

# لیزینی باسیلوس: کاندیدای مناسبی برای تولید کلسیت و مطالعه کارایی پتانسیل سیمانی کردن آن

غلامرضا قزلباش<sup>۱\*</sup>، آرزو کرمی<sup>۲</sup>

۱- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران  
۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\*صندوق پستی ۶۱۳۵۷۸۳۱۵۱، اهواز، ایران  
rghezelbash@scu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷

## چکیده

سیمانی شدن خاک‌ها و بتن‌ها توسط فرایند التواء میکروبی به واسطه فعالیت اوره‌آزی فرایندی است که مستقیماً به کارایی این آنزیم در باکتری‌های مولد آن مرتبط است. جداسازی میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت بالای اوره‌آزی ممکن است به جداسازی جدایه‌هایی منجر شود که در مقایسه با سویه‌های حاضر دارای قابلیت بیشتری در سیمانی کردن باشند. این پژوهش به جداسازی جدایه‌هایی با قابلیت بالای اوره‌آزی می‌پردازد. جدایه ۲۳۳ از بین ۲۸۳ جدایه دارای بیشترین فعالیت اوره‌آزی بود که فعالیت اوره‌آزی آن آزاد سازی ۵/۰۴ میکرومول آمونیوم در میلی‌لیتر در دقیقه بود. این جدایه با استفاده از تعیین توالی قطعه‌ای از 16S rRNA و خصوصیات بیوشیمیایی به‌عنوان یک لیزینی باسیلوس شناسایی شد و تحت عنوان *Lysinibacillus* sp. strain 233 در NCBI با شماره دسترسی OQ379213 ثبت شد. آنالیز کریستال‌های کلسیت این باکتری در محیط رسوبی توسط XRD نیمه کمی نشان داد که ۸۷/۱ درصد کریستال‌های تولید شده کلسیت بوده و تنها ۱۲/۹ درصد از کریستال‌های تولید شده واتریت بودند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی FESEM به خوبی کریستال‌های مکعبی کلسیت را نشان داد و آنالیز EDX حضور عناصر کلیدی کلسیت-کربن، اکسیژن و کلسیم را اثبات کرد.

**کلید واژگان:** فعالیت اوره‌آزی، کلسیت، لیزینی باسیلوس، XRD

## ۱- مقدمه

فرایند رسوب میکروبی کلسیت یک مکانیسم ساده از رسوب کربنات کلسیم است که غلظت بالایی از کلسیت را در مدت زمان کوتاه تولید می‌کند. یکی از مکانیسم‌های تولید کلسیت میکروبی استفاده از فعالیت اوره‌آزی میکروارگانیسم‌ها است. مقدار آنزیم اوره‌آز و فعالیت اوره‌آزی، غلظت اوره، pH، غلظت کلسیم و در دسترس بودن مکان‌های هسته‌گذاری از عوامل مهم در تولید کلسیت در این روش هستند [۱]. غلظت بالای سلول باکتری باعث افزایش میزان رسوب کلسیت در فرایند رسوب کلسیت طی القاء میکروبی<sup>۱</sup> (MICP) از طریق افزایش غلظت اوره‌آز برای هیدرولیز اوره می‌شود. بنابراین، هیدرولیز اوره ارتباط مستقیمی با غلظت سلول های باکتری و همین‌طور توان اوره‌آزی آنها دارد [۲]. جدا از آنزیم اوره‌آز آنزیم کربنیک انیدراز نیز موجب تولید کلسیت می‌شود. تاکنون بسیاری از باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از جمله می‌توان به *آئروباکتر آئروژنز*<sup>۲</sup>، *باسیلوس ساب‌تیلیس*<sup>۳</sup>، *باسیلوس مگاتریوم*<sup>۴</sup>، *سودوموناس دنیتریفیکانس*<sup>۵</sup> و *اسپوروسارسینا پاستوری*<sup>۶</sup> اشاره کرد.

ژئوتکنولوژی میکروبی، استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا مشتقات آنها در تغییر مشخصات مهندسی خاک با هدف بهبود مقاومت، پایداری و سختی آن است. رسوب کلسیت طی القاء میکروبی، فرایند سیمانی شدن زیستی<sup>۷</sup> است که به موجب آن ذرات خاک در محل‌های تماس سطوح به یکدیگر متصل می‌شوند و فضای خالی در محیط متخلخل را کاهش می‌دهند. سیمانی‌شدن زیستی در

مقایسه با تکنیک‌های سنتی، ارزان‌تر و سازگارتر با محیط زیست است. میکروارگانیسم‌های مولد اوره‌آز با تولید این آنزیم و طی یکسری واکنش‌های بیولوژیکی و شیمیایی در نهایت موجب تولید یون کربنات می‌شوند. یون‌های کربنات با یون‌های کلسیم واکنش داده و موجب رسوب کلسیت بر روی جسم باکتری می‌شوند [۳].

تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های خاک توانایی تولید آنزیم اوره‌آز را دارند [۴]. القای میکروبی رسوب کربنات کلسیم نیازمند یک ارگانیسم با توانایی بالا در تولید آنزیم اوره‌آز است. بیشترین مطالعات در این زمینه، بر روی باکتری خاکزی *اسپوروسارسینا پاستوری*، به دلیل تولید زیاد اوره‌آز و بیان دائمی آن تمرکز داشته است [۵]. *اسپوروسارسینا پاستوری* رایج‌ترین باکتری استفاده شده برای رسوب‌گذاری کربنات کلسیم می‌باشد. مطالعات مشخص کرده‌اند که مقدار کلسیت تولید شده با توجه به انواع گونه‌های باکتری و فعالیت اوره‌آزی آنها متفاوت است [۶]. این مطالعه تلاش می‌کند تا باکتری‌های مولد اوره‌آز تولید کننده کلسیت را قابلیت تولید بالایی داشته باشد را از منابع محیطی جدا کند. از سوی دیگر، نوع کریستال‌های تولید شده مطالعه و فعالیت اوره‌آزی آنها سنجید می‌شود تا شاید بتوان به جدایه‌هایی با قابلیت صنعتی شدن به منظور افزایش مقاومت خاک‌ها و بتن‌ها دست یافت. هدف اصلی این پژوهش رسیدن به جدایه های مولد اوره‌آز به جز موارد رایجی است که در تمام کلکسیون‌های میکروبی وجود دارد.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱ مواد و محیط

تمام مواد این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) و دکتر مجلی (ایران) تهیه شده است. برای بررسی کیفی تولید آنزیم اوره‌آز از محیط کشت اوره آگار بیس استفاده شد که به آن ۲ درصد اوره اضافه شد. برای تشکیل نانوکریستال‌های کلسیت از محیط کشت رسوبی استفاده

<sup>۱</sup> Microbial induced carbonate precipitation (MICP)<sup>۲</sup> *Aerobacter aerogenes*<sup>۳</sup> *Bacillus subtilis*<sup>۴</sup> *Bacillus megaterium*<sup>۵</sup> *Pseudomonas denitrificans*<sup>۶</sup> *Sporosarcina pasteurii*<sup>۷</sup> Bio-cementation

شد که شامل نوترینت برات ۰/۸ درصد، کلرید کلسیم آبدار ۲/۵ درصد،  $\text{NaHCO}_3$  ۰/۲ درصد،  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ۱ درصد، اوره ۲ درصد و آگار ۱/۵ درصد (pH=8) بود. در تمام موارد اوره بعد از اتوکلاو محیط و به صورت فیلتر شده استریل و به محیط اضافه شد [۷].

## ۲-۲ غربالگری اولیه باکتری‌ها

برای جداسازی اولیه باکتری‌ها، ۱۰ گرم از نمونه خاک مناطق مختلف استان فارس (قلات، سپیدان، بابامیر و دهستان‌های ماهور، برم شور و میشان علیا) و استان خوزستان (اهواز، حمیدیه، رود کارون و پساب کارخانه الکل سازی رازی) به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل، منتقل شد. نمونه‌ها بر روی دستگاه شیکر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد شیک (شیکر انکوباتور، فاطر الکتریک، ایران) شدند. رقت های  $10^{-3}$  تا  $10^{-6}$  تهیه شد و از رقت‌های فوق ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی پلیت‌های حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. نمونه‌های آب مناطق فوق نیز تهیه شد که در این حالت مستقیماً رقیق و سپس کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند. سپس طی خالص‌سازی، تک کلنی‌های به دست آمده بر روی محیط NA کشت داده شدند تا غربالگری‌های بعدی بر روی آنها انجام شود [۸و۹].

## ۳-۲ غربالگری باکتری‌های مولد اوره‌آز

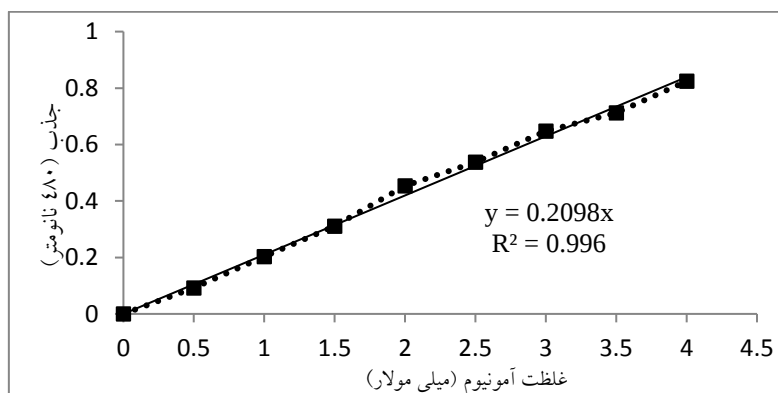
برای غربالگری باکتری‌های مولد اوره‌آز، هریک از جدایه‌های خالص شده مرحله قبلی بر روی محیط اختصاصی اوره آگار بیس کشت داده شدند. جدایه‌های تولیدکننده اوره‌آز با آزادسازی آمونیوم ناشی از هیدرولیز اوره باعث قلیایی شدن محیط کشت و در پی آن موجب تغییر رنگ محیط به رنگ صورتی می‌شدند. به این ترتیب باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز از سایر باکتری‌های که فاقد این آنزیم بودند تشخیص داده شد [۱۰].

