

## Isolating and Using Bacteria, Producing Urease and L-asparaginase, and Effective on Calcium Carbonate Bioproduction to Remove Zinc from Contaminated Solutions

ZAHRA GHANBARI<sup>1</sup>, NASRIN GHORBANZADEH<sup>1\*</sup>, MOHAMMAD BAGHER FARHANGI<sup>1</sup>, MARYAM KHALILI RAD<sup>1</sup>

1. Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran  
(Received: Nov. 25, 2020- Revised: Dec. 22, 2020- Accepted: Dec. 27, 2020)

### ABSTRACT

Heavy metal pollution in soil and water resources has become a serious problem not only in the production of healthy agricultural products, but also in the ecosystem health. Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) is a low-cost and environmentally friendly methods for reducing water resources and soil pollution. The aim of this study was to isolate native and efficient bacteria in the biological production of calcium carbonate in order to remove zinc from contaminated solution. Isolating and screening native bacteria, producing urease and L-asparaginase, was accomplished. Then, the changes in ammonia, pH and electrical conductivity (EC), as well as removal of zinc from the contaminated solutions were studied using these two efficient isolated bacteria in the presence of *Sporosarcina pasteurii*. The results showed that in the presence of all three bacteria, the amount of produced ammonia, pH and EC in the culture media increased significantly compared to the ones in the control (without bacterial inoculation) ( $p \leq 0.05$ ). The efficiency of isolated urease-producing strain in removal of zinc from the contaminated solution was almost equal to that of *Sporosarcina pasteurii*, while the efficiency of isolated L-asparaginase-producing strain was more. *Sporosarcina pasteurii* removed 51.32, 65.94 and 70.36% and urease producing strain removed 65.49, 68.07, and 71.46 of zinc in the solutions containing 0.5, 2 and 4 mM Zn, respectively. However, L-asparaginase-producing strain removed 96.29, 93.88, 97.06 and 97.32% of zinc in solution containing 0.5, 2, 4 and 8 mM Zn, respectively. Therefore, it seems native urease- and L-asparaginase-producing bacteria can be useful and efficient in Zn bioremediation of contaminated solutions by MICP process.

**Keywords:** Biomineralization, Bioremediation, Calcite, Heavy Metals.

## جداسازی و استفاده از باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز موثر در تولید زیستی کربنات کلسیم به منظور حذف روی از محلول‌های آلوده

زهرا قنبری<sup>۱</sup>، نسرین قربان‌زاده<sup>۱\*</sup>، محمدباقر فرهنگی<sup>۱</sup>، مریم خلیلی راد<sup>۱</sup>

۱. گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۵ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۰/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۱۰/۷)

### چکیده

آلودگی منابع خاک و آب به فلزهای سنگین نه تنها در تولید محصولات کشاورزی سالم بلکه در سلامت اکوسیستم نیز به یک مسئله جدی تبدیل شده است. فرایند رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی یک روش کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست در راستای کاهش آلودگی منابع آب و خاک است. هدف این پژوهش جداسازی باکتری‌های بومی و موثر در تولید زیستی کربنات کلسیم به منظور حذف فلز روی از محلول‌های آلوده بود. غربال‌گری و جداسازی باکتری‌های بومی تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز انجام شد و سپس تغییرات آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی و همچنین حذف روی از محلول آلوده با کاربرد دو باکتری جدا شده در حضور باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در حضور هر سه باکتری مقدار آمونیاک تولید شده، pH و قابلیت هدایت الکتریکی نسبت به شاهد (بدون مایه‌زنی باکتری) افزایش معنی‌داری پیدا کرد ( $p \leq 0.01$ ). کارایی جدایه تولیدکننده اوره‌آز جدا شده در حذف روی از محلول آلوده تقریباً به اندازه کارایی باکتری *Sporosarcina pasteurii* بود اما کارایی جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز بومی بالاتر از آن‌ها بود. *Sporosarcina pasteurii* حذف ۵۱/۳۲، ۶۵/۹۴، ۷۰/۳۶ درصدی و جدایه تولیدکننده اوره‌آز حذف ۶۵/۴۹ و ۶۸/۰۷ و ۷۱/۴۶ درصدی را نسبت به مقدار اولیه روی به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۴ میلی‌مولار نشان دادند و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز در غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار روی به ترتیب ۹۳/۸۸، ۹۶/۲۹، ۹۷/۰۶ و ۹۷/۳۲ درصد روی را حذف نمود. بنابراین به نظر می‌رسد باکتری‌های بومی تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز می‌توانند در زیست‌پالایی روی از محیط‌های آبی آلوده با فرایند رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی مفید و کارآمد باشند.

**واژه‌های کلیدی:** زیست‌پالایی، فلزهای سنگین، کلسیت، معدنی‌شدن زیستی.

### مقدمه

بیشتر فلزهای سنگین (کادمیوم، نیکل، روی و ...) به‌طور طبیعی در غلظت کم در زیستگاه‌های مختلف وجود دارند و برخی از آنها برای رشد موجودات زنده ضروری هستند. با این حال از زمان شروع انقلاب صنعتی، غلظت این فلزها در محیط افزایش یافته و آلودگی جدی و فراگیری را در سطح محیط زیست ایجاد کرده‌اند (Singh et al., 2011; Dixit et al., 2015). بر خلاف آلاینده‌های آلی که به‌وسیله فعالیت‌های میکروبی اکسید شده و به آب و دی-اکسید کربن تبدیل می‌شوند، فلزهای سنگین تحت تجزیه میکروبی و شیمیایی قرار نمی‌گیرند (Kirpichtchikova et al., 2006) و مقدار کل آن‌ها پس از ورود به محیط زیست در طولانی مدت ثابت باقی می‌ماند (Adriano, 2003). فلز روی (Zn) در بین فلزهای سنگین بسیار قابل توجه

است زیرا یکی از سمی‌ترین این فلزها است و شیوع آن در محیط زیست به دلیل ماندگاری و تجمع آن در زنجیره‌های غذایی بسیار زیادتر است (Yamagata et al., 2010; Kwon et al., 2017). علاوه بر این، در بین فلزهای مختلف، روی در pH های مختلف بیشتر به صورت محلول، قابل تبادل و پیوند شده با مواد آلی است و بنابراین پویایی بالایی داشته و می‌تواند به آسانی از منبع آلوده-کننده به منابع آبی منتقل شود (Moberly et al., 2010; Kwon et al., 2017). سطح بالای روی سبب تغییر در متابولیسم پروتئین و عملکرد اندام‌های حیاتی موجودات زنده (Hasan et al., 2017) از طریق جایگزینی / جابجایی یون‌های اساسی از سطوح یاخته‌ای و مسدود کردن گروه‌های عاملی مولکول‌های مهم بیوشیمیایی مانند آنزیم‌ها، پلی‌نوکلئوتیدها و مواد مغذی ضروری می‌شود. انتقال روی بیشتر از طریق فاضلاب و پساب صنایع آب‌کاری، گالوانیزه، تولید باتری، کاغذ و صنایع متالورژی انجام می‌شود

Mitchell and Ferris استفاده از فرایند MICP را در زیست‌پالایی آب‌های زیرزمینی آلوده به استرانسیوم گزارش کردند. (2019) Bhattacharya *et al.* از فرایند MICP با باکتری EMB19 *Enterobacter cloacae* به منظور زیست‌پالایی فلز روی از محلول آلوده استفاده کردند. در پژوهشی دیگر که با استفاده از باکتری‌های اورتولیتیک جدا شده از مکان‌های آلوده به فلزهای سنگین روی، سرب و کادمیوم انجام شد، در محلول آبی حاوی اوره و کلرید کلسیم پس از ۷۲ ساعت از آنکو باسیون به طور میانگین، به ترتیب ۹۶/۹، ۷۲/۳۷ و ۶۸/۸۶ درصد از سرب، کادمیوم و روی از محلول آلوده حذف شد (Jalilvand *et al.*, 2019).

پژوهش‌ها نشان داده که باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ال-آسپاراژیناز<sup>۳</sup> نیز می‌توانند با وجود تولید آمونیاک کمتر در فرایند MICP مفید واقع شوند (Akiyama and Kawasaki, 2012). Li *et al.* (2015) گزارش نمودند که فرایند MICP بر پایه فعالیت اوره‌آز سبب تولید بیش از حد آمونیاک می‌شود که ممکن است تاثیر منفی بر سلامت انسان و محیط‌زیست داشته باشد. همچنین آمونیاک سبک‌تر از هوا بوده و به راحتی در جو تجزیه و بوی نامطبوع آن شرایط نامطلوبی را برای کار ایجاد می‌کند. از سوی دیگر اوره به‌طور گسترده‌ای در فرایند MICP به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌شود و به دلیل استفاده از آن برای کشاورزی و مواد خام برای تولید کود، قابلیت اقتصادی فرایند در این شرایط کاهش می‌یابد که برای حل و اصلاح چنین مشکلاتی استفاده از آسپاراژین به‌عنوان سوبسترای آنزیم ال-آسپاراژیناز در فرایند MICP توصیه شده است (Akiyama and Kawasaki, 2012; Yu *et al.*, 2015).

