کانی سازی کلسیت اتوژنیک تحت نفوذ فعالیت های میکروبی در رسوبات دریایی جنوب شرق ژاپن

سمانه کیانپور*[1]، محمد حسین محمودی قرائی[1]، رضا موسوی حرمی[1]، منصور مشرقی[2]، ریو ماتسوموتو[3]

[1] گروه زمین شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

[2] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

[3] دپارتمان علوم زمین و نجوم، دانشکده علوم، دانشگاه توکیو

*مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: *samanekianpour@ymail.com*

(دریافت: ۸۸/۱۰/۲؛ پذیرش: ۸۹/۸/۵)

چکیده

تراف نانکای (Nankai Trough) یک حاشیه فعال همگرا در جنوب شرق ژاپن است. رسوبات این حوضه عمدتاً ماسه، سیلت و رس با سیمانی از کربنات اتوژنیک است. واکنش های بیولوژیک در رسوبات توسط میکروارگانیسم ها انجام شده و نتیجه آن تبدیل مواد آلی به مخلوطی از متان و CO_2 است. این تغییر و تبدیلات توسط باکتری ها و آرکی ها در شرایط بی هوازی اتفاق می افتد. اکسیداسیون بی هوازی متان به وسیله باکتری های احیاء کننده سولفات و اکسید کننده متان در اعماق کم رسوبات در بستر دریا انجام می شود و باعث افزایش آلکالینیته آب منفذی و تشکیل رسوب کلسیت اتوژنیک می گردد. بیوفیلم میکروبی مشاهده شده در مقاطع میکروسکوپی شاهدی بر این نوع رشد میکروبی است. بر اساس نتایج بدست آمده تشکیل بلورهای کلسیت اتوژنیک ناشی از فعالیت باکتری های خاص ازقبیل باکتری های کلسیت ساز بوده و هم زمان با اکسیداسیون بی هوازی متان و احیاء سولفات صورت گرفته است. فرایندهای فیزیولوژیکی و ساختار مخصوص باکتری ها مورفولوژی و کانی شناسی انواع کانی های کربناته را تحت تأثیر قرار می دهند. دو عامل مهم در ته نشست کربنات های اتوژنیک تراف نانکای عبارت از آلکالینیته و ماتریکس آلی مترشحه از میکرو ارگانیسم ها (extracellular polymeric substance [EPS]) است. ماتریکس آلی در تشکیل بیوفیلم ایجاد شده در رسوبات نقش مهمی را ایفا می کند. گاز متان به میزان فراوان و به شکل هیدرات در اعماق پائین تر از کف حوضه رسوبی در خلل و فرج رسوبات است. کربنات های اتوژنیک ممکن است مستقیماً از گاز متان نیز در این حوضه رسوبی تشکیل شوند.

واژه های کلیدی: کلسیت اتوژنیک، ارگانومینرال، نانکای تراف، رسوبات دریایی.

مقدمه

میکروارگانیسم ها و عمدتاً باکتری ها نقش مهمی در چرخه بیوژئوشیمیایی مواد آلی و غیر آلی ایفا می نمایند. رسوبات دریایی بیش از هفتاد درصد سطح زمین را پوشانده و در بردارنده سلول های فراوان میکروبی و فعالیت های پروکاریوتی گوناگون هستند (Teske 2006). این رسوبات مخزن بزرگی از کربن آلی در مقیاس جهانی بوده و اثرات ژرفی بر فرآیندهای بیوژئوشیمیایی از قبیل حفظ و یا تجزیه کربن دارند. مطالعات اخیر، حضور جمعیت های فعال و فراوان باکتری-ها در بین رسوبات را به اثبات رسانده است (Toffin *et al.* 2004). باکتری ها در رسوبات عمدتاً به شکل مجموعه های باکتریایی در بیوفیلم ها زندگی می کنند. بیوفیلم میکروبی مجموعه ای از میکرو-ارگانیسم ها و تولیدات پر سلولی آنها است که بر روی یک سطح جامد تجمع می یابند (Stolz 2000). تجمع مجموعه های باکتریایی در این سطوح بستگی به تشکیل ماتریکس پلی مریک خارج سلولی (extracellular polymeric substance [EPS]) دارد. ماتریکس پلی-مریک عبارت از ماده مترشحه توسط میکروارگانیسم ها است که اطراف سلول های باکتریایی را فرا می گیرد (Obst *et al.* 2009). میکروارگانیسم ها از طریق واکنش های بیولوژیکی وتبدیل مواد آلی به مخلوطی ازمتان و CO_2 انرژی مورد نیاز جهت ادامه حیات را کسب می نمایند. این تغییر و تبدیلات توسط باکتری ها و آرکی ها در شرایط بی هوازی اتفاق می افتد. متان عمدتاً دراثرفعالیت باکتری های موجود در این بیوفیلم ها تحت شرایط بی هوازی در رسوبات انتشار می یابند که می تواند عاملی جهت ته نشست کانی های اتوژنیک در رسوبات دریایی باشد. به عبارتی انواع مجموعه های باکتریایی تأثیرات مستقیم و یا غیر مستقیم قابل توجهی بر ته نشست انواع کانی های اتوژنیک دارند (Dupraz *et al.* 2009). مطالعات زیادی برروی نقش میکروارگانیسم

ها، به ویژه باکتری ها، در تشکیل کانی های اتوژنیک صورت گرفته است که موید اهمیت باکتری ها در تشکیل کلسیت در سیستم های طبیعی زمین شناسی بوده (Knorre & Krumbien 2000) و این موضوع در مطالعات آزمایشگاهی نیز به اثبات رسیده است (Plee *et al.* 2008; Obst *et al.* 2009).

