

زیست‌پالایی کادمیم با روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم در خاک شنی

سمیرا عبدالرحیمی^۱ - نسرین قربان‌زاده^{۲*} - اکبر فرقانی^۳ - محمد باقر فرهنگی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۰

چکیده

آلودگی زیستگاه‌های طبیعی به فلزهای سنگین به سبب سمیت بالا سلامت موجودات زنده و محیط زیست را تحت تأثیر قرار می‌دهد. معدنی شدن زیستی بر اساس تشکیل رسوب کربنات کلسیم زیستی روشی نویدبخش برای پالایش فلزهای سمی در خاک‌های آلوده می‌باشد. این پژوهش به منظور بررسی حذف کادمیم به روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم از مسیر هیدرولیز اوره با باکتری اسپورسارسینا پاستوری انجام شد. آزمایش ابتدا در محلول دارای کادمیم (در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار کادمیم) و سپس در یک خاک شنی آلوده شده با کادمیم (در پنج سطح صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تکرار اجرا شد. آزمایش‌ها در دو سطح با باکتری و بدون باکتری بودند. رسوب کادمیم در محلول آلوده در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار کادمیم در حضور باکتری به ترتیب ۹۹/۶، ۹۹/۸ و ۹۹/۸ درصد بود. نتایج این پژوهش نشان داد که در تیمارهای دارای باکتری در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری مقدار کادمیم در بخش محلول + تبادل کاهش یافته و در بخش کربناتی افزایش آماری چشم‌گیری ($P \leq 0.05$) پیدا کرد. به طوری که مقدار کادمیم در بخش محلول + تبادل خاک در ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم در حضور باکتری به ترتیب ۸۵/۹، ۶۱/۱، ۷۴/۳ و ۸۰/۳ درصد کاهش نشان داد. بنابراین، نتایج این پژوهش حاکی از آن است که جداسازی فلزهای سنگین بر مبنای روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم از طریق رسوب همزمان با کلسیت می‌تواند برای پالایش زیستی فلزهای سنگین سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپورسارسینا پاستوری، اوره‌آز، معدنی شدن زیستی، کلسیت، کادمیم

مقدمه

پالایش این منابع و بروز بحران‌های زیست‌محیطی، زیست‌پالایی^۵ در کانون توجه قرار گرفته است. هدف اصلی زیست‌پالایی استفاده از موجودات زنده برای تجزیه انواع آلاینده‌ها و مواد سمی است که به صورت طبیعی یا مصنوعی وارد محیط زیست شده‌اند (۲). روش‌های فیزیکوشیمیایی حذف فلزهای سنگین از خاک‌های آلوده از قبیل تصفیه، رسوب، روش‌های الکتروشیمیایی، شست و شوی خاک، اکسایش و کاهش، تبادل یونی، اسمز معکوس، تثبیت و غیره مشکلاتی شامل نیاز به مواد شیمیایی فراوان و انرژی و هزینه بالا دارد. از سوی دیگر این روش‌ها محصولات جانبی ثانویه نیز ایجاد می‌شود (۲).

در میان روش‌های مختلف، زیست‌پالایی یک فن‌آوری مؤثر، کم هزینه و دوست‌دار طبیعت است که با به کارگیری فعالیت‌های ریزجانداران از خطرهای ایجاد شده ناشی از انباشت مواد شیمیایی سمی در محیط زیست می‌کاهد. روش‌های زیستی متنوعی مانند

فلزهای سنگین مانند کادمیم، سرب، مس، نیکل و روی به طور طبیعی در غلظت‌های خیلی پایین در خاک‌ها، ته‌نشست‌ها و منابع آبی وجود دارند (۱۸). این فلزها به طور مداوم بر اثر فعالیت‌های مختلف در طبیعت رها شده و از آن‌جا که تجزیه نمی‌شوند در محیط انباشته شده و به زنجیره غذایی وارد می‌شوند و بنابراین در بافت گیاهان، حیوان و انسان تجمع می‌یابند (۳۳ و ۲۳). در میان فلزهای سنگین، کادمیم به سبب فعالیت بالا و قابلیت انحلال نسبی در آب در بافت‌های زنده سمیت بالایی ایجاد می‌کند و از این جهت بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲۸). در سال‌های اخیر با توجه به حجم بالای آلودگی منابع طبیعی و ناکارآمدی روش‌های فیزیکوشیمیایی مرسوم برای

۱، ۲، ۳ و ۴ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

* - نویسنده مسئول: (Email: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com)

DOI: 10.22067/jsw.v32i2.68373

هیدرولیز کننده اوره و تولید کننده آنزیم اوره‌آز هستند که گونه‌های آن‌ها به طور گسترده‌ای در خاک‌ها توزیع شده‌اند. وارن و همکاران (۳۴) گزارش نمودند که ۹۵٪ از استرانسیم با رسوب بر روی کلسیت ایجاد شده بر اثر فعالیت باکتری *Sporosarcina pasteurii* از فاز محلول حذف شد. ناگونکار و همکاران (۲۷) نیز حذف ۹۲٪ آرسنیک از فاز محلول خاک را به وسیله *Enterobacteriaceae* در پایان ۵ روز از مایه‌زنی باکتری گزارش نمودند. این روش زیست‌پالایی در حذف آلودگی فلزهای سنگین با وجود اهمیت آن، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، با توجه به مقدار اندک کربنات در خاک‌های استان گیلان در مقایسه با سایر استان‌های کشور، این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش MICCP در زیست‌پالایی خاک شنی آلوده به کادمیم و کاهش مقدار کادمیم در بخش محلول و تبادل و انتقال آن به بخش کربناتی در حضور باکتری اسپورسارسینا پاستوری در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه و بازکشت باکتری

باکتری اسپورسارسینا پاستوری (PTCC1645) از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد و در محیط کشت NA (نوترینت آگار) بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشت NBU (نوترینت برات همراه با ۲٪ وزنی به حجمی اوره (۳۳۳ میلی‌مولار) و ۲۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم) منتقل و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با هوادهی دائمی بر روی شیکر (۱۱۰ rpm) تا زمان رسیدن باکتری به مرحله انتهایی فاز رشد نمایی انکوباسیون شد. به منظور ارزیابی تولید اوره‌آز توسط این باکتری، مقدار آمونیاک آزاد شده بر اساس روش فنل - هیپوکلریت در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ روز اندازه‌گیری شد (۱).

آماده‌سازی محلول مادر کادمیم

محلول مادر (۵۰۰ میلی‌مولار) کادمیم از نمک $CdCl_2$ تهیه شد و در تاریکی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار کادمیم با رقیق‌سازی از محلول مادر تهیه و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شدند.

آزمایش کمترین غلظت بازدارنده (MIC) کادمیم

این آزمایش به منظور تعیین کمترین غلظتی از کادمیم که از رشد باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد، انجام شد. یاخته‌های باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت NB کشت داده شدند در چگالی

جذب زیستی^۱، تجمع زیستی^۲، معدنی شدن زیستی^۳، گیاه پالایی و غیره وجود دارد (۱۶). معدنی شدن زیستی فرآیندی است که به وسیله آن ریزجانداران کانی‌ها را تولید می‌کنند. ساخت کانی‌ها به وسیله پروکاریوت‌ها به طور کلی به دو بخش معدنی شدن کنترل شده زیستی^۴ (BCM) و معدنی شدن تحریک شده زیستی^۵ (BIM) دسته بندی می‌شوند (۱۳). در میان تمامی کانی‌هایی که با معدنی شدن زیستی ایجاد می‌شوند، کربنات‌ها مشهورترین هستند. رسوب کربنات کلسیم تحریک شده میکروبی^۶ (MICCP) به طور گسترده‌ای به عنوان شاخه‌ای از معدنی شدن زیستی در زمینه‌های مختلف مانند بیوتکنولوژی، ژئوتکنولوژی و دیرین‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفته است. در این فرآیند، ریزجانداران به عنوان بخشی از فعالیت‌های متابولیکی پایه خود به طور طبیعی مواد غیرآلی تولید می‌کنند (۲۶).