## ۴-۲ غربالگری باکتری‌های مولد کلسیت

این غربالگری برای بررسی تولید یا عدم تولید نانوکریستال‌های کربنات کلسیم توسط جدایه‌های منتخب انجام شد. برای این منظور ابتدا جدایه‌ها بر روی محیط کشت رسوبی کشت داده شدند و سپس پلیت‌های رسوبی کشت داده شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس، با میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) با بزرگنمایی ۴۰-۴۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند [۷].

## ۵-۲ پروفایل رشد باکتری و فعالیت اوره‌آزی

باکتری بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۲ درصد اوره کشت داده شد و به مدت ۱۲ ساعت با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت.



شکل ۱ منحنی استاندارد آمونیوم در غلظت‌های مختلف با استفاده از معرف نسلر

با استفاده از کلنی‌های خالص فعال شده فوق مایع تلقیح با کدورت ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (اسپکتروفتومتر Mapada، چین) تهیه شد و به نسبت ۱ درصد حجمی حجمی به محیط نوترینت براث حاوی اوره تلقیح شد. ارلن‌های تلقیح شده به مدت ۴۰ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هر ۴ ساعت یکبار جذب باکتری و فعالیت اوره‌آزی باکتری بررسی شد. به منظور فعالیت اوره‌آزی هر ۴ ساعت سلول‌ها شسته شدند و در بافر فسفات ۰/۱ مولار pH=8 حاوی اوره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ انکوباسیون شدند. سپس مقدار آمونیوم آزاد شده توسط معرف نسلر و بر اساس منحنی استاندارد تعیین شد (شکل ۱) [۱۱ و ۱۲]. برای رسم منحنی استاندارد ۵۰۰ میکرولیتر نمونه استاندارد در غلظت‌های مختلف با ۱۷۵۰ میکرولیتر آب و ۲۵۰ مایکرولیتر معرف نسلر مخلوط و بعد از ۱۰ دقیقه جذب آن در ۴۸۰ نانومتر مطالعه شد. نمونه‌های مجهول هم طبق همین روش تعیین غلظت شدند و در مواردی که غلظت از حد نهایی منحنی بیشتر بود رقیق‌سازی انجام شد. یک واحد آنزیمی مقداری از آنزیم است که ۱ میکرومول آمونیوم از اوره در ۱ دقیقه در ۱ میلی‌لیتر آزاد کند. فعالیت ویژه آنزیم نیز با تقسیم فعالیت آنزیمی بر کدورت باکتری (OD600 nm) به دست آمد [۱۲].

## ۶-۲ شناسایی جدایه توسط تکنیک‌های مولکولی و

### بیوشیمیایی

بهترین جدایه بر اساس توانایی آزاد کردن آمونیوم و فعالیت‌های آنزیمی انتخاب شد و طی آنالیز مولکولی و تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. ابتدا استخراج ژنوم با روش جوشاندن انجام شد [۱۳]. پرایمرهای (رفت: 27F-YM، برگشت: 1492R-Y) مورد استفاده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی توسط شرکت سیناژن سنتز شدند. برنامه PCR (ترموسایکر اپندروف، آلمان) شامل ۹۵ درجه ۴ دقیقه مرحله اول یا

واسرشت، مرحله دوم شامل ۳۵ سیکل بود که شامل ۹۴ درجه، ۱ دقیقه؛ ۵۵ درجه، ۱ دقیقه و ۷۲ درجه، ۲ دقیقه بود. مرحله سوم یا نهایی مرحله طولی سازی بود که ۵ دقیقه در ۷۲ درجه به طول انجامید [۱۳]. بعد از ژل الکتروفورز (Labnet، کره) و مشاهده تک باندهای مشخص و قرار گرفته در ناحیه ۱۵۰۰ جفت بازی توسط ژل‌داک (Vilber Lourmat، فرانسه)، محصول PCR به منظور تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد. نتایج مربوط به تعیین توالی پس از ویرایش توسط نرم‌افزار Fintch TV در سامانه بین‌المللی NCBI، BLAST و با باکتری‌های موجود در GenBank مقایسه شد و نزدیکترین سویه باکتریایی بر اساس توالی 16S rRNA تعیین شد. پس از تعیین جایگاه فیلوژنی، تست‌های واکنش گرم، حرکت، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته و هیدرولیز ژلاتین به‌عنوان تست‌های مکمل شناسایی انجام شد [۱۵].

## ۷-۲ آنالیز XRD کریستال‌ها

در این مطالعه کلنی‌ها بعد از جمع‌آوری و خشک‌سازی توسط XRD نیمه کمی مطالعه شدند. ابتدا کلنی‌های خشک شده برای بررسی شکل‌شناسی نانو ذرات از دستگاه طیف نگار پرتوایکس (Bruker) D8 advance، آلمان) با تشعشع  $CuK\alpha$  تحت شرایط ۴۰ kV و ۴۰ mA بررسی شدند. پرتو دهی نمونه‌ها توسط XRD در زاویه‌ی ۵-۸۰ درجه و width step ۰/۰۵ درجه و زمان اسکن  $2^{-1}$  ثانیه انجام شد. آنالیزهای XRD نیمه کمی توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان انجام شد [۱۴ و ۱۶].