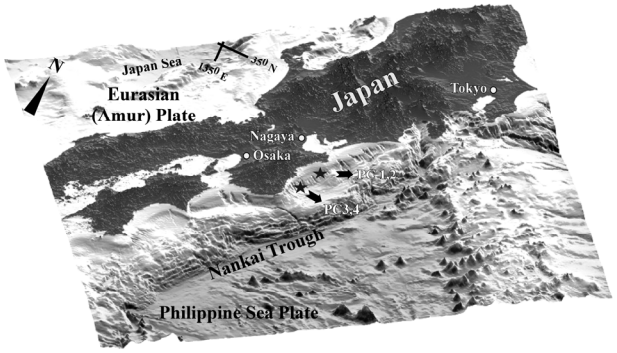
تشکیل کانی های کربناته در تراف نانکای (Nankai Trough) از طریق باکتری های هتروتروفیک کربنات ساز امکان پذیر است. نور و کرومباین (۲۰۰۰) معتقدند که رسوب کربنات کلسیم در اثر تولید متابولیک باکتری ها تحت شرایط ویژه محیطی صورت می گیرد، در حالیکه کاستنیر و همکاران (۲۰۰۰) به تغییرات آلکالینیته به دلیل متابولیسم باکتری ها تأکید دارند. بعبارتی باکتری های هتروتروف (که از کربن آلی به عنوان منبع کربن تغذیه می کنند) ذرات کربناته را توسط مکانیسم خاصی رسوب نداده، بلکه با افزایش آلکالینیته تحت تأثیر فرایندهای فیزیولوژیک در ایجاد رسوب کربنات موثر بوده اند (Knorre & Krumbien 2000).

اصطلاح کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی (Biologically-influenced mineralization) توسط دوپراز و همکاران در سال ۲۰۰۹ معرفی شد. این فرایند، کانی سازی غیر فعال ماده آلی است. بطوریکه پارامترهای محیطی و داخلی و فعالیت های میکروبی، مسئول ایجاد شرایط مناسب (مانند افزایش آلکالینیته) برای رسوب کانی هستند. در فرایند کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی وجود ماتریکس آلی (EPS)، مورفولوژی و ترکیب بلورهای راسب را تحت تأثیر خود قرار می دهد (Dupraz *et al.* 2009).

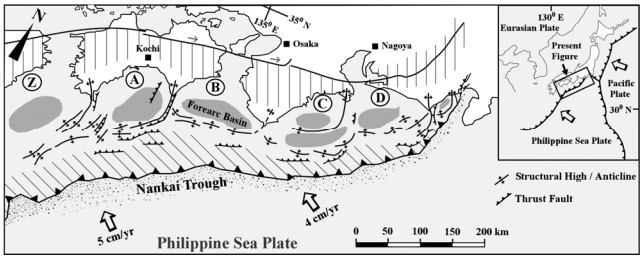
وجود کانی های اتوژنیک از قبیل کربنات کلسیم از رسوبات دریایی نسبتاً عمیق تا عمیق تراف نانکای قبلاً گزارش شده است (Chen 2005). رسوب کربنات های اتو ژنیک در این حوضه می تواند متأثر از حضور گاز متان و فعالیت باکتری های احیاء کننده سولفات و اکسید کننده متان باشد (Chen 2005; Colwell *et al.* 2004). در این تحقیق، رسوبات به دست آمده از تراف نانکای (شکل ۱ و ۲) به منظور بررسی دقیق تر نقش اجتماعات میکروبی (در ارتباط با فعالیت و ساختار باکتری ها) در تشکیل کربنات اتوژنیک مورد مطالعه آزمایشگاهی ژئومیکروبیولوژی قرار گرفته است تا بتواند بعنوان الگویی برای مطالعه کربنات های حاصل از فعالیت های میکروبی در این حوضه و احتمالاً سایر حوضه های رسوبی مورد استفاده قرار گیرد.

زمین شناسی منطقه مورد مطالعه

منطقه مرزی صفحات همگرا، بین پلیت های اورازیا و دریای فیلیپین، به عنوان تراف نانکای شناخته شده و در نواحی جنوبی هونشوی (Honsho) ژاپن قرار دارد. حواشی همگرائی چون تراف نانکای محل ها



شکل ۱: نقشه سه بعدی ژاپن و محل های نمونه برداری. همانطوریکه در شکل مشخص شده است نمونه ها متعلق به منطقه شیب قاره ای هستند (Japan Marine Science and Technology Center [JAMSTEC], 2009).



شکل ۲: گسل ها و تراست های متعددی در حوضه جلو قوسی نانکای وجود دارند که منجر به تقسیم این ناحیه به پنج قسمت می شوند (Sugiyama 2007). نمونه های برداشت شده جهت انجام این مطالعه از زون C بوده است.

