Nova Biologica Reperta 7(1): 37-45 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.1.37

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۱، صفحات ۳۷ الی ۴۵ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست مولد اوره‌آز و مطالعه تولید نانوکریستال آن‌ها

مریم حدادی و غلامرضا قزلباش
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
مسئول مکاتبات: غلامرضا قزلباش، rghezelbash@scu.ac.ir

چکیده. باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز می‌توانند با تولید اوره‌آز در حضور اوره و کلسیم نانوکریستال‌های کلسیت تولید کنند. رسوب کلسیت طی فعالیت میکروبی فرایندی است که موجب سیمانی شدن ذرات خاک در طبیعت می‌شود. هدف از این بررسی جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست مولد اوره‌آز به منظور رسوب کلسیت در خاک‌های شور بود. نمونه‌های طبیعی اعم از خاک و آب‌های شور برای این منظور انتخاب شدند. ابتدا با استفاده از محیط‌های TSB حاوی نمک باکتری‌های نمک دوست و سپس با استفاده از محیط‌های اختصاصی حاوی اوره و فنل رد باکتری‌های مولد اوره‌آز جداسازی شدند. جدایه‌های مولد اوره‌آز با آزادسازی آمونیوم موجب قلیایی شدن محیط کشت و تشکیل هاله صورتی رنگ اطراف کلنی‌ها می‌شدند. سپس باکتری‌های منتخب که هاله بیشتری داشتند طی سنجش آزادسازی آمونیوم به روش نسلر تحت بررسی قرار گرفتند. توانایی یا عدم توانایی تولید نانوکریستال جدایه‌ها با کشت به مدت ۱۰ روز بر روی محیط رسوبی حاوی درصد نمک‌های متفاوت تحت بررسی قرار گرفت. مجموعا ۱۱۰ جدایه نمک دوست جداسازی شد که از این میان ۵۸ جدایه مولد اوره‌آز بودند. مطالعات میکروسکوپی کلنی‌ها نشان داد که تنها ۶ جدایه بر روی محیط‌های رسوبی قادر به تولید کریستال هستند. جدایه ۶ به منظور مطالعات بیشتر انتخاب و خصوصیات کریستال‌های آن طی تحلیل‌هایی توسط XRD و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مجهز به EDX تحت بررسی قرار گرفت. مطالعات فعالیت اوره‌آزی نشان داد که این جدایه دارای قدرت آزادسازی آمونیوم به میزان ۲۰/۸۶ میلی‌مولار آمونیوم بعد از ۱۸ ساعت است. این باکتری طی تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد و مقایسه توالی 16S rRNA آن تشابه ۹۹/۹۲ درصدی با استافیلوکوکوس زایلوسوس نشان داد و در بانک ژنومی NCBI با شماره دسترسی MG655155 ثبت شد. این مطالعه نشان داد که این باکتری در محیط فاقد نمک و محیط حتی با نمک ۱۰ درصد قادر به تولیدکلسیت است. امروزه تلاش‌های زیادی در جهت تولید سیمان‌های پاک و زیستی انجام شده است و از همین رو استفاده از باکتری‌های متحمل به نمک مولد اوره‌آز کاندیداهای مناسبی به منظور سیمان سازی زیستی در محیط‌های شور است.

واژه‌های کلیدی. پراش اشعه ایکس، سیمان زیستی، کلسیت، نانوکریستال، میکروسکوپ الکترونی روبشی

The isolation of halophilic urease-producing bacteria and the study of their nano-crystal production

Maryam Haddadi & Gholam Reza Ghezelbash
Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Correspondent author: Gholam Reza Ghezelbash, rghezelbash@scu.ac.ir

Abstract. Urease-producing bacteria can precipitate calcite nano-crystals by producing urease in the presence of urea and calcium. Calcite precipitation resulting from microbial activity is a process which causes cementation of soil particles in nature. The purpose of this study was to isolate urease-producing halophilic bacteria in order to precipitate calcite in saline soil. Natural samples, including soil and saline waters, were selected for this purpose. At First, halophilic bacteria were isolated by salt-containing TSB medium. Then, a selective medium containing phenol red and urea facilitated the isolation of urease-producing bacteria. Hydrolysis of urea by urease causes alkalization of the medium and the formation of pink halo around colonies. Finally, the best isolate was selected for further study by measuring the release of ammonium by the Nessler method. The ability or inability of isolates to produce calcite was investigated by culturing the isolates on sedimentary medium with different salt concentrations for 10 days. In total, 110 halophilic isolates were isolated, among which 58 isolates had the ability of urease production. The microscopic studies of colonies showed that only 6 isolates were able to produce crystals on precipitation medium. Isolate 6 was selected for further study and then analyzed by X-ray diffraction crystals on precipitation medium. Isolate 6 was selected for further study and then analyzed by X-ray diffraction (XRD)

Received 18.02.2018/ Revised 11.06.2019/ Accepted 16.06.2019/ Published 04.04.2020
دریافت ۱۳۹۶/۱۰/۲۹/ اصلاح ۱۳۹۸/۰۳/۲۱/ پذیرش ۱۳۹۸/۰۳/۲۶/انتشار ۱۳۹۹/۰۱/۱۶

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]

and scanning electron microscope (SEM) equipped with an energy dispersive X-ray (EDX) detector. Studies of urease activity showed that this strain released 20.86 mM ammonium after 18 hours. This bacterium was identified by biochemical and molecular analyses and the comparison of its 16S rRNA gene sequence showed 99.92% similarity with the similar gene sequence in *Staphylococcus xylosus* and then this sequence was submitted in NCBI database with the accession number MG655155. This isolate was able to produce calcite in free salt medium, with salinity up to 10%. Nowadays, many efforts have been made to produce environmental-friendly cements, and therefore, the use of urease-producing halophilic bacteria is an appropriate candidate for bio-cementing in saline environments.