بسیاری از ریزجانداران از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها، اکتینومایست‌ها و جلبک‌ها توانایی تولید ال-آسپاراژیناز برون‌یاخته‌ای را دارند (Arima *et al.*, 1972). آنزیم ال-آسپاراژیناز (ال-آسپاراژین آمیدوهیدرولاز EC3.5.1.1)، ال-آسپاراژین را به ال-آسپاراتات هیدرولیز و یون‌های آمونیوم را آزاد می‌کند. فرآورده‌های هیدرولیز، تشکیل آلانین و یون بی‌کربنات می‌دهند که سبب افزایش pH می‌شود و در نهایت تعادل بی‌کربنات را تغییر می‌دهد و سبب تشکیل یون‌های کربناته می‌شود. افزایش غلظت کربنات موجب افزایش سطح بالایی از رسوب کربنات کلسیم در اطراف یاخته‌های باکتریایی در حضور یون‌های کلسیم محلول می‌شود (Li *et al.*, 2015).

به طور کلی MICP یک فرایند بیوشیمیایی گسترده در خاک‌ها، غارها، آب‌های شیرین، رسوبات رودخانه‌ای و

(Moberly *et al.*, 2010; Redmile-Gordon and Chen, 2017). ورود روی به منابع آبی از طریق پساب‌های آلوده و در نهایت انتقال آب آلوده به خاک سبب انباشت بالای روی در خاک شده و اثر منفی آن بر فعالیت ریزجانداران و کرم‌های خاکی سبب اختلال در تجزیه مواد آلی می‌شود (Greany, 2005).

اغلب فرآیندهای اصلاح فیزیکی و شیمیایی آب‌ها و خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین مقرون به صرفه نبوده و زمان‌بر هستند و حذف آلاینده‌ها با این روش‌ها تولید ضایعات سمی می‌کند. در کشورهای در حال توسعه با تراکم زیاد جمعیت و امکانات اندک برای بازسازی محیط زیست، روش‌های کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست به‌منظور کاهش آلودگی منابع آبی و خاک‌ها و همچنین تولید محصولات کشاورزی سالم و افزایش امنیت غذایی مورد نیاز است (Kang *et al.*, 2014).

رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی<sup>۱</sup> (MICP) یک فرایند بیوژئوشیمیایی است که با تولید آنزیم توسط ریزجانداران ویژه، امکان حذف فلزهای سنگین و رادیونوکلیوتیدها در پیکره خاک و منابع آبی را موجب می‌شود (Fujita *et al.*, 2000). طیف گسترده‌ای از ریزجانداران توانایی تولید آنزیم اوره‌آز<sup>۲</sup> (اوره آمیدوهیدرولاز EC3.5.1.5) را دارند که سبب هیدرولیز اوره به آمونیوم و کربنات و در نتیجه افزایش pH محیط در زمان کوتاهی می‌شوند (Al-Thawadi, 2011). در این روش دیواره یاخته باکتریایی به دلیل داشتن بارهای منفی به عنوان نقاط هسته‌ای عمل می‌کند و سبب جذب یون‌های فلزی دو ظرفیتی با بار مثبت و همچنین تشکیل مواد معدنی از جمله کربنات کلسیم در محیطی غنی از اوره و کلرید کلسیم می‌شود (Tobler *et al.*, 2011). بنابراین هنگامی که محیط از یون‌های کلسیم و کربنات در pH بالا اشباع می‌شود، تبلور کربنات کلسیم اتفاق می‌افتد. این امر در نهایت سبب رسوب فلزهای سنگین دو ظرفیتی بر روی این فاز کربناتی و غیرقابل دسترس شدن آن‌ها می‌شود (Dhami *et al.*, 2014). فعالیت آنزیم اوره‌آز و مقدار کربنات کلسیم تولید شده طی فرایند MICP به عوامل مختلف محیطی از جمله pH، دما، غلظت یاخته‌های باکتری و همچنین غلظت مواد واکنش‌دهنده بستگی دارد (Anbu *et al.*, 2016).

در پژوهش‌های متعددی به پتانسیل فرایند MICP در کاهش غلظت فلزهای سنگین از منابع آب و خاک اشاره شده است. (Kang *et al.*, 2014) حذف یون‌های کادمیوم از محلول آبی را با استفاده از روش MICP بررسی کرده و پس از ۴۸ ساعت حذف ۹۵ تا ۹۹ درصدی این فلز را عنوان نمودند. (2005)

هدایت الکتریکی و مقدار روی در آن اندازه‌گیری و سپس از آن سری رقت تهیه شد. سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های بالاتر به پلیت‌های حاوی محیط NA منتقل و پخش شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C آنکوباسیون شدند (Hester et al., 2014). پس از رشد کلنی‌ها، تعداد ۲۰ کلنی با ظاهر و رنگ و اندازه متفاوت انتخاب و برای مرحله غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده اوره‌ز و ال-آسپاراژیناز جداسازی شدند.

#### غربال‌گری باکتری تولیدکننده اوره‌آز

به منظور غربال‌گری باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز از محیط کشت مخصوص اوره آگار بیس<sup>۳</sup> (UAB) با اجزای پپتون (۱ گرم در لیتر)، گلوکز (۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۵ گرم در لیتر)، دی‌سدیم فسفات (۱/۲ گرم در لیتر)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۰/۸ گرم در لیتر)، معرف فنل رد (۰/۱۲ گرم در لیتر) و آگار (۱۵ گرم در لیتر) با pH ۶/۵ استفاده شد که در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. علاوه بر موارد فوق محلول اوره ۴۰ درصد (وزنی به حجمی) نیز به طور جداگانه فیلتر (۰/۲۲ میکرومتر) شد و ۱۰ میلی‌لیتر محلول اوره ۴۰ درصد به طور استریل به ۹۹۰ میلی‌لیتر از محیط UAB اضافه شد (Christensen, 1946). کلنی‌های باکتریایی بر روی پلیت‌های حاوی محیط UAB به مدت ۴۸ الی ۱۲۰ ساعت در دمای ۳۰°C آنکوباسیون شدند. مقدار تولید اوره‌آز کلنی‌ها از طریق مشاهده بصری و تغییر رنگ محیط UAB توسط معرف فنل رد مورد بررسی قرار گرفت. این معرف در محیط اسیدی به رنگ زرد است که با افزایش pH در اثر فعالیت اوره‌آزی باکتری‌ها به رنگ صورتی تبدیل می‌شود. کلنی که قادر به تغییر رنگ محیط UAB از زرد کم رنگ به صورتی در کوتاه‌ترین زمان آنکوباسیون و با شدت تغییر رنگ بیشتر بود به‌عنوان کلنی با بیشترین فعالیت آنزیمی برای ادامه آزمایش انتخاب شد (شکل ۱ الف). بازکشت باکتری انتخاب شده بر روی محیط کشت NA انجام شد.

#### غربال‌گری باکتری تولیدکننده ال-آسپاراژیناز

بررسی فعالیت آسپاراژینازی کلنی‌های جدا شده بر اساس روش (Gulati et al., 1997) با استفاده از محیط کشت جامد اختصاصی M9 انجام شد. این محیط کشت شامل ۱۰ گرم آسپاراژین، ۶ گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات دو آب، ۲ میلی‌لیتر منیزیم سولفات هپتا هیدرات (۱ مولار)، ۰/۲۵ گرم معرف فنل رد، ۱۰ میلی‌لیتر گلوکز ۲۰ درصد، ۰/۵ گرم کلرید سدیم، ۰/۷۵ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۱ میلی‌لیتر کلرید کلسیم مونو هیدرات (۰/۱

زیستگاه‌های بسیار شور است. این فرایند شامل ساخت زیستی کانی‌ها به وسیله ریزجانداران است. در طبیعت فرایندهای معدنی شدن زیستی در محیط‌های متفاوت گسترده شده‌اند و شامل ریزجاندارانی با طبقه‌بندی و مسیرهای متابولیکی متفاوت می‌شود (Castro-Alonso et al., 2019).

بنابراین باتوجه به این‌که پیشرفت‌های روزافزون صنعتی شدن، حجم زیادی از پساب‌های دارای فلزهای سنگین از جمله روی را وارد منابع آبی می‌کند که با ورود این پساب‌ها به زمین‌های کشاورزی خطر جدی برای تولید محصولات سالم ایجاد می‌نمایند، این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش MICP در حذف روی از محلول‌های آلوده با کاربرد باکتری‌های جدا شده بومی تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز و مقایسه کارایی آن‌ها با باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه و بازکشت باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii*

باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* (PTCC۱۶۴۵) از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد و در محیط کشت نوترینت آگار<sup>۱</sup> (NA) با اوره ۲ درصد بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشت نوترینت برات<sup>۲</sup> (NB) همراه با ۲ درصد وزنی به حجمی اوره (۳۳۳ میلی‌مولار) و کلرید کلسیم (۲۵ میلی‌مولار) منتقل و در دمای ۳۰°C با هوادهی دائمی بر روی شیکر (۱۱۰ rpm) تا زمان رسیدن باکتری به مرحله انتهایی فاز رشد نمایی به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت (Achal et al., 2009).

