مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰ DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

بررسی اثر مقادیر مختلف اوره و کلسیم در تشکیل فرمهای مختلف کربنات کلسیم با استفاده از *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی

نرجس گندلی مصطفی، غلامرضا قزلباش* و محمد شفیعی

ایران، اهواز، دانشگاه شهیدچمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۱

چکیده

سیمان سازی زیستی، فرآیند جدیدی است که در آن باکتری های هیدرولیزکننده‌ی اوره با تجزیه‌ی اوره و افزایش pH محیط و در حضور یون کلسیم امکان تشکیل کربنات کلسیم جامد را فراهم می‌کنند. هدف از این بررسی تولید کلسیت توسط باکتری *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی و بهینه سازی فاکتورهای موثر در تولید آن است . بعلاوه اثر منابع کربنی در محیطهای رسوبی مورد مطالعه قرار گرفت. طبق نتایج آنالیز XRD نیمه کمی مشخص شد که در محیط رسوبی، نمونه‌ی حاوی ۱ درصد اوره با ۹۴ درصد کلسیت و ۲/۴ درصد واتریت بهترین نمونه از نظر داشتن خلوص کلسیت بود. نمونه‌ی حاوی ۲ درصد کلسیم کلرید نیز با داشتن ۹۲/۳ درصد کلسیت، ۲/۸ واتریت و ۴/۹ درصد واتریت بیشترین میزان خلوص کلسیت و کمترین میزان محصولات جانبی را داشته است. طبق آنالیز ذرات توسط FESEM مشخص شد که ذرات تولید شده در محیط اوره ۱ درصد غالبا بین محدوده زیر ۱۰۰ نانومتر هستند. با افزایش اوره این محدوده بیشتر شد بطوریکه در اوره ۲ درصد فراوانی ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر کمتر گردید. آنالیزهای FESEM نشان داد که افزایش کلرید کلسیم موجب کاهش قابل ملاحظه‌ایی در درصد ذرات با اندازه ۰ تا ۵۰ نانومتر می‌شود. این مطلب در مورد اوره نیز صادق بود و مشخص شد اندازه ذرات کریستال‌ها در غلظت‌های بالای واکنش‌گرها افزایش می‌یابد. بعلاوه، اثر حضور منابع کربنی در محیط رسوبی در تولید نوع کریستال‌های کربنات کلسیم نیز بررسی شد که در مقایسه با عدم حضور آنها در مورد گلوکز و سوکروز تفاوت معنی داری دیده نشد. حضور مالتوز موجب کاهش کلسیت و افزایش دیگر کریستالها می‌شود.

واژه های کلیدی: محیط رسوبی، کلسیت، *اسپوروسارسینا پاستوری*، FESEM، XRD، نیمه کمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۶۴۴۸۱۵، پست الکترونیکی: rghezelbash@scu.ac.ir

مقدمه

کربنات کلسیم ماده معدنی فراوانی است که ۴٪ پوسته‌ی زمین را تشکیل داده و بواسطه‌ی کانی‌سازی زیستی (Biomineralization) یون‌های کلسیم، توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شود که از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۵ و ۷). کربنات کلسیم سه فرم کریستالی بدون آب به نام‌های کلسیت، آراگونیت و واتریت دارد. فرم‌های آبدار شامل فرم‌های کریستالی مونوهیدروکلسیت و ایکائیت (Ikaite) (کربنات کلسیم شش آبه) و کربنات کلسیم بی‌شکل (Amorphous calcium carbonate) (ACC) می‌باشد. کلسیت پایدارترین و واتریت ناپایدارترین فرم کریستالی کربنات کلسیم است. کاربرد کربنات کلسیم بستگی به مورفولوژی، اندازه، ساختمان، مساحت سطوح و خلوص که همگی به روش‌های آماده-سازی و فرایند تولید بستگی دارد. فرم‌های آمورف یا بی-شکل ناپایدارند و تمایل دارند به فرمهای کریستالی تبدیل شوند (۷).

مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰
DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

سیمان سازی زیستی (Biocementation) فرآیند جدیدی در مهندسی ژئوتکنیک (Geotechnical engineering) است که در آن باکتری‌های مولد اوره‌آز، اوره را هیدرولیز کرده و در حضور یون‌های کلسیم امکان تشکیل کربنات کلسیم کریستالی را فراهم می‌سازند. فراوانی و اهمیت میکروارگانیسم‌ها در ایجاد رسوب کلسیت باعث شده که این فرایند به مهم‌ترین محصول متابولیکی کانی‌سازی زیستی تبدیل شود. فرایند تولید میکروبی کلسیت (Microbial induced calcite precipitation (MICP)) یک فناوری موثر و سازگار با محیط زیست است که می تواند برای حل مشکلات مختلف محیطی از جمله اصلاح خاک کاربرد داشته باشند. حضور کلسیت بین ذرات ماسه موجب اتصال آنها با یکدیگر و افزایش مقاومت خاک‌های ماسه‌ایی می‌شود (۹ و ۱۶).