-ی مناسبی برای تشکیل هیدرات های متان هستند که به علت داشتن پتانسیل مخزنی بالا، می توانند تا دو سوم مخازن هیدرات گازی دریایی را به خود اختصاص دهند (Kastner 2001). به دلیل وجود گسل ها و روراندگی های فراوان ناشی از تکتونیک فعال در منطقه، حوضه پیش کمانی نانکای به پنج ناحیه تقسیم شده است (Sugiyama 2007). نمونه های مورد مطالعه از ناحیه C و شیب قاره‌ای (شکل های ۱ و۲) برداشت شده است که نزدیک به نواحی پایداری هیدرات متان است. وجود هیدرات متان بر روی حاشیه قاره‌ای تراف و عمدتاً در رسوبات دانه درشت با منشأ آواری قبلاً تایید شده است (Martin *et al.* 2004). زون پایداری هیدرات های متان در این منطقه توسط مطالعات ژئوفیزیکی و با استفاده از داده های BSR (Bottom Simulating Reflector) مشخص شده است. BSR در اعماق متفاوتی بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ متری زیر سطح رسوبات دریا (mbsf , meter base floor surface) قرار دارد و بر حضور گسترده ای از هیدرات متان در این منطقه دلالت می نماید (Matsumoto 2000). رسوبات پیش کمانی جنوب شرق ژاپن دارای گستره سنی از ائوسن تا عهد حاضر است (Tsuji *et al.* 2004).

روش مطالعه

نمونه های مورد مطالعه توسط مغزه گیر پیستونی (Piston Corer) از رسوبات کف دریا و از اعماق حدود ۹۱۰ تا ۲۰۳۳ متری نسبت به سطح آب دریا از سطحی ترین بخش کف بستر تا عمق ۳ متری زیر آن برداشت شده است. ۴ مغزه و از هر مغزه ۱۰ نمونه جهت این مطالعه استفاده شده است. مغزه های بدست آمده حاوی ۳ تا ۵ متر از رسوبات نرم کف حوضه رسوبی است. ابتدا هر یک از مغزه ها به دو نیمه طولی برش داده شده و توالی رسوبی موجود در آن با مشاهده سطح تازه آن مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور مطالعات کانی شناسی، ۴۰ عدد نمونه توسط دستگاه MAC Science مدل MXP-3 در دانشگاه توکیو ژاپن پراش اشعه X (XRD) شده است. شکل ۳ برشی از یک مغزه، محل نمونه برداری و درصد کانی های موجود (با توجه به آنالیز XRD انجام شده، شکل ۵) را نشان می دهد.

ایزوتوپ های پایدار کربن و اکسیژن در دانشگاه توکیو با دستگاه اسپکترومتری جرمی مدل MAT 252 اندازه گیری شده است و دقت اندازه گیری ایزوتوپ کربن و اکسیژن به ترتیب ۰/۰۵± و ۰/۰۲± قسمت در هزار (‰) است.

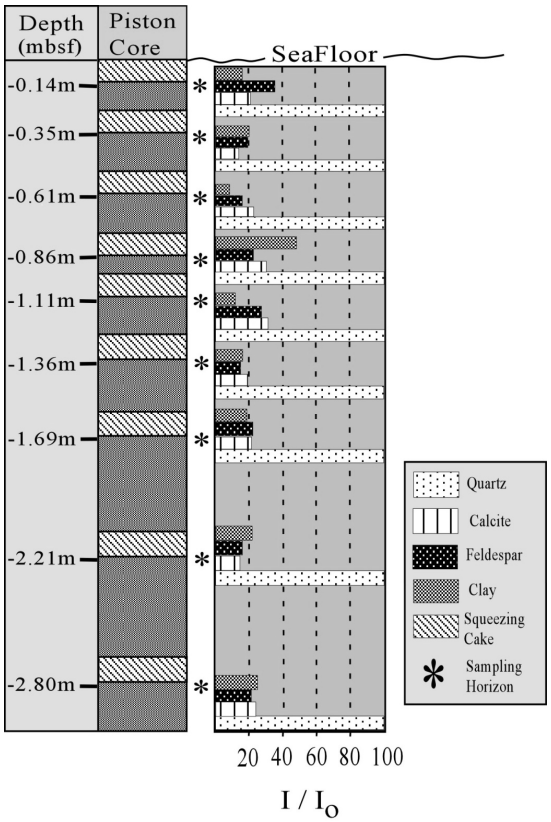
جهت مطالعات پتروگرافی از ۱۰ نمونه رسوبات نرم مقاطع نازک میکروسکوپی تهّیه شد و ۹ نمونه به منظور مشاهدات میکروسوپ الکترونی در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد با مدل LEO1450-vp انتخاب شد.

درک مکانیسم های موثر در ته نشست کربنات های اتوژنیک حاصل از فعالیت باکتری ها نیازمند بررسی های دقیق و تهیه محیط کشت جهت رشد میکرو ارگانیسم های موجود در رسوبات است. روش نور و کرومباین (۲۰۰۰) جهت تهّیه محیط کشت باکتری‌های مورد مطالعه انتخاب شد و بر اساس آن ترکیب مصنوعی آب دریا (ASW) تهیه گردید. سپس برای رشد هر چه بهتر باکتری ها و بر اساس همان روش، مواد زیر به عنوان منبع کربن به محیط کشت اضافه شد.