Keywords. biocement, calcite, nanocrystal, scanning electron microscope, X-ray diffraction

مقدمه

آنزیم‌ها بالقوه‌ترین بیوکاتالیست‌ها برای بسیاری از واکنش‌ها هستند و استفاده بیوتکنولوژیکی آن‌ها در این سال‌ها بسیار افزایش یافته است. اوره‌آز یک آنزیم حاوی نیکل در گیاهان، برخی بی‌مهره‌ها و تعدادی از میکروارگانیسم‌ها است که موجب هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی اکسید کربن می‌شود (Mobley et al., 2001; Dhami et al., 2016). رسوب میکروبی کربنات کلسیم (MICP) پدیده‌ای است که بر اساس فعالیت اوره‌آزی میکروارگانیسم‌ها بوده و می‌توانند برای سیمان‌سازی زیستی و محکم‌سازی خاک در مهندسی ژئوتکنیک استفاده شوند (Stabnikov et al., 2013). تولید سیمانی که در ساختمان‌سازی و مقاوم‌سازی بناهای ساختمانی و همین‌طور در مهندسی محیطی و شهرسازی استفاده می‌شود، فرایندی انرژی‌بر است و از نظر زیست محیطی یک فرایند نامطلوب محسوب می‌شود. تولید جهانی سیمان جدا از نیاز به ۵ درصد مصرف انرژی به علاوه تولید آن موجب انتشار حدود ۱۵درصد CO_2 در طبیعت می‌شود. از همین روست که امروزه تلاش‌های زیادی در جهت تولید سیمان‌های پاک و زیستی انجام شده است. تولید نانو کلسیت میکروبی طی فعالیت اوره‌آزی باکتری‌های مولد اوره‌آز یکی از این سیمان سازی‌های زیستی است. تولیدکریستال کلسیت بر روی سطوح ذرات خاک طی فرایند MICP توسط باکتری‌های مولد اوره‌آز در حضور اوره و یون‌های کلسیم موجب تشکیل کلسیت بر روی ذرات خاک و چسبیدن آن‌ها به‌هم می‌شود (Stabnikov et al., 2013; Arias et al., 2015). کریستال‌های مختلف کربنات کلسیم مانند کلسیت و دولومیت در طبیعت وجود دارند که باکتری‌ها به عنوان عواملی مهم برای تولید و رسوب این مواد معدنی مطرح هستند. معروف‌ترین آن باکتری‌های تجزیه کننده اوره هستند که طی فعالیت اوره‌آزی خود اوره را به دی اکسید کربن و آمونیاک هیدرولیز می‌کنند. آمونیاک با آب واکنش داده و موجب تولید آمونیوم و یون هیدروکسید می‌شوند. یون‌های هیدروکسید با دی اکسید کربن واکنش داده و موجب تولید کربنیک اسید می‌شوند. کربنیک اسید حاضر با کلسیم واکنش داده و موجب تولید کریستال‌های کربنات کلسیم می‌شوند. جدا از نقش این آنزیم در تولید این کریستال‌ها، می‌توان از این آنزیم در حذف فلزات از آب دریا نیز استفاده کرد (Arias et al., 2015).

باکتری‌های نمک دوست باکتری‌هایی هستند که برای رشد به کلرید سدیم نیاز دارند. کمی نمک‌دوست به ۳-۲ درصد، نمک‌دوست‌های معتدل به ۱۰-۵ درصد، باکتری‌های شدیدا نمک دوست آن‌هایی هستند که به منظور بهترین رشد به بیش از ۱۰ درصد کلرید سدیم نیاز دارند. باکتری‌های غیر نمک‌دوست نیز آن‌هایی هستند که که برای رشد به ۲-۰ درصد کلرید سدیم نیاز دارند. اهمیت باکتری‌های مولد اوره‌آز هالوفیل این است که می‌توان از این باکتری‌ها و آنزیم‌های آن‌ها در محیط‌های طبیعی حاوی نمک به هر منظور بیوتکنولوژیکی از جمله سیمانی کردن خاک‌های شور استفاده کرد (Oren, 2002). باکتری‌های مولد اوره‌آز که برای سیمان‌سازی زیستی خاک‌های شور به‌کار می‌روند باید در محیط ژئوتکنیکی با غلظت بالای نمک فعال باشند. بنابراین باکتری‌های مولد اوره‌آز (UPB) نمک‌دوست، متحمل به نمک و قلیادوست بایستی انتخاب ارجح به منظور سیمانی شدن زیستی این محیط‌ها باشند. اوره‌آز میکروبی برای سیمان سازی زیستی باید در غلظت بالای نمک معدنی (مثل $CaCl_2$) و pH بالای ۸/۵ فعال باشد. رایج‌ترین سویه مولد کلسیت میکروبی سویه متحمل به نمک و آلکالوفیل *Sporosarcina pasteurii* است که در مطالعات زیادی از MICP استفاده شده است (Stabnikov et al., 2013).