## ۸-۲ آنالیز FESEM کریستال‌ها

آنالیز شکل‌شناسی کریستال‌ها نیز توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان و شرکت مهامکس با استفاده از FESEM (MIRA3، TE-SCAN، جمهوری چک) انجام شد. ابتدا نمونه‌ها برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آنالیز ذرات توسط چسب مس بر روی استاب‌های (نگهدارنده

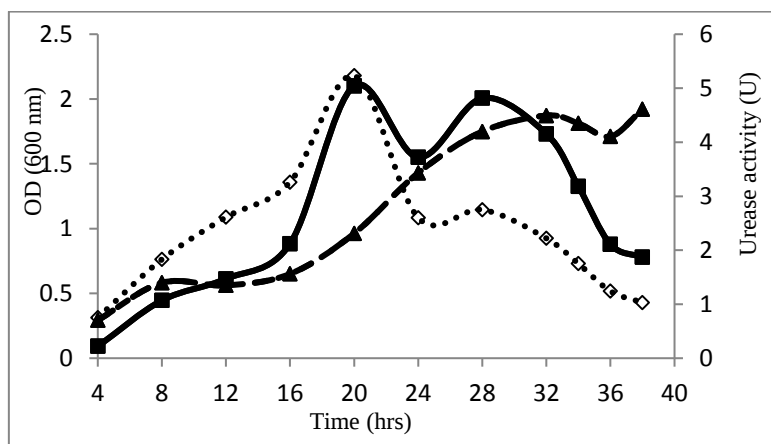
نمونه) فلزی تثبیت شدند و سپس با طلا پوشش‌دهی شدند [۱۴]. علاوه بر این، برای اثبات ماهیت کلسیت بودن یا تعیین اجزاء تشکیل دهنده کریستال‌ها از EDX استفاده شد.

### ۳- نتایج

#### ۳-۱ غربالگری باکتری مولد اوره‌آز و کلسیت

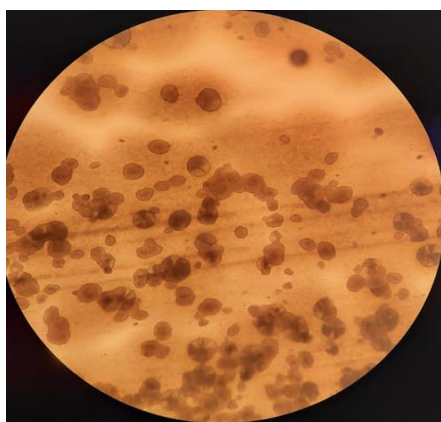
در این بررسی در مجموع ۲۸۳ جدایه اعم از مولد اوره‌آز یا فاقد اوره‌آز در غربالگری اولیه جداسازی شد که از این میان ۷۰ جدایه نسبت به سایر جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم اوره‌آز داشتند. غربالگری اولیه اوره‌آزی جدایه‌ها به صورت کیفی و با محیط اسلنت اوره آگار انجام شد. جدایه‌هایی که با سرعت بیشتر و شدت رنگ بیشتری در محیط فوق تغییر رنگ ایجاد کردند برای غربالگری بعدی انتخاب شدند. برای این منظور، جدایه‌های مولد اوره‌آز بر روی محیط رسوبی کشت داده شدند و پس از ۱۰ روز گرماگذاری، کلنی‌ها توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. بهترین جدایه در این بررسی جدایه ۲۳۳ بود که تصویر ۱۰X کریستال‌های آن در محیط رسوبی در شکل ۲ نشان داده شده است. جدایه ۲۳۳ از خاک روستای میشان علیا جدا شد.

#### ۳-۲ پروفایل رشد باکتری و فعالیت اوره‌آزی



شکل ۳ نمایی از پروفایل رشد *لیزنی باسیلوس* و فعالیت اوره‌آزی آن (■: فعالیت آنزیمی، ▲: منحنی رشد، ◇: فعالیت آنزیمی ویژه)

شکل ۳ منحنی رشد سلول‌های باکتری *لیزنی باسیلوس* در کشت مایع را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که از ساعت ۳۰ به بعد رشد باکتری ثابت شده و وارد فاز سکون شده است و بعد از آن نیز از ساعت حدوداً ۳۴ به بعد وارد فاز مرگ می‌شود. فعالیت اوره‌آزی باکتری و فعالیت اوره‌آزی ویژه باکتری نیز در نمودار مشخص است. این باکتری بعد از ۲۰ ساعت بیشترین فعالیت اوره‌آزی (۵/۰۴ واحد) را داشت که در همین ساعت فعالیت ویژه اوره‌آزی آن ۵/۲۴ واحد بود.