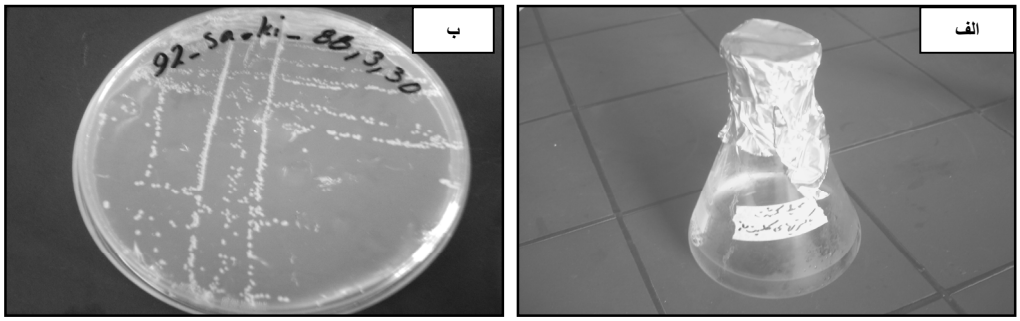
(Sodium Acetate = 6 g L^{-1}; Glutamate = 6 g L^{-1}; Glucose (D^{+}) = 6 g L^{-1}; Peptone = 6 g L^{-1}; Yeast Extract = 6 g L^{-1}).

در انتها pH محیط کشت برابر با ۶/۶۳ تنظیم شده (توسط pH متر accumet مدل ۱۵) و سپس محیط های کشت مایع و جامد (شکل-های ۴ الف و ب) استریل شدند. pH محیط در مراحل مختلف اندازه گیری شد. مقدار pH به دست آمده قبل از کشت برابر با ۶/۶۳، در طی رشد باکتری ها و بعد از گذشت ۴ روز به حدود ۷/۶ رسیده و بعد از رشد کامل آنها pH محیط کشت در حد ۸/۶۳ بوده است. نمونه‌ها در شرایط هوازی و در دمای ^{0C} ۲۷ کشت داده شدند. جهت مشاهده مستقیم باکتری ها توسط میکروسکوپ، تعداد ۴۰ نمونه به دو روش رنگ آمیزی (رنگ آمیزی گرم و مخصوص مشاهده کپسول) شده اند. باکتری ها توسط محلول بافر فسفات از رسوبات جدا شده و به شکل پورپلیت (Pour Plate) کشت داده شدند. در این نوع محیط کشت جامد، تشکیل بلورهای کربنات کلسیم در شرایط هوازی و یا بی‌هوازی مشخص می گردد.

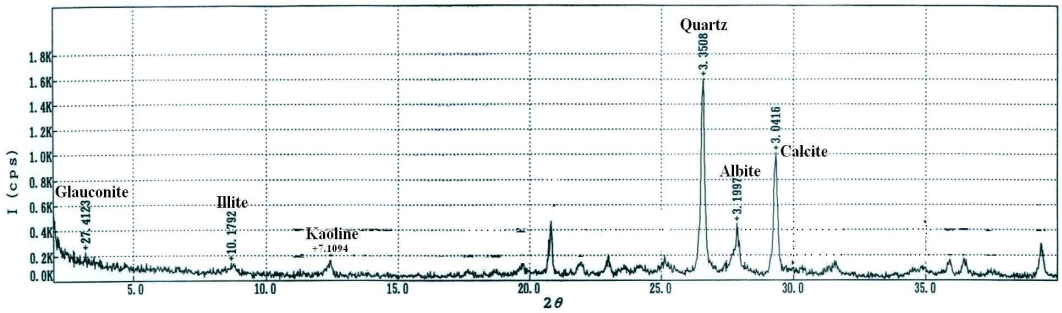
به علت حضور باکتری به همراه بلورهای کربنات، روش های آماده سازی ویژه جهت تصویر برداری با SEM بر روی ۱۰ نمونه در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است. ذرات کربناته و میکرو ارگانیسم ها از محیط کشت مایع فیلتر شده و سپس نمک زدایی شدند. میکروارگانیسم ها به کمک Glutaraldehyde(2/5%) و اکسید اسمیم تثبیت شده و با اتانول و در شرایط خلأ محفظه دسیکاتور آب زدایی و در نهایت برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی با Au و Pd پوشش داده شدند.



شکل۳: درصد کانی های موجود در رسوبات و محل های نمونه برداری شده در یک مغزه (Pistone Core) فراوانی کانی های موجود نسبت به کوارتز در نمونه های آنالیز شده بوسیله XRD نشان داده شده است. (مغزه شماره ۴)



شکل۴: الف) محیط کشت مایع باکتری های کربنات ساز. به منظور استریل کردن محیط کشت لازم است تا ارلن با گاز و پنبه و فویل آلومینیومی سر بندی شود و سپس داخل دستگاه اتوکلاو قرار گیرد و آماده کشت باکتری های مد نظر گردد. ب) محیط کشت جامد به همراه کلونی‌های باکتری جدا شده از طریق روش کشت زیگزاگ (streak plate) تحت شرایط کاملاً استریل.