ابتدا آنزیم اوره‌آز هیدرولیز اوره را به آمونیوم و کربنات کاتالیز می‌کند. در این واکنش، ابتدا یک مول اوره به یک مول آمونیاک و یک مول اسیدکربامیک هیدرولیز می‌شود (واکنش ۱) که اسیدکربامیک فوق سپس بطور خودبخودی به یک مول آمونیاک و اسید کربنیک تجزیه می‌شود (واکنش ۲). محصولات فوق (H_2CO_3, NH_3) در آب موجب تشکیل بی‌کربنات، دو مول آمونیوم و دو مول یون-های هیدروکسید می‌شوند (واکنش ۳ و ۴). یون‌های هیدروکسید منجر به افزایش pH شده و موجب تشکیل یون های کربنات می‌شود (واکنش ۵) که در صورت حضور کلسیم با کلسیم رسوب کربنات کلسیم ایجاد می-گردد (واکنش ۶). (۵).

$$CO(NH_2)_2+H_2O\rightarrow NH_2COOH+ NH_3 \quad (۱)$$

$$NH_2COOH +H_2O\rightarrow H_2CO_3+ NH_3 \quad (۲)$$

$$H_2CO_3\rightarrow HCO_3^-+H^+ \quad (۳)$$

$$2NH_3 +2H_2O\rightarrow 2NH_4^++2OH^- \quad (۴)$$

$$HCO_3^-+H^++2OH^-\rightarrow CO_3^{2-}+2H_2O \quad (۵)$$

$$Ca^{2+} +CO_3^{2-}\rightarrow CaCO_3 \quad (۶)$$

اشکال مختلف کربنات کلسیم، به ترکیبات موجود در محیط کشت و شرایط تولید بستگی دارد. کلسیم کلرید و کلسیم استات به عنوان منابع کلسیم در محیط کشت می باشند و برخی از باکتری‌های شناخته شده مثل *باسیلوس* (*Bacillus*) و *سودوموناس* (*Pseudomonas*) به عنوان تولید کننده‌ی کربنات کلسیم در هر دو شرایط محیط طبیعی و آزمایشگاهی گزارش شدند (۱۹). مقادیر مختلف غلظت‌های اوره، مقادیر مختلف کلسیم کلراید و دیگر مواد غذایی بر روی تولید مقادیر مختلف کریستال‌های کربنات کلسیم و همین‌طور اندازه آنها موثر است. در مطالعه حاضر نیز اثر عوامل مختلفی مانند غلظتهای مختلف اوره، کلسیم کلراید و منابع کربنی در محیط رسوبی به طور کامل طی آنالیزهای XRD نیمه کمی و FESEM مطالعه شدند و اثر واکنش‌گرها و حضور دیگر مواد غذایی مانند کربن‌ها بر نوع کریستال کربنات کلسیم تولید شده و همین‌طور طیف ذرات تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روشها

میکروارگانیسم و مواد شیمیایی: تمام مواد شیمیایی در این مطالعه از شرکت مرک و سامچوئن کره تهیه شد. باکتری مولد کلسیت باکتری *اسپوروسارسینا پاستوری* (*Sporosarcina pasteurii*) محموعه کلکسیون‌های میکروبی ایران با کد PTCC1645 بود که طبق کاتالوگ در محیط نوترینت آگار حاوی ۲ درصد اوره فعال و نگهداری شد.

تولید کلسیت در محیط رسوبی: مواد سازنده محیط رسوبی که برای تولید و رسوب نانوکریستال‌های کلسیت استفاده شد شامل (گرم بر لیتر) نورینت براث ۳، کلرید کلسیم بی آب ۲۰، اوره ۲۰، بی‌کربنات سدیم ۲/۱۲، کلرید آمونیوم ۱۰ و آگار-آگار ۱۵ (pH= ۸) بود (۶). محیط رسوبی فوق بعد از تهیه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به

DOI: 10.22034/CMR.2022.2180 مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰

مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد و اوره توسط فیلتر ۰/۴۵ سرسرنگی و کلسیم کلراید توسط اتوکلاو به طور جداگانه استریل و به محیط رسوبی اضافه شد. بمنظور کشت باکتری و تولید کلسیت بر روی این محیط ابتدا باکتری به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۲ درصد اوره کشت داده شد و سپس در محلول سرم فیزیولوژی استریل غلظت OD_{600}=1 تهیه و ۱۰۰ مایکرولیتر از محلول فوق در محیط رسوبی کشت چمنی داده شد و به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری شدند. کلنی‌های حاوی رسوبات کریستالی تولید شده بعد از مطالعه توسط میکروسکوپ نوری لنز ۱۰x و اطمینان از تولید کریستال‌ها، جمع آوری و سپس شستشو و در دمای اتاق خشک شدند. سپس رسوبات خشک شده طی آنالیزهای مختلف مورد بررسی واقع شد (۸ و ۹).

بهینه سازی محیط رسوبی: در این مطالعه اوره در سطوح ۱ تا ۴ وزنی حجمی (۱، ۲، ۳ و ۴) درصد به صورت یک فاکتور در یک زمان ابتدا بهینه شد. سپس بعد از انتخاب بهترین غلظت اوره مقادیر کلسیم کلراید در غلظتهای ۱/۵ تا ۳ (۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳) درصد بهینه شد. pH تمام محیطهای فوق قبل از اتوکلاو بر روی ۸ تنظیم شد.

اثر منابع کربنی مختلف بر روی تولید کلسیت: محیط رسوبی فوق در حالتهای فاقد منبع کربنی اضافی و دارای منبع کربن اضافه در سه نوع گلوکز، مالتوز و سوکروز در دو سطح ۰/۵ و ۱ درصد بهینه شدند. بعبارت دیگر اثر حضور منابع کربنی در محیط رسوبی مورد مطالعه قرار گرفت.