باکتری‌ها به عنوان جایگاه‌های هسته‌ساز در رسوب کربنات کلسیم اثر می‌گذارند. به دلیل حضور گروه‌های با بار منفی روی دیواره سلولی باکتری، در pH خنثی، یون‌های فلزی با بار مثبت می‌توانند به سطح باکتری‌ها متصل شوند. اتصال یون‌های فلزی (مثل کلسیم) و متعاقب آن واکنش با آنیون‌هایی مثل کربنات انجام شده و نمک نامحلول کلسیم کربنات به وجود می‌آید (De Muynck et al., 2010). مطالعات نشان داد که سویه نمک‌دوست معتدل *Deleya halophila* جداسازی شده از سواحل مدیترانه علاوه بر ویژگی‌های رشدی و نیازهای نمکی دارای توانایی بسیار خوبی در رسوب کلسیت است (Rivadeneyra et

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]

al., 1996). چندین جنس از باکتری‌های نمک‌دوست گزارش شده که در زیستگاه‌های دریایی کربنات‌ها را رسوب می‌دهند که می‌توان *Halomonas*، *Deleya*، *Flavobacterium*، *Actinobacteria* و *Salinivibrio* را نام برد. این باکتری‌ها توان رشد در طیف وسیعی از غلظت‌های اسمزی را دارند که آن-ها را جهت مطالعه تاثیر غلظت‌های مختلف نمکی روی رسوب کربنات مناسب می‌سازد (Bansal et al., 2016). هدف از این بررسی جداسازی باکتری‌های نمک دوست مولد اوره‌آز است که با تحمل در شرایط نامساعد محیطی قادر به تولید کلسیت و متعاقبا سیمانی شدن این محیط‌ها هستند.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست

پنج گرم از نمونه خاک (خوزستان، کیش) یا پنج میلی‌لیتر از نمونه آب (کیش، آب قنات اصفهان) را در ۴۵ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل به‌مدت چند ساعت شیک شد و بعد از رسوب‌شدن خاک از محلول رویی روی محیط TSB و لوریا برتونی فاقد نمک اضافی و حاوی درصدهای مختلف نمک کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه گرماگذاری شدند (Carpa et al., 2014; Vahed et al., 2011).

جداسازی باکتری‌های مولد اوره‌آز

باکتری‌های جداشده در مرحله قبل در این مرحله به منظور تولید اوره‌آز تحت بررسی قرار گرفتند. برای این منظور هر یک از جدایه‌های خالص شده در مرحله قبل را بر روی محیط اختصاصی حاوی ۳ درصد TSB، ۲۰-۰ درصد کلرید سدیم، ۰/۰۰۱۲ درصد سولفات منگنز هفت آبه، ۰/۰۰۲۴ درصدکلرید نیکل شش آبه، ۰/۰۰۱ درصد فنل رد ، ۲درصد اوره ، ۱/۵ درصد آگار (pH=۶/۸-۷/۳) کشت داده شد. جدایه‌های تولیدکننده اوره‌آز با آزادسازی آمونیوم ناشی از هیدرولیز اوره باعث قلیایی شدن محیط کشت و تشکیل رنگ صورتی می‌شوند (Stabnikov et al., 2013).

جداسازی باکتری‌های مولد کلسیت

به منظور مطالعه توانایی جدایه‌های منتخب در تولید نانوکریستال‌های کربنات کلسیم از محیط کشت اختصاصی رسوبی حاوی ۰/۳ درصد TSB، ۲/۵درصد کلسیم کلرید، ۰/۲۱۲ درصد بیکربنات سدیم، ۱درصد آمونیوم کلرید، ۲درصد اوره، ۱/۵ درصد آگار (pH =۸) و غلظت‌های مختلف نمک از صفر تا ۲۰ درصد استفاده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز حضور کریستال‌ها روی کلنی‌های فوق توسط میکروسکوپ نوری (×۴۰) بررسی شدند (Chahal et al., 2011).

سنجش توانایی تجزیه اوره

به منظور بررسی رشد و آزادسازی آمونیوم، هر جدایه به صورت شبانه بر روی محیط اوره آگار حاوی ۵ درصد نمک کشت و در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری شد. پس از رشد، یک لوپ از باکتری فعال فوق به محیط مایع حاوی اوره منتقل و پس از رسیدن کدورت آن به ۰/۸-۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به نسبت ۱ درصد به محیط کشت مایع حاوی اوره با ۵ درصد نمک به عنوان محیط تولید تلقیح شد. سپس در ساعت‌های مشخص از محیط کشت نمونه‌گیری شد و فعالیت اوره‌آزی باکتری از طریق روش اندازه‌گیری آمونیوم آزاد شده با استفاده از معرف نسلر سنجش و منحنی تولید آمونیوم و منحنی رشد رسم شد. طبق این نتایج بهترین زمان تولید آنزیم مشخص شد.

