Research Article

Nova Biologica Reperta 10(3): 208-218 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.3.208

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۱۰، شماره ۳، صفحات ۲۰۸ الی ۲۱۸ (۱۴۰۲)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

سیمان سازی زیستی و رسوب کلسیت توسط عصاره درون سلولی باکتری اسپوروسارسینا پاستوری

مصطفی حسین‌پور، محمد محمدی و غلامرضا قزلباش

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

مسئول مکاتبات: غلامرضا قزلباش، rghezelbash@scu.ac.ir

چکیده. سیمان سازی زیستی فرایند جدیدی است که در آن باکتری های هیدرولیز کننده اوره و یا آنزیم اوره‌آز آزاد با تجزیه اوره و افزایش pH محیط و فعل و انفعالات شیمیایی در حضور یون کلسیم موجب تشکیل کلسیت می‌شوند. امروزه نانوکلسیت کاربرد فراوانی در زمینه مهندسی مانند افزایش مقاومت خاک و بتن و همچنین در پزشکی مانند حمل دارو و درمان سرطان دارد. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط آزمایشگاهی تولید ذرات نانو کلسیت با کیفیت، اندازه مناسب و خالص توسط عصاره آنزیمی اسپوروسارسیناپاستوری برای استفاده در مطالعات پزشکی و مهندسی بود. برای این منظور باکتری اسپوروسارسینا پاستوری در محیط نوترینت براث حاوی اوره و نیکل کشت داده شد و با رسیدن به زمان مناسب سلول‌ها جدا و شست و شو شدند. سپس به وسیله سونیکاسیون عصاره آنزیمی آن‌ها استخراج شد و سپس تولید رسوب کلسیت در غلظت‌های مختلف اوره و کلسیم کلراید و مقادیر مختلف آنزیم و دما مورد مطالعه قرار گرفت. کیفیت کریستال‌های کلسیت تولید شده و نسبت آن در مقایسه با دیگر کریستال‌ها توسط آنالیزXRD و SEM مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج آنالیز XRD مشخص شد که در اوره ۰/۵ مولار و کلسیم کلراید ۰/۲۵ مولار بیشترین میزان کلسیت با ۹۶ درصد و کمترین محصولات جانبی تولید می‌شود. بررسی هیستوگرام اندازه ذرات در نمونه حاوی ۰/۵ مولار اوره و ۰/۲۵ مولار کلسیم کلراید مشخص کرد که طیف ذرات بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر است. ماهیت و جنس کریستال‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد و آنالیزهای EDX حضور کلسیم، اکسیژن و کربن را نشان داد. طبق نتایج حاصل مشخص شد که با افزایش غلظت اوره و کلسیم، طیف اندازه ذرات بزرگتر شده و همچنین درصد کلسیت تولید شده در غلظت های پایین اوره و کلسیم، بیشتر از غلظت‌های بالا است.

واژه‌های کلیدی. اسپوروسارسینا پاستوری، اوره‌آز، BEICP، XRD، SEM-EDX

Biocementation and calcite precipitation by intracellular extract of *Sporosarcina pasteurii*

Mostafa Hossein Pour, Mohammad Mohammadi & Gholam Reza Ghezelbash

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding author: Gholam Reza Ghezelbash, rghezelbash@scu.ac.ir

Abstract. Biological cementation is a new process in which urea hydrolysis bacteria or free urease enzyme decompose urea and increases the pH of the environment and chemical interactions in the presence of calcium ions to form calcite. Nowadays, nano-calcite is widely used in engineering, such as increasing the strength of soil and concrete, as well as in medicine, such as drug delivery and cancer treatment. This study aimed to investigate the laboratory conditions for producing nano-calcite particles with appropriate quality, size and purity by *Sporosarcina pasteurii* enzyme extract for use in medical and engineering studies. This investigation aimed to make calcite by *S. pasteurii* enzyme extract and optimize influential factors in calcite production. For this purpose, the bacterium *S. pasteurii* was cultured in nutrient broth containing urea and nickel, and upon reaching the appropriate time, the cells were separated and washed. Then, their enzyme extract was prepared by sonication, and calcite precipitation was studied in different amounts of urea, calcium chloride, enzyme and temperature. The quality of produced calcite crystals and their ratio compared to other crystals were investigated by XRD and SEM analyses. According to the results of XRD analysis, it was found that in 0.5 M urea and 0.25 M calcium chloride, the highest amount of calcite is produced with 96%, and the least side products are produced. Examining the particle size histogram in the sample containing 0.5 M urea and 0.25 M calcium chloride revealed that the range of particles were between 50 and 100 nm. The nature and type of crystals were studied by electron microscopy, and EDX analysis showed the presence of calcium, oxygen, and carbon. According to the results, it was found that by the increase of the concentrations of urea and calcium, the range of particle size became larger. Also, the percentage of calcite produced in low urea and calcium chloride concentrations is higher than those in high concentrations.

Key words. *Sporosarcina pasteurii*, Urease, BEICP, XRD, SEM-EDX

Received 06.10.2022/ Revised 13.09.2023/ Accepted 25.09.2023/ Published 20.12.2023

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۴/ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۶/۲۲/ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۳/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

شش فرم کربنات کلسیم در طبیعت وجود دارد. سه فرم آراگونیت (Aragonite)، کلسیت، واتریت کریستالی‌های بی آب و دو فرم ایکایت (Ikaite) و مونوهیدروکلسیت نیز فرم‌های کریستالی آبدار هستند. فرم ششم کربنات کلسیم بی‌شکل و آمورف (Amorphous calcium carbonate) است که آبدار و ناپایدار بوده و به راحتی به ساختارهای بلوری تبدیل می‌شود. کلسیت ساختاری لوزی شکل، آراگونیت ساختار سوزن مانند و واتریت ساختار کروی دارد. واتریت به دلیل حداقل پایداری ترمودینامیکی، معمولاً کمتر در طبیعت وجود دارد. واتریت در محلول آبی به سرعت می‌تواند به کلسیت و آراگونیت تبدیل شود (Putra et al., 2022). در بین تمام فرم‌های موجود، کلسیت در دما و فشار اتمسفری، پایدارترین فرم است. آراگونیت زیاد پایدار نبوده و به مرور زمان تبدیل به کلسیت می شود (Castanier et al., 1999).

رسوبات کربنات ممکن است به وسیله فرایندهای مختلفی مانند هیدرولیز اوره، دنیتریفیکاسیون، احیاء سولفات و احیاء آهن تولید شوند (Torgal et al., 2015). میکروارگانیسم‌ها می‌توانند کربنات کلسیم را در محیط‌های غنی از کلسیم با طی یکی از مکانیسم‌های فوق رسوب دهند. مسیر اصلی تولید کلسیت استفاده از باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز است که به این فرایند رسوب کلسیت توسط القاء میکروبی (Microbial Induced Carbonate Precipitation) گفته می‌شود. MICP فرایند سیمان سازی با واسطه زیستی است که می‌تواند ذرات خاک را در محل‌های تماس سطوح ذرات خاک ببندد و فضای خالی در محیط متخلخل را کاهش دهد (Costa et al., 2017).