##### منطقه نمونه‌برداری از آب برای جداسازی باکتری‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌های بومی تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز با قابلیت رسوب زیستی کربنات کلسیم، نمونه‌برداری از چشمه آب گرم منطقه سنگرود، روستایی واقع در پانزده کیلومتری شهر لوشان (گیلان) به طرف شهر کوهستانی جیرنده با موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه و ۱۹ ثانیه شمالی و ۴۹ درجه و ۳۸ دقیقه و ۵۷ ثانیه شرقی و ارتفاع ۱۱۰۰ متری از سطح دریا انجام شد. نمونه آب در بطری‌های استریل و در یک جعبه یخ (در محل نمونه‌برداری) به آزمایشگاه منتقل شد و در یخچال در دمای ۴°C نگهداری شد.

##### جداسازی باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز

پس از انتقال نمونه‌ی آب به آزمایشگاه در ابتدا pH و قابلیت

کشت جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز (محیط مایع M9) و همچنین pH محیط کشت بدون باکتری (شاهد) در طول ۷ روز با روش پتانسیومتری با دستگاه pH متر مدل (ORION 420A) اندازه‌گیری شد. قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت جدایه‌ها و محیط کشت شاهد نیز در طول ۷ روز با دستگاه EC متر مدل (Jenway-LAB 960) اندازه‌گیری شد.

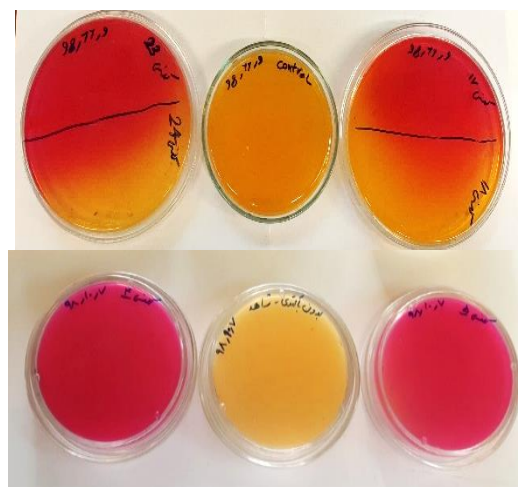
#### آماده‌سازی محلول مادر روی و آزمایش کمترین غلظت بازدارنده<sup>۱</sup> (MIC)

محلول مادر ۵۰۰ میلی‌مولار روی از نمک کلرید روی ( $ZnCl_2$ ) تهیه شد و در تاریکی در دمای  $4^{\circ}C$  نگهداری شد. غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۴، ۸، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار با رقیق‌سازی از محلول مادر تهیه و اتوکلاو شدند. این آزمایش به منظور تعیین کمترین غلظتی از روی که از رشد باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد، برای هر باکتری به صورت جداگانه انجام شد. یاخته‌های باکتریایی که به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت NBU، نوترینت برات همراه با ۲ درصد وزنی به حجمی اوره، (برای جدایه تولیدکننده اوره آز و *Sporosarcina pasteurii*) و محیط M9 مایع حاوی آسپاراژین (برای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز) رشد یافته بودند (Gulati et al., 1997) به مقدار ۵ درصد حجمی ( $10^7$  سلول بر میلی‌لیتر) به غلظت‌های مختلف روی (۰/۵، ۲، ۴، ۸، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) تلقیح شدند. یاخته‌های باکتریایی به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور در محیط حاوی غلظت‌های مختلف روی انکوباسیون شدند. تعداد یاخته‌های باکتریایی از طریق شمارش بر روی پلیت<sup>۲</sup> (CFU) برای هر باکتری با کشت بر روی محیط کشت مربوط به آن باکتری تعیین شد (Amoozegar et al., 2012).

#### حذف روی از محلول آلوده

کمترین غلظت بازدارنده روی بدست آمده از مرحله قبل برای جدایه تولیدکننده اوره‌آز و *Sporosarcina pasteurii* غلظت ۴ میلی‌مولار روی بود. به همین دلیل غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۴ میلی‌مولار روی برای انجام این مرحله از آزمایش برای این باکتری‌ها در نظر گرفته شد. به منظور حذف روی به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت NA (حاوی اوره دو درصد و کلرید کلسیم ۲۵ میلی‌مولار) در حدود ۲۵ میلی‌لیتر محلول آلوده روی با غلظت‌های ذکر شده در لوله‌های فالتون ۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از هر باکتری ( $10^7$  سلول بر میلی‌لیتر) به لوله‌ها افزوده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $30^{\circ}C$  انکوباسیون شدند (Kang et al., 2014). کمترین غلظت بازدارنده روی بدست آمده از مرحله قبل برای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز، غلظت ۸ میلی‌مولار بود.

مولار) و ۲۰ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. این محیط کشت در دمای  $121^{\circ}C$  به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. کلنی‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط M9 در دمای  $32^{\circ}C$  به مدت ۴۸ تا ۱۲۰ ساعت انکوباسیون شدند. فعالیت آنزیمی از طریق مشاهده تغییر رنگ محیط M9 توسط معرف فنل رد مورد بررسی قرار گرفت و کلنی با بیشترین فعالیت آنزیمی برای ادامه آزمایش انتخاب شد. بازکشت باکتری انتخاب شده بر روی محیط کشت NA انجام شد (شکل ۱ ب).



شکل ۱- تغییر رنگ معرف فنل رد در محیط کشت UAB (الف) و در محیط کشت اختصاصی M9 (ب) به ترتیب به دلیل ایجاد محیط قلیایی در نتیجه فعالیت اوره‌آزی و ال-آسپاراژینازی جدایه‌ها در کنار نمونه‌های شاهد (بدون مایه‌زنی باکتری) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

#### آنالیز فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کلنی‌های جدا شده

آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌ها بر اساس روش‌های طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌ها انجام شد (Bergey, 1984). برای این منظور آزمون‌های واکنش گرم، اسپور، تحرک و کاتالاز انجام گرفت (Leboffe and Pierce, 2015).

#### بررسی تغییرات آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت باکتریایی

به منظور ارزیابی فعالیت آنزیم اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز، مقدار آمونیاک آزاد شده بر اساس روش فنل-هیپوکلیت در زمان‌های صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز برای هر یک از باکتری‌ها و باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* به طور جداگانه در طول موج ۶۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل VARIAN CARY Scan 100 اندازه‌گیری شد (Achal et al., 2009). pH محیط کشت‌های باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* و جدایه تولیدکننده اوره‌آز (NA حاوی اوره ۲ درصد) و pH محیط

دستگاه جذب اتمی غیر قابل تشخیص بود.

#### آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های جدا شده

بعد از غربال‌گری اولیه جدایه‌ها برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها از جمله آزمون رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، رنگ‌آمیزی اسپور و تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که هر دو جدایه گرم مثبت بوده و با مشاهده جدایه‌ها در زیر میکروسکوپ ملاحظه شد که جدایه تولیدکننده اوره‌آز به شکل کوکسی و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز به صورت باسیل‌های میله‌ای شکل بودند (شکل ۲). نتیجه آزمون کاتالاز هر دو باکتری مثبت شد که بیانگر هوازی (یا بی‌هوازی اختیاری) بودن هر دو جدایه می‌باشد. پژوهش‌ها حاکی از آن است که باکتری‌های کارا در فرایند MICP اغلب از نوع باسیل‌های گرم مثبت و هوازی است که از جمله می‌توان به *Bacillus subtilis* و *Bacillus thuringiensis* اشاره نمود (Ganendra et al., 2014). نتایج رنگ‌آمیزی اسپور هر دو جدایه، اسپوردار بودن هر دو را تایید نمود. آزمون تحرک جدایه تولیدکننده اوره‌آز منفی و برای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز مثبت بود.



شکل ۲- نتیجه آزمون رنگ‌آمیزی گرم جدایه‌ها از آب چشمه سنگرود. جدایه تولیدکننده اوره‌آز (الف) و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز (ب)

#### تغییرات آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت باکتریایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر باکتری و زمان انکوباسیون و برهم‌کنش آن‌ها بر تغییرات آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت معنی‌دار بود ( $p \leq 0.01$ ) (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر باکتری، زمان انکوباسیون و برهم‌کنش آن‌ها بر مقدار آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت باکتریایی

میانگین مربعات		منبع تغییرات	
قابلیت هدایت الکتریکی	pH	آمونیاک	درجه آزادی
۲۷/۳۳**	۷/۵۸**	۳۶۶/۷۱**	۳
۱۱/۳۳**	۳/۰۴**	۸۲/۰۹**	۶
۳/۰۷**	۰/۳۵**	۲۰/۰۲**	۱۸
۱/۳۳	۰/۳۳	۰/۰۵	۵۶
۲/۷۷	۱/۴۳	۱۰/۵۹	ضریب تغییرات

\*\* بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد است.