آنالیزها: در این بررسی کلنی‌ها بعد از جمع‌آوری و خشک سازی 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 ساخت شرکت Bruker آلمان با تشعشع CuK_{α} تحت شرایط ۴۰ kV و ۴۰ mA استفاده گردید. پرتودهی نمونه‌ها توسط XRD در زاویه‌ی ۸۰-۵ درجه و width step ۰/۰۵ درجه و scan time $^{-1}$۲ ثانیه انجام شد (۸). آنالیزهای XRD نیمه کمی توسط آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان و اندازه ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گیسل میدانی (Field emission scanning electron microscopy) (FESEM) مدل MIRA3 ساخت شرکت TESCAN کشور جمهوری چک توسط شرکت آریا الکترون اپتیک تهران تعین شد. آنالیز شکل شناسی کریستال‌ها نیز توسط FESEM شرکت آریا الکترون اپتیک انجام شد. نمونه‌ها بمنظور تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آنالیز ذرات با استفاده از دستگاه FESEM با استفاده از چسب مس بر روی استاب‌های (نگهدارنده نمونه SEM) فلزی تثبیت شدند و سپس با طلا پوشش‌دهی شدند. آنالیزهای آماری نتایج نیز توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه در سطح معنی داری $p<0.01$ و آزمون تعقیبی توکی صورت گرفت.

نتایج

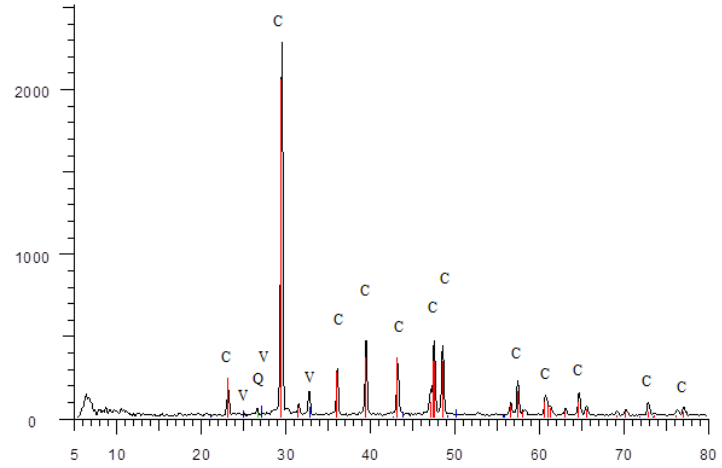
آنالیز XRD رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی با غلظت‌های مختلف اوره: نتایج XRD نیمه کمی نشان داد که اوره ۱ درصد یا ۲ درصد تفاوت چندانی ندارند اما با افزایش اوره درصد دیگر کریستالهای جانبی افزایش می‌یابد (جدول ۱). طبق این نتایج مشخص شد که محیط رسوبی حاوی ۱ یا ۲ درصد اوره با تشکیل میزان۹۴ و ۹۳/۵ درصد رسوب کلسیت و بدلیل داشتن محصولات جانبی کمتر به عنوان غلظتهای بهتری نسبت به سایر غلظت‌های اوره بودند. شکل ۱ و ۲ طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی بترتیب با اوره ۱ و ۲ درصد و غلظت ثابت کلسیم ۲ درصد را نشان می‌دهد. تصاویر مربوط به آنالیز XRD غلظتهای ۳ و ۴ درصد اوره در قسمت ضمیمه آمده است. مقادیر درصدی کلسیت، آراگونیت و واتریت در غلظت-

مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰
DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

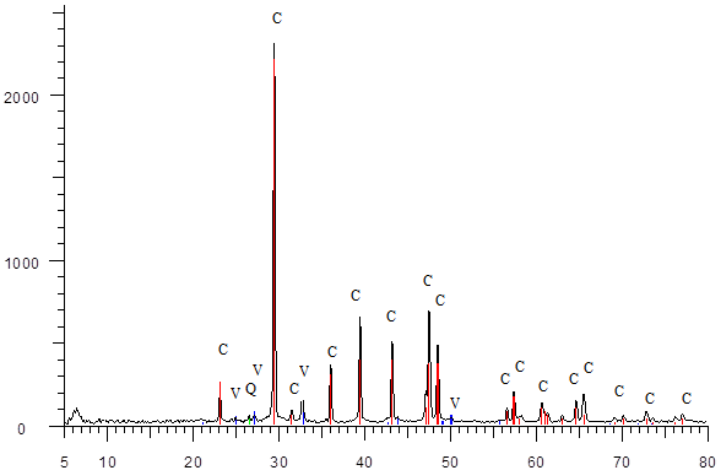
های مختلف اوره به لحاظ آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تفاوت قابل ملاحظه‌ایی بین ۱ و ۲ درصد اوره نیز به لحاظ مقادیر کریستال‌ها وجود ندارد. لذا وقتی تفاوتی بین غلظتهای اوره به لحاظ نسبت کریستالی تفاوتی قابل ملاحظه‌ایی نیست باید برای انتخاب بهترین غلظت اوره جدا از نسبت کریستالهای تولید شده به اندازه کریستال‌ها نیز نگاهی داشت که در ادامه به آن پرداخته شده است.