استوکس- فیشر و همکاران به بررسی فعالیت اوره‌آزی و تاثیر آن بر رسوب کلسیت پرداختند که برای اولین بار از اصطلاح MICP استفاده کردند (Stocks-Fischer et al., 1999). بیشتر موارد محلول باکتری به همراه اوره و منبع کلسیم به ذرات خاک اضافه می‌شود و باعث افزایش استحکام و مقاومت خاک می شود (DeJong et al., 2006 van Paassen, 2009;). برخی محققان تاثیر پارامترهای اثرگذار بر رسوب میکروبی کلسیت مانند غلظت باکتری، غلظت اوره و کلسیم کلرید را بر میزان رسوب کربنات کلسیم توسط باکتری اسپوروسارسینا پاستوری مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که در این باکتری موثرترین شرایط آزمایشگاهی غلظت ۱ مولار اوره و ۲ مولار کلسیم کلرید است (Keykha et al., 2018).

بر خلاف MICP، آنزیم اوره‌آز آزاد مورد استفاده در رسوب کلسیت توسط القاء آنزیمی (Enzymed Induced Calcite Precipitation) حدودا دارای اندازه ۱۲ نانومتر است و محلول در آب که باعث افزایش تولید ذرات کلسیت نانو و کاهش اندازه آن‌ها می‌شود. علاوه بر این در EICP نیازی به تغذیه باکتری‌ها نیست. ایده استفاده از رسوب کلسیت ناشی از آنزیم آزاد (EICP) در اوایل دهه ۲۰۰۰ مطرح شد. ایده جدیدی که در آن از یک اوره‌آز خالص گیاهی برای تامین فرایند EICP به منظور ترمیم ترک با مواد بتنی استفاده شد (Hoang et al., 2019). اخیرا، محققان ژئوتکنیک زیستی عمدتا از اوره‌آز تجاری استفاده می‌کنند (Hamdan et al., 2016; Oliveira et al., 2016). مطالعات جدید به منظور صنعتی شدن فرایند از عصاره گیاهان یا بذر استفاده کرده‌اند (Javadi et al., 2018; Dilrukshi et al., 2018). هدف از این مطالعه تولید کلسیت توسط عصاره آنزیمی اسپوروسارسینا پاستوری بود که به‌علاوه اثر مقادیر مختلف واکنشگرهای کلسیم و اوره بر روی اندازه و درجه خلوص کلسیت تولید شده مطالعه شد. تولید خالص کلسیت به منظور مطالعات دارویی و تثبیت ریزگرده‌ها که عملا مشخص شده ذرات ریز خاک توسط فرایند MICP قابل کنترل نیستند از فرایندهایی هستند که امروزه به EICP نیاز است. لذا این تحقیق به تمام جنبه‌های EICP با استفاده از عصاره باکتری اسپوروسارسینا پاستوری می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

میکرارگانیسم و محیط کشت

باکتری مورد استفاده در این تحقیق اسپوروسارسینا پاستوری با کد PTCC 1645 بود که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه و طبق دستورالعمل فعال‌سازی شد. برای فعال‌سازی و کشت این باکتری از محیط نوترینت آگار حاوی ۲ درصد اوره استفاده شد (Behzadipour et al., 2011). تمام مواد شیمیایی و محیط‌های کشت به‌کار رفته در این بررسی از دو شرکت مرک (آلمان) و شارلوآ (اسپانیا) تهیه شدند. تمامی محیط‌های کشت در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو (ریحان طب، ایران) استریل شدند و اوره جداگانه فیلتر (Biofil، آمریکا) و به محیط‌های فوق بعد از اتوکلاو اضافه شدند.

رسم منحنی رشد باکتری اسپوروسارسینا پاستوری

به منظور رسم منحنی رشد ابتدا باکتری فوق بر روی محیط نوترینت آگار حاوی اوره فعال شد و سپس از کلنی‌های فوق محلولی با کدورت ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. تلقیح با نسبت ۱ درصد از محلول قبلی به محیط کشت نوترینت براث حاوی ۲ درصد اوره انجام شد. محیط فوق بر روی شیکر انکوباتور

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

(فاطر الکترونیک، ایران) با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. جذب محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ازای هر ۲ ساعت یکبار خوانده شد و منحنی رشد باکتری براساس نتایج به‌دست آمده از جذب رسم شد (Behzadipour et al., 2011).

تهیه عصاره سلولی

برای تهیه عصاره سلولی ابتدا باکتری را فعال و سپس برای کسب بیشترین توده سلولی در محیط مایع نوترینت حاوی ۲ درصد اوره کشت داده شد. سپس طی زمان‌های مختلف ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۰ و ۴۲ ساعت پس از رشد باکتری مقدار ۵۰ میلی لیتر از باکتری در حال رشد برداشت شد و جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (MAPADA، چین) خوانده شد و سپس برای تهیه عصاره از آن استفاده شد. سپس محیط‌های فوق در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (آرش طب، ایران) و محلول رویی دور ریخته شد. سپس باکتری‌های ته نشین شده با بافر تریس ایچ‌سی‌ال (pH=۸) دو بار به صورت مجزا شستشو داده شد و مجدد سانتریفیوژ صورت گرفت. رسوب به‌دست آمده در انتها با بافر تریس ایچ‌سی‌ال مخلوط شد و برای تخریب دیواره سلولی باکتری و استخراج محتویات درون سلولی از روش سونیکاسیون (MSE، انگلستان) استفاده شد. بدین صورت که ۱۵ ثانیه سونیکاسیون و سپس ۱۵ ثانیه استراحت داده شد. این سیکل ۴ دفعه تکرار شد و فرکانس دستگاه ۲۵ کیلوهرتز و قدرت ۱۵۰ وات بود. همچنین دمای محلول را در محدوده صفر درجه سلسیوس کنترل شد تا دستگاه گرم نشود و فعالیت آنزیمی خود را از دست ندهد. پس از سونیکاسیون محلول سانتریفیوژ شد و رسوبات باکتری و اجساد در ته ظرف رسوب می‌یابند و محلول رویی محتوی عصاره سلولی آنزیمی است (Christians & Kaltwasser,1986). برای اطمینان از تخریب دیواره باکتری ها و خروج محتویات باکتری از میکروسکوپ نوری استفاده شد.

فعالیت اوره‌آزی در زمان‌های مختلف رشد باکتری با روش هدایت سنجی

برای سنجش فعالیت اوره‌آزی در زمان‌های مختلف کشت باکتری از روش هدایت سنجی استفاده شد. بدین صورت که ابتدا ۰/۶ گرم اوره را در ۹ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و ۱ میلی لیتر عصاره سلولی به این محلول اضافه شد. بلافاصله با دستگاه هدایت سنج، تغییرات سنجیده شد. بدین صورت که مقدار هدایت الکتریکی محلول فوق در طول ۵ دقیقه در ۵ نقطه خوانده شد و شیب نمودار رسم گردید. هر اندازه که شیب نمودار بیشتر باشد فعالیت اوره‌آزی در آن ساعت بیشتر خواهد بود. هر میلی زیمنس در دقیقه هدایت الکتریکی معادل هیدرولیز ۱۱ میلی مولار اوره در دقیقه است (Harkes et al., 2010).