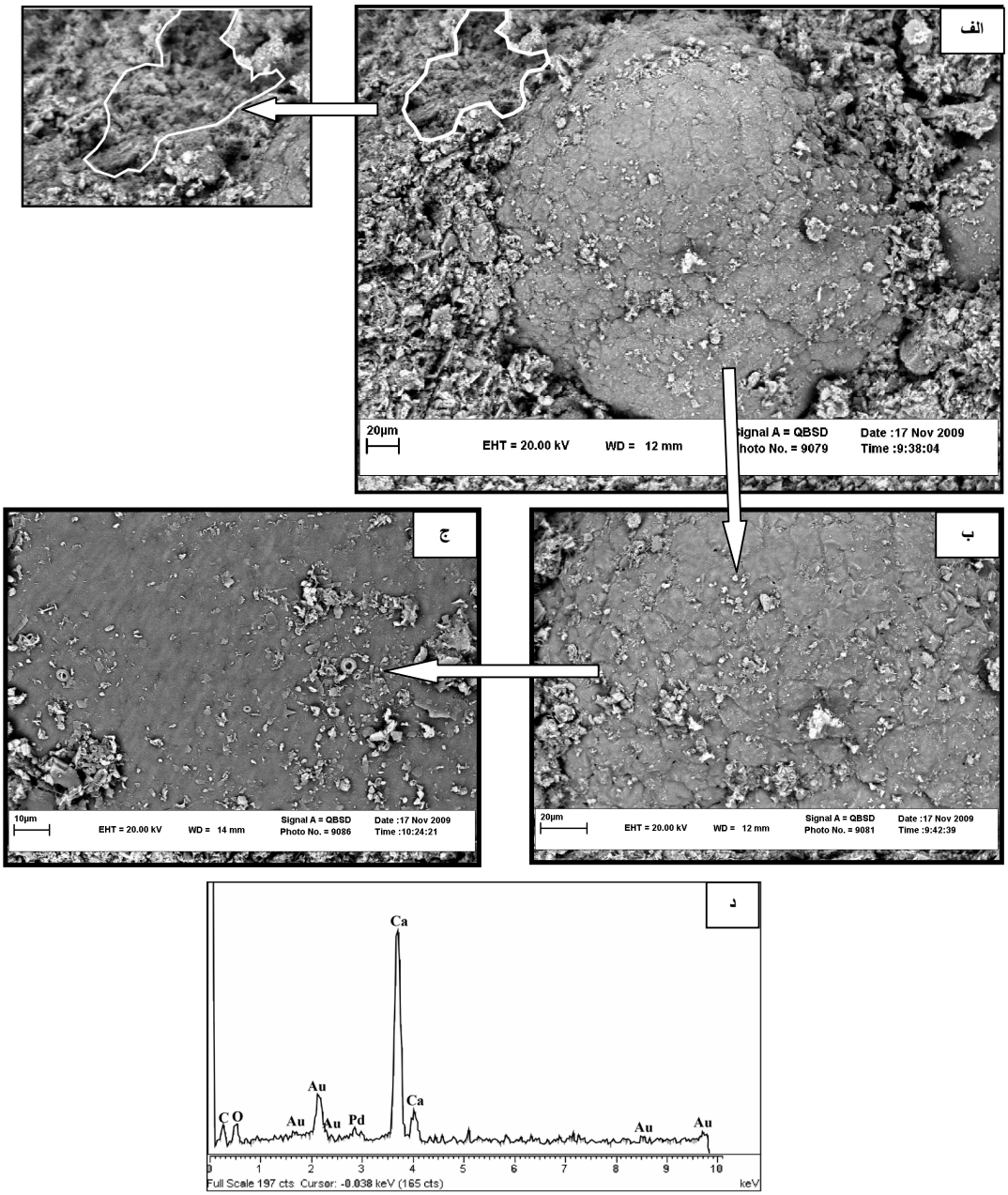
شکل۵: آنالیز XRD یکی از نمونه‌های مورد مطالعه در حوضه رسوبی نانکای در جنوب شرق ژاپن که نشان دهنده وجود کلسیت، کوارتز، آلبیت و کانی‌های رسی است.

نتایج و بحث

رسوبات بدست آمده از تراف نانکای عمدتاً ریز دانه و در اندازه گل بوده و به دلیل وجود مواد آلی به رنگ خاکستری تیره هستند. کلسیت به صورت سیمان میکریتی در اندازه ۸۰ تا ۱۲۰ میکرون (در مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، شکل ۶الف، ب و ج) درفضای بین ذرات ماسه و سیلت رسوب کرده است ولی فراوانی آن در نمونه‌های مورد مطالعه یکسان نیست. آثار و شواهد میکروبی همراه با کلسیت اتوژنیک قابل مشاهده است (شکل ۶ الف). کربنات‌های اتوژنیک (Authigenic) عمدتاً کلسیت‌اند و معمولاً در بستر یا نزدیک کف دریا ته نشین می‌کنند. با توجه به نتایج آنالیز XRD (شکل ۵) وجود این مقدار کربنات در تراف نانکای قابل توجه بوده و با توجه به عمق ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ متری آن و رسوب گذاری ذرات عمدتاً آواری در این حوضه، تشکیل کربنات می‌تواند در شرایط متفاوتی صورت گرفته باشد. وجود هیدرات متان به خصوص در مکان‌هایی مانند تراف نانکای که گاز متان به شکل حباب از رسوبات کف بستر خارج می‌شود، نقش مهمی در ته نشست کربنات‌های اتوژنیک دارد. میزان مواد آلی (TOC, %) در این حوضه از ۰/۱۳ تا ۲/۵۷٪ و میزان اکسیداسیون متان از $۲/۷۲ \times ۱۰^{-۲}$ mg/l/yr تا $۲/۷۲ \times ۱۰^{-۵}$ در تغییر است (Horsfield *et al.* 2006).

