of Iran. Samples were cultured using urea broth medium. Urease-positive bacteria were assessed for the level of urease activity. Identification of active strains was performed based on conventional biochemical tests and *16S rRNA* gene sequencing. Optimum temperature and pH conditions for biocement production were evaluated in urease-positive bacteria and was compared with sporosaicina pasteurii (ATCC 11589) strain. Finally, calcium carbonate crystals were assessed byX-ray diffraction (XRD) crystallography test at the temperature of 25 °C and pH of 8.5 as optimal conditions.

Results: 304 strains were isolated from 5 different bacterial genera. *Bacillus* and *Sporosarcina* were the major ureolytic isolates of arid regions. The most amount of calcium carbonate was produced at the temperature of 25 °C and a pH of 8.5. Ten most effective isolates in the production of urease enzymes and biocement were identified by molecular analysis and subsequently registered in NCBI Genbank. In addition, biocement production by selected isolates was confirmed by XRD test.

Conclusion: Our results showed that the amount of urea and calcium chloride plays an important role in calcium carbonate crystals production. *S. pasteurii* was one of the most important biocement-producing bacteria. Therefore, optimization of growth conditions in higher scale is recommended for further applications in stabilizing the sand, ground strength and bridging.

Keywords: Biocement, *Sporosarcina pasteurii*, Urease, *16S rRNA* gene.

Correspondence to: Mohammad Kargar

Tel: +98 9173149203

E-mail: mkargar@jia.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(1): 51-60.

Archive of SID

www.SID.ir