اندازه‌گیری آمونیوم آزاد شده توسط باکتری

مقدار آمونیوم آزاد شده از فعالیت اوره‌آزی طی کشت بسته با استفاده از معرف نسلر تعیین شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت براث حاوی باکتری به میکروتیوب منتقل و با rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ را با ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف نسلر ورتکس و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و جذب نمونه‌ها در OD با ۴۵۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. مقدار آمونیوم نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با سولفات آمونیوم مشخص شد.

تحلیل‌های XRD ، SEM و EDX

کلنی‌هایی که دارای ذرات رسوب یافته کریستال در مطالعه میکروسکوپی بودند با استفاده از یک لوپ به آرامی برداشت شد و به یک شیشه ساعت تمیز انتقال داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک و پودر شدند و درون میکروتیوب منتقل شدند. نمونه‌های فوق به منظور تحلیل‌های EDX وSEM به شرکت آریا الکترون اپتیک تهران و به منظور تحلیل XRD به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان ارسال شدند.

شناسایی باکتری

جدایه مولد نانوکلسیت با استفاده از تست‌های موفولوژی، بیوشیمیایی (Brenner et al., 2005) و مولکولی شناسایی شد. جهت آنالیز مولکولی، استخراج ژنوم با روش دستی جوشاندن انجام شد. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ناحیه‌ای از ژن 16S rRNA از پرایمرهای عمومی ۲۷F و ۱۴۲۹R که توسط شرکت سیناژن سنتز شده بود استفاده شد. پرایمرهای رفت 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' و برگشت 5'

'TAAGGAGGTGATCCAGCC-3- موجب تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی یک میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکو مول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (۵u/µl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM) ، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر آنزیم (۱۰X) ، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ mM)، ۱ میکرولیتر DNA الگوی باکتریایی و ۱۷/۰۵میلی لیتر آب مقطر استریل انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad آلمان با شرایط دمایی ۴ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Hoffman & Arnold, 2010) . کیفیت محصول PCR طی الکتروفورز بر روی ژل ۱ درصد آگارز مشخص و سپس به شرکت زیست فناوران رنا (اصفهان) ارسال شد تا توالی آن مشخص شود. توالی به دست آمده در سامانه بین‌المللی NCBI با توالی‌های موجود در GenBank مقایسه شد و نزدیک‌ترین سویه‌های باکتریایی بر اساس توالی‌های 16S rRNA تعیین و سپس ثبت شد.

نتایج

جداسازی باکتری‌های نمک دوست مولد کلسیت

از کل ۱۱۰ جدایه نمک دوست جداسازی شده، ۵۸ جدایه جداسازی شده دارای فعالیت اوره‌آزی بودند که از میان این ۵۸ جدایه، ۶ جدایه بر روی محیط اختصاصی حاوی اوره و فنل رد هاله بهتری داشته‌اند و به عنوان جدایه‌های منتخب استفاده شدند. جدایه ۶ که از آب قنات در اصفهان جداسازی شده بود به دلیل تولید کلسیت در غلظتهای بالای نمک به منظور مطالعات بیشتر انتخاب شد. شکل (۱) نمای میکروسکوپی کریستال‌های تشکیل شده توسط جدایه ۶ بر روی محیط رسوبی را نشان می‌دهد.

منحنی رشد و تولید آمونیوم

جدایه ۶ بیشترین آمونیوم را در ساعت ۱۸ رشد خود به مقدار ۲۰/۸۶ میلی مولار در محیط کشت اولیه آزاد می‌کرد. شکل (۲) منحنی رشد و آزادسازی آمونیوم را در این جدایه نشان می‌دهد.

تحلیل‌های XRD

تصاویر (۳)، (۴) و (۵) نتایج حاصل از XRD کلنی‌های خشک شده جدایه ۶ در محیط رسوبی با غلظت‌های مختلف نمک را نشان می‌دهد. طبق تحلیل XRD جدایه ۶ قادر بود در محیط رسوبی فاقد نمک اضافی و همین‌طور محیط رسوبی حاوی ۵ درصد و ۱۰ درصد نمک نانو کریستال کلسیت تولید کند. مطالعات XRD به علاوه دیگر کریستال‌ها در محیط رسوبی فاقد نمک اضافی و همین‌طور محیط رسوبی ۵ درصد و ۱۰ درصد را نیز نشان داد. این باکتری در محیط رسوبی فاقد نمک اضافی و همینطور محیط رسوبی حاوی ۱۰ درصد نمک هیدورکسی آپاتیت و در محیط رسوبی ۵ درصد نمک کریستال آمونیوم کلرید نیز تولید کرد. به علاوه مشخص شد کریستال‌های هالیت نیز در تمام محیط‌ها تشکیل شده که بسته به مقدار نمک محیط این مقادیر متفاوت بودند.

تصاویر SEM و تحلیل EDX

شکل (۶) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی کریستال‌های تشکیل شده توسط جدایه ۶ را نشان می‌دهد. شکل (۷) نیز تحلیل EDX همان نمونه را با نمایش عناصر تشکیل دهنده رسوب نانو کریستال کلسیت را نشان می‌دهد که حضور عناصر تشکیل دهنده کلسیت بودن آن را اثبات می‌کند.