جدول ۱- نتایج آنالیز XRD برای رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی جامد با غلظت های مختلف اوره: غلظت کلسیم: ۲ درصد

نمونه / درصد اوره	۱ درصد	۲ درصد	۳ درصد	۴ درصد
درصد کلسیت	۹۴	۹۳/۵	۹۴	۹۳/۵
درصد کوارتز	_	_	۲/۵	۲/۴
درصد واتریت	۲/۴	۲/۲	۳/۱	۴/۱



شکل ۱- طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۱ درصد و غلظت کلسیم ۲ درصد. C: کلسیت،V: واتریت، Q: کوارتز



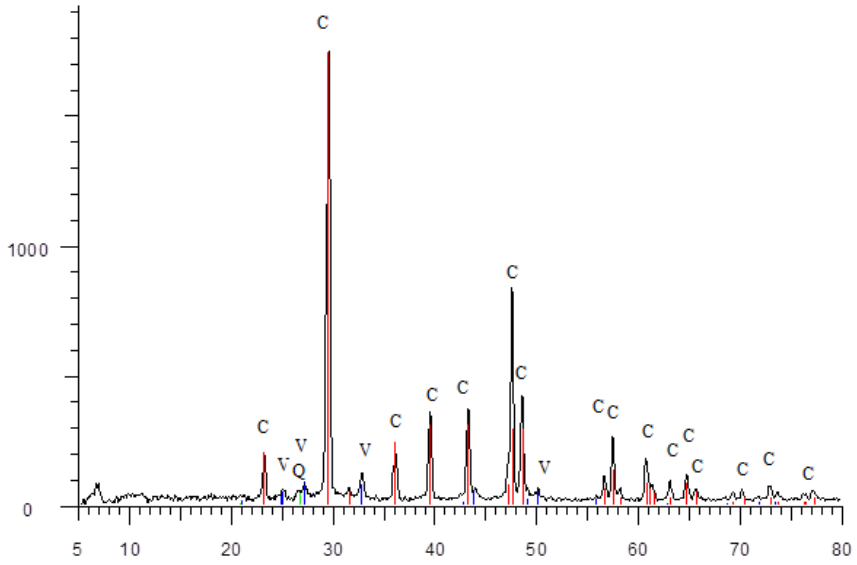
شکل ۲- طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۲ درصد و غلظت کلسیم ۲ درصد. C: کلسیت،V: واتریت، Q: کوارتز

DOI: 10.22034/CMR.2022.2180 مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰

آنالیز XRD رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی با غلظتهای مختلف کلسیم کلرید: نتایج XRD نیمه کمی نشان داد که کلسیم ۲ درصد بهترین نتایج را به لحاظ مقدار کلسیت و محصولات جانبی نشان می‌دهد (جدول۲). طبق این نتایج مشخص شد که محیط رسوبی حاوی ۲ درصد کلسیم با تشکیل میزان ۹۲/۳ درصد رسوب کلسیت و بدلیل داشتن محصولات جانبی کمتر به عنوان بهترین نمونه نسبت به سایر غلظتهای کلسیم را میتوان انتخاب کرد. این نتایج تفاوت مشخصی بین خصوصیات کریستال تولید شده ۱/۵ و ۲ درصد کلسیم را نشان می‌دهد. اثر مقادیر کلسیم کلراید بر مقادیر نسبی تولید کوارتز، واتریت و کلسیت طبق آنالیز آمری معنی‌دار بود ($p<0.01$). شکل ۳ طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با کلسیم کلراید ۲ درصد و اوره ۱ درصد را نشان می‌دهد. نتایج دیگر مقادیر کلسیم کلراید در ضمیمه آمده است.

جدول ۲- نتایج آنالیز XRD برای رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی با غلظتهای مختلف کلسیم کلرید و غلظت اوره ۱ درصد

نمونه / درصد کلسیم کلراید	۱/۵ درصد	۲ درصد	۲/۵ درصد	۳ درصد
درصد کلسیت	۷۸/۹	۹۲/۳	۹۰/۶	۸۹/۳
درصد کوارتز	_	۲/۸	۲/۶	۳/۸
درصد واتریت	۲/۱	۴/۹	۶/۹	۶/۹



شکل ۳- طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با کلسیم کلراید ۲ درصد و اوره ۱ درصد. C: کلسیت،V: واتریت، Q: کوارتز

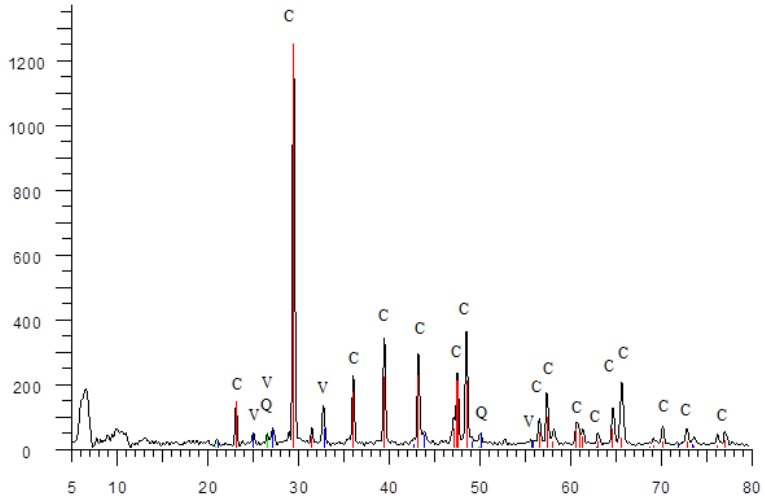
آنالیز XRD رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی با غلظت های مختلف سوکروز، مالتوز و گلوکز: طبق این نتایج مشخص شد که محیط حاوی ۰/۵ درصد سوکروز با تشکیل ۹۳/۶ درصد رسوب کلسیت و داشتن محصولات جانبی کمتر نسبت به سایرین، بهترین نمونه برای تشکیل کریستال کلسیت است. با افزایش غلظت ۱ درصدی سوکروز درصد خلوص کلسیت با ۹۱/۳ کاهش و درصد واتریت به عنوان محصول جانبی با غلظت ۱/۵ درصد افزایش یافت. مالتوز ۰/۵ و ۱ درصد نیز بترتیب دارای ۹۰/۲ و ۸۴/۷ درصد و گلوکز ۰/۵ و ۱ درصد نیز

مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰
DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

بترتیب داری ۹۲/۳ و ۹۳/۵ درصد کلسیت می‌باشد. نمونه‌ی حاوی ۰ درصد منبع کربن نیز دارای ۹۳/۶ درصد کلسیت و ۱/۸ درصد واتریت و ۱/۱ درصد کوارتز بود. طبق آنالیز آماری نتایج مقادیر کریستال تولید شده در دو قند گلوکز و سوکروز در مقایسه با عدم حضور آنها معنی دار نبود. تفاوت معنی داری در بین محیط رسوبی حاوی قند مالتوز در مقایسه با محیط رسوبی فاقد قند مشاهده شد ($p<0.01$). نتایج نشان داد حضور و افزایش درصد برخی قندها مانند مالتوز در محیط رسوبی *اسپوروسارسینا پاستوری* در تولید کریستال‌های تولید شده اثر دارد و با افزایش آن درصد کلسیت کم و درصد واتریت افزایش می‌یابد. شکل ۴ طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۱ درصد، کلسیم کلراید ۲ درصد و سوکروز ۰/۵ را نشان می‌دهد. شکل ۵ نیز طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۱ درصد، کلسیم کلراید ۲ درصد و فاقد قند را نشان می‌دهد.

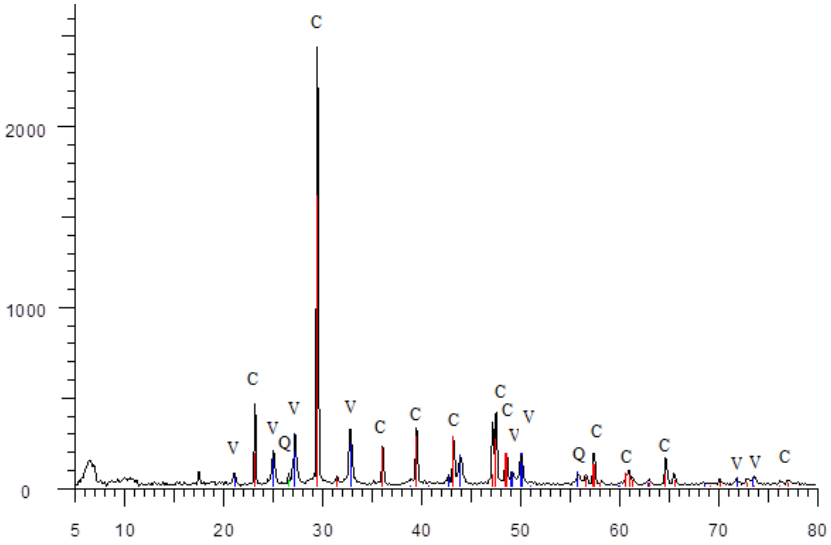
جدول ۳- نتایج آنالیز XRD رسوبات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی با غلظت های مختلف از سوکروز، مالتوز و گلوکز: غلظت اوره ۱ درصد، غلظت کلسیم کلراید ۲ درصد

نمونه	درصد کلسیت	درصد واتریت	درصد کوارتز
سوکروز ۰/۵ درصد	۹۳/۶	۲/۶	۳/۸
سوکروز ۱ درصد	۹۱/۳	۵/۱	۳/۶
مالتوز ۰/۵ درصد	۹۰/۲	۶/۷	۳/۱
مالتوز ۱درصد	۸۴/۷	۱۱/۴	۳/۹
گلوکز ۰/۵درصد	۹۲/۳	۴/۳	۳/۴
گلوکز ۱ درصد	۹۳/۵	۲/۸	۳/۷
فاقد قند	۹۳/۶	۱/۸	۱/۱



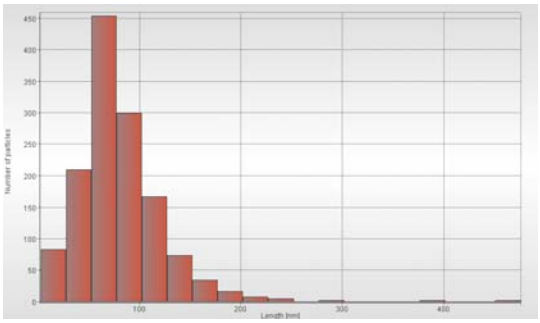
شکل ۴- طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۱ درصد، کلسیم کلراید ۲ درصد و سوکروز ۰/۵ درصد. C: کلسیت، V: واتریت، Q: کوارتز

مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰ DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

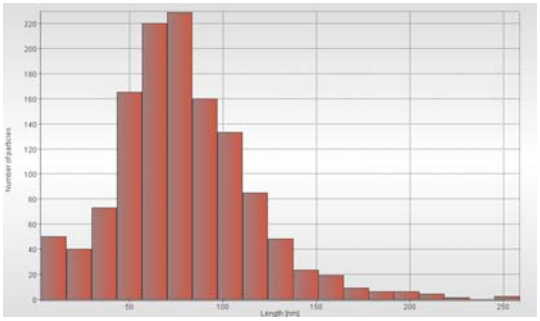


شکل ۵- طیف XRD رسوب تولید شده توسط *اسپروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی با اوره ۱ درصد، کلسیم کلراید ۲ درصد و فاقد قند. C: کلسیت، V: واتریت، Q: کوارتز