فعالیت ویژه اوره‌آزی

برای تعیین فعالیت ویژه ابتدا فعالیت آنزیمی بر اساس آزاد سازی آمونیوم از اوره و معرف نسلر (Thompson & Morrison, 1951) و منحنی استاندارد آمونیوم استفاده شد. برای تعیین فعالیت آنزیمی بافر۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl (pH=۸) حاوی ۰/۲۵ مولار اوره و ۰/۱ میلی‌مولار کلرید نیکل استفاده شد. سپس به هر کدام از این محلول‌های بافری فوق به مقدار یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به منظور توقف فعالیت آنزیم از محلول تری کلرو استیک اسید ۱/۵ مولار به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر استفاده شد. سپس ۰/۵ سی‌سی از محلول آنزیمی فوق به همراه ۱/۷۵ سی‌سی آب و ۲۵۰ میکرولیتر معرف نسلر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد و سپس جذب آن در طول موج۴۸۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی اوره‌آز مقداری از آنزیم است که در ۱ دقیقه در ۱ میلی‌لیتر ۱ میکرومول آمونیوم آزاد می‌کند. سپس فعالیت آنزیمی بر مقدار پروتئین به دست آمده طبق روش بردفورد تقسیم شد و فعالیت ویژه اوره‌آزی تعیین شد (Follmer et al., 2004; Nakano et al., 1984).

تعیین غلظت پروتئین سلولی

به منظور تعیین مقدار پروتئین موجود در محلول آنزیمی یا همان عصاره سلولی از روش برادفورد استفاده شد. بر این اساس ۱۰ میکرولیتر از عصاره سلولی را با ۹۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (pH=۸) و ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد مخلوط کرده و بعد از گرماگذاری در دمای محیط به مدت ۵ دقیق جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. سپس مقدار پروتئین دقیق با توجه به نمودار استاندارد مشخص گردید (Bradford, 1976).

تولید کلسیت

تولید کلسیت در EICP به این صورت است که محلول حاوی آنزیم یا عصاره آنزیمی با محلول واکنش‌گر که حاوی کلراید نیکل به‌عنوان کوفاکتور اوره‌آز، اوره و کلرید کلسیم است مخلوط می‌شود. بعد از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت رسوبات ایجاد شده بعد از جداسازی و شستشو خشک شده و بعد از وزن شدن با ترازوی حساس مورد آنالیز قرار می‌گیرند. مقادیر اوره و کلسیم در این مطالعه کلراید به صورت یک فاکتور در زمان بهینه شدند. اوره به عنوان سوبسترا برای آنزیم اوره‌آز از مهمترین پارامترهایی است که برای تولید بیشترین میزان رسوب کربنات کلسیم باید آن را بهینه سازی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

کرد. به منظور بهینه سازی اوره محلول‌هایی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ مولار اوره تهیه شد که غلظت کلسیم در همه آن‌ها ثابت و برابر ۲ مولار بود. سپس مقدار مساوی عصاره به هر کدام از محلول‌ها اضافه شد تا اینکه حجم محلول کلی ۵ میلی‌لیتر شد. رسوبات تشکیل شده جمع آوری و با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شدند. پس از آنکه غلظت بهینه اوره برای تولید بیشترین مقدار رسوب مشخص شد این غلظت ثابت نگه داشته شد و کلسیم در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ مولار کلرید کلسیم بدون آب بهینه شد.

آنالیز نانو کریستال کلسیت

پس از سانتریفیوژ و خشک شدن رسوبات با قرار دادن آن‌ها در پتری دیش‌های شیشه‌ای در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت و سپس وزن کردن، نمونه‌ها به منظور آنالیز XRD نیمه کمی و درصد کریستال‌ها به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان ارسال شدند. در این بررسی رسوبات خشک شده فوق توسط XRD نیمه کمی و PSA مطالعه شدند. ابتدا کلنی‌های خشک شده بمنظور بررسی شکل شناسی نانو ذرات از دستگاه طیف نگار پرتوایکس D8 advance (Bruker، آلمان) با تشعشع CuK_{α} تحت شرایط ۴۰ kV و ۴۰ mA استفاده گردید. پرتودهی نمونه‌ها توسط XRD در زاویه ۸۰-۵ درجه و width step ۰/۰۵ درجه و scan time $۲^{-۱}$ ثانیه انجام شد (Ghezelbash & Haddadi, 2018). آنالیزهای XRD نیمه کمی توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان و اندازه ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گیسل میدانی (Field Emission Scanning Electron Microscopy) مدل MIRA3 (TESCAN، جمهوری چک) توسط شرکت آریا الکترون اپتیک تهران تعیین شد. آنالیز شکل شناسی کریستال‌ها نیز توسط FESEM شرکت نامبرده انجام شد و نمونه‌های تهیه تصاویر و تعیین ذرات ابتدا با استفاده از چسب مس بر روی نگهدارنده نمونه SEM فلزی تثبیت شدند و سپس با طلا پوشش‌دهی شدند.

نتایج

منحنی رشد اسپوروسارسینا پاستوری

شکل ۱ منحنی رشد سلولهای باکتری اسپوروسارسینا پاستوری در کشت مایع را نشان میدهد. به نظر می‌رسد که از ساعت ۲۲ به بعد رشد سلول ثابت شده و وارد فاز سکون شده است و بعد از آن نیز از ساعت حدودا ۲۸ به بعد وارد فاز مرگ می‌شود.

فعالیت اوره‌آزی در زمان های مختلف رشد باکتری با هدایت سنجی

فعالیت آنزیمی در ساعت‌های مختلف رشد باکتری به منظور به دست آوردن بهترین زمان فعالیت آنزیمی و بهترین زمان استخراج توسط روش هدایت سنجی انجام شیب خط فعالیت آنزیمی در ۲۰ ساعت رشد سلول از بقیه ساعات بیشتر است. بعبارت دیگر بهترین زمان استخراج آنزیمی ساعت ۲۰ بعد از رشد سلول‌ها در محیط کشت مایع است که معادل هیدرولیز ۳/۸ میلی‌مولار اوره در دقیقه است.

فعالیت اوره‌آزی ویژه

عصاره آنزیمی استخراج شده از باکتری اسپوروسارسینا پاستوری به‌کار رفته در این مطالعه بعد از ۲۲ ساعت کشت در محیط کشت حاوی اوره برابر ۶/۸ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین فعالیت آنزیمی ویژه نشان داد.