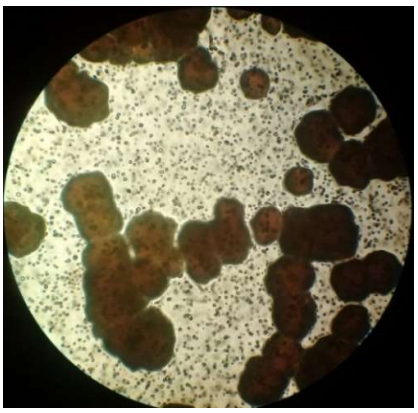
شناسایی باکتری

نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمایی جدایه ۶ در جدول (۱) آمده است. به علاوه شناسایی فیلوژنتیکی نشان داد این جدایه تشابه ۹۹/۹۲ درصدی با *Staphylococcus xylosus* دارد. توالی به دست آمده این باکتری در سامانه بین المللی NCBI با شماره دسترسی MG655155 به ثبت رسید.

بحث

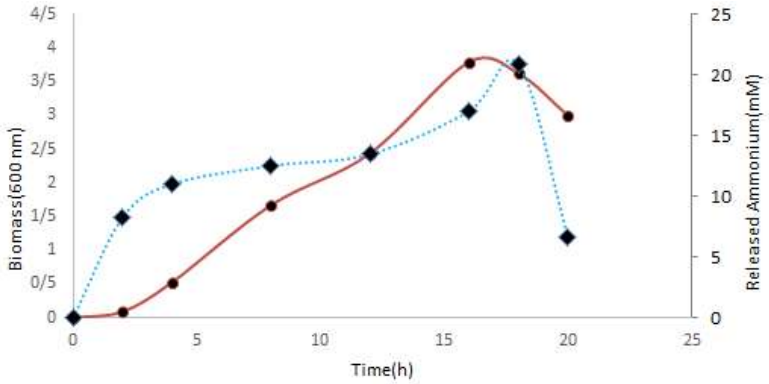
در این بررسی از میان ۶ جدایه منتخب که از منابع طبیعی آب و خاک شور جداسازی شدند همگی قادر به تولید کلسیت بودند و جدایه *S. xylosus* مورد مطالعه بیشتر قرار گرفت. این جدایه در محیط رسوبی ۵ درصد و ۱۰ درصد نمک و هم فاقد نمک کلسیت تولید کرد. مطالعات نشان دادند که رسوب کلسیم کربنات با افزایش غلظت نمکی در *Exiguobacterium mexicanum* کاهش می‌یابد (Bansal et al., 2016). حداکثر رسوب کربنات کلسیم در بررسی نامبرده در غلظت نمکی ۳/۶ درصد و سپس در ۵ درصد نمک مشاهده شد اما بیشترین رشد را در غلظت نمک ۷/۵ و۱۰ درصد نشان داد. رسوب کربنات کلسیم عمدتا در فشار نمکی ۱۰درصد کاهش می‌یافت. بررسی حاضر نیز نشان داد که این جدایه با افزایش غلظت نمک تا میزان ۱۰ درصد نیز قادر به تولیدکلسیت است. غالب مطالعات انجام شده بر روی نانوکریستال‌های کلسیت طی تحلیل‌های XRD تعیین ساختار شدند. به‌علاوه میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به EDX بهترین ابزار برای تعیین مورفولوژی ذرات و ماهیت ذرات نانوکریستال است. مطالعه ذرات کلسیت بر روی باکتری *Exiguobacterium mexicanum* توسط XRD نشان داد که اندازه کریستال‌های تشکیل شده بین ۵۰-۲۰ میکرومتر بوده اما واتریت و آراگونیت نیز وجود داشت (Bansal et al., 2016).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]



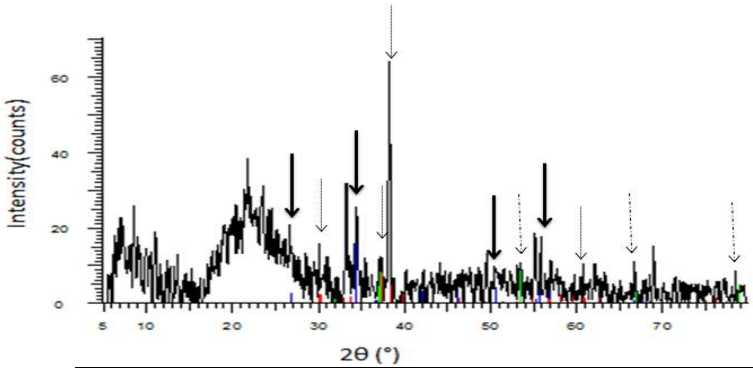
شکل ۱- کریستال‌های تولید شده در خارج و داخل کلنی‌های جدایه ۶ بر روی محیط رسوبی با بزرگنمایی ×۴۰.

Fig. 1. Crystals produced outside and inside colonies by isolate 6 streaked on precipitating medium at 40 × magnifications.



شکل ۲- منحنی رشد و تجزیه اوره توسط جدایه ۶ در محیط TSB حاوی ۵ درصد نمک (■: بیومس، ▲: آزاد سازی آمونیوم و تجزیه اوره).