آنالیز اندازه ذرات و میکروسکوپ الکترونی: طبق آنالیز ذرات توسط FESEM میتوان به این نتیجه رسید که ذرات تولید شده در محیط اوره ۱ درصد غالبا بین محدوده زیر ۱۰۰ نانومتر بودند (شکل ۶). با افزایش اوره این محدوده بیشتر می‌شود بطوریکه در اوره ۲ درصد فراوانی ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر کمتر می‌گردد (شکل ۷). طبق جدول ۲ مشخص شد که غلظت ۲ درصد کلسیم کلراید بهترین مقدار بمنظور بیشترین تولید کریستال کلسیت است. این درصد کلسیم کلراید در مقایسه با دیگر مقادیر کلسیم کلراید به لحاظ طیف ذرات نتایج قابل ملاحظه‌ایی داشت. بطوریکه همانطور طیف هیستوگرام اندازه ذرات نشان می-دهد پراکنش اندازه ذرات در غلظت ۲ درصد کلسیم کلراید در زیر ۱۰۰ نانومتر فراوانی قابل ملاحظه‌ایی دارد (شکل ۸). نتایج آنالیز ذرات نشان داد که با افزایش کلسیم کلراید درصد اندازه ذرات ۰ تا ۵۰ نانومتر به طور قابل ملاحطه‌ایی کم می‌شود (پیوست). شکل ۹ ظاهر کریستال‌ها در میکروسکوپ FESEM را نشان می‌دهد.

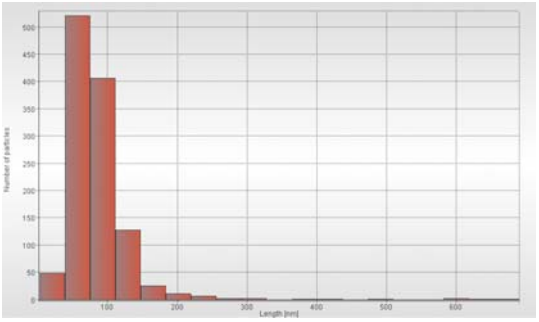


شکل ۶- آنالیز طیف ذرات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی حاوی اوره ۱ درصد و کلسیم کلراید ۲ درصد

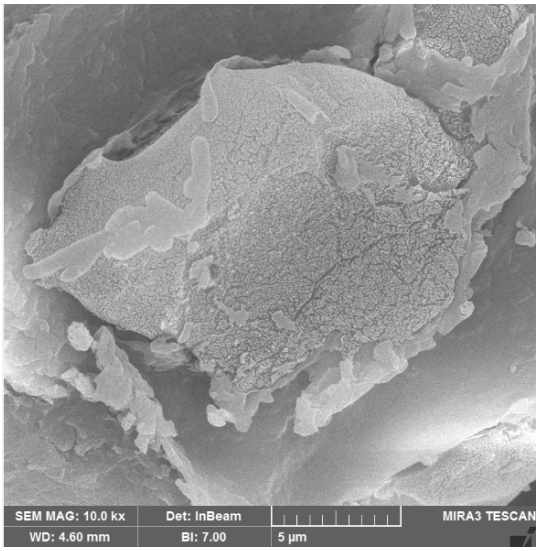


شکل ۷- آنالیز طیف ذرات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی حاوی اوره ۲ درصد و کلسیم کلراید ۲ درصد

DOI: 10.22034/CMR.2022.2180
مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰



شکل ۸- آنالیز طیف ذرات کلسیت تولید شده در محیط رسوبی حاوی کلسیم کراید ۲ درصد و اوره ۱ درصد



شکل ۹- تصویر الکترونی کریستال‌های تولید شده توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط رسوبی حاوی اوره ۱ و کلسیم کلراید ۲ درصد: برخی از باکتری‌ها در تصاویر مشخص است.

بحث

مطالعه حاضر به بهینه سازی ترکیبات اصلی محیط رسوبی بمنظور تولید کلسیت می‌پردازد. از آنجائیکه کلسیت یک ماده پر کاربرد در مهندسی است و از باکتری‌های مختلف مولد اوره‌آز بهمراه محیط کشت بعنوان عامل مولد کلسیت استفاده می‌شود. در بیشتر موارد الگوی محیط رسوبی در تهیه محیط مایع حاوی باکتری تزریقی به خاک استفاده می‌شود. برای مثال استاکس فیشر و همکاران (۱۹۹۹) (۱۷) و Al Qabany (۲۰۱۱ و ۲۰۱۳) (۲ و ۴) به این نتیجه رسیدند که غلظت ۳ گرم بر لیتر نوترینت براث یا عصاره‌ی مخمر در محلول به‌سازی شده جهت رسیدن به رشد و دوام کافی باکتریهای مولد اوره‌آز بهترین مقدار این ترکیب است. بعلاوه به میزان ۱۰ گرم بر لیتر کلرید آمونیوم و ۲/۱۲ گرم بر لیتر $NaHCO_3$ نیز استفاده شده است که دقیقا مشابه مقادیر محیط رسوبی‌ست. نکته مهم این است که برخی مطالعات بجای نوترینت براث از عصاره مخمر استفاده کرده‌اند و اگر هر دو به‌طور همزمان به‌کار برده شود غلظت مجموع نهایی باید رعایت شود (۱۷). مطالعات نشان داده که کلرید آمونیوم بمنظور کند کردن فعالیت تولید کلسیت افزوده می‌شود. تندی واکنش یا افزایش اوره موجب تشکیل سریع و کلسیته شدن باکتری‌ها میشود که از طرفی نیز موجب افزایش اندازه ذرات کلسیت نیز می‌شود (۱۸).