شکل ۲ نمای میکروسکوپی کلنی‌های جدایه ۲۳۳ با بزرگنمایی ۱۰X: کلنی به صورت توده‌هایی دیده می‌شود که کریستال‌ها درون آنها رسوب داده‌اند.

جنس شباهت داشت و آن نیز جنس *Lysinibacillus* بود. این قطعه ۳۳/۲ درصد از کل 16S rRNA را با تشابه ۱۰۰ درصدی از *Lysinibacillus* را پوشش می‌دهد. نتایج تست های بیوشیمیایی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی در مجموع جنس *لایزینی باسیلوس* را تأیید می‌کند.

### ۳-۴ آنالیز رسوبات

نتایج XRD کلسیت بودن کریستال‌ها را تأیید کرد و بعلاوه طی آنالیز نیمه کمی درصد کریستال‌های کربنات کلسیم نیز تعیین شد. شکل ۴ نمایی از پیک‌های کلسیت و واتریت را در رسوب تولید شده توسط باکتری جدا شده در این بررسی را نشان می‌دهد.

به عبارت دیگر این باکتری بیشترین فعالیت اوره‌آزی را در طول زمان‌های مختلف در ساعت ۲۰ نشان داد. فعالیت ویژه طبق فرمول بکار رفته نیز مشخص می‌کند که اگر غلظت سلول‌ها در فعالیت آنزیمی لحاظ شود همچنان در ساعت ۲۰ منحنی رشد بیشترین فعالیت آنزیمی وجود دارد.

### ۳-۳ شناسایی جدایه توسط تکنیک‌های مولکولی و

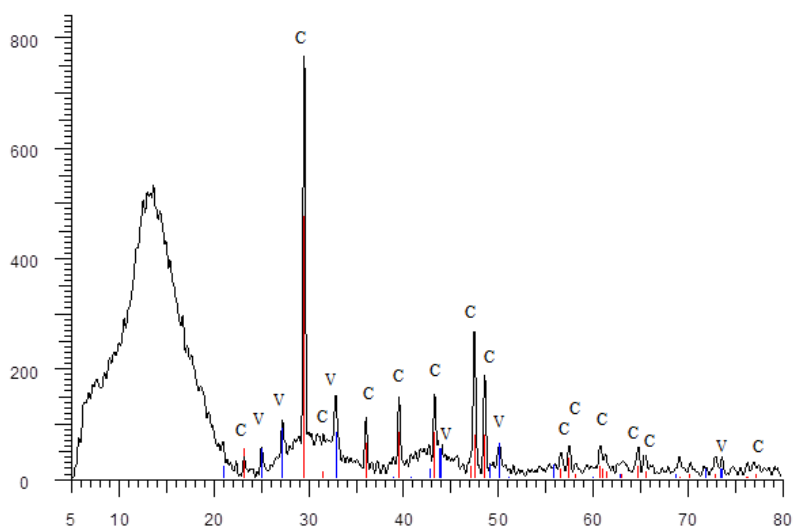
#### بیوشیمیایی

محصول واکنش PCR پس از تعیین توالی در سایت NCBI و EZBioCloud بلاست شد. نتایج بلاست در NCBI نشان داد که این باکتری یک *Lysinibacillus* sp. است. طول قطعه بلاست شده ۴۸۹ نوکلئوتید بود که بلاست همین قطعه در سایت EZBioCloud تنها با یک

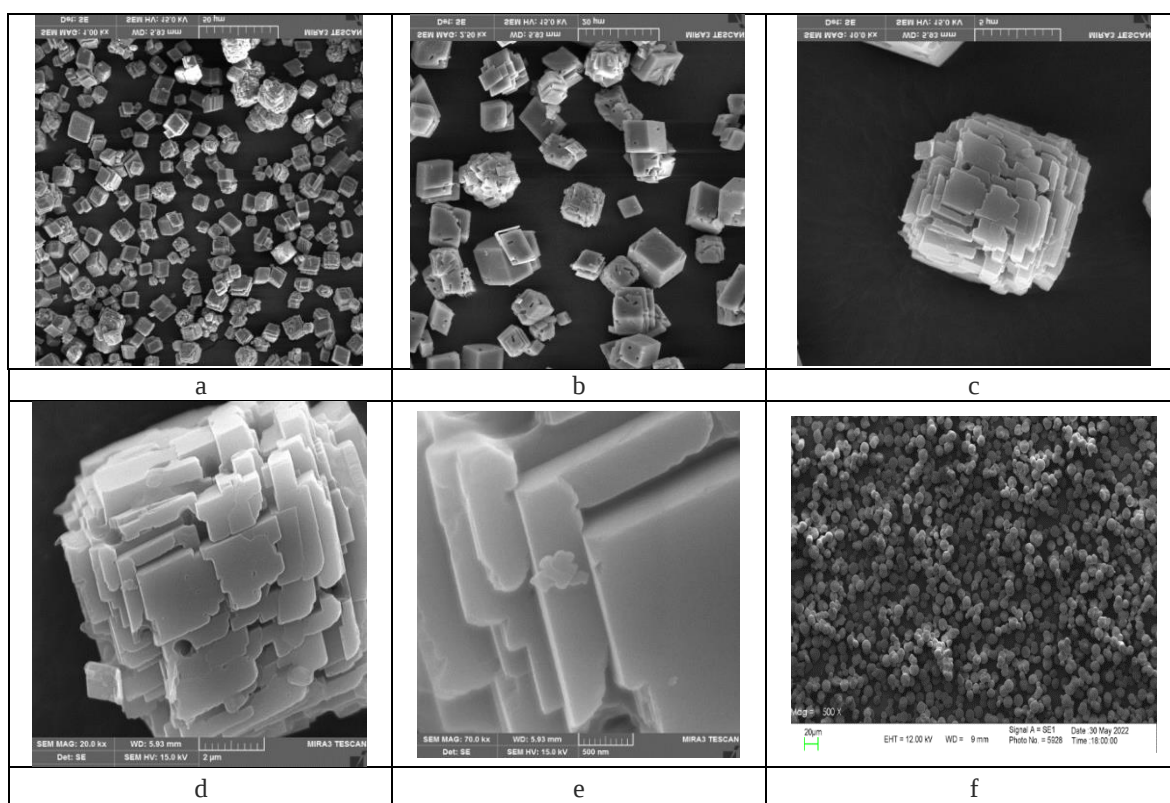
جدول ۱ تست‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی جدایه ۲۳۳