فرآیند MICCP مبتنی بر هیدرولیز اوره، توانایی نگه‌داری فلزهای سنگین و رادیونوکلوئیدها را از طریق جذب سطحی و رسوب هم‌زمان در شبکه کلسیت دارد. حساس نبودن این روش به پتانسیل اکسایش-کاهش و پایداری کلسیت در محیط‌های مختلف زمین شناسی مانع آزادسازی دوباره آلودگی به محیط می‌شود (۱۶ و ۳۷). حذف فلزهای سنگین در فرآیند MICCP از مسیر هیدرولیز اوره رخ می‌دهد. باکتری‌هایی که توان تولید آنزیم اوره‌آز^۷ را دارا هستند، در فرآیند هیدرولیز اوره شرکت می‌کنند (۱۸). اوره‌آز (آمیدوهیدرولاز اوره^۸) آنزیمی است که اوره را به یک مول کربنات و دو مول آمونیاک هیدرولیز می‌کند. آزادسازی یون‌های کربنات (CO_3^{2-}) و آمونیوم (NH_4^+) با افزایش پی‌اچ، در حضور یون‌های فلزی سبب رسوب کربنات این یون‌ها می‌شود. یون کربنات آزاد شده به درون آب یا خاک می‌تواند با کلسیم به فرم کربنات کلسیم (کلسیت) ترکیب شود (۱۸). کلسیت فرآورده‌ی معدنی شدن زیستی این فرآیند است که فلزهای سنگین بر روی ساختار کریستالی آن رسوب کرده و از خاک‌های آلوده حذف می‌شوند (۱۹).

رسوب زیستی کلسیت با چندین فلز دو ظرفیتی مانند کادمیم، آهن، روی، اورانیم، کبالت، سرب، مس و جیوه و همچنین بسیاری از اکتینیدها گزارش شده است (۱۴). بیوربانک و همکاران (۱۱) بیان نمودند که باکتری‌های جنس *Lysinibacillus*، *Sporosarcina*، *Brevibacterium* و *Bacillus Arthrobacter* باکتری‌های معمول

- 1- Biosorption
- 2- Bioaccumulation
- 3- Biomineralization
- 4- Biologically Controlled Mineralization
- 5- Biologically Induced Mineralization
- 6- Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation
- 7- Ureolytic
- 8- Urea amidohydrolase

مخلوط شد. پس از آن مقدار ۱۰۰ گرم از خاک‌های آلوده در ظرف های پلاستیکی با ظرفیت ۵۰۰ گرم ریخته شد و تقریباً تا حداکثر ظرفیت زراعی، آبیاری و به مدت دو هفته انکوباسیون شدند تا در حد امکان برهم کنش‌های آلاینده و خاک صورت پذیرد و شرایط آلودگی طبیعی تر باشد. مقدار ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک آلوده و سترون شده به درون ظرف‌های دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت NBU ریخته شد و باکتری با غلظت (تقریباً ۱۰^۷ سلول بر میلی‌لیتر) به ظرف‌ها افزوده شد. سپس نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۷ روز انکوباسیون شدند. در پایان ۷ روز، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز به روش تعیین آمونیوم با روش تقطیر بخار (۲۴) و دهیدروژناز به روش اندازه‌گیری تغییر شکل بستره ۵، ۳، ۲-تری فنیل تترازولیوم کلراید به ۵، ۲-تری فنیل فورمازان (۳۲) اندازه‌گیری شد. غلظت عنصر کادمیم در بخش‌های (محلول و تبادل و کربناتی) برای تمام غلظت‌های کادمیم (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و در بخش‌های (اکسیدهای آهن - منگنز، ماده آلی و باقیمانده) تنها برای غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم بر طبق مراحل عصاره‌گیری پی در پی با روش تسیر (۳۱) در نمونه‌های خاک اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

آنالیز آماری

آزمایش زیست‌پالایی خاک آلوده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل ۵ غلظت کادمیم به ترتیب صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، دارای دو سطح با باکتری و بدون باکتری بودند. نتایج به دست آمده از تمامی آزمایش‌ها در بخش‌های مختلف با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی با یکدیگر با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی‌وشیمیایی و زیستی خاک مورد آزمایش در جدول ۲ نشان داده شده است. مقدار شن، سیلت و رس در این خاک به ترتیب ۸۲، ۱۰ و ۸ درصد و بافت خاک شنی بود. همچنین در خاک مورد آزمایش غلظت کادمیم کل، صفر میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

مقدار آمونیاک حاصل از فعالیت آنزیم اوره‌آز باکتری اسپورسارسینا پاستوری در شش روز آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است. مقدار آمونیاک تولید شده تا روز چهارم روند افزایشی داشت و پس از آن به مقدار تقریباً ثابتی رسید. آچال و همکاران (۱) نیز بیشترین مقدار آمونیاک را در حضور باکتری *Sporosarcina pasteurii* روز پنجم در طی ۷ روز آزمایش گزارش نمودند.

نوری ۶۰۰ نانومتر تا حدود ۱ رقیق شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر (۱۰٪ حجمی به حجمی) از یاخته‌های باکتریایی رقیق شده به غلظت‌های مختلف از کادمیم (۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار) افزوده شد. سپس به یاخته‌های باکتری اجازه داده شد که در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی در این محیط‌های دارای کادمیم رشد نمایند. تعداد یاخته‌های باکتریایی از طریق شمارش بر روی پلیت (CFU) مشخص و کمترین غلظت کادمیم که از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرد به عنوان کمترین غلظت بازدارنده در نظر گرفته شد (۸). هم‌زمان با شمارش تعداد یاخته‌های باکتریایی جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری شد.

حذف کادمیم از محلول آلوده

مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از کمترین غلظت بازدارنده کادمیم به دست آمده از مرحله قبل (۲ میلی‌مولار) به درون ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت NBU به همراه باکتری (تقریباً ۱۰^۷ سلول بر میلی‌لیتر) به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و بر روی شیکر (۱۱۰rpm) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون شد. این آزمایش در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار کادمیم) و در سه تکرار انجام شد. لوله‌ها پس از انکوباسیون سانتریفوژ شده و غلظت کادمیم در محلول رویی با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل VARIAN 220 اندازه‌گیری شد (۱۹).

زیست‌پالایی خاک آلوده به کادمیم

یک نمونه خاک شنی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر نمونه‌برداری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه و هوا خشک کردن، نمونه خاک برای آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. مقداری از خاک نیز برای انجام آنالیزهای زیستی در یخچال نگهداری شد. برخی از ویژگی‌های خاک شامل بافت به روش هیدرومتری (۱۲)، پی‌اچ و رسانایی الکتریکی (درعصاره‌ی اشباع) (۲۹)، ماده آلی به روش والکی و بلک (۳۵)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (۳۰)، تنفس میکروبی پایه خاک (۹)، کربن زیست‌توده میکروبی از روش گازدهی با کلروفرم (تدخین-انکوباسیون) (۱۷) اندازه‌گیری شد. نمونه خاک در شرایط آزمایشگاهی سترون و سپس با نمک کلرید کادمیم (CdCl₂) آلوده گردید. به منظور آلوده کردن خاک، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم با توجه به حد معمول آن در خاک (۱ تا ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (۲۰) انتخاب شدند و غلظت صفر کادمیم نیز به عنوان تیمار شاهد در آزمایش گنجانده شد. مقدار نمک کلرید کادمیم برای هر یک از غلظت‌های کادمیم محاسبه و با مقدار مشخصی از خاک

جدول ۱- روش عصاره‌گیری پی‌درپی تسیر و همکاران (۱۹۷۹)
Table 1- Sequential extraction procedure (Tessier et al., 1979)