Fig. 2. Growth curve and urea degradation rate for isolate 6 in TSB medium containing 5 % NaCl. (■: Biomass, ▲: Urea degradation rate)

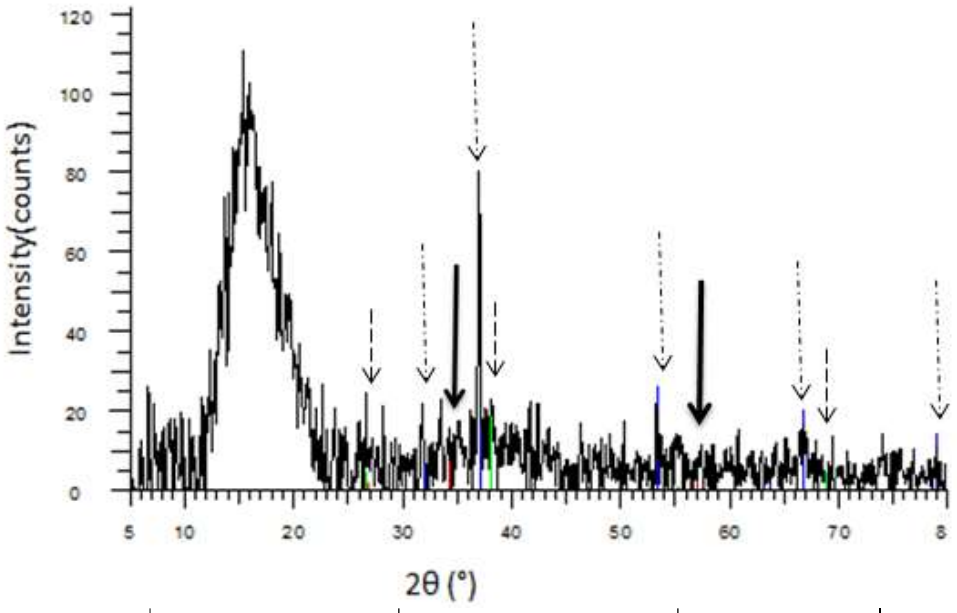


Line style	Compound Name	Formula
→	Calcite	$CaCO_3$
⇢	Hydroxylapatite	$Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2$
-·-·-·-·-·	Halite	NaCl

شکل ۳- الگوی پراکنش ایکس رسوب ایجاد شده از جدایه ۶ بر روی محیط رسوبی (فاقد نمک اضافی).

Fig. 3. X-ray diffraction pattern of precipitates collected from isolate 6 were cultured on precipitated medium (without additional salt).

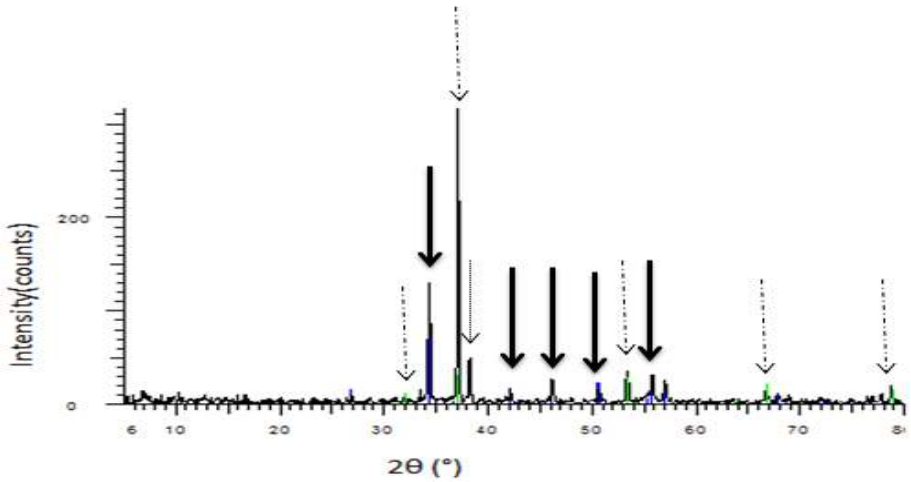
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]



Line style	Compound Name	Formula
→	Calcite	$CaCO_3$
→·	Halite	NaCl
→–	Salammoniac	NH_4Cl

شکل۴- الگوی پراکنش ایکس رسوب ایجاد شده از جدایه ۶ بر روی محیط رسوبی حاوی ۵ درصد نمک.

Fig. **4**. X-ray diffraction pattern of precipitates collected from isolate 6 cultured on precipitated medium containing 5 % NaCl.

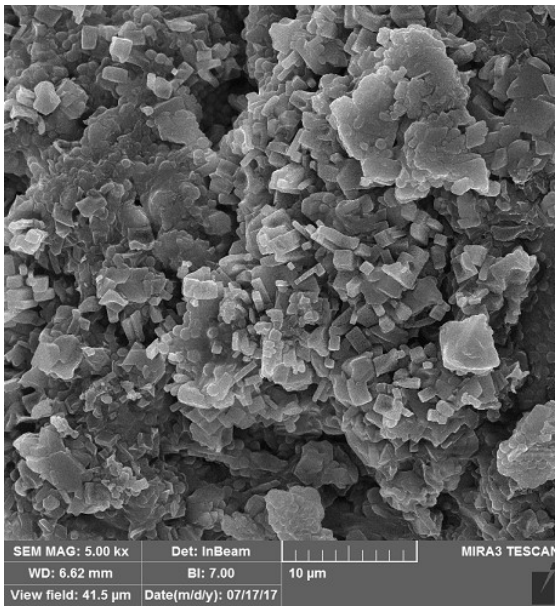


Line style	Compound Name	Formula
→	Calcite	$CaCO_3$
→···	Hydroxylapatite	$Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2$
→··	Halite	NaCl