باکتری شاخص در تمام زمان‌ها با تفاوت معنی‌داری بالاتر از مقدار آمونیاک تولید شده در تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز و تیمار شاهد بود ( $p \leq 0.01$ ). مقدار آمونیاک حاصل

به همین دلیل غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۴ و ۸ میلی‌مولار روی برای انجام این مرحله آزمایش در نظر گرفته شد. از روشی مشابه روش ذکر شده برای جدایه تولیدکننده اوره‌آز استفاده شد با این تفاوت که از محیط کشت M9 مایع حاوی کلرید کلسیم استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. لوله‌ها بعد از انکوباسیون سانتریفیوژ شدند (۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) و غلظت روی در محلول رویی با استفاده از دستگاه جذب اتمی (VARIAN 220) اندازه‌گیری شد.

#### آنالیز آماری

آزمایش در بخش بررسی تغییرات آمونیاک، pH و قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت باکتریایی، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل چهار سطح باکتری شامل کنترل (بدون مایه‌زنی باکتری)، باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii*، باکتری تولیدکننده اوره‌آز و باکتری تولیدکننده ال-آسپاراژیناز و ۷ سطح زمان انکوباسیون (صفر، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ روز) بود. آزمایش در بخش حذف روی از محلول آلوده در قالب طرح کاملاً تصادفی با غلظت‌های مختلف روی برای هر باکتری به طور جداگانه (سه غلظت برای جدایه تولیدکننده اوره‌آز و *Sporosarcina pasteurii* و چهار غلظت برای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز) در سه تکرار انجام شد. آنالیز نتایج پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SAS9.4 و مقایسه میانگین تیمارها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

#### نتایج و بحث

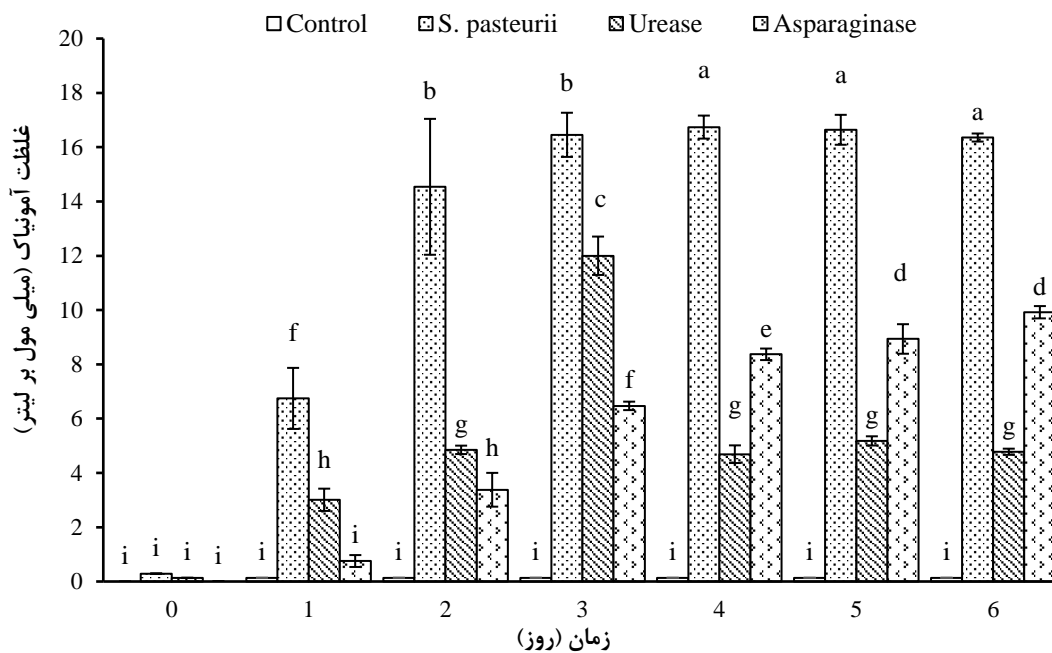
مقدار pH و قابلیت هدایت الکتریکی آب سنگرود به ترتیب ۷/۲ و ۲/۰۱ دسی‌زیمنس بر متر بود و غلظت روی در آن توسط

#### تغییرات آمونیاک

برهم‌کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر مقدار آمونیاک تولید شده در شکل (۳) نشان داده شده است. مقدار آمونیاک حاصل از

گروه‌های آمینی موجود در NA تحت تاثیر قرار گیرد (Burbank et al., 2012). (et al., 2009). Achal نیز در پژوهش خود بیشترین مقدار فعالیت اوره‌آزی باکتری *Sporosarcina pasteurii* را در روز پنجم از یک دوره ۷ روزه انکوباسیون گزارش نمودند.

از فعالیت آنزیم اوره‌آز باکتری *Sporosarcina pasteurii* تا روز پنجم آزمایش روند افزایشی داشت و از غلظت ۰/۲۹ در زمان صفر به غلظت ۱۶/۷۴ میلی‌مول بر لیتر در روز پنجم رسید و پس از آن تقریباً ثابت شد. باید توجه داشت که اندازه‌گیری آمونیاک ممکن است تحت تاثیر آمونیاک آزاد شده توسط هیدرولیز اوره از



شکل ۳- اثر برهم‌کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر مقدار آمونیاک تولیدشده در طول ۶ روز انکوباسیون. حروف متفاوت بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است. نوارهای خطا انحراف از معیار می‌باشند.

داشتند فعالیت آنزیم پروتئاز پس از چهار روز افزایش یافته و این آنزیم با انباشته شدن در محیط کشت، اثر منفی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز داشته و در نهایت سبب کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید آمونیاک شده است. (Zhao et al., 2016) نیز بیان کردند که فعالیت آنزیم اوره‌آز توسط باکتری *Bacillus sp.* سویه GZ-22 جدا شده از خاک معدن، در ۶ ساعت اولیه به سرعت افزایش پیدا کرد. با گذشت زمان انکوباسیون، مقدار فعالیت آنزیم اوره‌آز کاهشی شد که ممکن است به افزایش زیست‌توده باکتری مرتبط باشد. مصرف مواد غذایی و انباشت فرآورده‌های سمی در محیط بسته نیز ممکن است فعالیت میکروبی را در طول فاز ثابت رشد کاهش دهد (Peleg and Corradini, 2011).

مقدار آمونیاک حاصل از فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز جدایه تولیدکننده این آنزیم در ۶ روز آزمایش روند افزایشی نشان داد. به طوری که بیشترین مقدار آمونیاک در روز ششم انکوباسیون تولید شد که البته تفاوت معنی‌داری با سایر زمان‌ها به جز روز پنجم انکوباسیون در همین جدایه داشت. مقدار آمونیاک حاصل از فعالیت جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز از غلظت صفر در

جدایه تولیدکننده اوره‌آز بیشترین مقدار آمونیاک را در روز سوم آزمایش تولید کرد که تفاوت معنی‌داری با سایر زمان‌های همین جدایه دارد. همچنین بیشترین آمونیاک تولید شده در تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره‌آز به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار دارای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز و تیمار شاهد (بدون مایه‌زنی باکتری) و کمتر از تیمار دارای باکتری شاخص بود. مقدار آمونیاک تولید شده در تیمار دارای باکتری تولیدکننده اوره‌آز از روز صفر آزمایش تا روز سوم روند افزایشی داشت و از غلظت ۰/۱ میلی‌مول بر لیتر پس از ۷۲ ساعت رسید اما در روز چهارم انکوباسیون مقدار آمونیاک تولید شده توسط باکتری به طور چشم‌گیری کاهش یافت و به غلظت ۴/۶۹ میلی‌مول بر لیتر رسید و از آن به بعد ثابت شد (شکل ۳). این امر احتمالاً به دلیل کاهش فعالیت اوره‌آزی باکتری می‌باشد. (Kang (2014) نیز در پژوهش خود گزارش نمودند که فعالیت اوره‌آزی باکتری *Lysinibacillus sphaericus* CH-5 در طول چهار تا پنج روز اول انکوباسیون روند افزایشی داشت و پس از آن به طور چشم‌گیری کاهش یافت. این پژوهش‌گران همچنین بیان