تولید کلسیت

بعد از مخلوط کردن عصاره آنزیمی و محلول واکنش‌گر در غلظت‌های مختلف رسوب ایجاد شده از چند جنبه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شکل ۲ میزان رسوبات تولید شده در غلظت‌های مختلف اوره را نشان می‌دهد که غلظت کلسیم کلراید به صورت ثابت نگاه داشته شد. همانطور که مشخص است غلظت ۲ مولار اوره بیشترین میزان رسوب را به لحاظ وزنی نشان می‌دهد. پس از آنکه مشخص شد در چه غلظتی از اوره بیشتری میزان رسوب تولید می‌شود غلظت ۲ مولار اوره ثابت نگه داشته و غلظت‌های مختلف کلسیم را برای تهیه بیشترین میزان رسوب اعمال شدند. نتایج شکل ۳ میزان رسوبات حاصل پس از اعمال غلظت‌های مختلف کلسیم کلراید را نشان می‌دهد. غلظت ۲ مولار کلسیم کلراید نیز بیشترین میزان رسوب را به لحاظ وزنی نشان داد.

جنبه دیگری که تولید کریستال کلسیت مطالعه شد مقادیر نسبی کریستال‌ها بود که توسط آنالیز XRD نیمه کمی تعیین شد. بر اساس این نتایج در غلظت‌های ۰/۵ مولار اوره بیشترین میزان کلسیت و به مقدار ۹۱/۳ درصد تولید شده و به دلیل داشتن محصولات جانبی کمتر به عنوان بهترین نمونه نسبت به سایر غلظت‌های اوره گزارش شد.

براساس آنالیز نیمه کمی XRD غلظت‌های ۰/۲۵ مولار و ۲ مولار کلسیم کلراید، بیشترین میزان کلسیت تولید شده به ترتیب و با درصدهای ۹۶ و ۹۵/۴ نسبت به بقیه محصولات تولید شد. ۰/۲۵ مولار کلسیم کلراید بدلیل داشتن محصولات جانبی کمتر به عنوان بهترین نمونه نسبت به سایر غلظت‌های کلسیم کلراید گزارش شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جنبه دیگر مقایسه بهترین شرایط تولید کلسیت اندازه کریستال‌ها بودند که طبق شکل ۹ و ۱۰ می‌توان گفت که غلظت‌های ۰/۵ مولار اوره و ۰/۲۵ مولار کلسیم کلراید بهترین غلظت واکنش‌گرها در تولید کلسیت با بهترین پراکنش اندازه است. به‌عنوان مثال در غلظت‌های بالای اوره یا غلظت کلسیم کلراید این اندازه‌ها تغییر می‌کند و ذرات طیف بزرگتری را شامل می‌شوند.

نتایج XRD

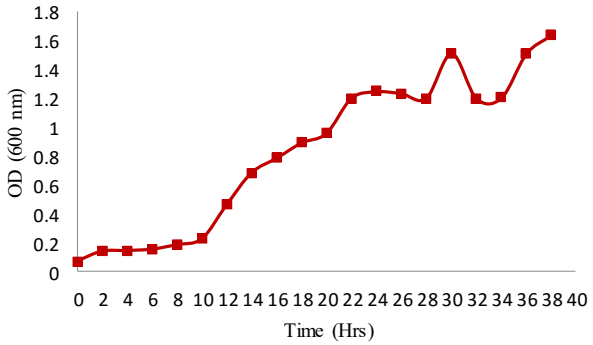
نتایج XRD کلسیت بودن کریستال‌ها را تائید کرد و به‌علاوه طی آنالیز نیمه کمی درصد کریستال‌ها نیز تعیین شد. شکل ۶ و ۷ تصاویر بهترین درصد اوره (۰/۵ مولار) و کلسیم کراید (۰/۲۵ مولار) را نشان می‌دهد.

نتایج SEM

شکل‌های ۸ و ۹ به ترتیب تصاویر SEM کریستال‌های تولید شده طی فرایند EICP در غلظت ۰/۵ مولار اوره و ۰/۲۵ مولار کلرید کلسیم را نشان دهد. حضور کریستال‌ها در SEM پراکنش آنها و عدم تنوع اشکال را نشان می‌دهد. کریستال‌ها در چند نقطه مختلف آن آنالیز EDX انجام شد و مشخص شد که عناصر کربن، اکسیژن و کلسیم در آنها به عنوان تنها عناصر وجود دارد (شکل ۱۰).

بحث

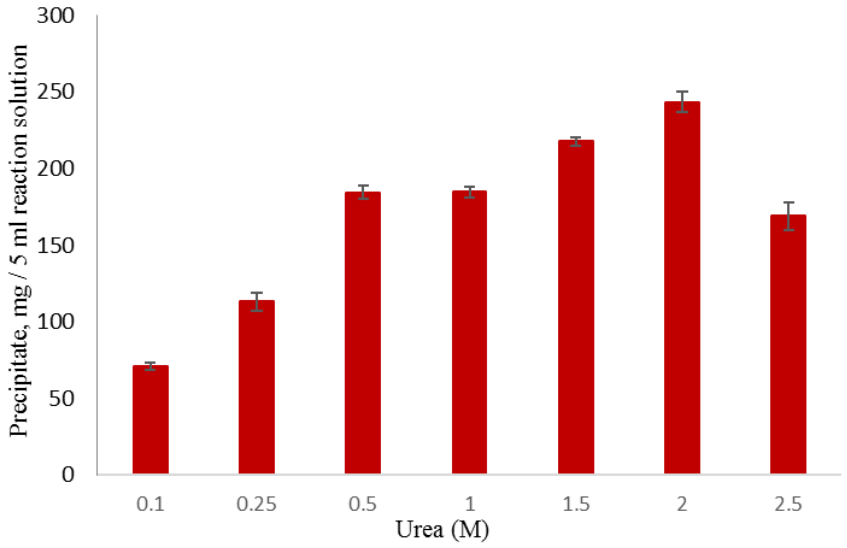
امروزه نانو کلسیت کاربردهای فراوانی در زمینه پزشکی، محیط و مهندسی دارد. یکی از روش‌های سبز که اثرات جانبی کمتری بر روی محیط زیست دارد تولید نانوکلسیت به کمک آنزیم اوره‌آز است که به آن EICP می‌گویند (Kavazanjian & Hamdan, 2015; Hamdan et al., 2016) منابع آنزیمی متعددی را می‌توان به‌عنوان منابع اوره‌آز مطرح کرد ولی تا به امروز تمام یافته‌های تحقیقاتی مرتبط با EICP از منابع گیاهی یا اوره‌آز تجاری تولید از منابع گیاهی استفاده کرده‌اند. نعمتی و همکاران (Nemati et al., 2005) بیان کردند که مقدار کربنات کلسیم تولید شده توسط اوره‌آز طی فرایند EICP تقریبا سه برابر بیشتر از مقدار اندازه‌گیری شده با روش MICP بوده است. روش EICP متکی بر آنزیم مشتق‌شده از گیاه است که هنوز چندین اشکال دارد. تولید در مقیاس بزرگ و مقیاس میدانی اوره‌آز تجاری موجود که با منشاء گیاهی‌ست برای صنعت بسیار گران تمام می‌شود. در بعضی از تحقیقات جدید از عصاره آنزیمی باکتریایی برای بهبود خاک استفاده شده که به این روش (BEICP) گفته می‌شود. مطالعه هوانگ و همکاران (Hoang et al., 2019) نشان داد که عصاره آنزیمی اوره‌آز باکتریایی در مقایسه با MICP یا EICP نتایج بهتری در افزایش مقاومت خاک‌های ماسه‌ایی از خود نشان داده است. اندازه کوچک یک آنزیم اوره‌آز حل‌شده در آب به آن یک مزیت متمایز نسبت به فرایند MICP برای کاربردهای مهندسی می‌دهد که قادر به نفوذ به فضاهای خالی بسیار کوچک است. تقریبا تمام باکتری‌های شناخته‌شده قطر بیش از ۳۰۰ نانومتر دارند و اکثر آن‌ها در محدوده ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ نانومتر قرار دارند که توانایی آن‌ها را برای نفوذ به خاک‌های ریزتر از ماسه ریز را محدود می‌کند. آنزیم اوره‌آز آزاد محلول در آب است و بنابراین می‌تواند اتصال ذرات ریز خاک یا ریزگردها به نظر می‌رسد. فرایند MICP پیشتر در اتصال ریزگردها ناموفق بوده است چرا که با توجه به اندازه باکتری‌ها این اتصال بین ریزگردها ممکن نیست (Pakbaz et al., 2018). برخی محققین با آزمایش‌های تونل باد نشان دادند که رسوب کربنات ناشی از فعالیت آنزیم (EICP) به عنوان روشی برای کاهش انتشار گرد و غبار محلی عمل می‌کند (Kavazanjian & Hamdan, 2015). گرد و غبار محلی که به وسیله باد بوجود می آید یک مشکل زیست محیطی مهم در محیط‌های خشک و نیمه‌خشک است. مطالعه حاضر و بررسی کمی و کیفی کریستال‌های ایجاد شده در آن راهکار مناسبی برای کنترل ریزگردها طی فرایند زیست محیطی ارائه می‌دهد که نیازمند مطالعات بیشتر است.