محققان زیادی از محیط رسوبی بکار رفته در این تحقیق بمنظور جداسازی باکتری‌های مولد کلسیت یا مطالعه تولید کلسیت توسط یک باکتری خاص استفاده کرده‌اند (۶ و ۱۰). نکته مهم تغییر مقادیر برخی موارد مانند کلسیم و اوره است که در مقالات با هدف غربالگری می‌توان این تغییرات را چشم پوشی کرد. بعبارت دیگر اگر هدف مطالعه اثر مواد غذایی بر روی نوع و اندازه کریستال‌ها باشد باید به این جزئیات دقت گردد. چراکه غلظت کلسیم و اوره بر درصد انواع کریستالهای کربنات کلسیم و همینطور اندازه آنها اثر دارد.

مُبلی و همکاران (۱۹۸۹) (۱۱) گزارش کردند که میکروارگانیسم‌ها از اوره بعنوان منبع نیتروژن و انرژی استفاده می‌کنند. با این حال در این فرایندها آمونیوم و کربنات تولید می‌شود و در صورت وجود یون‌های کلسیم، کربنات کلسیم رسوب می کند. طبق گفته‌ی استاکس فیشر (۱۹۹۹) (۱۷) سطح سلول‌های باکتری دارای بار منفی است و سطح سلول‌های باکتری به‌عنوان محل‌های یون

DOI: 10.22034/CMR.2022.2180 مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰

کلسیم یا هسته گذاری عمل می‌کنند. مقالات متعددی تایید کردند که در باکتری *اسپوروسارسینا پاستوری* وقتی غلظت اوره و کلسیم بالا باشد بازده رسوب کلسیت کاهش می یابد و بر عکس با مقادیر کم این ترکیبات (۰/۵ تا ۰/۲۵ مول) این کارایی افزایش می‌یابد. بعبارتی سرعت هیدرولیز اوره و سرعت تولید محصولات آن بر روی نوع کریستال تولیدی به لحاظ اندازه و خلوص اثرگذار است.

نوع باکتری، مقدار باکتری، غلظت اوره، غلظت کلسیم، pH اولیه محیط و قدرت یونی محیط از عوامل موثر در فعالیت اوره‌آزی ست که خود می‌تواند تولید کلسیت را کنترل کند. فعالیت اوره‌آزی با مقدار باکتری افزایش می‌یابد که طبق بسیاری از مقالات افزایش کلسیم نیز موجب افزایش رسوب کربنات کلسیم می‌شود. مطالعه اوکاوا نشان داد که افزایش یون کلسیم از ۲۵ میلی مولار به ۲۵۰ میلی مولار رسوب کربنات کلسیم را ۱۰ درصد افزایش می‌دهد (۱۴). مطالعات نشان داده که افزایش غلظت کلسیم و اوره در محلول تزریقی به خاک بمنظور بهبود خاک موجب پراکنش ناهمگن آنها بر روی ذرات ماسه می‌شود. لذا آنها بمنظور سیمانی شدن یکنواخت ذرات پیشنهاد می‌دهند که غلظت مواد را کم و تعداد دفعات تزریق بیشتر گردد (۳). اندازه ذرات کریستال‌ها در غلظت‌های بالای واکنش‌گر افزایش می‌یابد. غلظتهای کم واکنش‌گر هم موجب پراکنش بهتر کریستال‌ها و کوچک شدن اندازه ذرات می‌شود (۴ و ۱۲). نتایج FESEM این تحقیق اثبات کرد که اندازه ذرات کریستال‌ها در غلظت‌های بالای واکنشگرها افزایش می‌یابد.

حضور کربن‌های مختلف در محیط‌های طبیعی یا استفاده منابع کربنی ارزان قیمت بمنظور تولید نانوکریستال‌های کربنات کلسیم بحث دیگری ست که نقش منابع کربنی در تولید این کریستال‌ها را با اهمیت جلوه می‌دهد. آچال و همکاران (۱) اثبات کردند که تولید کلسیت توسط *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط لیکور ذرت تفاوت خاصی با محیطهای نوترینت براث و عصاره مخمر ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد افزودن منابع کربنی مانند گلوکز و سوکروز در محیط رسوبی اثر کاهشی معنی‌داری در تولید کریستال‌ها ندارد اما اثر مالتوز در تولید کلسیت و محصولات جانبی معنی دار ($p<0.01$) بود. حضور منابع کربنی مختلف در طبیعت و خاک‌ها امری اجتناب ناپذیر است و بعلاوه اکثر محققان اثر مواد غذایی اصلی را در تولید کلسیت در بتن‌ها و خاکها مطالعه می‌کنند و به نقش منابع کربنی موجود در طبیعت یا افزوده شده به صورت مصنوعی نمی‌پردازند. آچال و همکاران با مطالعه رشد و فعالیت آنزیمی *اسپوروسارسینا پاستوری* در محیط لیکور ذرت و عصاره مخمر و نوترینت براث دقیقا اثبات کردند که رشد و فعالیت آنزیمی در لیکور ذرت در مقایسه با محیطهای استاندارد تفاوت خاصی ندارد. هر چند مطالعه آچال و همکاران به مقادیر و نسبت کریستال‌ها نپرداختند. نکته مهم این است که محیط‌های غذایی جدا از نقش در مقدار تولید بر روی درصد کریستال‌ها هم نقش بازی می‌کنند. محققین امروزه از ملاس یا لاکتوز بعنوان تحریک کننده باکتری‌های خاک و تولید کلسیت استفاده کردند که مقاومت ایجاد شده در خاک اهمیت استفاده از ملاس یا لاکتوز را بعنوان منبع کربن ارزان قیمت نشان می‌دهد (۱۳ و ۱۵). مطلب مهمی که این مطالعه به آن تاکید دارد این است که مواد غذایی محیط‌های رسوبی یا مواد غذایی که به محیط‌های طبیعی بهمراه باکتری بمنظور تولید کلسیت استفاده می‌شوند به نظر میرسد در نسبت مقادیر تولید شده کریستال‌های کربنات کلسیم مانند کلسیت، واتریت و آراگونیت مهم باشند. در این تحقیق جدا از مطالعه مقادیر اوره و کلسیم کلراید بعنوان واکنش‌گرها، اثر منابع کربنی در تنوع کریستاله‌ای کربنات کلسیم نیز مطالعه شد و مشخص شد اثر همه قندها در مقادیر تولید شده کریستال‌ها یکسان نیست.