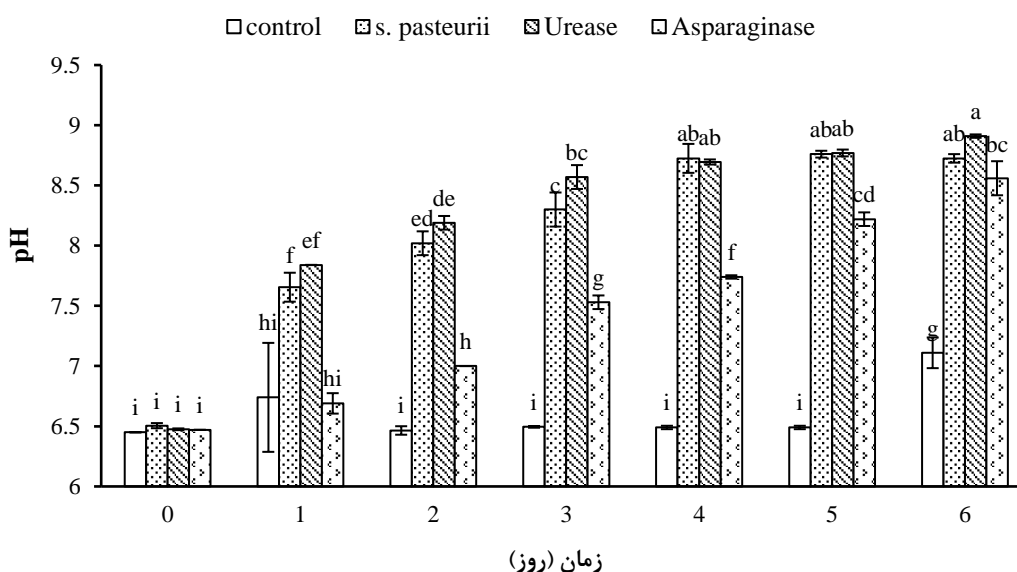
(۴) نشان داده شده است. به طور کلی مقدار pH محیط کشت باکتریایی در تیمارهای دارای باکتری به طور معنی داری افزایش چشم گیری نسبت به تیمار بدون باکتری داشت ( $p \leq 0.01$ ). حداکثر افزایش pH در تیمار دارای باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii*، جدایه تولیدکننده اوره آز و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز به ترتیب در روز ۵، ۶ و ۶ آزمایش مشاهده شد. بین حداکثر مقدار pH تیمار دارای باکتری شاخص و جدایه تولیدکننده اوره آز تفاوت آماری معنی داری دیده نشد اما بین تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره آز و ال-آسپاراژیناز اختلاف معنی داری وجود داشت و مقدار pH در تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره آز به طور معنی داری بیشتر از مقدار pH در تیمار دارای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز بود. مقدار pH در محیط کشت باکتری شاخص از ۶/۵ در زمان صفر به ۸/۷۶ در روز پنجم آزمایش رسید و در جدایه تولیدکننده اوره آز از ۶/۴۷ در زمان صفر به ۸/۹۱ در روز ششم افزایش یافت که می توان این امر را به فعالیت و تولید آنزیم اوره آز توسط باکتری ها ارتباط داد.

زمان صفر به ۹/۹۲ میلی مول بر لیتر در روز ششم رسید که به طور معنی داری کمتر از حداکثر مقدار آمونیاک تولید شده در تیمار دارای باکتری شاخص و تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره آز و البته بیشتر از تیمار شاهد بود (شکل ۳).

در پژوهشی توسط Li et al. (2015) نیز فعالیت آسپاراژینازی و اوره آزی باکتری *Bacillus megaterium* در طول ۷ روز انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنزیم آسپاراژیناز باکتری از ۲۵/۱ به ۴۰/۶  $U\ ml^{-1}$  با حداکثر فعالیت بعد از ۱۴۴ ساعت (۶ روز) رسید و سپس کاهش یافت. در حالی که فعالیت آنزیم اوره آز باکتری پس از ۵ روز روند کاهشی داشت. این پژوهش گران همچنین گزارش نمودند حداکثر تولید آمونیاک، بر طبق فعالیت های آنزیمی تفاوت معنی داری را بین فعالیت آنزیم اوره آز ( $U\ ml^{-1}$  ۵۹۲) و فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز ( $U\ ml^{-1}$  ۴۰/۶) نشان داد.

#### تغییرات pH

برهم کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر مقدار pH در شکل



شکل ۴- اثر برهم کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر مقدار pH در طول ۶ روز انکوباسیون. حروف متفاوت بر روی ستون ها نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد است. نوارهای خطا انحراف از معیار می باشند.

مقدار pH در محیط کشت تیمار دارای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز نیز از ۶/۴۷ در زمان صفر به ۸/۵۶ در روز ششم افزایش یافت که نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش معنی داری داشت (شکل ۵). این امر بیانگر تولید و فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز توسط باکتری است که سبب هیدرولیز ال-آسپاراژین شده است (Li et al., 2015). حداکثر مقدار pH در تیمار دارای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز به طور معنی داری کمتر از حداکثر مقدار pH در تیمار دارای جدایه تولیدکننده اوره آز بود

آنزیم اوره آز در هیدرولیز کردن اوره در محدوده مشخصی از مقادیر pH به طور فعال تری عمل می کند. مقدار pH بهینه برای تشکیل رسوب زیستی کربنات کلسیم توسط باکتری *Sporosarcina pasteurii* در حدود ۹ گزارش شده است (Whiffin, 2004). (Stocks-Fischer et al., 1999) اظهار داشتند که فعالیت اوره آز با افزایش pH افزایش می یابد و بیشترین فعالیت آن را در pH برابر ۸ گزارش نمودند.

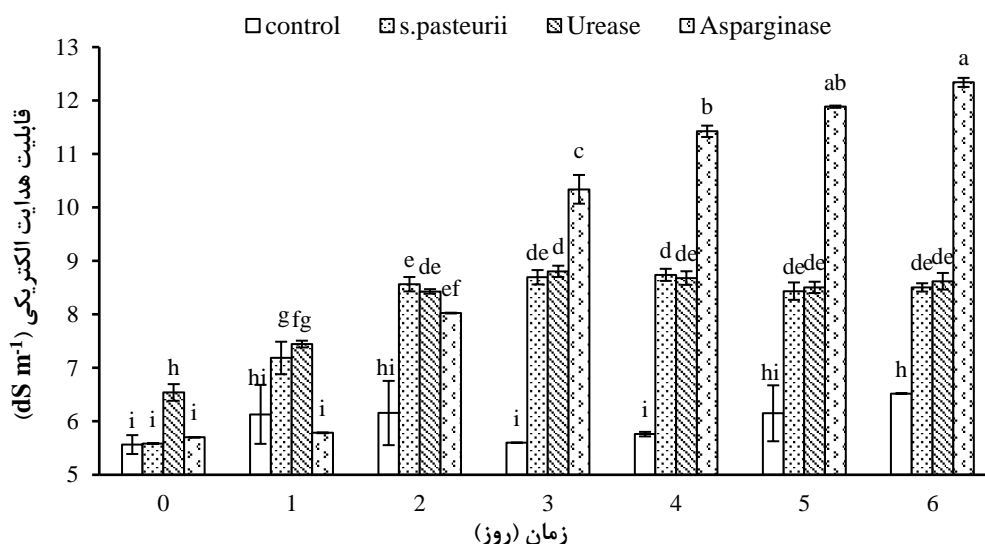


الکتریکی در شکل (۵) نشان داده شده است. به‌طور کلی مقدار قابلیت هدایت الکتریکی محیط کشت باکتریایی در تیمارهای دارای باکتری به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار بدون باکتری بود ( $p \leq 0.01$ ). بالاترین مقدار قابلیت هدایت الکتریکی در تیمار دارای باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii*، جدایه تولیدکننده اوره‌آز و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز به‌ترتیب در زمان‌های ۴، ۳ و ۶ انکوباسیون دیده شد و بین بالاترین مقدار قابلیت هدایت الکتریکی تیمار دارای باکتری شاخص و جدایه تولیدکننده اوره‌آز تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت. اما بالاترین مقدار قابلیت هدایت الکتریکی در تیمار دارای جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز به‌طور معنی‌داری بیشتر از بالاترین مقدار قابلیت هدایت الکتریکی در دو تیمار دیگر دارای باکتری بود.

درحالی‌که با تیمار دارای باکتری شاخص تفاوت معنی‌داری نداشت. (Li *et al.* (2015) نیز در پژوهشی مقدار pH محیط باکتری تولیدکننده ال-آسپاراژیناز را پس از ۱۴۴ ساعت از رشد باکتری در حدود ۹/۳ و pH محیط رشد باکتری تولیدکننده اوره‌آز را پس از ۱۲۰ ساعت ۱۰/۸ گزارش نمودند. (Sarada *et al.* (2009) با پژوهش بر روی سطح فعالیت اوره‌آز بر روی سه نوع مختلف باکتری تولیدکننده اوره‌آز دریافتند که *Sporosarcina pasteurii* (Bacillus pasteurii NCIM 2477) می‌تواند آنزیم اوره‌آز را در مقادیر تقریباً دو برابر بیشتر از دو باکتری *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871 و *Bacillus lentus* 2466-NCIB 8773 تولید کند.

### تغییرات قابلیت هدایت الکتریکی

برهم‌کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر مقدار قابلیت هدایت



شکل ۵- اثر برهم‌کنش سطوح مختلف باکتری و زمان بر قابلیت هدایت الکتریکی در طول ۶ روز انکوباسیون. حروف متفاوت بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است. نوارهای خطا انحراف از معیار می‌باشد.