شکل ۱- منحنی رشد سلول‌های اسپوروسارسینا پاستوری.

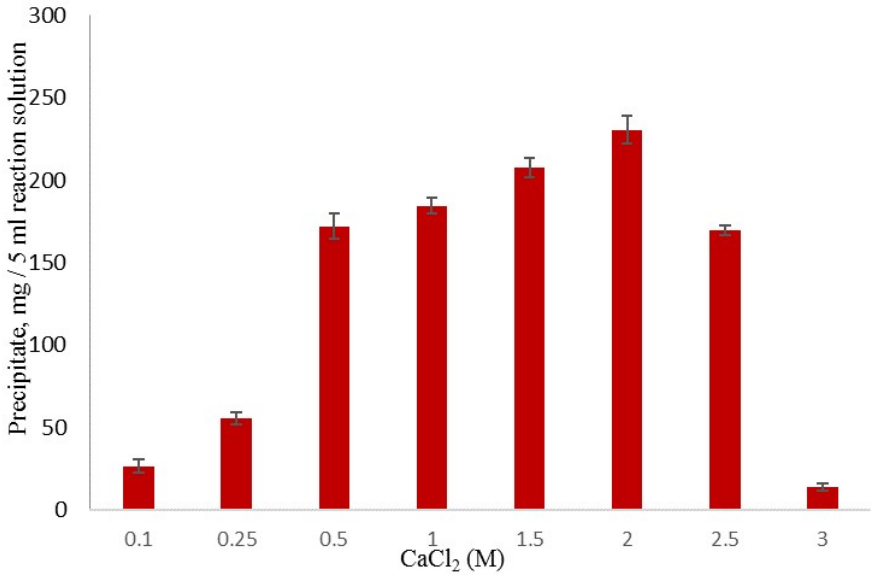
Figure 1. Growth curve of *Sporosarcina pasteuri* cells.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۲- مقایسه مقدار رسوبات در غلظت‌های مختلف اوره.

Figure 2. Comparison of the amount of precipitate in different urea concentrations.



شکل ۳- مقایسه مقدار رسوبات در غلظت‌های مختلف کلسیم کلراید.

Figure 3. Comparison of the amount of precipitates in different calcium chloride concentrations.

جدول ۱- درصدهای کلسیت، آراگونیت، واتریت و آمونیوم کلرید رسوب یافته در غلظت‌های مختلف اوره.

Table 1. The percentages of calcite, aragonite, vaterite, and ammonium chloride precipitated in different urea concentrations.

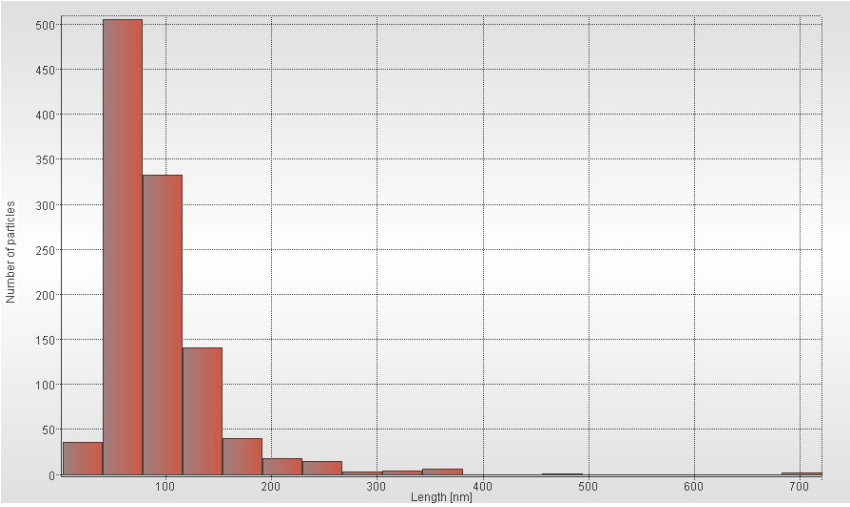
Urea Concentration / Crystal Percent	0.25 M	0.5 M	1 M	1.5 M	2 M	2.5 M
Calcite	85.6	91.3	84.4	87.1	86.9	86.4
Aragonite	2.8	2.2	2.2	2	2.8	2.4
Vaterite	11.6	6.5	6	7.7	4.8	4.4
Ammonium Chloride	_	-	7.4	3.2	5.5	6.8

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۲- درصدهای کلسیت، آراگونیت، واتریت ،آمونیوم کلرید رسوب یافته در غلظت‌های مختلف کلسیم کلراید.