| تست مورفولوژی و بیوشیمیایی    | جدایه ۲۳۳    | <i>Lysinibacillus</i> spp. |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|
| رنگ آمیزی گرم                 | +            | +                          |
| محل اندوسپور                  | نیمه انتهایی | نیمه انتهایی               |
| حرکت                          | +            | +                          |
| کاتالاز                       | +            | +                          |
| اکسیداز                       | +            | +                          |
| مصرف قندها به عنوان منبع کربن | گلوکز        | +                          |
|                               | مانیتول      | +                          |
|                               | سوکروز       | -                          |
|                               | لاکتوز       | -                          |
| هیدرولیز نشاسته               | +            | V                          |
| هیدرولیز کازئین               | +            | V                          |

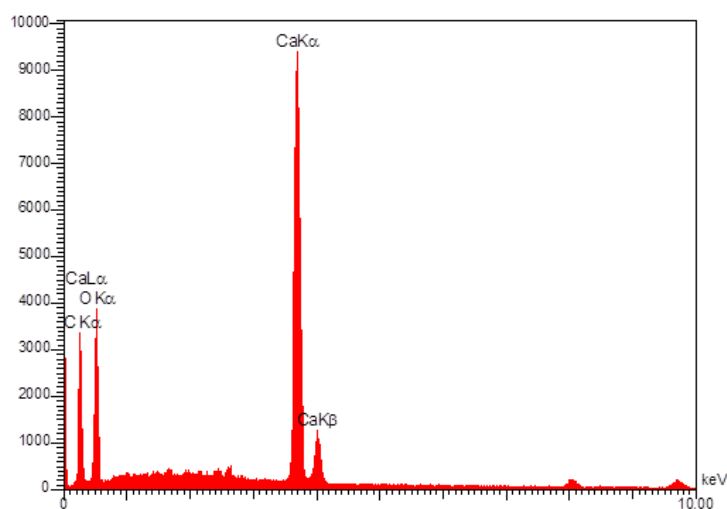
+: Positive, -: Negative, V: Variable



شکل ۴: نمایی از آنالیز XRD رسوب ایجاد شده توسط لیزنی باسیلوس در محیط رسوبی (C: کلسیت، V: واتریت).



شکل ۵: نمایی از SEM کریستال‌های کلسیت در بزرگنمایی‌های مختلف (a, b, c, d و e) و دولومیت (f)



شکل ۶ آنالیز EDX کریستال‌های مکعبی

کیلودالتون تعیین شد و دمای بهینه فعالیت این آنزیم ۶۵- ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود [۱۷].

در یک مطالعه توسط عبدالعلیم و همکاران (۲۰۱۹) [۱۸]، نه عدد نمونه خاک مصری برای یافتن باکتری‌های تولید کننده اوره‌آز بررسی شد که از آن پانزده نمونه استخراج و بین آنها تولید کننده‌های اوره‌آز مطلوب شناسایی شد. میزان رشد در pH های متفاوت و در حضور ملاس به عنوان منبع کربن بررسی شد. در این مطالعه، مشخص شد که ۱۵ نمونه می‌توانند رنگ شاخص pH را تغییر بدهند. همه این نمونه‌ها برای بررسی مورفولوژی کلنی روی محیط نوترینت آگار، شکل میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم بررسی شدند. همچنین، نواحی 16S rRNA آنها هم توالی‌یابی شدند و از این میان، دو نمونه سودوموناس /زئوفورمنس، با میزان فعالیت ۵۴/۹ U/ml و سیتروباکتر فروئیدی با مقدار ۴۵/۵ U/ml بیشترین آنزیم اوره‌آز را ترشح کرده بودند.