می‌کند و با توجه به این‌که طی متابولیسم میکروبی، سوبسترای مغذی که شامل ترکیب‌های بزرگ مولکول است مصرف شده و مولکول‌های کوچک با بار الکتریکی ایجاد می‌شود، افزایش تدریجی قابلیت هدایت الکتریکی در تیمارهای دارای باکتری در مقایسه با تیمار شاهد را می‌توان به فعالیت آنزیمی در تیمارهای دارای باکتری ربط داد. در واقع افزایش قابلیت هدایت الکتریکی به‌دلیل تولید یون‌های  $\text{NH}_4^+$  و  $\text{CO}_3^{2-}$  از بستر غیر یونی اوره است (Whiffin, 2004; Al-Thawadi, 2008). (Hammad *et al.* (2013) به سنجش فعالیت اوره‌آزی در باکتری *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841 پرداختند و به ارتباط مستقیم افزایش قابلیت هدایت الکتریکی با فعالیت اوره‌آزی باکتری با زمان اشاره

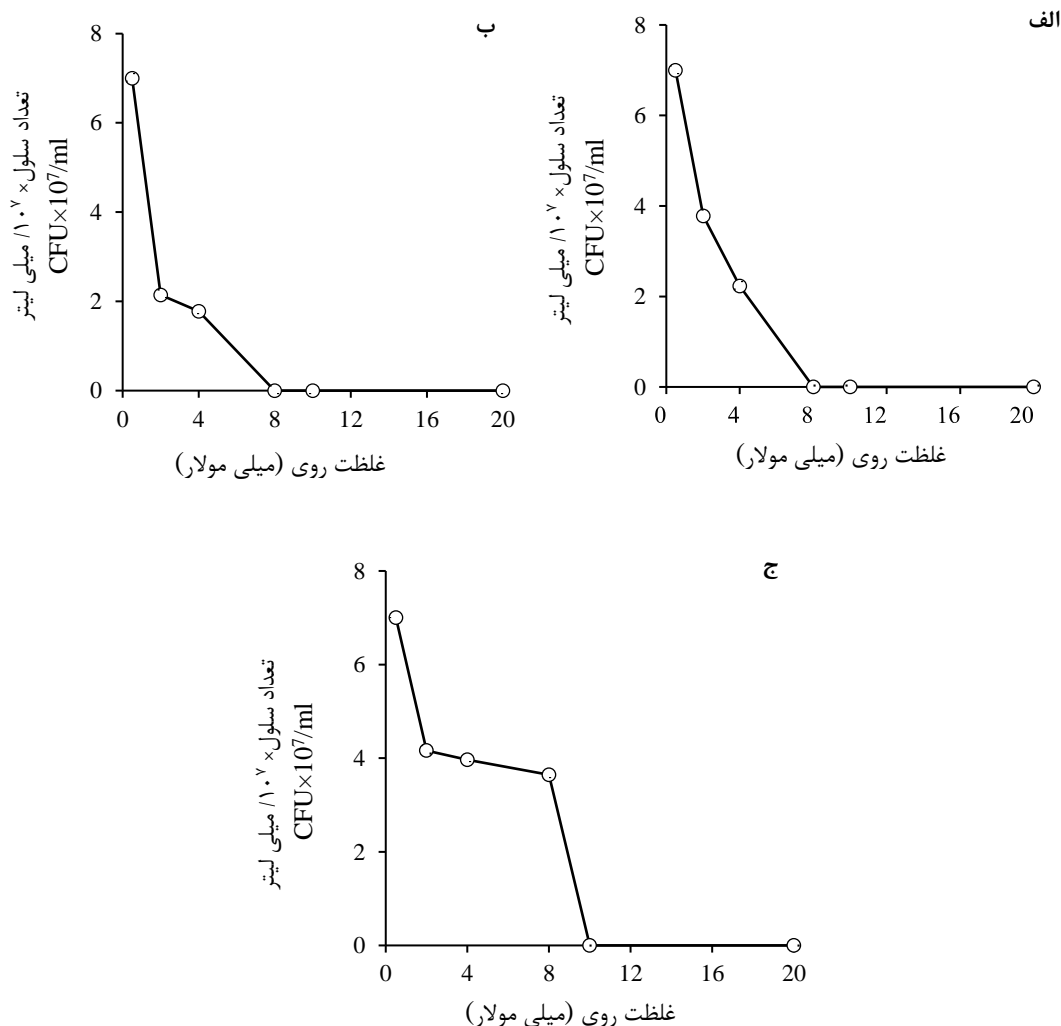
قابلیت هدایت الکتریکی در تیمار دارای باکتری شاخص از ۵/۵۸ در زمان صفر به ۸/۷۴ دسی‌زیمنس بر متر در روز چهارم انکوباسیون رسید و از آن به بعد روند تقریباً ثابتی داشت و تفاوت معنی‌داری بین قابلیت هدایت الکتریکی در روز سوم و زمان‌های بعد از آن وجود نداشت. در جدایه تولیدکننده اوره‌آز نیز قابلیت هدایت الکتریکی از ۶/۵۴ در زمان صفر به ۸/۸ دسی‌زیمنس بر متر در روز سوم انکوباسیون رسید و از آن به بعد تقریباً ثابت شد. در جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز قابلیت هدایت الکتریکی از ۵/۷ در زمان صفر به ۱۲/۳۴ دسی‌زیمنس بر متر در روز ششم افزایش یافت (شکل ۵). از آنجایی که مقدار قابلیت هدایت الکتریکی، مقدار یون‌های الکترولیت موجود در محلول را منعکس

نمودند.

(2016). از این رو به منظور تعیین کمترین غلظت بازدارنده روی، باکتری *Sporosarcina pasteurii* و دو جدایه باکتریایی آب چشمه سنگرود در معرض غلظت‌های مختلف روی قرار گرفتند. نتایج رشد باکتری‌ها در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۲، ۴، ۸، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار روی پس از گذشت ۴۸ ساعت در شکل (۶) نشان داده شده است.

#### آزمایش کمترین غلظت بازدارنده روی (MIC)

از آن‌جا که زنده‌مانی و عملکرد باکتری‌ها در فرآیند MICP تحت تأثیر سمیت فلزهای سنگین قرار دارد، استفاده از جدایه‌های با مقاومت بالا در برابر فلزهای سمی برای افزایش راندمان معدنی شدن زیستی در مکان‌های آلوده ضروری است (Kang and So)



شکل ۶- تعداد یاخته‌های باکتریایی در غلظت‌های مختلف روی پس از گذشت ۴۸ ساعت. باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* (الف)، جدایه تولیدکننده اوره آز (ب) و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز (ج)

نتوانستند در محیط به کار رفته رشد کنند (شکل ۶ الف و ب). Jalilvand *et al.* (2019) نیز در پژوهش خود غلظت ۴ میلی‌مولار روی را برای باکتری *Sporosarcina pasteurii* به عنوان MIC گزارش نمودند که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مطابقت دارد. با این حال در پژوهش دیگری توسط Mugwar and Harbottle (2016) غلظت ۰/۵ میلی‌مولار روی برای باکتری

به طور کلی، MIC برای هر فلز غلظتی از آن در محیط است که بیش از ۷۰ درصد رشد ریزجانداران را نسبت به رشد بهینه آن‌ها کاهش می‌دهد (Ruggiero *et al.*, 2005). بنابراین کمترین غلظتی از روی که مانع رشد نرمال باکتری *Sporosarcina pasteurii* و جدایه تولیدکننده اوره آز شد، غلظت ۴ میلی‌مولار روی بود و در غلظت‌های بالاتر این فلز این باکتری‌ها