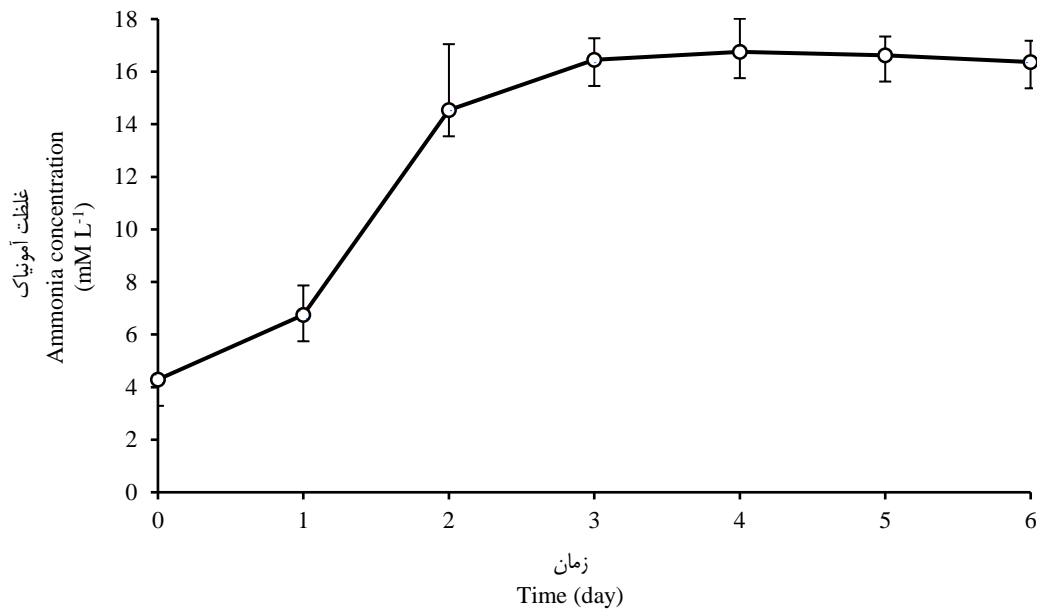
مدت تکان دادن و شرایط عصاره‌گیری Shaking time and extraction conditions	حجم عصاره‌گیر به ازای یک گرم خاک (میلی لیتر) Volume of extractant for one gram of soil (ml)	محلول عصاره‌گیر Extractant solution	بخش‌های کادمیم Cadmium fractions	مرحله عصاره‌گیری Extraction step
2 ساعت	4	کلرید منیزیم، یک مولار (pH=7)	محلول + تبادلی Exchangeable+soluble fraction	1
5 ساعت	4	استات سدیم، یک مولار (pH=5، تنظیم با اسید استیک)	پیوند با کربنات‌ها Carbonate bound fraction	2
5 ساعت در حمام آب گرم در دمای 96 درجه‌ی سلسیوس	20	هیدروکسیل آمونیوم کلراید، 0.04 مولار در اسید استیک 25 درصد (حجمی/حجمی)	پیوند با اکسیدهای آهن و منگنز Fe-Mn oxides bound fraction	3
2 ساعت در حمام آب گرم در دمای 85 درجه‌ی سلسیوس	5+3	اسید نیتریک، 0.02 مولار + آب اکسیژنه 30 درصد (pH=2، تنظیم با اسید استیک)	پیوند با مواد آلی Organic matter bound fraction	4
1 ساعت در دمای 180 درجه‌ی سلسیوس	24	اسید کلریدریک 35 درصد + اسید نیتریک 70 درصد، (به نسبت 1 به 3)	باقی مانده Residual fraction	5

جدول ۲- برخی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و زیستی خاک
Table 2- Some physicochemical and biological characteristics of soil

کربن آلی Organic carbon	کربنات کلسیم معادل Equivalent calcium carbonates	رسانایی الکتریکی (ECe) Electrical conductivity	پH (pH)	ویژگی‌های خاک Soil properties
	g. 100 g ⁻¹	dS.m ⁻¹		
0.019	2	0.4	7.4	
	فعالیت آنزیم دهیدروژناز Dehydrogenase enzyme activity	تنفس پایه میکروبی Microbial basal respiration	کربن زیست‌توده میکروبی Microbial carbon biomass	
	mg TPF.g ⁻¹ dm ⁻¹ 16h ⁻¹	mgCO ₂ .gdm ⁻¹ 24h ⁻¹	mg C kg dm ⁻¹	
	0.012	0.2	7.1	

به طور کلی فلزهای سنگین پرخطر مانند کادمیم، کروم، مس و روی پیامدهای زیان‌باری بر روی ریزجانداران دارند. از این رو افزایش غلظت این فلزها در محیط به بیش از حد آستانه سبب کاهش رشد ریزجانداران می‌شود (۲۱). به منظور تعیین MIC کادمیم، باکتری *Sporosarcina pasteurii* در معرض غلظت‌های مختلف کادمیم قرار گرفت. نتایج رشد باکتری در غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی‌مولار کادمیم پس از گذشت ۴۸ ساعت از انجام آزمایش در شکل ۳ نشان داده شده است.

همچنین نتایج کانگ و همکاران (۱۸) مشخص کرد که فعالیت اوره‌آز در حضور باکتری *Lysinibacillus sphaericus* CH-5 تا روزهای چهارم و پنجم افزایش داشته و پس از آن به گونه چشم‌گیری کاهش پیدا کرده است. این پژوهش‌گران بیان داشتند که بعد از پنج روز فعالیت آنزیم پروتئاز افزایش پیدا کرده و این آنزیم از طریق انباشت روی محیط کشت، بر روی فعالیت اوره‌آز پیامد منفی داشته و سرانجام سبب کاهش تولید اوره‌آز شده است. در شکل ۲ رسوب تشکیل شده توسط باکتری اسپورسارسینا پاستوری پس از ۴۸ ساعت از شروع آزمایش آمده است.



شکل ۱- غلظت آمونیاک در طول شش روز آزمایش در حضور باکتری اسپورسارسینا پاستئوری. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می باشند (n=2)

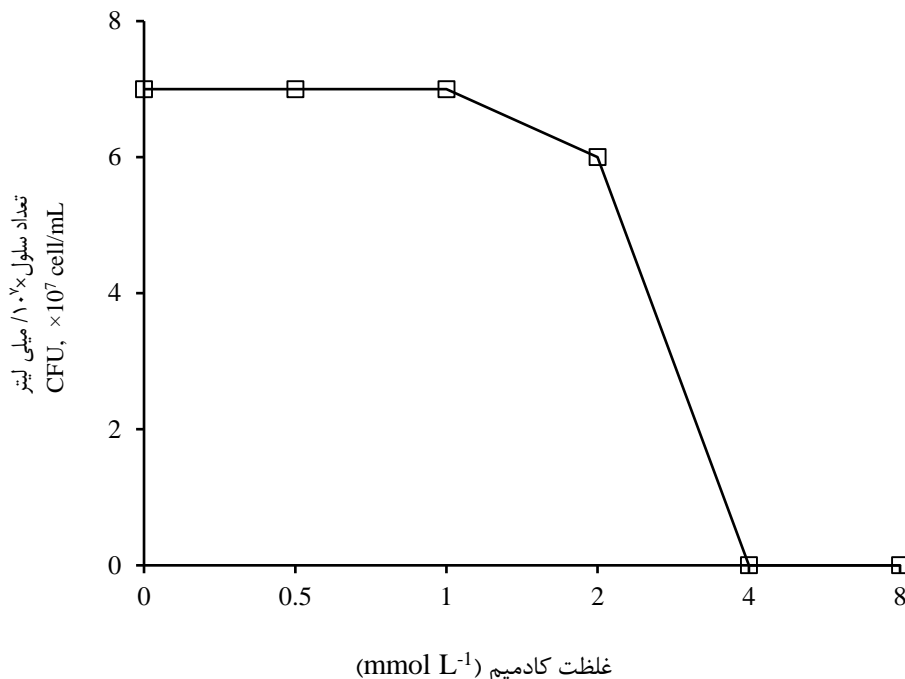
Figure 1- Ammonia concentration during six days of experiment in the presence of *Sporosarcina pasteurii* Error bars are deviations from the criteria (n = 2)



شکل ۲- رسوب کلسیت تشکیل شده توسط باکتری اسپورسارسینا پاستئوری پس از ۴۸ ساعت
Figure 2- Calcite precipitation formed by *Sporosarcina pasteurii* after 48 hours