نسبت ایزوتوپی کربن ($\delta^{13}C$) در اکثر نمونه‌های کربنات مطالعه شده به شکل سیمان حدود صفر در هزار (‰) است. این مقدار معرف این است که بیشتر کربنات ها درشرایط تعادل ایزوتوپی یا نزدیک به تعادل با آب دریا رسوب کرده اند. به عبارتی منبع کربن از طریق یون کربنات و یا CO_2 محلول در آب تأمین شده است Colwell *et al.* (2004). از طرفی در ۱۰ نمونه میزان $\delta^{13}C$ سبکتر بوده و مقادیری از ۱/۰۳۵‰- تا ۴/۷۵۷ ‰- را نشان می دهد. بر اساس این مقادیر ایزوتوپی، منبع کربن مورد نیاز جهت تشکیل کربنات ها متفاوت بوده و می‌تواند از طریق ۱- اکسیداسیون بی هوازی متان، ۲- سیالات دارای هیدروکربن که معمولاً مقدار $\delta^{13}C$ این سیالات حدود ۰/۸‰+ تا ۱۶/۳‰- است (Colwell *et al.* 2004) و ۳- فعالیت باکتری‌های کربنات ساز (Calcinogenic Bacteria) در تراف نانکای تأمین شده باشد.

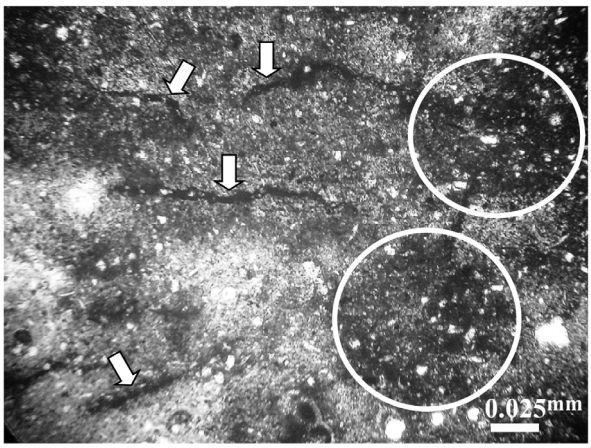
اگر چه با توجه به داده های ایزوتوپ کربن، هر یک از موارد فوق می تواند محتمل باشد اما فعالیت باکتریها در تشکیل بلورهای کربنات در شرایط هوازی از اهمیت بیشتری برخوردار است، زیرا وجود بیوفیلم و باکتری ها همراه با رسوب کربنات اتوژنیک در مقاطع نازک میکروسکوپی و میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده هستند.



شکل۶: تصویر میکروسکوپ الکترونی بلور کلسیت به شکل سیمان میکریتی در رسوبات تراف نانکای. الف) اندازه بلور کلسیت حدود۸۰ تا ۱۲۰ میکرون است به همراه با این بلور شواهدی از آثار میکروبی نیز قابل مشاهده است. ب و ج) تصویر میکروسکوپ الکترونی از بلور کلسیت با بزرگنمایی بالاتر که نشان دهنده سطح صاف سیمان کلسیتی در رسوبات است. د) آنالیز EDX نیز نشان دهنده ترکیب بلور کربنات کلسیم می‌باشد.

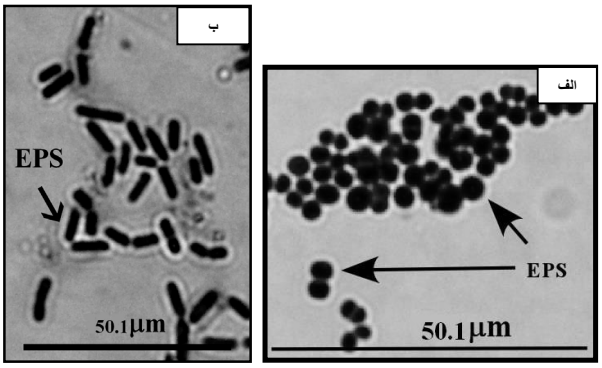
تمرکز مواد آلی حاصل از فعالیت های میکروبی علاوه بر سطح نمونه های مورد مطالعه و حضور در فضاهای بین ذره ای در سطوح ضعف و ریزدرزه های مربوط به آن از فراوانی بیشتری برخوردار بوده (شکل ۷) و باعث توسعه بیوفیلم های میکروبی در آن شده است. تجمع مجموعه های باکتریایی در بیوفیلم ها بستگی به تشکیل ماتریکس پلیمریک خارج سلولی (EPS) دارد. EPS علاوه بر تاثیر بیوشیمیائی آن بر ایجاد بلورهای کربنات، می تواند ترکیبات غیر آلی و اجزاء غیر زیستی موجود در محیط را نیز به تله بیندازد (Dupraz *et al.* 2009). طبق تعریف مارشال (۱۹۹۲) و کاسترتن (۱۹۹۵) بیوفیلم توده ای از میکروکلونی های هوازی و بی هوازی است که محصور در پوشش EPS بوده و با استفاده از آن به سطح رسوب می چسبند. این کلونی ها شامل انواع گوناگون به ویژه آرکی های اکسید کننده متان و باکتری های احیاء کننده سولفات هستند که با مواد آلی، کربنات و پیریت اتوژنیک همراه می شوند (شکل۷) (Bhaskar & Bhosle 2005).