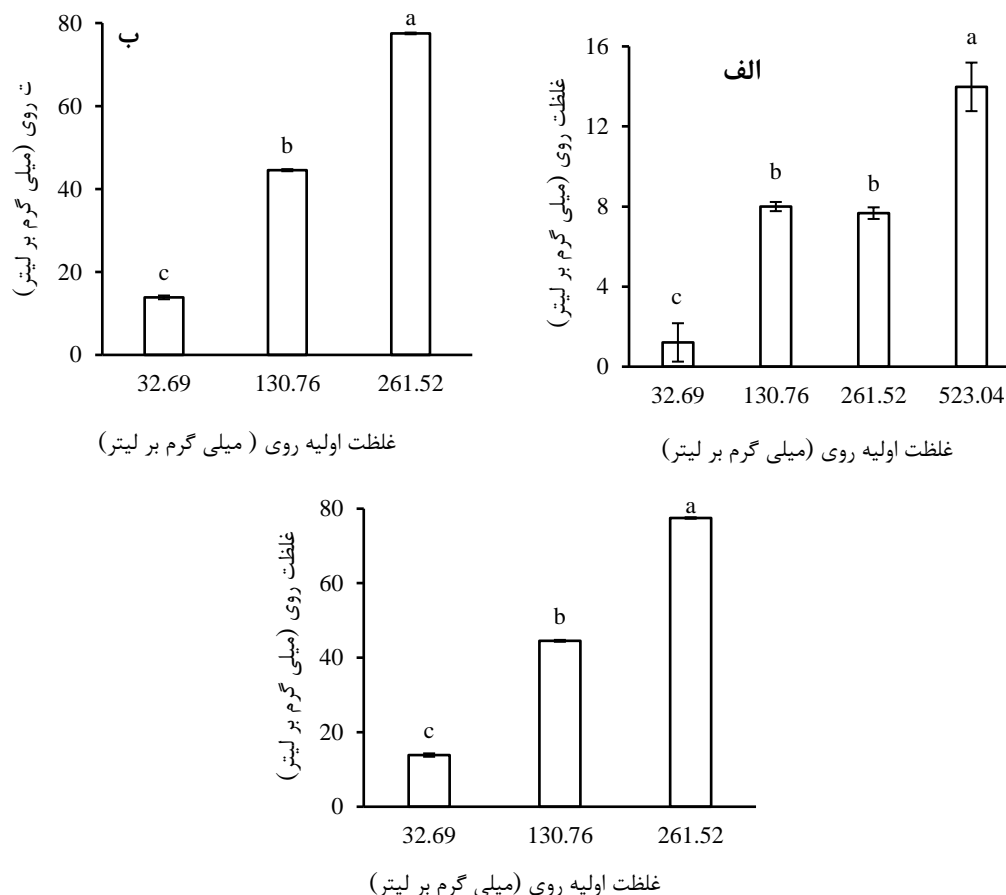
داد (شکل ۷ الف). نتایج حاصل از تاثیر جدایه تولیدکننده اوره‌آز بر حذف روی از محلول آلوده بسیار مشابه باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* بود. این باکتری نیز غلظت روی در محلول آلوده با غلظت‌های اولیه گفته شده در بالا را به ۱۱/۲۸، ۴۱/۷۵، ۷۴/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر کاهش داد که به ترتیب ۶۵/۴۹ و ۶۸/۰۷ و ۷۱/۴۶ درصد کاهش نسبت به مقدار اولیه می‌باشد. حذف روی توسط این جدایه نیز در هر سه غلظت تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر داشت و بیشترین حذف در غلظت ۴ میلی-مولار روی رخ داد (شکل ۷ ب). مقدار روی در محلول آلوده توسط جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز از غلظت‌های اولیه ۳۲/۶۹، ۱۳۰/۷۶، ۲۶۱/۵۲، ۵۲۳/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر روی (۰/۵، ۲، ۴، ۸ میلی‌مولار) به ترتیب به غلظت ۱/۲۱، ۷/۹۹، ۷/۶۷ و ۱۳/۹۷ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافت که به ترتیب برابر با ۹۶/۲۹، ۹۳/۸۸، ۹۷/۰۶ و ۹۷/۳۲ درصد کاهش نسبت به مقدار اولیه است. نتایج همچنین نشان داد حذف روی توسط جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز در غلظت ۲ و ۴ میلی‌مولار تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت اما تفاوت آماری معنی‌داری با غلظت ۰/۵ و ۸ میلی‌مولار داشتند و بیشترین حذف روی در غلظت ۸ میلی‌مولار آن رخ داد (شکل ۷ ج). همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش غلظت روی، حذف آن توسط هر سه باکتری افزایش یافت که این امر در مورد جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز نسبت به دو باکتری دیگر برجسته‌تر بود.

در پژوهش Li et al. (2013) نیز که به بررسی حذف فلزهای سنگین از محلول آلوده توسط شش سویه جدا شده از خاک و باکتری *Sporosarcina pasteurii* پرداختند نتایج حاکی از مقدار بالای حذف فلزهای سنگین از ۸۸ تا ۹۹ درصد پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در بین سویه‌های مختلف بود. در بین سویه‌های مختلف جدا شده در پژوهش آن‌ها سویه *Sporosarcina sp. R-31323* بالاترین مقدار حذف را برای فلز روی (۹۹/۸ درصد) نشان داد که بالاتر از درصد حذف باکتری *Sporosarcina pasteurii* (۹۶ درصد) بود. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد که در فرایند MICP، حذف مس توسط باکتری *Sporosarcina koreensis UR47* تقریباً ۹۳ درصد بود که بالاتر از باکتری *Sporosarcina pasteurii ATCC 11859* با مقدار حذف ۹۰ درصدی از این فلز بود.

*Sporosarcina pasteurii*، کمترین غلظت بازدارنده گزارش شده است. فلزهای ضروری و غیر ضروری در غلظت‌های بالا از طریق تخریب غشای یاخته، تغییر ویژگی‌های آنزیم، از بین بردن ساختار DNA و مختل کردن عملکرد یاخته بر رشد باکتری‌ها تأثیر منفی می‌گذارند (Bruins et al., 2000). بنابراین می‌توان گفت این کاهش در تعداد یاخته‌های باکتریایی احتمالاً به سبب اثر منفی سمیت فلز است که از رشد باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد. در پژوهش حاضر کمترین غلظت روی که مانع رشد نرمال جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز شد غلظت ۸ میلی‌مولار بود (شکل ۶ ج). به نظر می‌رسد جدا از اثرات مخرب روی، این باکتری بتواند EC بالاتری را نیز در مقایسه با دو باکتری دیگر تحمل نماید که این مسئله در نمودار EC نیز قابل ملاحظه است. بر اساس نتایج این پژوهش جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز مقاومتی بالاتر از باکتری *Sporosarcina pasteurii* و جدایه تولیدکننده اوره‌آز به روی نشان داد. (Jalilvand et al., 2019) غلظت ۱۵ میلی‌مولار روی را برای ایزوله *Variovorax C113 boronicumulans* جدا شده از مکان‌های آلوده به روی به عنوان MIC گزارش کردند. (Yamina et al., 2012) نیز گزارش نمودند که کادمیوم بیشترین سمیت را با MIC برابر ۲/۷ میلی‌مولار بر گونه‌های مختلف باسیلوس نشان داد در حالی که سرب و روی به ترتیب با MIC ۵/۸ و ۳/۸ میلی‌مولار سمیت کمتری داشتند. به‌طور کلی آلاینده‌های فلزی مرحله تاخیر<sup>۱</sup> رشد باکتری‌ها را طولانی می‌کنند و در نتیجه سبب کاهش سرعت رشد یا مهار کامل رشد باکتری‌ها می‌شوند (Ruggiero et al., 2005).

#### حذف روی از محلول آلوده

بررسی اثر حذف روی از محلول آلوده توسط باکتری *Sporosarcina pasteurii* و دو جدایه از آب چشمه سنگرود پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکل (۷) نشان داده شده است. باکتری *Sporosarcina pasteurii* منجر به کاهش غلظت-های اولیه ۳۲/۶۹، ۱۳۰/۷۶، ۲۶۱/۵۲ میلی‌گرم بر لیتر روی در محلول آلوده (۰/۵، ۲ و ۴ میلی‌مولار) به ترتیب به غلظت‌های ۵۱/۳۲، ۱۳۰/۸۶، ۴۴/۵۳، ۷۷/۵ میلی‌گرم بر لیتر شد که به ترتیب ۵۱/۳۲، ۶۵/۹۴، ۷۰/۳۶ درصد کاهش نسبت به مقدار اولیه می‌باشد. حذف روی توسط باکتری در هر سه غلظت تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر داشت که بیشترین حذف در غلظت ۴ میلی‌مولار روی رخ



شکل ۷- مقدار حذف روی از محلول آلوده توسط باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* (الف)، جدایه تولیدکننده اوره آز (ب) و جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز (ج) پس از گذشت ۴۸ ساعت. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است. نوارهای خطا (Error bar) انحراف از معیار می‌باشد.