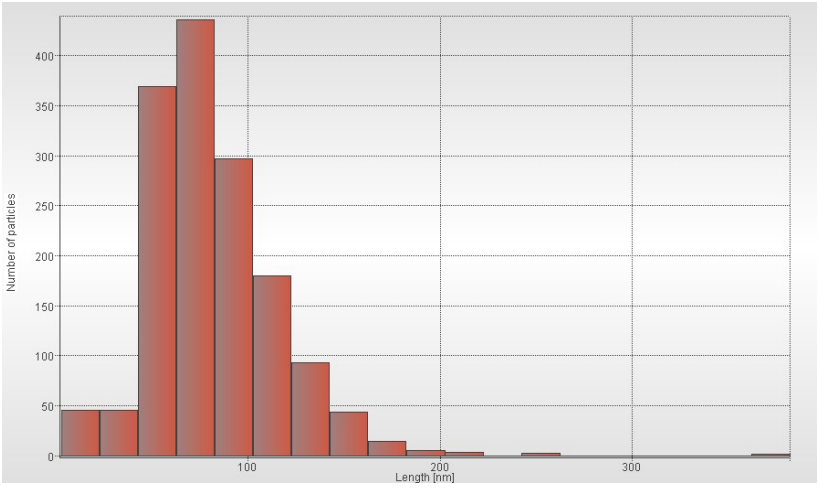
Table 2. The percentages of calcite, aragonite, vaterite, and ammonium chloride precipitated in different calcium chloride concentrations.

Calcium Chloride Concentration / Crystal Percent	0.25 M	0.5 M	1 M	1.5 M	2 M	2.5 M
Calcite	96	89.9	93.3	89.5	95.4	93.1
Aragonite	3.9	3.5	2.3	3	2.8	2.7
Vaterite	-	-	1	5.1	1.8	4.2
Ammonium Chloride	-	6.7	4.3	6	-	-



شکل ۴- پراکنش اندازه ذرات کریستال‌های تولید شده در غلظت ۰/۵مولار اوره به وسیله PSA.

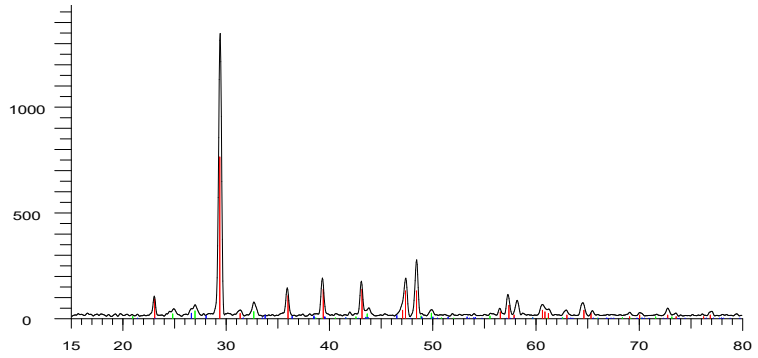
Figure 4. The particle size distribution of produced crystals in 0.5 M urea concentration using PSA.



شکل ۵- پراکنش اندازه ذرات کریستال‌های تولید شده در غلظت ۰/۲۵مولار کلسیم کلراید به وسیله PSA.

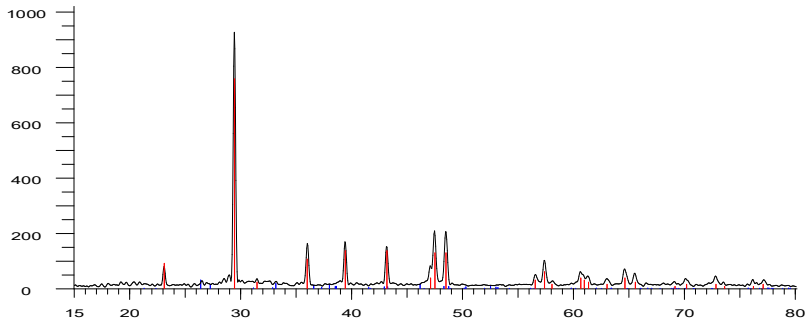
Figure 5. The particle size distribution of produced crystals in 0.25 M calcium chloride concentration using PSA.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۶- آنالیز XRD نمونه‌ی ۰/۵ مولار اوره.

Figure 6. XRD analysis of 0.5 M urea sample.



شکل ۷- آنالیز XRD نمونه ی ۰/۲۵ مولار کلسیم کلراید.

Figure 7. XRD analysis of 0.25 M calcium chloride sample.

بر اساس مطالعات برخی محققین مقدار مشخصی از محلول اوره‌آز و محلول واکنش‌گر حاوی اوره، کلرید کلسیم و کلرید نیکل مخلوط شده و متعاقبا طی هیدرولیز اوره کربنات کلسیم رسوب یافته در پایین لوله‌های آزمایش ته‌نشین می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که نسبت رسوب ۹۵ ٪ ی کلسیت برای کم‌ترین غلظت اوره - کلرید کلسیم (۰/۲۵ mol/L) به این معنی است مقدار اوره‌آز موجود در محلول قادر به هیدرولیز تقریبا تمام اوره است و برای هیدولیز تمام اوره کافی‌ست. به طور غیر منتظره، نتایج همچنین نشان می‌دهند که با افزایش غلظت اوره - کلرید کلسیم باعث کاهش کارایی فرآیند می‌شود و نسبت رسوب کاهش می‌یابد. بعبارت دیگر یعنی بخشی از اوره موجود در محلول توسط اوره‌آز هیدرولیز نمی‌شود. این رفتار ممکن است به دلیل مقدار ناکافی آنزیم اوره‌آز و یا به دلیل اثر منفی غلظت بالا اوره - کلرید کلسیم باشد که تمایل به مهار فعالیت اوره‌آز دارد و در نتیجه در فرآیند بیوکاتالیز کم‌تر موثر است (Carmona et al., 2016). در واقع، اثر منفی افزایش غلظت اوره - کلرید کلسیم نیز توسط دیگر محققین نیز در نمونه‌های آماده‌شده به روشی مشابه گزارش شده است (Yasuhara & Debendra, 2012). اگرچه افزایش اولیه کلسیم و اوره مقدار رسوب کریستالی را افزایش می‌دهد اما این مطالعه نشان داد که از طرف دیگر با افزایش اوره و کلسیم کریستالهای کلسیت کوچک و بخش کلسیت آن نیز کمتر می‌شود.