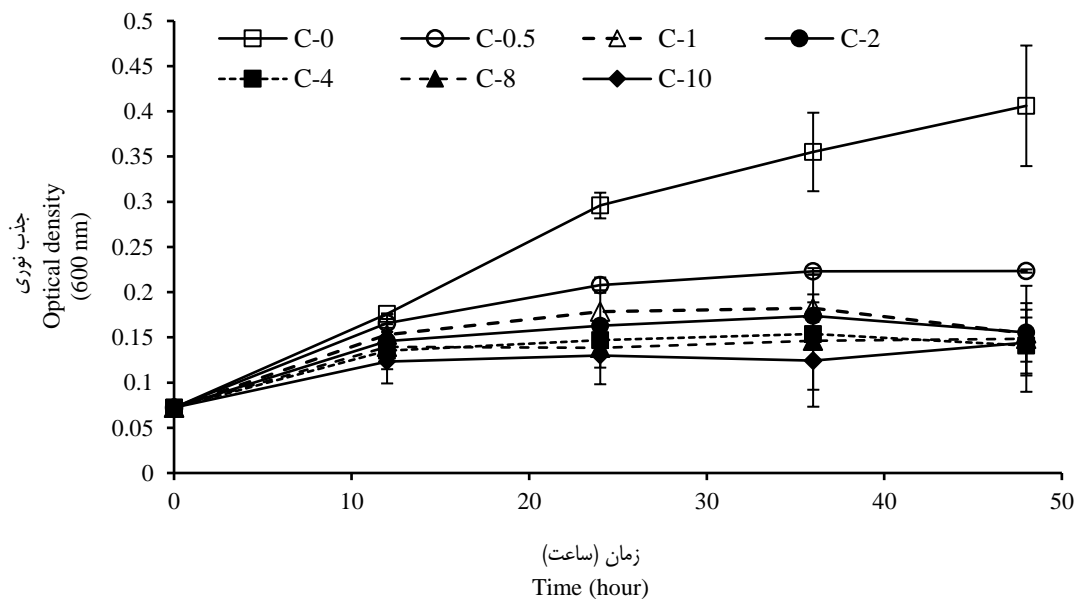
بیان داشت که جلوگیری از رشد باکتری بر اساس نوع و غلظت فلز تغییرپذیر است. همچنین لی (۲۲) گزارش کرد که حداکثر رشد مخمر *Rhodotorula sp. Y11* با افزایش غلظت Cd(II) تا ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر نسبت به غلظت صفر این فلز کاهش پیدا می کند. بنابراین می توان گفت که احتمالاً این کاهش به سبب پیامد منفی فلز است که رشد باکتری را کند می کند. کاهش رشد یاخته باکتریایی در حضور فلز همچنین ممکن است به سبب تجمع این یون بر روی سطح غشای یاخته باشد که در نتیجه منجر به انبساط غشا و افزایش تعداد مکان های پیوندی شده که سبب کاهش نقل و انتقال مواد مورد نیاز رشد یاخته می شود (۶).

کمترین غلظتی از کادمیم که از رشد باکتری جلوگیری می کند، غلظت ۲ میلی مولار بود و در غلظت های ۴ تا ۸ میلی مولار کادمیم رشد باکتری به صفر رسید. کانگ و همکاران (۱۸) کاهش رشد باکتری تولید کننده اوره *Lysinibacillus sphaericus* CH-5 در محیط دارای ۲ گرم بر لیتر کادمیم در مقایسه با رشد باکتری در محیط بدون کادمیم را گزارش نمودند. نتایج همچنین نشان داد که جذب نوری در غلظت های ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میلی مولار کادمیم به ترتیب نسبت به غلظت صفر کادمیم (شاهد) کاهش پیدا کرده است (شکل ۴). هاسن (۱۵) در پژوهشی در رابطه با پیامد فلزهای سنگین بر رشد *Bacillus thuringiensis* و *Pseudomonas aeruginosa*



شکل ۳- تعداد یاخته باکتری اسپورسارسینا پاستوری در غلظت‌های مختلف کادمیم پس از ۴۸ ساعت

Figure 3- The number of *Sporosarcina pasteurii* cells in different concentrations of cadmium after 48 hours



شکل ۴- جذب نوری در غلظت‌های مختلف کادمیم در ۴۸ ساعت. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند (n=2)

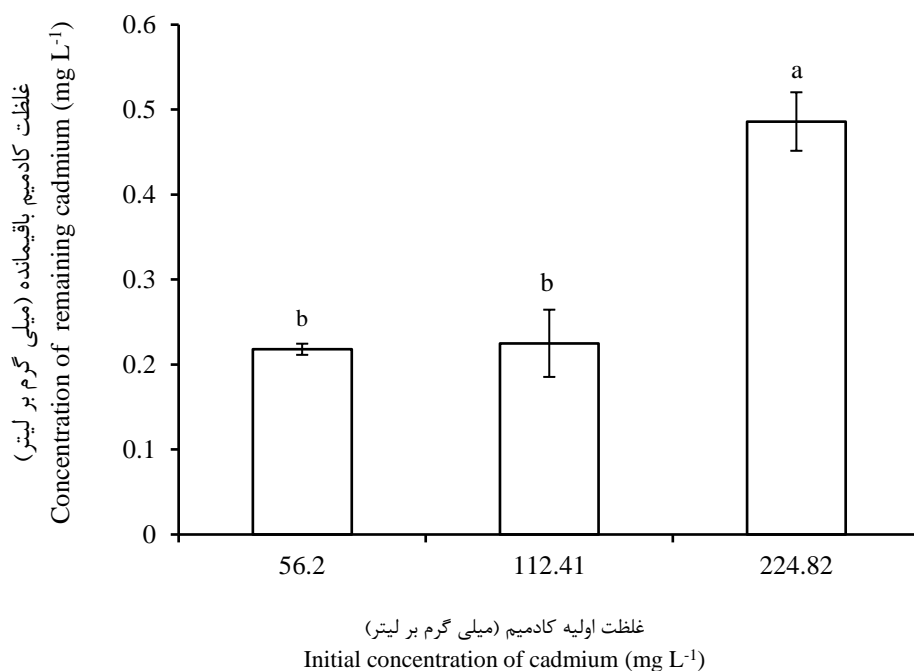
Figure 4- Optical density at different concentrations of cadmium during 48 hours. Error bars are deviations from the criteria (n = 2)

(شکل ۵) که به ترتیب برابر با ۹۹/۶، ۹۹/۸ و ۹۹/۸ درصد کاهش نسبت به غلظت اولیه است. نکته جالب توجه این است که با افزایش غلظت اولیه کادمیم در محلول آلوده، کاهش غلظت بیشتر و تفاوت آن با دو تیمار دیگر چشم‌گیر نیز بوده است ($P \leq 0.05$). این نتایج با

بررسی پیامد باکتری بر حذف کادمیم از محلول آلوده نشان داد که غلظت کادمیم در محلول آلوده از غلظت‌های اولیه ۵۶/۲، ۱۱۲/۴۱ و ۲۲۴/۸۲ میلی‌گرم بر لیتر (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار) کادمیم به ترتیب به ۰/۲۱۸، ۰/۲۲۵ و ۰/۴۸۶ میلی‌گرم بر لیتر کاهش پیدا کرده است

Enterobacter cloaca می‌توانند در حذف سرب از محلول آلوده با روش MICCP مؤثر باشد (۱۹). این پژوهش‌گران حذف سرب در حضور باکتری‌های KJ-46 و KJ-47 را به ترتیب ۶۸/۱ و ۵۴/۲ درصد گزارش کردند. هیدرولیز میکروبی اوره با تولید سریع کربنات در حضور یون کلسیم منجر به رسوب کلسیت شده که فلز کادمیم بر روی ساختار کریستالی آن رسوب کرده و از محلول حذف می‌شود (۱۸). ژائو و همکاران (۳۷) نیز حذف کادمیم از محلول آلوده را با روش MICCP در حضور باکتری *Bacillus sp.* GZ-22 جداسازی شده از خاک معدن را ۵۳/۰۶٪ بعد از ۳ ساعت گزارش کردند.