وایفین و همکاران (۲۰۰۴) [۱۲] برای اولین بار پژوهش‌های میدانی در زمینه سیمنتاسیون ذرات خاک به روش MICP را آغاز کردند. آنها برای معرفی سویه مناسب برای انجام واکنش هیدرولیز اوره، ابتدا آزمایشاتی بر روی فعالیت اوره‌آزی و میزان غلظت آمونیوم دو سویه

نتایج FESEM نیز نشان می‌دهد که کریستال‌ها شامل کلسیت و واتریت هستند. فراوانی کلسیت در تصاویر میکروسکوپ الکترونی واضح است. آنالیز کریستال‌های کلسیت این باکتری در محیط رسوبی توسط XRD نیمه کمی نشان داد که ۸۷/۱ درصد کریستال‌های تولید شده کلسیت (شکل ۵ قسمت‌های a، b و c) بوده و تنها ۱۲/۹ درصد از کریستال‌های تولید شده واتریت (شکل ۵ قسمت d) بودند. شکل ۶ آنالیز EDX کریستال‌های کلسیت را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل دیده می‌شود پیک‌های عناصر کلسیم، کربن و اکسیژن در شکل مشهود است.

#### ۴- بحث

تاکنون اوره‌آز از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان مختلفی جداسازی و مطالعه شده است. ناکانو و همکارانش (۱۹۸۴)، آنزیم اوره‌آز را از عصاره سلولی بروی باکتریوم آمونیاجنز<sup>۱</sup> خالص‌سازی کردند. فعالیت آنزیم اوره‌آز به دو روش نسلر و فنل هیپوکلریت سنجش شد و فعالیت ویژه آنزیم بعد از خالص‌سازی ۳۵۰۰ U/mg محاسبه شد. وزن مولکولی آنزیم اوره‌آز از طریق ژل فیلتراسیون حدود ۲۰۰

<sup>۱</sup> *Brevibacterium ammoniagenes*

جدایه به دست آمده در این پژوهش به لحاظ تولید آنزیم اوره‌آز از دسته میکروارگانیزم‌هایی هستند که پیوسته این آنزیم را تولید می‌کنند و با محصول خود سرکوب نمی‌شوند. این باکتری مانند *اسپوروسارسینا پاستوری* گرم مثبت و دارای اندوسپور است و به لحاظ مصرف منابع کربنی تنوع کربنی قابل قبولی دارد و بسیاری از منابع کربنی را نیز مصرف می‌کند.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی این پایان نامه کمال تشکر را دارند.

#### ۵- منابع

- [1] Behzadipour, H., Pakbaz, M. S. and Ghezelbash, G. R. (2019) Effects of biocementation on strength parameters of silty and clayey sands. *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterials*. 9, 24-32.
- [2] Khodadadi Tirkolaei, H. and Bilsel, H. (2015) Statistical modeling of environmental factors on microbial urea hydrolysis process for biocement production. *Adv. Mater. Sci.* 2015, 340930
- [3] Gomez, M. G., Graddy, C. M., DeJong, J. T. and Nelson, D. C. (2019) Biogeochemical changes during bio-cementation mediated by stimulated and augmented ureolytic microorganisms. *Sci. Rep.* 9, 1-5.
- [4] Sarda, D., Choonia, H. S., Sarode, D. D. and Lele, S. S. (2009) Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1111-1115.
- [5] Lauchnor, E. G., Topp, D. M., Parker, A. E. and Gerlach, R. (2015) Whole cell kinetics of ureolysis by *Sporosarcina pasteurii*. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1321-1332.
- [6] Ng, W. S., Lee, M. L. and Hii, S. L. (2012) An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement. *Int. J. Civ. Environ. Eng.* 6, 188-94.
- [7] Chahal, N., Rajor, A. and Siddique, R. (2011) Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 8359-72.

*اسپوروسارسینا پاستوری* و پروتئوس و لگاریس انجام دادند. پروتئوس و لگاریس ۱۰ برابر کمتر از آنچه برای سیمتاسیون ذرات خاک لازم می‌باشد، فعالیت اوره‌آزی دارد و *اسپوروسارسینا پاستوری* را می‌توان به دلیل فعالیت اوره‌آزی بالا و بیماریزا نبودن، مناسب‌ترین گزینه در این زمینه دانست.

وایفن و همکاران (۲۰۰۷) [۱۹] برای بررسی بهسازی بیولوژیکی خاک ماسه‌ای از میکروارگانیزم *اسپوروسارسینا پاستوری* استفاده کردند و به این نتایج دست یافتند که فعالیت میکروارگانیزم در داخل خاک با تولید رسوب کلسیت که مسئول پرکردن فضای خالی بین ذرات خاک هستند، باعث محدود شدن جریان آب در داخل خاک شده و نفوذپذیری خاک تا ۳۰ درصد کاهش پیدا می‌کند و افزایش مقاومت فشاری محصور نشده را بسیار قابل توجه گزارش دادند.