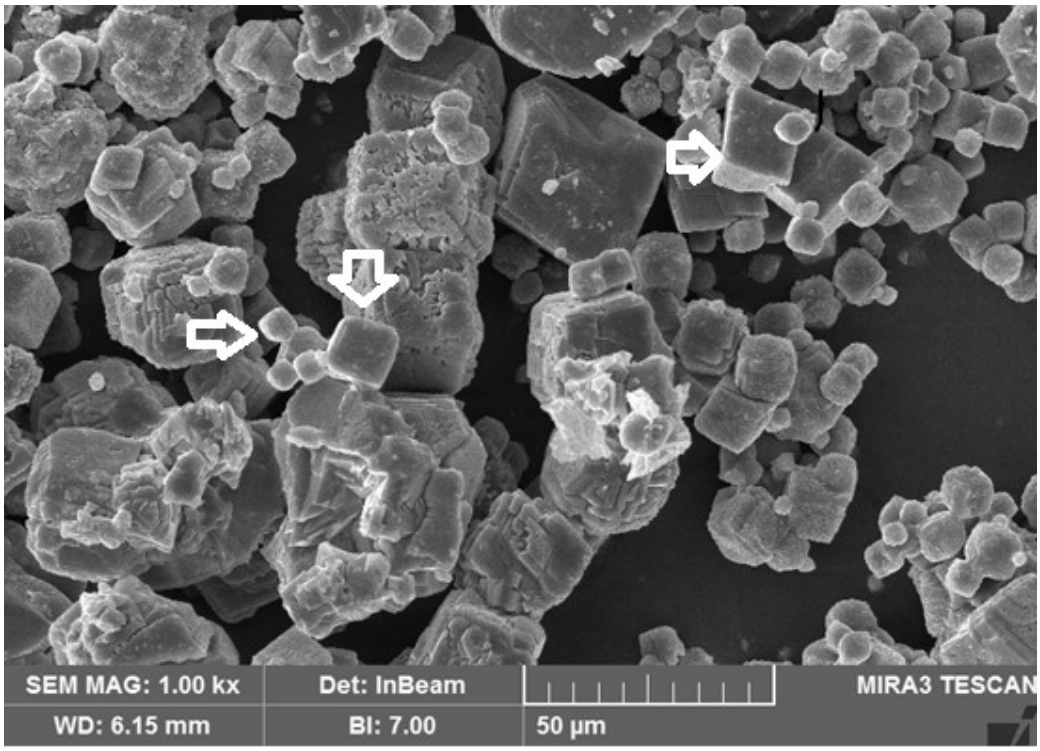
نتیجه‌گیری

EICP فرایندی صنعتی در چند جنبه پر اهمیت مانند تولید کلسیت به منظور کاربردهای بیوتکنولوژی و کنترل ریزگردها از اهمیت زیادی برخوردار است که در این مقاله به لحاظ تولید کلسیت به آن پرداخته شد. این مطالعه نشان داد تولید کلسیت در EICP فرایندی کارا به لحاظ نوع کریستال‌ها، مقدار کریستال‌های کربنات کلسیم و اندازه آنها است.

سپاسگزاری

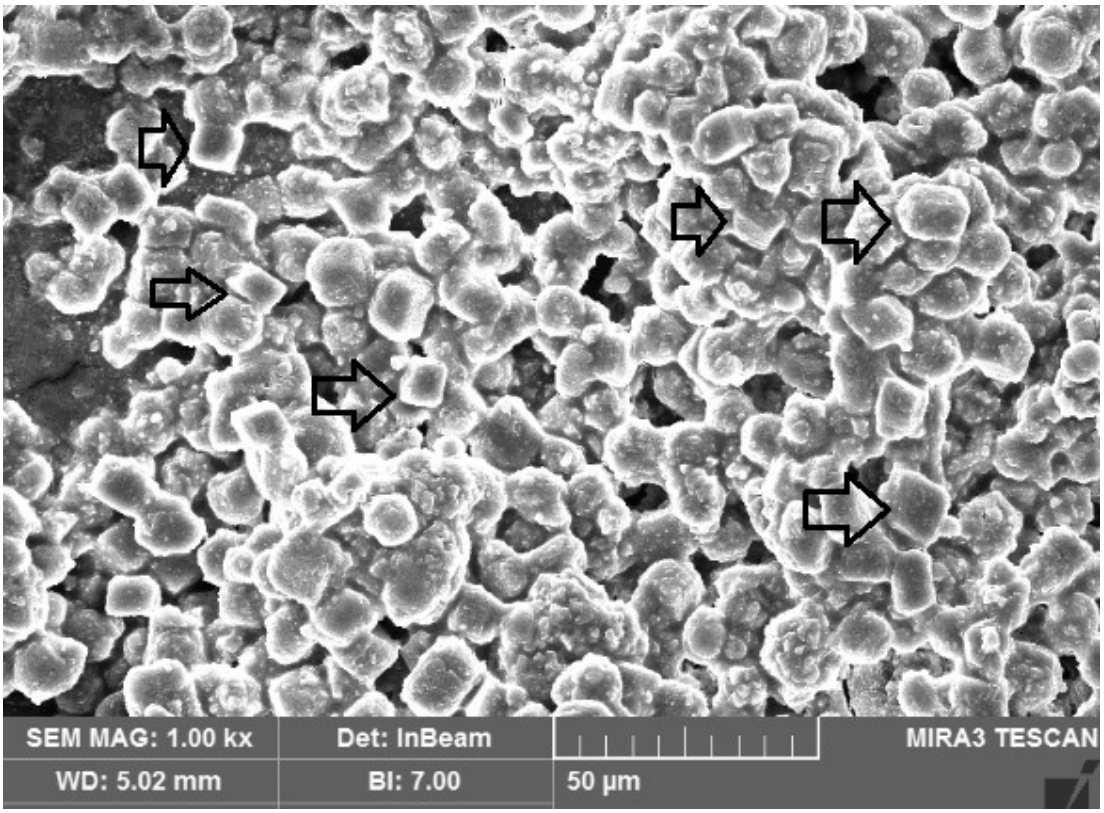
نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۸- تصویر کریستال‌های نمونه ۰/۵ مولار اوره: کریستال‌های مکعبی کلسیت هستند.

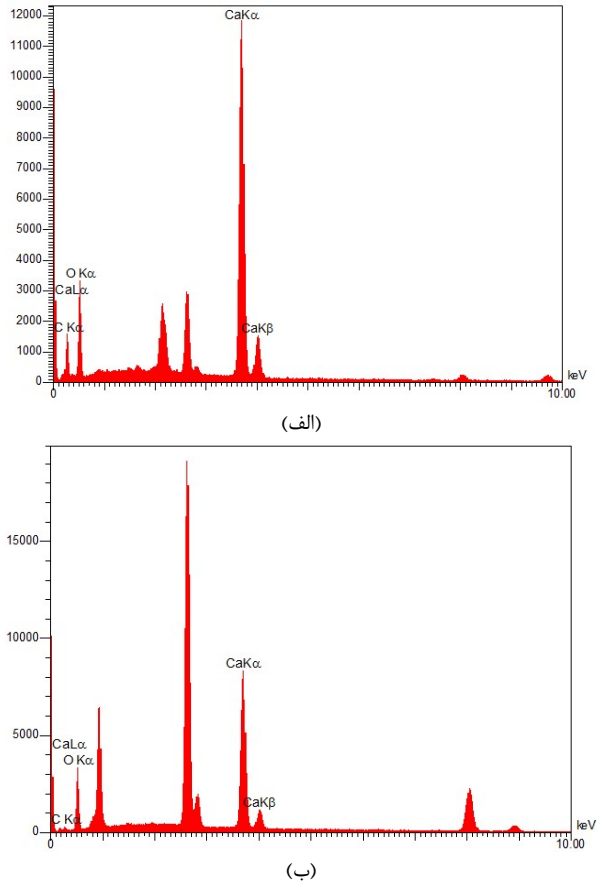
Figure 8. The image of crystals of 0.5 M urea sample: Cubic crystals are calcite.