DOI: 10.22034/CMR.2022.2180 مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشکر می-نمایند. بعلاوه از جناب دکتر ولی اله نوبخت عضو هیات علمی گروه شیمی دانشگاه شهید چمران اهواز به علت کمک در آنالیزهای XRD و FESEM تقدیر و تشکر می-شود.

منابع

1- Achal V, Mukherjee A, Basu PC, Reddy MS. 2009. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36(3):433-8.
2- Al Qabany A, Mortensen B, Martinez B, Soga K, Dejong J. 2011. Microbial carbonate precipitation: correlation of S-wave velocity with calcite precipitation. In Geo-Frontiers; Advances in Geotechnical Engineering. 3993-4001.
3- Al Qabany A, Soga K, Santamarina C. 2012. Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering. 138(8):992-1001.
4- Al Qabany A, Soga K. 2013. Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. Géotechnique 63 (4): 331-339.
5- Anbu, P, Kang, CH, Shin, YJ and So, JS. 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus, 5(1), pp.1-26.
6- Chahal N, Rajor A, Siddique R. 2011. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. African Journal of Biotechnology. 10(42):8359-72.
7- Galván-Ruiz M, Hernández J, Baños L, Noriega-Montes J, Rodríguez-García ME. 2009. Characterization of calcium carbonate, calcium oxide, and calcium hydroxide as starting point to the improvement of lime for their use in construction. Journal of Materials in Civil Engineering. 21(11):694-8.
8- Ghezelbash GR, 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(12):1-0.
9- Ghosh T, Bhaduri S, Montemagno C, Kumar A. 2019. *Sporosarcina pasteurii* can form nanoscale calcium carbonate crystals on cell surface. PloS One. 14(1):e0210339.
10- Hammes F, Boon N, de Villiers J, Verstraete W, Siciliano SD. 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. Applied and Environmental Microbiology. 69(8):4901-9.
11- Mobley, H, and Hausinger, R. 1989. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterisation. Microbiological Reviews, 52(1), 85-108.
12- Mori D, Uday KV. 2021. A review on qualitative interaction among the parameters affecting ureolytic microbial-induced calcite precipitation. Environmental Earth Sciences. 80(8):1-20.
13- Nikseresht F, Landi A, Sayyad G, Ghezelbash GR, Schulin R. 2020. Sugarecane molasse and vinasse added as microbial growth substrates increase calcium carbonate content, surface stability and resistance against wind erosion of desert soils. Journal of Environmental Management. 268:110639.
14- Okwadha GD, Li J. 2010. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. Chemosphere. 81(9):1143-8.
15- Pakbaz MS, Ghezelbash GR, Afzal A. 2020. Sugarcane molasses: a cheap carbon source for calcite production in different class of soils using stimulation of indigenous urease-producing bacteria. Geomicrobiology Journal. 37(3):213-29.
16- Shraddha G, Darshan M. 2019. Microbially induced calcite precipitation through urolytic organisms—a review. International Journal of Life Sciences. 7:133-9.
17- Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS. 1999. Microbiological precipitation of CaCO3. Soil Biology and Biochemistry. 31(11):1563-71.
18- Whiffin VS, Van Paassen LA, Harkes MP. 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal. 24(5):417-23.
19- Zhu T, Dittrich M. 2016. Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 4:4.

مقاله پژوهشی، صفحات ۴۴-۳۰ DOI: 10.22034/CMR.2022.2180

Investigating the ddifferent amounts of urea and calcium on the formation of different forms of calcium carbonate in precipitation medium using *Sporosarcina pasteurii*

Gandali Mostafa N., Ghezelbash Gh.R.* and Shafiei M.

Dept. of Biology, Facculty of Science, Shahid CHamaran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran.

Abstract

Bio-cementation is a new process in which urea hydrolysing bacteria decompose urea into ammonia and produce calcium carbonate crystals at higher pH due *to* the production of an alkaline environment. This study aimed to investigate calcite production using *S. pasteurii* in a precipitation medium and optimize the factors affecting this reaction. In addition, the effect of carbon sources in the precipitation medium was studied. According to the results of *quantitative* XRD analysis, it was found that 1% urea with 94% calcite, 2.4% vaterite, and 2% calcium with 92.3% calcite, 4.9% vaterite productivity, respectively, were the best condition for the highest calcite productivity in precipitation medium. Particle size analysis using FESEM revealed that particles produced in 1% urea were often below 100 nm. With increasing urea concentration, the frequency of particles below 100 nm in size decreased. The particle size distribution showed that less than 100 nm particles were lower in 2% urea than 1%. FESEM analysis showed that increasing calcium chloride particles of less than 50 nm decreased significantly. The same was true of urea, and it was found that the particle size of the crystals increased at high concentrations of the reactants. In addition, we investigated the effect of the presence of carbon sources in the precipitation medium on the production of calcium carbonate crystals. The result was not significantly different from their absence (glucose and sucrose). Maltose sugar decreases calcite and increases other crystals.

Key words: Precipitation medium, Calcite, *Sporosarcina pasteurii*, FESEM, Semi quantitative XRD