مطلب مهم دیگر کنترل فعالیت آنزیمی اوره‌آز است. در بسیاری از باکتری‌ها تولید اوره‌آز بسیار شدید توسط سیستم تنظیمی نیتروژن کنترل می‌شود. یعنی در حضور آمونیوم یا ترکیبات نیتروژنی بیان ژن اوره‌آز سرکوب می‌شود. آرتروباکتر اکسیدانز، سودوموناس فلورسنس، کلسیلا آتروژنز و باسیلوس مگاتریوم از این موارد هستند. دیگر باکتری‌ها در حضور اوره القاء می‌شوند و به حضور اوره به عنوان القاء گر بیان اوره‌آز رفتار می‌کنند. پروتئوس میرابیلیس و پروتئوس و لگاریس از این دسته هستند. کلاس سوم آنهایی هستند که پیوسته اوره‌آز را تولید می‌کند و بیان این آنزیم تحت تاثیر فقر یا فراونی نیتروژن محیط مثل آمونیوم، ترکیبات نیتروژنی یا اوره نیست. *اسپوروسارسینا پاستوری*، *اسپوروسارسینا اوره‌آ*، کمپیلوباکتر پیلوری، ریزوبیوم لگومینوزاروم و لیزنی باسیلوس از این دسته سوم هستند که اهمیت آنها را در صنعت و مطالعات محیطی ارزشمند می‌کند [۲۰].

- urease producing halophilic strain of *Staphylococcus saprophyticus* and analysis of its properties by XRD and SEM. World J. Microbiol. Biotechnol. 34, 1-10.
- [15] Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M. (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2. Springer, New York, pp 392-420.
- [16] Li, W., Liu, L.P., Zhou, P.P., Cao, L., Yu, L.J. and Jiang, S.Y. (2011). Calcite precipitation induced by bacteria and bacterially produced carbonic anhydrase. Curr. Sci. 100, 502-508.
- [17] Nakano, H., Takenishi, S. and Watanabe, Y. (1984) Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes*. Agric. Biol. Chem. 48, 1495-1502.
- [18] Abdel-Aleem, H., Dishisha, T., Saafan, A., AbouKhadra, A. A. and Gaber, Y. (2019) Biocementation of soil by calcite/aragonite precipitation using *Pseudomonas azotoformans* and *Citrobacter freundii* derived enzymes. RSC Adv. 31, 17601-17611.
- [19] Whiffin, V. S. (2004) Microbial  $\text{CaCO}_3$  precipitation for the production of biocement. Doctoral dissertation, Murdoch University.
- [20] Mobley, H. L. and Hausinger, R. P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. Microbiol. Rev. 53, 85-108.
- [8] Nasfi, Z., Busch, H., Kehraus, S., Linares-Otoya, L., König, G. M., Schäberle, T. F. and Bachoual, R. (2018) Soil bacteria isolated from tunisian arid areas show promising antimicrobial activities against gram-negatives. Front. Microbiol. 9, 2742.
- [9] Eaton, A. D., Clesceri, L. S. and Greenberg, A. E. (2014) Standard methods: for the examination of water and wastewater. Water Environment Federation, Virginia, United States, pp 5-35.
- [10] Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V. and Li, Y. (2013) Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. World J. Microbiol. Biotechnol. 29, 1453-60.
- [11] Gat, D., Tsesarsky, M., Shamir, D., and Ronen, Z. (2014). Accelerated microbial induced  $\text{CaCO}_3$  precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria. Biogeosciences, 11(10), 2561 .
- [12] Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A. and Harkes, M. P. (2007) Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiol. J. 24, 417-423.
- [13] Leeprasert, L., Chonudomkul, D. and Boonmak, C. (2022) Biocalcifying potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair. Microorganisms. 10, 963.
- [14] Ghezlbash, G. R. and Haddadi, M. (2018) Production of nanocalcite crystal by a

# ***Lysinibacillus* sp.: a suitable candidate for producing calcite and studying the efficiency of its bio-cementation potential**

Ghezelbash, G. R.<sup>\*1</sup>, Karami, A.<sup>2</sup>

1. Associate Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Master of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

rghezelbash@scu.ac.ir

Receipt: 2023/09/08

Accepted: 2024/12/30

## **Abstract**

The process of soil and concrete cementation through microbial induction depends on the efficiency of the enzymes in producing bacteria. The isolation of microorganisms with high urease activity may lead to the isolation of strains that are better at cementing in compression to the current strains. This research deals with the isolation of isolates with high urease ability. Isolate 233 out of 283 isolates was associated with the best urease activity, and its urease activity was the release of 5.04 micromoles of ammonium per millilitre per minute. This isolate was identified as *Lysinibacillus* through sequencing of a 16S rRNA fragment and characterization of its biochemical properties and it has been deposited in NCBI under accession number OQ379213 as *Lysinibacillus* sp. strain 233. The semi-quantitative XRD analysis the calcite crystals produced by the bacterium in the precipitation medium revealed that 87.1% were calcite while only 12.9% were vaterite. FESEM images revealed cubic calcite crystals and EDX analysis confirmed the presence of the key elements—carbon, oxygen, and calcium—corresponding to the calcite composition.

**Keywords:** Urease activity, Calcite, *Lysinibacillus* sp., XRD