شکل ۹- تصویر کریستال‌ها در نمونه ۰/۲۵ مولار کلسیم کلراید: کریستال‌های مکعبی کلسیت هستند.

Figure 9. The image of crystals of 0.25 M calcium chloride sample: Cubic crystals are calcite.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۱۰- آنالیز EDX کریستال‌های رسوبی الف) ۰/۵ مولار اوره و ب) ۰/۲۵ مولار کلرید کلسیم: حضور عناصر کربن، اکسیژن و کلسیم.

Figure 10. EDX analysis of precipitated crystals: the presence of carbon, oxygen, and calcium elements.

REFERENCES

Behzadipour, H., Pakbaz, M.S. & Ghezelbash, G.R. 2019. Effects of biocementation on strength parameters of silty and clayey sands. Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials 9: 24-32.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Carmona, J.P., Oliveira, P.J.V. & Lemos, L.J. 2016. Biostabilization of a sandy soil using enzymatic calcium carbonate precipitation. Procedia Engineering 143: 1301-1308.

Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.P. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. Sedimentary Geology 126: 9-23.

Chen, C., Han, H., Yang, W., Ren, X. & Kong, X. 2016. Polyethyleneimine-modified calcium carbonate nanoparticles for p53 gene delivery. Regenerative *Biomaterials* 13: 57-63.

Christians, S. & Kaltwasser, H. 1986. Nickel-content of urease from *Bacillus pasteurii*. Archives of Microbiology 145: 51-55.

Costa, L.M.M., Olyveira, G.M. & Salomão, R. 2017. Precipitated calcium carbonate nano-microparticles: applications in drug delivery. Advanced Tissue Engineering Regenerative Medicine 3: 00059.

DeJong, J.T., Fritzges, M.B. &Nüsslein, K. 2006. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 132: 1381-1392.

Dilrukshi, R.A.N., Nakashima, K. &Kawasaki, S. 2018. Soil improvement using plant-derived urease-induced calcium carbonate precipitation. Soils and Foundations, 58: 894-910.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D. & Carlini, C.R. 2004. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. European Journal of Biochemistry 271: 1357-1363.

Ghezelbash, G.R. & Haddadi, M. 2018. Production of nanocalcite crystal by a urease producing halophilic strain of *Staphylococcus saprophyticus* and analysis of its properties by XRD and SEM. World Journal of Microbiology and Biotechnology 34: 1-10.

Hamdan, N.M. 2015. Applications of enzyme induced carbonate precipitation (EICP) for soil improvement. Doctoral dissertation. Arizona State University. pp 25-31.

Hamdan, N., Zhao, Z., Mujica, M., Kavazanjian, E.J. & He, X. 2016. Hydrogel-assisted enzyme-induced

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

carbonate mineral precipitation. The Journal of Materials in Civil Engineering 25: 864-870.

Harkes, M.P., Van Paassen, L.A., Booster, J.L., Whiffin, V.S. & van Loosdrecht, M.C. 2010. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. Ecological Engineering 36: 112-117.

Hoang, T., Alleman, J., Cetin, B., Ikuma, K. & Choi, S.G. 2019. Sand and silty-sand soil stabilization using bacterial enzyme–induced calcite precipitation (BEICP). Canadian Geotechnology Journal 56: 808-822.

Javadi, N., Khodadadi, H., Hamdan, N. & Kavazanjian, E.J. 2018. EICP treatment of soil by using urease enzyme extracted from watermelon seeds. In IFCEE. Pp. 115-124.

Kavazanjian, E. & Hamdan, N. 2015. Enzyme induced carbonate precipitation (EICP) columns for ground improvement. In IFCEE. Pp. 2252-2261.

Keykha, H.A., Asadi, A., Huat, B.K. &Kawasaki, S. 2018. Microbial induced calcite precipitation by *Sporosarcina pasteurii* and *Sporosarcina aquimarina*: Environmental Geotechnics 6: 562-566.

Nakano, H., Takenishi, S. & Watanabe, Y. 1984. Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes.* Agricultural and Biological Chemistry 1: 1495-502.

Nemati, M., Greene, E.A. & Voordouw, G. 2005. Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option. Process Biochemistry 40: 925-933.

Oliveira, P.J.V., Freitas, L.D. &Carmona, J.P.S.F. 2016. Effect of soil type on the enzymatic calcium carbonate precipitation process used for soil improvement. Journal of Materials in Civil Engineering 29: 1-7.

Pakbaz, M.S., Behzadipour, H. & Ghezelbash, G.R. 2018. Evaluation of shear strength parameters of sandy soils upon microbial treatment. Geomicrobiology Journal 35: 721-726.

Putra, H., Yasuhara, H. & Fauzan, M. 2022. Review of enzyme-induced calcite precipitation as a ground-improvement technique. Infrastructures 5: 1-14.

Sekkal, W. & Zaoui, A. 2013. Nanoscale analysis of the morphology and surface stability of calcium carbonate polymorphs. Scientific Reports 3: 1-10.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. 1999. Microbiological precipitation of $CaCO_3$. Soil Biology and Biochemistry 3: 1563-1571

Thompson, J. & Morrison, G. 1951. Determination of organic nitrogen. Control of variables in the use of Nessler's reagent. Analytical Chemistry 23: 1153-1157.

Torgal, F.P., Labrincha, J.A., Diamanti, M.V., Yu, C.P. & Lee, H.K. 2015. Biotechnologies and biomimetics for civil engineering. Springer International, pp: 21-56.

van Paassen, L.A. 2009. Biogrout: Ground improvement by microbially induced carbonate precipitation. Ph.D. dissertation. Delft University of Technology. Delft, Netherlands, 203 pp.

Yasuhara, H. & Debendra N. 2012. Evaluation of cementation effect of sand mediated by enzyme induced calcium carbonate precipitation. In proceedings of the 2012 World Congress on Advances in Civil, Environmental, and Materials Research, Seoul, Korea. pp: 26-30.

*****

How to cite this article:

Hossein Pour, M., Mohammadi, M. & Ghezelbash, G.R. 2023**.** Biocementation and calcite precipitation by intracellular extract of *Sporosarcina pasteurii*. Nova Biologica Reperta 10: 208-218. (In Persian).

حسین‌پور، م.، محمدی، م. و قزلباش، غ.ر. ۱۴۰۲. سیمان سازی زیستی و رسوب کلسیت توسط عصاره درون سلولی باکتری اسپوروسارسینا پاستوری. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۲۱۸-۲۰۸.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]