تولید اوره‌آز در ارتباط است و تولید بالای اوره‌آز سبب زیست‌پالایی بالای فلز شده است (۳). نتایج بیانگر این است که یاخته‌های باکتریایی با افزایش غلظت فلز در محیط، فعالیت اوره‌آز را افزایش داده و غلظت فلز نیز با افزایش مقدار رسوب در محیط کاهش یافته است. عموماً زیست‌پالایی با ریزجانداران زنده به شدت به جمعیت یاخته‌ها بستگی دارد که سبب کاهش غلظت فلز سنگین در طی فاز لگاریتمی می‌شود (۱۹). در پژوهش کانگ و همکاران (۱۸) باکتری *Lysinibacillus sphaericus* CH-5 توانست ۹۹/۹۵ درصد از کادمیم را در محلول آلوده را با این روش حذف کند. در آزمایشی دیگر نیز مشخص شد که سوبه‌های KJ-46 و KJ-47 باکتری



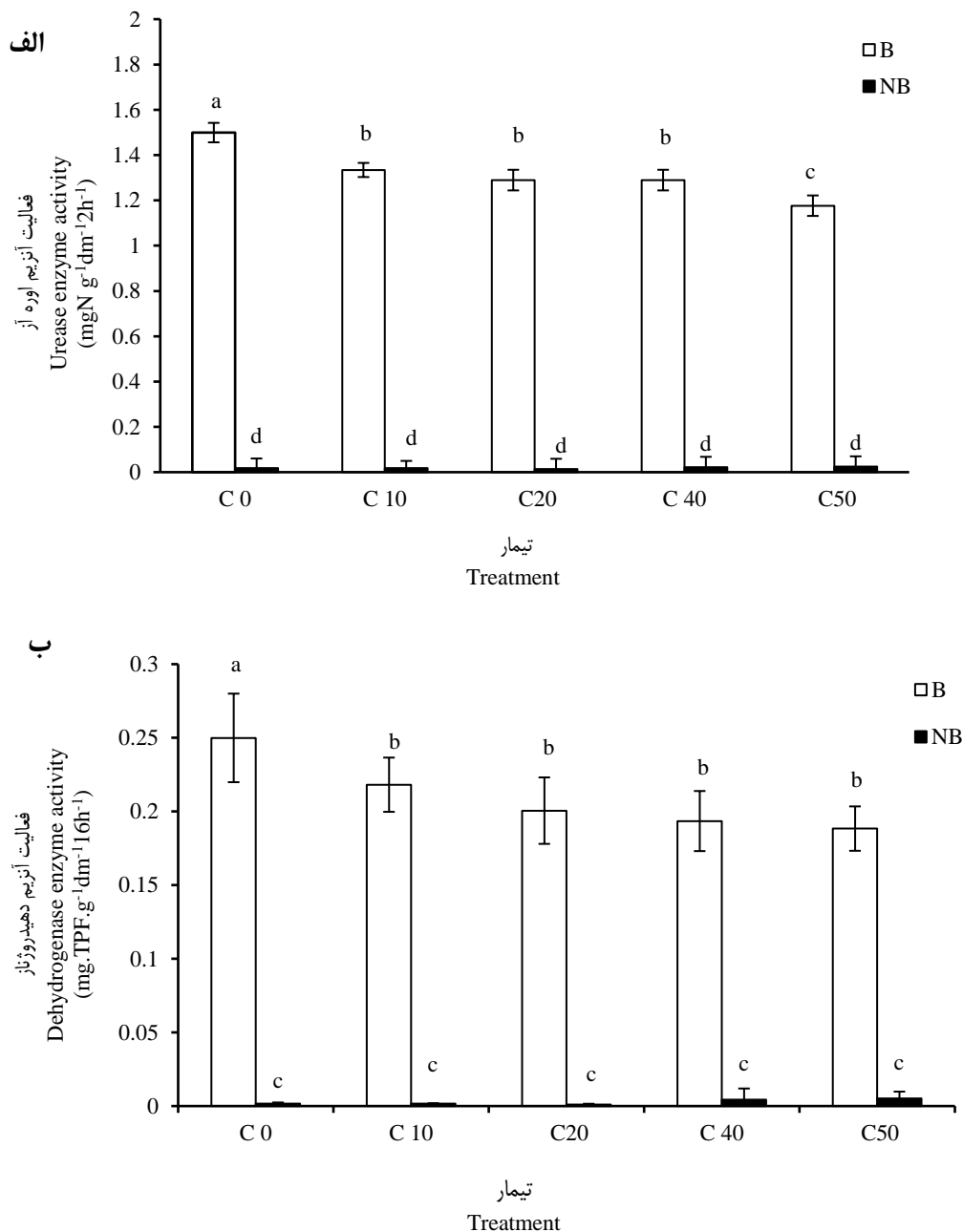
شکل ۵- مقدار حذف کادمیم از محلول آلوده توسط باکتری *Sporosarcina pasteurii* پس از گذشت ۴۸ ساعت. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند (n=3)
Figure 5- The amount of cadmium removed from the polluted solution by *Sporosarcina pasteurii* after 48 hours. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey method). Error Bars are deviations from the criteria (n = 3)

در آزمایش مربوط به زیست‌پالایی خاک آلوده پس از گذشت ۷ روز از انجام آنکوباسیون فعالیت آنزیم اوره‌آز و دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۶ (الف) مقدار فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک در غلظت‌های مختلف کادمیم در حضور و عدم حضور باکتری را در پایان ۷ روز نشان می‌دهد. مقدار فعالیت اوره‌آز در تیمارهایی که تحت پالایش زیستی قرار گرفتند در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری افزایش چشم‌گیری داشت ($P \leq 0.05$). نتایج نشان داد که اگرچه فعالیت اوره‌آز در تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم در تیمار همراه باکتری نسبت به تیمار غلظت صفر کادمیم در حضور باکتری mg^{-1}

کاهش داشته است اما نسبت به تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم بدون باکتری ۴۷ برابر افزایش داشته است. فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک تیمارهای تحت پالایش زیستی در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری در غلظت‌های مختلف کادمیم در پایان آزمایش در شکل ۶ (ب) نشان داده شده است. این نتایج نیز افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم دهیدروژناز را در حضور باکتری نسبت به نبود باکتری نشان می‌دهد. آچال و همکاران (۴) گزارش کردند که مقدار قابل توجهی آنزیم اوره‌آز توسط باکتری *Halomonas sp.* SR4 در کوارتز شنی آبدار و در شرایط پالایش

این‌ها همچنین حاکی از آن بود که در این روش زیست‌پالایی، نه تنها یون‌های سرب در خاک آلوده ناپویا می‌شوند، بلکه فعالیت میکروبی خاک، گنجایش متابولیکی خاک و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز نیز بهبود می‌یابند.

زیستی تولید شد. همچنین این پژوهش‌گران (۵) بیان کردند که در پالایش خاک آلوده به سرب (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با باکتری تولید کننده اوره‌آز *Kocuria flava* CR1، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز به مقدار چشم‌گیری در خاک افزایش یافت. نتایج پژوهش

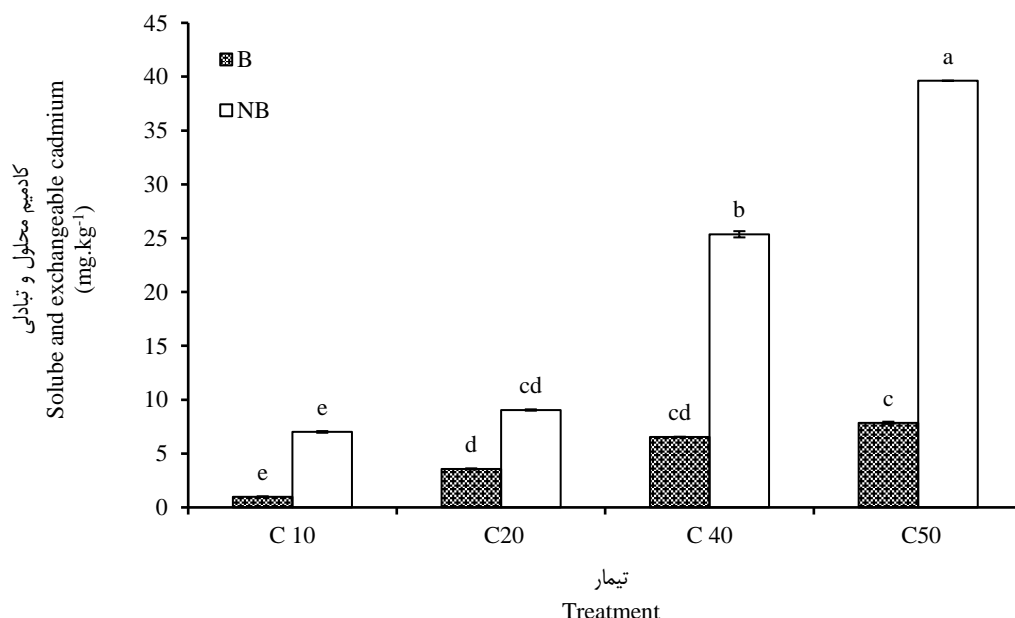


شکل ۶- فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز (الف) و دهیدروژناز (ب) در غلظت‌های مختلف کادمیم در حضور (B) و بدون حضور (NB) باکتری در پایان ۷ روز انکوباسیون. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند (n=3)