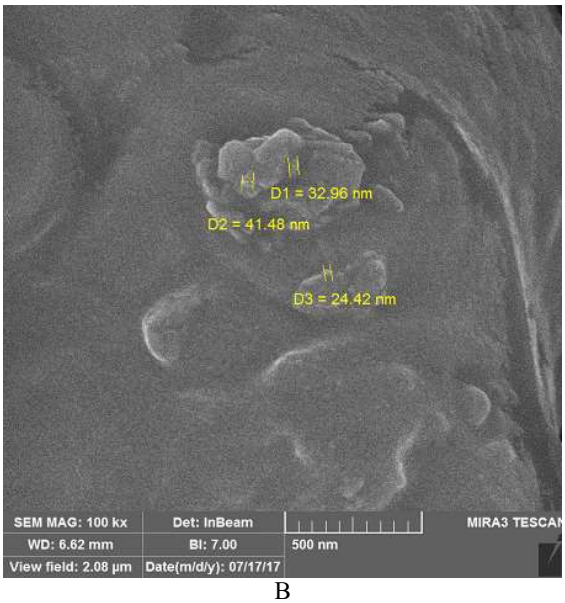
شکل۵- الگوی پراکنش ایکس رسوب ایجاد شده از جدایه ۶ روی محیط رسوبی حاوی ۱۰ درصد نمک.

Fig. 5. X-ray diffraction pattern of precipitates collected from isolate 6 cultured on precipitated medium containing 10 % NaCl.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]



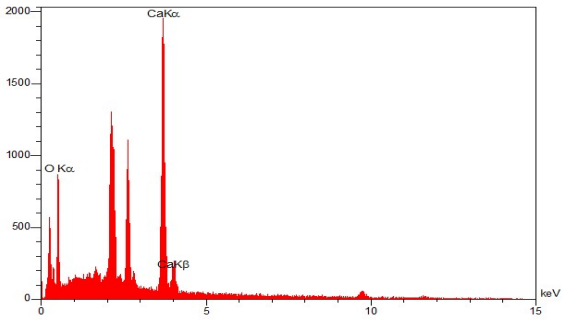
A



B

شکل ۶- تصاویر SEM از تجمعات کریستالها تولید شده توسط جدایه ۶ بر روی سطوح باکتری در محیط رسوبی با بزرگنمایی‌های مختلف. **A**. 5kx. **B**. 100kx.

Fig. 6. SEM images of aggregation of nanocrystals produced by isolate 6 on bacterial cell surfaces in precipitating medium with different magnifications. **A.** 5kx. **B.** 100kx.



شکل ۷- تحلیل EDX از سه ناحیه رسوب کلسیت تولید شده توسط جدایه ۶ .

Fig. 7. SEM-EDX analyses of three areas from a calcinated precipitate produced by isolate 6.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]

جدول ۱- تست‌های بیوشیمیایی ایزوله ۶ (d: 11-89% سویه‌ها مثبت و w _: واکنش ضعیف یا منفی).

Table 1. Biochemical test results of isolate 6 (d: 11-89% strain positive and w _: weak or negative reaction).

Characteristics	*Staphylococcus xylosus* (ATCC29971)	Isolate 6
Pigment	d	-
Catalase	+	+
Coagulase	-	-
Oxidase	-	-
Urease	+	+
Hemolysis	_w	-
Deoxyribonuclease (DNase agar)	_w	-
Novobiocin resistance	+	+
Growth in the presence of 10 and 15 % NaCl:		
10%	+	+
15%	d	+
Aerobic acid production from:		
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Fructose	+	+
Lactose	d	+
Glucose	+	+
Starch	-	-
Xylose	+	+
Galactose	d	+
Mannose	+	+