متابولیسم میکروبی همراه با وضعیت محیطی، می تواند شرایط لازم را برای رسوب کانی کربنات در بیوفیلم های موجود در رسوبات دریایی تراف نانکای ایجاد کند.کانی سازی بیوژیکی (Organomineralization) زمانی انجام خواهد شد که اندیس اشباع شدگی و مکان های هسته هر دو با هم حضور داشته باشند و EPS می تواند هر دو نقش را در این زمینه ایفا نماید (Braissant *et al.* 2007).



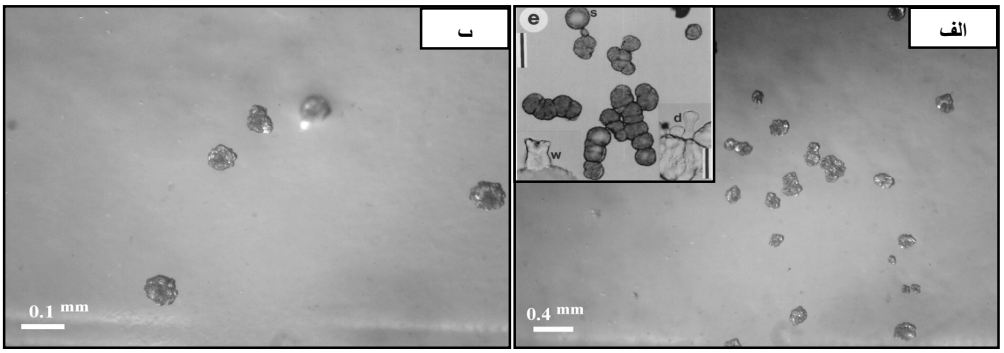
شکل۷: بیوفیلم ها به همراه مواد آلی فراوان و ذرات آواری در رسوبات دریایی عمیق تراف نانکای قابل مشاهده هستند. نوک پیکانهای سفید بیوفیلم هایی هستند که حاوی میکرو ارگانیسم های موثر در ته نشست کانی های اتوژن را نشان می دهند. محدوده های داخل دایره های سفید نشان دهنده تجمع مواد آلی هستند.

مطالعات آزمایشگاهی باکتری‌های موجود در مغزه‌های تهیه شده از تراف نانکای به منظور بررسی توانایی این میکروارگانیسم‌ها نسبت به تشکیل کانی کربنات کلسیم در محیط کشت اختصاصی و مشابه آب دریا همراه با منابع متفاوتی از کربن انجام شده است. افزایش pH مشاهده شده در نمونه‌های مورد مطالعه نشان دهنده فوق اشباع بودن محیط از یون بی کربنات و یکی ازعوامل موثربرتشکیل کربنات در شرایط آزمایشگاهی است. در محیط کشت جامد و مایع بلورهای کلسیت بعد از یک هفته تشکیل شدند. در محیط کشت مایع کربنات به شکل رسوب سفید رنگ راسب شده ولی در محیط کشت جامد (شکل ۹) بلورهای کروی شکل کربنات در سطح آن تشکیل شدند. بنا براین در تمامی نمونه‌های کشت شده در محیط کشت مایع و جامد کانی‌های کربناته قابل مشاهده هستند (شکل‌های ۹ و۱۰). بلورهای کروی شکل موجود در محیط کشت جامد مشابه بلورهای کروی کلسیت کشت شده توسط نور و کرومباین (۲۰۰۰) هستند. این تطابق می‌تواند تائیدی بر صحت آزمایشات انجام شده باشد. مشاهدات میکروسکوپی لام رنگ آمیزی شده از محیط کشت مایع اشکال متنوع تری از بلورهای کلسیت را نسبت به محیط کشت جامد نشان می دهد (شکل ۱۰). بلورهای کربنات کلسیم در محیط کشت جامد به روش پورپلیت در سطح رشد کرده که این خود بیانگر این است که باکتری-های کربنات ساز (Calcinogenic Bacteria) موجود در رسوبات تراف نانکای هوازی اجباری هستند (شکل ۹). شکل بلور کربنات کلسیم در سطح محیط کشت جامد با بلورهای کلسیت به شکل سیمان میکریتی موجود در رسوبات هماهنگی دارد. باکتری های تکثیر شده در محیط کشت با دو مورفولوژی کوکسی و باسیل مشاهده می شوند (شکل های ۸ الف و ب). EPS نیز به شکل ژل چسبنده ضخیم تا لایه نازک (Slime Layer) در اطراف باکتری ها به طور مشخص قابل مشاهده است (شکل ۸ ب) که خود عامل مهم دیگری جهت ته نشینی کربنات است. بنابراین وجود هردوعامل افزایش آلکالینیته و وجود ماتریکس EPS باکتری‌ها درمطالعات آزمایشگاهی انجام شده به اثبات می رسد. درمحیط آزمایشگاهی بدون حضور باکتری‌ها درمحیط کشت هیچ گونه کانی کربناته رسوب نکرده است که خود تائیدی براهمیت باکتری‌ها درتشکیل رسوبات کربناته در تراف نانکای است.