Figure 6- Urease activity (a) and dehydrogenase activity (b) in different concentration of cadmium in presence (B) and absence (NB) of bacterium at the end of 7 days of incubation. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey method). Error Bars are deviations from the criteria (n = 3)

۶/۵ و ۷/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری اسپورسارسینا پاستوری در فرآیند معدنی شدن زیستی منجر به حذف کادمیم از بخش محلول و تبدلی به ترتیب به مقدار ۸۵/۹، ۶۱/۱، ۷۴/۳ و ۸۰/۳ درصد شده است. یانگ و همکاران (۳۶) گزارش کردند که مقدار کادمیم در فرآیند MICCP توسط باکتری *Bacillus firmus* XP8 در فاز تبدلی از ۱۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های خاک شاهد (بدون باکتری) به ۱/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های دارای باکتری کاهش یافت. آچال و همکاران (۵) نیز گزارش نمودند که در فرآیند MICCP توسط باکتری *Sporosarcina ginsengisoli* CR5 غلظت آرسنیک در فاز تبدلی از ۲۵/۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های خاک شاهد به ۰/۸۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های خاک همراه با باکتری کاهش پیدا کرد.

به منظور بررسی پیامد باکتری بر ناپویاسازی کادمیم در پایان ۷ روز انکوباسیون غلظت عنصر کادمیم در بخش‌های (محلول + تبدلی و کربناتی) اندازه‌گیری شد. شکل ۷ غلظت کادمیم را در فاز محلول و تبدلی و در حضور و بدون حضور باکتری در غلظت‌های مختلف کادمیم نشان می‌دهد. از آنجا که مقدار کل کادمیم در خاک اولیه پیش از آلودگی صفر بود، پس در شکل‌ها آورده نشده است و تنها برای مقایسه فعالیت آنزیم‌های خاک از آن استفاده شد. مقدار کادمیم در فاز محلول و تبدلی در تیمارهای دارای باکتری کاهش چشم‌گیری در مقایسه با تیمارهای بدون باکتری داشت ($P \leq 0.05$). مقدار کادمیم بخش محلول و تبدلی در تیمارهای شاهد بدون باکتری برای غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب ۷، ۹، ۲۵/۳ و ۳۹/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. در حالی که در تیمارهای دارای باکتری مقدار کادمیم بخش محلول و تبدلی به ترتیب ۰/۹۹، ۳/۵،



شکل ۷- مقدار کادمیم در فاز محلول و تبدلی در حضور (B) و بدون حضور (NB) باکتری در غلظت‌های مختلف کادمیم در پایان ۷ روز انکوباسیون. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا

(Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند (n=3)

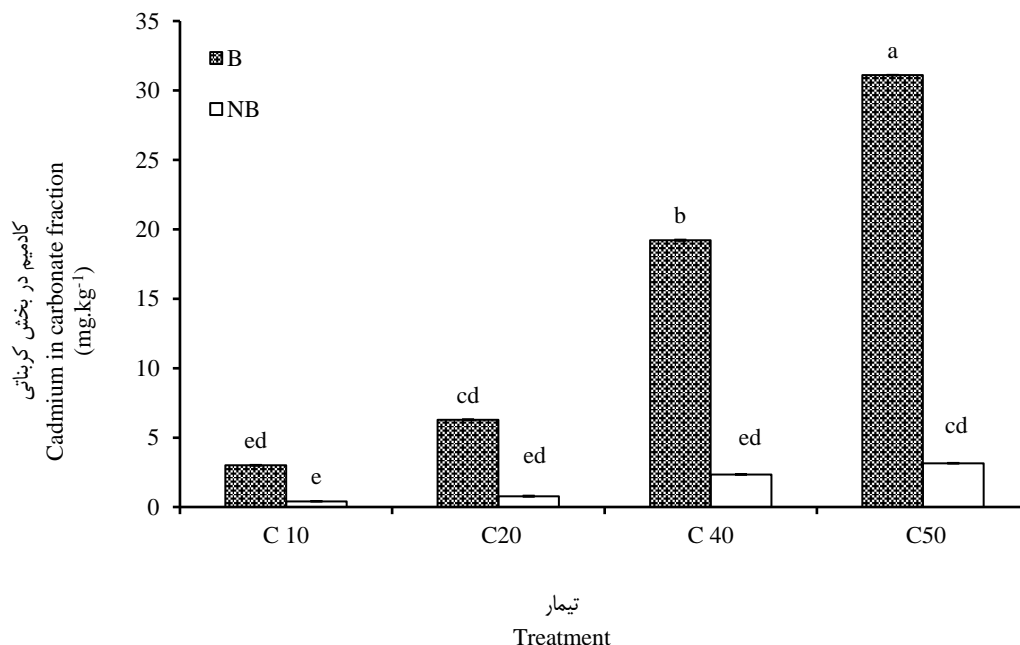
Figure 7- The amount of cadmium content in soluble and exchangeable phase in presence (B) and absence (NB) of bacterium at different concentrations of cadmium at the end of 7 days of incubation. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey method). Error Bars are deviations from the criteria (n = 3)

مقایسه با تیمارهای بدون باکتری نشان داد. مقدار کادمیم در غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ترتیب از ۰/۷، ۰/۴، ۲/۳ و ۳/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه خاک‌های بدون باکتری به

غلظت کادمیم در بخش کربناتی تیمارها در حضور و بدون حضور باکتری در شکل ۸ نشان داده شده است. مقدار کادمیم در فاز کربناتی در تیمارهای دارای باکتری افزایش قابل ملاحظه‌ای ($P \leq 0.05$) را در

یانگ و همکاران گزارش کردند که کادمیم بخش کربناتی در نمونه های دارای باکتری *Bacillus firmus* XP8 در فرآیند MICCP در مقایسه با نمونه شاهد بدون باکتری ۴۸ درصد افزایش داشته است (۳۶).

۳، ۶/۲، ۱۹/۲ و ۳۱/۱ میلی گرم بر کیلوگرم در نمونه خاک های همراه با باکتری افزایش پیدا کرده است. آچال و همکاران (۷) افزایش چشم گیر Cr(VI) در بخش کربناتی در حضور باکتری *Bacillus* sp. را در مقایسه با شاهد (بدون باکتری) گزارش کردند. همچنین