مطالعه حاضر نیز مانند مطالعه فوق نشان داد که برخی از میکروارگانیسم‌های مولد اوره‌آز جدا از کلسیت می‌توانند ساختارهای دیگر کربنات کلسیم و یا حتی کریستال‌های دیگر را نیز تولید کنند. *S. xylosus* در محیط رسوبی فاقد نمک و۱۰ درصد نمک علاوه بر کلسیت، هیدروکسی آپاتیت و هالیت را هم رسوب داد. در محیط رسوبی با ۵ درصد نمک علاوه بر رسوب کلسیت، پیک‌های هالیت و آمونیوم کلرید دیده شد. پژوهشگران سویه *Deleya halophila* را که قادر به تشکیل کلسیم کربنات تحت همه شرایط بود را مورد آزمایش قرار دادند (Ferrer et al., 1988). مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که مقدار تشکیل کریستال در ۲/۵ و ۷/۵ درصد نمک خیلی بالا بوده اما زمانی‌که غلظت نمک محیط تا ۲۰ درصد افزایش یافت این مقدار کلسیت کمتر شده است. بررسی‌های XRD نشان داد که کریستال‌های تشکیل شده توسط *D. halophila* در تمام موارد کلسیت بوده و طی مطالعه با SEM مشخص شد که تمام کریستال‌های تشکیل شده مورفولوژی مشابه داشتند و کریستال‌های کلسیت توده‌های پر منفذ با منظره کروی شکل دارند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از *S. xylosus* کریستال‌های کلسیت را به صورت منفرد و بی شکل یا توده‌های متصل به‌هم و بی‌شکل نشان داد. رسوب کلسیت به وسیله گونه‌های مختلف باکتری‌های نمک‌دوست معتدل آزمایش شد که فقط ۸۰ درصد این سویه‌ها قادر به تشکیل این ترکیب هستند (Del Moral et al., 1987). غلظت بهینه نمک برای رسوب کلسیم کربنات، ۱۰درصد بود وکلسیت در غلظت ۲۰ درصد و در ۲/۵ درصد نمک مقدارکمتری به خود اختصاص داد. باکتری جدا شده در این بررسی قادر به رشد در غلظت نمک بالا و فشار زیاد اسمزی بود و بعلاوه در محیط بدون نمک هم رشد نشان داد. مطالعات نشان داد سویه‌ایی از *Serratia* قادر به تولید مقادیر زیادی کلسیت در انتهای روز ۳۵ بوده و تحلیل XRD کریستال‌های کربنات رسوب یافته توسط این باکتری، کلسیت، واتریت و آراگونیت را نشان داد (Srivastava et al., 2015). کلسیت پلی‌مورف اصلی رسوب یافته توسط این باکتری بود و واتریت دیگر پلی‌مورف کلسیم کربنات در این طیف بود. تحلیل EDX نشان داد که رسوب تولید شده به وسیله این باکتری شامل عناصر Ca, C, O است. مشابه بررسی Srivastava طیف EDX در *S. xylosus* شامل عناصر Ca, C, O بود که حضور کلسیت را تایید می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]

REFERENCES

Arias, D., Valdes, P., Cisternas, L.A. & Rivas, M. 2015. Isolation and selection of halophilic ureolytic bacteria for biocementation of calcium and magnesium from seawater. Adv. Mat. Res. 1130: 489-492.

Bansal, R., Dhami, N.K., Mukherjee, A. & Reddy, M.S. 2016. Biocalcification by halophilic bacteria for remediation of concrete structures in marine environment. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 43: 1497-1505.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. & Garrity, G.M. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag. New York, pp: 392-420.

Carpa, R., Keul, A., Muntean, V. & Dobrotă, C. 2014. Characterization of halophilic bacterial communities in Turda salt mine (Romania). Orig. Life. Evol. Biosph. 44: 223-230.

Chahal, N., Rajor, A. & Siddique, R. 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. African J. Biotechnol. 10: 8359-8372.

De Muynck, W., De Belie, N. & Verstraete, W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. Ecol. Eng. 36: 118-136.

Del Moral, A., Roldan, E., Navarro, J., Monteoliva-Sanchez, M. & Ramos-Cormenzana, A. 1987. Formation of calcium carbonate crystals by moderately halophilic bacteria. Geomicrobiol. J. 5: 79-87.

Dhami, N.K., Mukherjee, A. & Reddy, M.S. 2016. Applicability of bacterial biocementation in sustainable construction materials. Asia-Pac. J. Chem. Eng. 11: 795-802.

Ferrer, M., Quevedo-Sarmiento, J., Bejar, V., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A. & Rivadeneyra, M. 1988. Calcium carbonate formation by *Deleya halophila*: effect of salt concentration and incubation temperature. Geomicrobiol. J. 6: 49-57.

Hoffman, M.T. & Arnold, A.E. 2010. Diverse bacteria inhabit living hyphae of phylogenetically diverse fungal endophytes. Appl. Environ. Microbiol. 76: 4063-4075.

Mobley, H.L.T., Méndez, G.L. & Hazell, S.L. 2001. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. – ASM press, Washington.

Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 56-63.

Rivadeneyra, M., Ramos-Cormenzana, A., Delgado, G. & Delgado, R. 1996. Process of carbonate precipitation by *Deleya halophila*. Curr. Microbiol. 32: 308-313.

Srivastava, S., Bharti, R.K. & Thakur, I.S. 2015. Characterization of bacteria isolated from palaeoproterozoic metasediments for sequestration of carbon dioxide and formation of calcium carbonate. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 1499-1511.

Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V. & Li, Y. 2013. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. World. J. Microbiol. Biotechnol. 29: 1453-1460.

Vahed, S.Z., Forouhandeh, H., Hassanzadeh, S., Klenk, H.P., Hejazi, M.A. & Hejazi, M.S. 2011. Isolation and characterization of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran. Microbiol. 80: 834-841.

*****

How to cite this article:

Haddadi M. & Ghezelbash, G.R. 2020. Isolation of halophilic urease producing bacteria and study of their nanocrystal production. Nova Biologica Reperta 7: 37-45. (In Persian).

حدادی، م. و قزلباش، غ.ر. ۱۳۹۹. جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست مولد اوره‌آز و مطالعه تولید نانوکریستال آنها. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۴۵-۳۷.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.4.6]

[DOI: 10.29252/nbr.7.1.37]