لیتر) را در فرایند MICP برای باکتری *S. pasteurii* در مقایسه با باکتری‌های بومی جدا شده در غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار روی گزارش کردند. مقادیر حذف روی از محلول آلوده به دست آمده از این پژوهش با مقادیر گزارش شده در سایر پژوهش‌ها قابل مقایسه است. نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن است که جدایه تولیدکننده ال-آسپاراژیناز بومی می‌تواند با تولید آمونیاک کمتر، مقدار حذف روی را از محلول آلوده با کارایی بیشتری نسبت به باکتری شاخص *Sporosarcina pasteurii* در فرایند MICP انجام دهد. این امر بیانگر وجود سویه‌های مختلف باکتریایی ناشناخته در محیط آب و خاک است که توانایی بهره‌مندی در فرایند MICP را دارند. ضمن این که می‌توان از پسماندهای آلی برای تولید ال-آسپاراژیناز استفاده کرد تا فرایند MICP بر اساس فعالیت آنزیم ال-آسپاراژیناز دوست‌دار محیط زیست و با صرفه اقتصادی انجام شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری‌های بومی موجود در آب منطقه سنگرود گیلان قابلیت حذف زیستی روی از محلول آبی

در پژوهش دیگری از (Bhattacharya et al. 2019) از باکتری *Enterobacter cloacae* EMB19 زیست‌پالایی فلز روی از محلول آلوده با فرایند MICP استفاده شد. نتایج آن‌ها نشان داد در محلول‌های حاوی اوره و کلرید کلسیم و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر از روی، حذف کامل روی به ترتیب پس از گذشت ۷۲ و ۹۶ ساعت آنکوباسیون مشاهده شد. (Mugwar and Harbottle 2016) گزارش کردند حذف روی از محلول آلوده در غلظت‌های بالای ۰/۵ میلی‌مولار با حضور یاخته‌های زنده در طول ۷ روز صورت می‌گیرد. این پژوهش‌گران افزایش pH و حذف روی و کلسیم از محلول را نیز گزارش کردند. چرا که جذب، هم‌رسوبی و تشکیل احتمالی رسوب روی بر کربنات کلسیم در فرایند MICP رخ می‌دهد. فلز روی به شدت بر روی کانی‌های کربنات کلسیم جذب می‌شود. در فرایند MICP کریستال‌های کربنات کلسیم تشکیل می‌شوند و بنابراین جذب و به دنبال آن به دام افتادن روی به شکل  $\text{Ca-Zn-CO}_3$  احتمالاً ترسیب طولانی مدت روی را سبب می‌شود. (2019) Jalilvand et al. بیشترین سطح رسوب  $\text{ZnCO}_3$  (۲۴/۳۶ گرم بر

پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های بعدی برای بررسی گسترده‌تر باکتری‌های این منطقه در فرایند MICP به‌عنوان یک روش نوین و کارا برای پالایش زیستی عناصر آلاینده باشد. "هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

## REFERENCES

- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., and Reddy, M.S. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), pp.981-988.
- Adriano, D.C. (2003). Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals, Springer, New York, NY, USA, 2nd edition.
- Akiyama, M., and Kawasaki, S. (2012). Microbially mediated sand solidification using calcium phosphate compounds. *Engineering Geology*, 137-138: 29-39.
- Al-Thawadi, S.M. (2008). High Strength In-Situ Biocementation of Soil by Calcite Precipitating Locally Isolated Ureolytic Bacteria. PhD thesis. University of Murdoch, Western Australia.
- Al-Thawadi, S.M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. *Journal of Advanced Science and Engineering Research* 1: 98-114.
- Amoozgar, M.A., Ghazanfari, N., and Didari, M. (2012). Lead and cadmium bioremoval by *Halomonas* sp., an exopolysaccharide-producing halophilic bacterium. *Progress in Biological Sciences*, 2(1): 1-11.
- Anbu, P., Kang, C.H., Shin, Y.J., and So, J.S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, 5: 250-262.
- Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., and Tamura, G., (1972). Production of extracellular L-asparaginases by microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36: 356-361.
- Bergey, D.H. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, USA.
- Bhattacharya, A., Naik, S.N., and Khare, S.K. (2019). Efficacy of ureolytic *Enterobacter cloacae* EMB19 mediated calcite precipitation in remediation of Zn (II). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 54(6), pp.536-542.
- Bruins, M.R., KapilS, O., and ehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 198-207.
- Burbank, M.B., Weaver, T.J., Williams, B.C., and Crawford, R.L. (2012). Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29(4), pp.389-395.
- Castro-Alonso, M.J., Montañez-Hernandez, L.E., Sanchez-Muñoz, M.A., Macias Franco, M.R., Narayanasamy, R., and Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete; microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*, 6(126): 1-15.
- Christensen, W.B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *Journal of Bacteriology*, 52: 461-466.
- Dhami, N.K., Reddy, M.S., and Mukherjee, A. (2014). Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Frontiers in microbiology*, 5: 304.
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B., Rai, J., Sharma, P., Lade, H., and Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 7(2):2189.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F. S., and Smith, R. W. (2000). Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 17(4), pp. 305-318.
- Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Arvaniti, E.C., Hosseinkhani, B., Ramos, J.A., Rahier, H., and Boon, N., (2014). Formate oxidation driven calcium carbonate precipitation by *Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:4659-466.
- Greany, K.M. (2005). *An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago*, Gulf of Panama. M.S. thesis, School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland.
- Gulati, R., Saxena, R., and Gupta, R., (1997). A rapid plate assay for screening L- asparaginase producing microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*, 24(1): 23-26.
- Hammad, I.A., Talkhan, F.N., and Zoheir, A.E. (2013). Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(3): 1525-1533.
- Hasan, M., Begum, L., Hosain, S., Poddar, P., Chowdhury, A., and Ali, F. (2017). Study on heavy metals (Zinc and Lead) in drinking water of tannery area, adjacent areas and outside village areas. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, 7: 2.
- Hester, L.L., Sarvary, M.A., and Ptak, C.J. (2014). Mutation and selection: An exploration of antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Proceedings of the Association for Biology*

- Laboratory Education*, 35,140-183.
- Jalilvand, N., Akhgar, A., Alikhani, H.A., Asadi Rahmani, H., and Rejali, F. (2019). Removal of heavy metals zinc, lead, and cadmium by biomineralization of urease-producing bacteria isolated from Iranian mine calcareous soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(1): 10.1007/s42729-019-00121-z.
- Kang, C.H., Han, S.H., Shin, Y., Oh, S.J., and So, J.S. (2014). Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4): 1929-1937.
- Kang, C.H., and So, J.S. (2016). Heavy metal and antibiotic resistance of ureolytic bacteria and their immobilization of heavy metals. *Ecological Engineering*, 97: 304-312.
- Kirpichtchikova, T. A., Manceau, A., Spadini, L., Panfili, F., Marcus, M.A., and Jacquet, T. (2006). Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(9): 2163-2190.
- Kwon, H.K., Jeon, J.Y., and Oh, S.J. (2017). Potential for heavy metal (copper and zinc) removal from contaminated marine sediments using microalgae and light emitting diodes. *Ocean Science Journal*, 52, 57 –66.
- Leboffe, M.J. and Pierce, B.E. (2015). *Microbiology: laboratory theory and application*. Morton Publishing Company.
- Li, M., Chen, G.X., and Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76: 81–85.
- Li, M., Fu, Q.L., Zhang, Q., Achal, V., and Kawasaki, S. (2015). Bio-grout based on microbially induced sand solidification by means of asparaginase activity. *Scientific Reports*, 5(16128):1-9.
- Mitchell, A.C., and Ferris, F.G. (2005). The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetics dependence, *Geochim Gosmochim Acta*, 69: 4199–4210.
- Moberly, J., Staven, A., Sani, R., and Peyton, B. (2010). Influence of pH and inorganic phosphate on toxicity of zinc to *Arthrobacter* sp. isolated from heavy-metal-contaminated sediments. *Environmental Science and Technology*, 44: 7302-7308.
- Mugwar, A.J., and Harbottle, M.J. (2016). Toxicity effects on metal sequestration by microbially-induced carbonate precipitation. *Journal of Hazardous Materials*, 314: 237-248.
- Peleg, M., and Corradini, M.G. (2011). Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition is a food science journal*, 51(10): 917-945.
- Redmile-Gordon, M., and Chen, L. (2017). Zinc toxicity stimulates microbial production of extracellular polymers in a copiotrophic acid soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 119: 413-418.
- Ruggiero, C.E., Boukhalfa, H., Forsythe, J.H., Lack, J.G., Hersman, L.E., and Neu, M.P. (2005). Actinide and metal toxicity to prospective bioremediation bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(1): 88-97.
- Sarada, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D., and Lele, S.S. (2009). Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 1111-1115.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., and Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(3): 246-253.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. and Bang, S.S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1563-1571.
- Tobler, D.J., Cuthbert, M.O., Greswell, R.B., Riley, M.S., Renshaw, J.C., Handley-Sidhu, S., and Phoenix, V.R. (2011). Comparison of rates of ureolysis between *Sporosarcina pasteurii* and an indigenous groundwater community under conditions required to precipitate large volumes of calcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(11): 3290-3301.
- Whiffin, V.S. (2004). *Microbial CaCO<sub>3</sub> precipitation for the production of biocement*. Ph.D. dissertation, University of Murdoch. Western Australia.
- Yamagata, H., Yoshizawa, M., and Minamiyama, M. (2010). Assessment of current status of zinc in wastewater treatment plants to set effluent standards for protecting aquatic organisms in Japan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 169: 67–73.
- Yamina, B., Tahar, B., and Laure, F. M. (2012). Isolation and screening of heavy metal resistant bacteria from wastewater: a study of heavy metal co-resistance and antibiotics resistance. *Water Science and Technology*, 66: 2041–2048.
- Yu, X., Qian, C., Xue, B., and Wang, X. (2015). The influence of standing time and content of the slurry on bio-sandstone cemented by biological phosphates. *Construction and Building Materials*, 82: 167-172.
- Zhao, Y., Yao, J., Yuan, Z., Wang, T., Zhang, Y., and Wang, F. (2016). Bioremediation of Cd by strain GZ-22 isolated from mine soil based on biosorption and microbially induced carbonate precipitation. *Environment Science and Pollutant Research*, 24(1): 372-380.