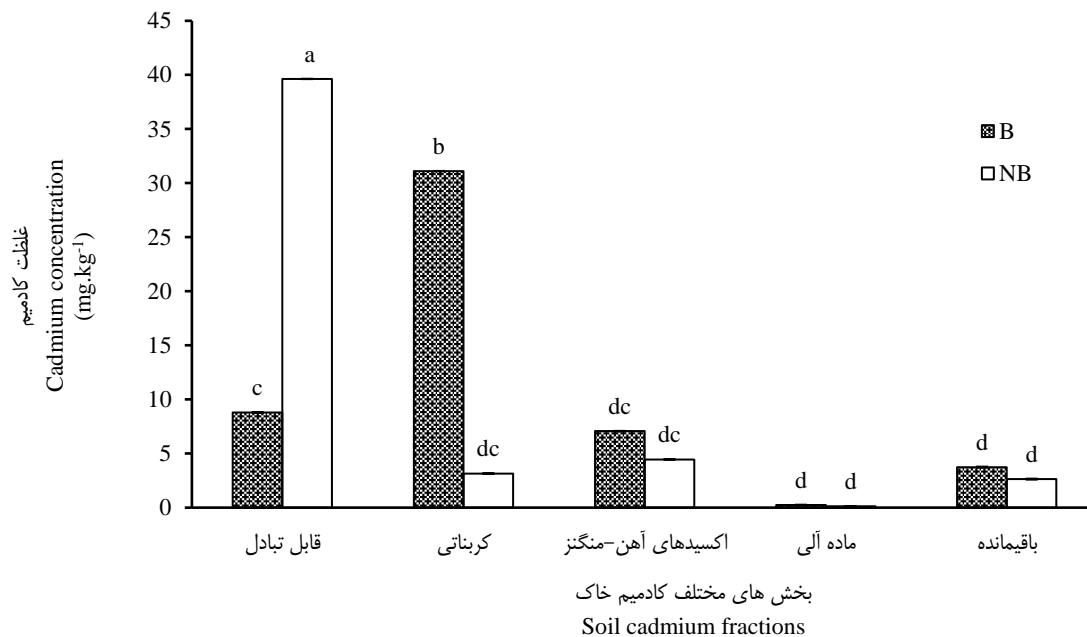


شکل ۸- مقدار کادمیم در فاز کربناتی در حضور (B) و بدون حضور (NB) باکتری در غلظت های مختلف کادمیم در پایان ۷ روز انکوباسیون. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون ها نشان دهنده نبود تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می باشند (n=3)

Figure 8- The amount of cadmium in carbonate phase in presence (B) and absence (NB) of bacterium at different concentrations of cadmium at the end of 7 days of incubation. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$ (Tukey method). Error Bars are deviations from the criteria (n = 3)

کربناتی بیشترین مقدار را داشت (۹۰/۴٪). نتایج بخش بندی خاک آلوده بدون باکتری توزیع فلز کادمیم را به صورت ماده آلی > باقیمانده > کربناتی > اکسیدهای آهن-منگنز > محلول + تبادلی نشان می دهد. در حالی که در خاک دارای باکتری توزیع فلز به صورت ماده آلی > باقیمانده > محلول + تبادلی > اکسیدهای آهن-منگنز > کربناتی بود. بنابراین نتایج حاکی از آن است که باکتری می تواند از طریق فرآیند معدنی شدن زیستی مبتنی بر هیدرولیز اوره مقدار قابل توجهی از کادمیم را از بخش تبادلی که پویایی و قابلیت دسترسی زیستی بالایی دارد کم نماید و به بخش کربناتی با پویایی کمتر منتقل کند. نتایج ناپویاسازی کادمیم به وسیله کلسیت تشکیل شده در نتیجه فعالیت باکتری تولید کننده اوره از بسیار قابل ملاحظه است زیرا کلسیت در محیط های مختلف زمین شناسی پایدار است و بنابراین می تواند یک روش مؤثر زیستی برای ناپویاسازی کادمیم باشد.

تهیه یک تصویر جامع از قابلیت دسترسی زیستی به کادمیم و دیگر پتانسیل های خطر غلظت کادمیم در بخش های مختلف خاک به وسیله عصاره گیری پی در پی مورد بررسی قرار می گیرد. با توجه به نتایج حاصل از مرحله قبل در رابطه با مقدار کادمیم در بخش های محلول، تبادلی و کربناتی، به دلیل قابل توجه بودن نتایج در تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کادمیم که بالاترین غلظت اعمال شده بود، مقدار کادمیم در این غلظت برای سایر بخش های خاک شامل اکسیدهای آهن-منگنز، ماده آلی و باقیمانده نیز اندازه گیری شد. مقدار کادمیم در تمام بخش های خاک آلوده با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کادمیم در دو سطح حضور و بدون حضور باکتری در شکل ۹ نشان داده شده است. بعد از گذشت ۷ روز انکوباسیون، مقدار کادمیم در بخش محلول و تبادلی برای نمونه شاهد بیشترین مقدار را دارا بود (۸۰/۴٪) و در سایر بخش های خاک تغییر قابل توجهی دیده نشد. اما در در نمونه خاک همراه با باکتری، مقدار کادمیم در بخش



شکل ۹- غلظت کادمیم در بخش‌های مختلف خاک در حضور (B) و بدون حضور (NB) باکتری در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم در پایان ۷ روز انکوباسیون. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا (Error Bars) انحراف از معیار می‌باشند (n=3)

Figure 9- Cadmium concentration in different fractions of soil in presence (B) and absence (NB) of bacterium at 50 mg Kg⁻¹ of cadmium at the end of 7 days of incubation. Different letters indicate significant differences at P < 0.05 (Tukey method).

Error Bars are deviations from the criteria (n = 3)

رسوب کرده و از بخش محلول + تبادل خاک آلوده به بخش کربناتی رفته و قابلیت دسترسی به آن کمتر می‌شود. فرآیند MICCP در این پژوهش نه تنها باعث ناپویا شدن یون‌های کادمیم در خاک شد بلکه به طور مؤثری باعث بهبود فعالیت آنزیمی خاک نیز شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری اسپورسارسینا پاستوروی با تولید آنزیم اوره‌آز از مسیر هیدرولیز اوره موجود در محیط، یون کربنات تولید می‌کند که در حضور منبع کلسیم سبب تولید رسوب کربنات کلسیم (کلسیت) می‌شود. در ادامه کادمیم روی کانی کلسیت

منابع

- 1- 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 Indian Microbiology and Biotechnology, 36: 981-988.
- 2- Abdel-Sabour M.F. 2007. Remediation and bioremediation of uranium contaminated soils Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry, 6: 2009-2023.
- 3- Achal V., Pan X., and Zhang D. 2011. Remediation of copper contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation. Ecological Engineering, 37: 1601-1605.
- 4- Achal V., Pan X., and Zhang D. 2012. Bioremediation strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp. Chemosphere, 89: 764-768.
- 5- Achal V., Pan X., Zhang D., and Fu Q. 2012. Bioremediation of Pb-contaminated soil based on microbially induced calcite precipitation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(2): 244-247.
- 6- Achal V., Pan X., Fu Q., and Zhang D. 2012. Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*. Journal of Hazardous Materials, 201-202: 178-184.
- 7- Achal V., Pan X., Lee D. J., Kumari D., and Zhang D. 2013. Remediation of Cr(VI) from chromium slag by

- biocementation. *Chemosphere*, 93: 1352-1358.
- 8- Amoozegar 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.
 - 9- Anderson J.P.E. 1982. Soil respiration. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, Page A.L. and Miller, R.H. (Eds.), American Society of Agronomy, Madison, 831-871.
 - 10- Brookes P. C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 269-275.
 - 11- 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): 389-395.
 - 12- Bouyoucos G.J. 1936. Direction for making mechanical analysis of soils by the hydrometer method. *Soil Science*, 42: 225-228.
 - 13- Dhami N., Sudhakarareddy M., and Mukherjee A. 2013. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4: 314.
 - 14- Fujita Y., Taylor J., Gresham T., Delwiche M., Colwell F., McIning T., Petzke L., and Smith R. 2008. Stimulation of microbial urea hydrolysis in groundwater to enhance calcite precipitation. *Environment Science Technology*, 42: 3025-3032.
 - 15- Hassen A., Saidi N., Cherif M., and Boudabous A. 1998. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*, 65: 73-82.
 - 16- Jain S., and Arnepalli D. N. 2016. Biomineralization as a remediation technique: a critical review. *Indian Geotechnical Conference*, 1-4.
 - 17- Jenkinson D.S., and Ladd J.N. 1981. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In *Soil Biochemistry* (Vol. 5). (Eds E.A. Paul & J.N. Ladd) New York, USA. Dekker, Page, A.
 - 18- Kang C.H., Han S.H., Shin Y., Oh S.J., and So J.S. 2014. Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Application of Biochemical and Biotechnology*, 172: 2907-2915.
 - 19- Kang C.H., Oh S.J., Shin Y.J., Han S.H., Nam I.H., and So J.S. 2015. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. *Ecological Engineering*, 24: 402-407.
 - 20- Khodaverdiloo H., Ghorbani Dashtaki S.H., and Rezapour S. 2011. Lead and cadmium accumulation potential and toxicity threshold determined for land cress and spinach. *International Journal of Plant Production*, 5 (3): 275-282.
 - 21- Luo S., Xiao X., Xi Q., Wan Y., Chen L., Zeng G., Liu C., Guo H., and Chen J. 2011. Enhancement of cadmium bioremediation by endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14 using industrially used metabolic inhibitors (DCC or DNP). *Journal of Hazardous Materials*, 190: 1079-1082.
 - 22- Li Z., Yuan H., and Hu X. 2008. Cadmium-resistance in growing *Rhodotorula* sp. Y11. *Bioresource Technology*, 99: 1339-1344.
 - 23- Li M., Cheng X., and Guo H. 2013. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76: 81-85.
 - 24- Mulvaney R.L. 1996. *Methods in Soil Analysis. Part 3. Chemical analysis. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI. Nitrogen-Inorganic forms*, P: 1123-1184.
 - 25- Mahanty B., Kim S., and Kim C.H.G. 2013. Assessment of biostimulated or bioaugmented calcification system with *Bacillus pasteurii* in a simulated soil environment. *Microbial Ecology*, 65: 679-688.
 - 26- Mitchell A.C., Dideriksen K., Spangler L.H., Cunningham A.B., and Gerlach R. 2010. Microbially enhanced carbon capture and storage by mineral-trapping and solubility-trapping. *Environment Science Technology*, 44: 5270-5276.
 - 27- Nagvenkar G.S., and Ramaiah N. 2010. Arsenite tolerance and biotransformation potential in estuarine bacteria. *Ecotoxicology*, 19: 604-613.
 - 28- Raoul T.D., Angwafor N.G., Christian N.S., Theophile K., Manga N.H., Gabche A.S., and Mbadcam K.J. 2016. Optimization of cadmium (II) adsorption onto modified and unmodified lignocellulosics (rice husk and egussi peeling). *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1): 45-51.
 - 29- Sparks D. L., Page A., Helmke P., Loeppert R., Soltanpour P., Tabatabai M., Johnston C., and Sumner M. 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical methods. Soil Science Society of America. Inc.*
 - 30- Shuman L.M., Dudka S., and Das K. 2002. Cadmium forms and plant availability in compost-amended soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33:737-748.
 - 31- Tessier A., Campbell P. G. C., and Bisson M. 1979. Sequential extraction procedures for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51: 844-851.
 - 32- Tabatabai M.A. 1982. *Soil enzymes Methods of soil analysis. Part 2. Am. Soc. Agron., Madison, WI, USA, PP: 539-579.*
 - 33- Wuana R.A., and Okieimen F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network*, 1-20.
 - 34- Warren L.A., Maurice P.A., Parmar N., and Ferris F.G. 2001. Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18: 93-115.

- 35- Walkley A., and Black A.I. 1934. Examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic and titration method. *Soil Science*, 34: 29–38.
- 36- Yang J., Pan X., Zhao C., Mou S., Achal V., Mortuza M.G., and Gadd G.M. 2016. Bioimmobilization of heavy metals in acidic copper mine tailings soil. *Geomicrobiology Journal*, 33:3-4, 261-266.
- 37- Zhao Y., Yao J., Yuan Z., Wang T., Zhang Y., and Wang F. 2017. 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.

Bioremediation of Cadmium in Contaminated Sandy Soil by Microbially Induced Calcite Precipitation

S. Abdulrahimi¹- N. Ghorbanzadeh^{2*}- A. Forghani³- M.B. Farhangi⁴

Received: 08-11-2017

Accepted: 09-04-2018

Introduction: Cadmium is considered to be one of the heavy metals with the highest toxicity, because it has high activity and a relative high dissolution rate in water and in living tissues. In recent years, due to the high volume of natural resources pollution and the inefficiency of conventional physicochemical methods for refining these resources and the occurrence of environmental crisis, bioremediation process has been at the forefront. Microbially induced calcite precipitation (MICCP) has been considered as a novel solution for these problems, and several bacterial species have been already utilized for MICCP. MICCP based degradation of urea occurs through the ureolytic pathway. Urease (urea amidohydrolase) is an enzyme that hydrolyzes urea into one mole of carbonate and two moles of ammonia per mole of urea. In this aspect, microbial mineral precipitation products such as calcite can strongly adsorb heavy metals on their surfaces and incorporate heavy metal ions into their crystal structure. Some studies have reported MICCP-based sequestration of soluble Cd via coprecipitation with calcite was useful for Cd bioremediation. Several bacterial species have been utilized for MICCP. The endospore forming bacteria *Sporosarcina pasteurii* have been shown to produce high levels of urease and have therefore been extensively studied. *Sporosarcina pasteurii* has attracted significant attention for its unique feature of calcium carbonate precipitation, which can be easily controlled. So, In the present study the ability of *Sporosarcina pasteurii* bacterium has been investigated in the remediation of Cd(II) in Cd-contaminated sandy soil based on MICCP method.

Materials and Methods: *Sporosarcina pasteurii* (PTCC 1645) was procured from Microbial Bank of Iran (Central Collection of Industrial Fungi and Bacteria, Karaj, Iran). The bacterial strain was inoculated into NB (nutrient broth) media containing 2% urea and 25 mM CaCl₂ (NBU media) and then incubated at 37°C for 6 days. The urease activity was determined at regular time intervals by measuring the amount of ammonia released from urea according to the phenol-hypochlorite assay. Minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed to determine the lowest concentration of cadmium chloride, which prevents the growth of bacteria. *Sporosarcina pasteurii* was inoculated into NBU media supplemented with 0.5, 1, 2, 4, 8 and 10 mmol l⁻¹ Cd and incubated at 37°C, 130 rpm for 50 hours. Control flasks without adding Cd were also incubated. Bacterial growth was determined in terms of optical density (OD) by measuring absorbance at a wavelength of 600 nm at regular time intervals (0, 10, 20, 30, 40 and 50 hours) and colony-forming units (CFU) were also counted. The cadmium removal in 0.5, 1 and 2 mM cadmium solutions (based on MIC) was measured. A sandy soil from a depth of 0 to 30 cm was sampled. The soil was polluted with 10, 20, 40 and 50 mg/kg of cadmium and incubated in room temperature for two weeks. After incubation time, the cadmium remediation studies were performed at 30°C in the beakers containing 100 g of sterilized dried contaminated soils and 200 mL of overnight grown of *Sporosarcina pasteurii* (~ to 10⁷cfu ml⁻¹) in NBU media. For each treatment corresponding control were included with the same condition but without bacteria. After 7 days of incubation, urease and dehydrogenase enzymes activity and concentration of cadmium in soluble + exchangeable and carbonate fractions were measured. The concentration of cadmium in iron-manganese oxides, organic matter and residual fractions in concentration of 50 mg/kg cadmium was also determined according to the continual extraction procedure of Tessier et al. (1979).

Results and Discussion: The amount of released ammonia by ureolytic activity of *Sporosarcina pasteurii* increased up to fourth day and then became almost constant. Optical density in different concentrations of cadmium decreased in comparison to control treatment after 48 hours. The minimum inhibitory concentration of cadmium for bacteria growth was 2 mM as determined by colony counting after 48 hours of incubation. Cadmium removal efficacy from solutions containing 0.5, 1 and 2 mM of cadmium was 99.6, 99.8 and 99.8%, respectively. The amounts of urease and dehydrogenase activities in the presence of bacterium were significantly higher than control treatments (P≤0.05). The results of the fractionation of contaminated soils in the absence of

1, 2, 3 and 4- M.Sc. Student, Assistant Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran, Respectively

(* - Corresponding Author Email: nasrin.ghorbanzadeh@gmail.com)

Sporosarcina pasteurii showed the distribution of cadmium as organic matter <residual < carbonated< Fe-Mn oxides< exchangeable, While in the soil with bacterium, the cadmium distribution was as organic matter <residual <exchangeable<Fe-Mn oxides< carbonated. The results indicated that *Sporosarcina pasteurii* could significantly reduce the exchangeable fraction and increase the carbonate fraction of cadmium.

Conclusion: The results showed that MICCP-based removal of heavy metals via coprecipitation with calcite may be useful for toxic heavy metal bioremediation.

Keywords: Biomineralization, Cadmium, Calcite, *Sporosarcina pasteurii*, Urease