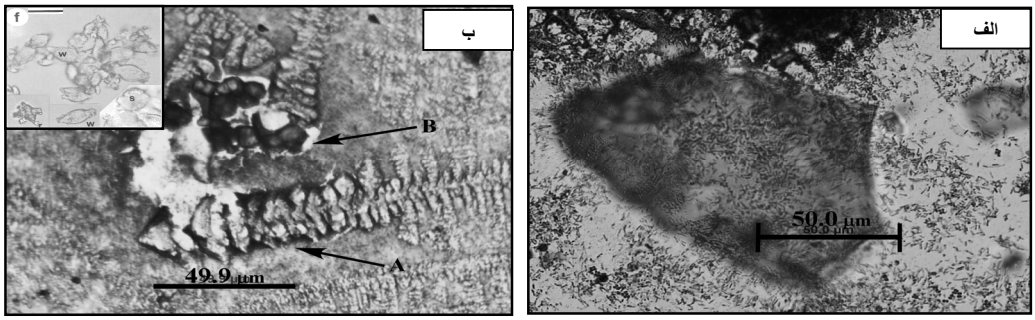


شکل۸: الف) کلونی‌های باکتریایی کوکسی شکل از محیط کشت جامد جدا شده و روی لام آورده شده سپس رنگ آمیزی شده است. ب) باکتری‌های باسیل شکل با رنگ آمیزی مخصوص کپسول. در این شکل ماتریکس آلی (EPS) در اطراف باکتری‌های کوکسی و باسیلی که در تشکیل رسوب کربنات کلسیم موثر می‌باشد، قابل مشاهده است.

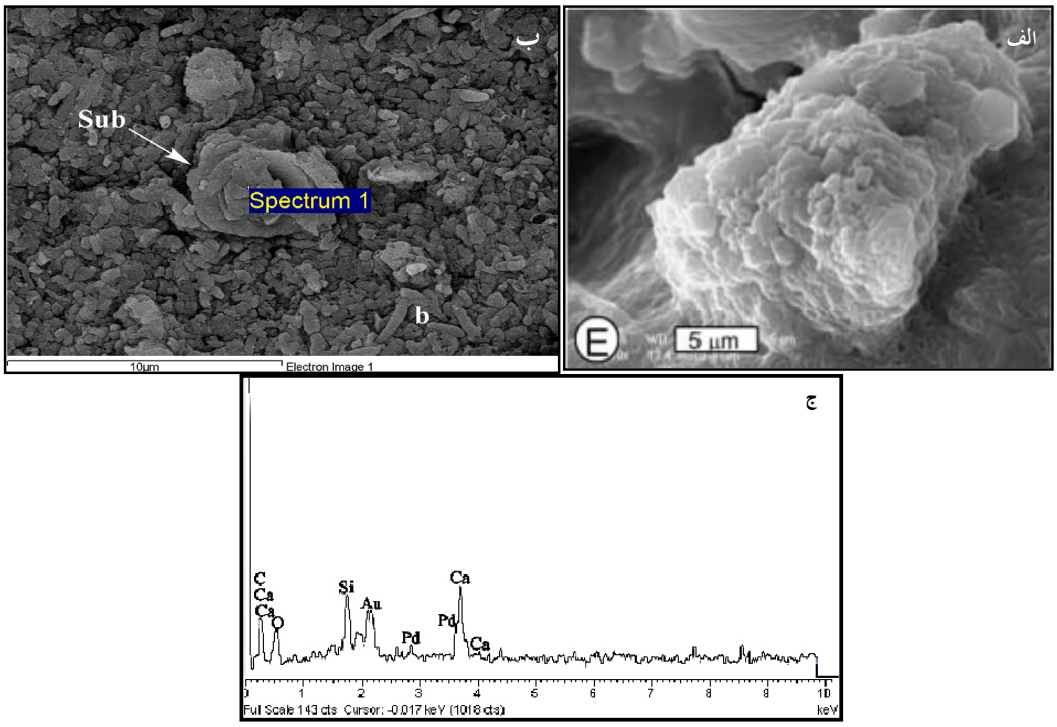
بررسی تصاویر میکروسکوپی و SEM نمونه های بدست آمده ازمحیط کشت مایع (شکل‌های ۹و۱۰و۱۱و۱۲الف)، مورفولوژی مختلف بلورهای کلسیت از قبیل رومبوئدری، کره‌ای و خوشه گندمی همراه با باکتری‌ها را نشان می‌دهد. درنمونه‌های مطالعه شده، بلورهای رومبوئدری کربنات به صورت نیمه شکل‌دار و در زمینه‌ای از باکتری های باسیلی شکل قرار گرفته است (شکل ۱۱ ب) که مشابه با نمونه‌های بدست آمده از دریای شمال (شکل ۱۱ الف) توسط کرمر و همکاران (۲۰۰۸) است. وجود کلسیت در آنالیز EDS (شکل ۱۱ج و۱۲ب) نیز این موضوع را تأیید می کند.



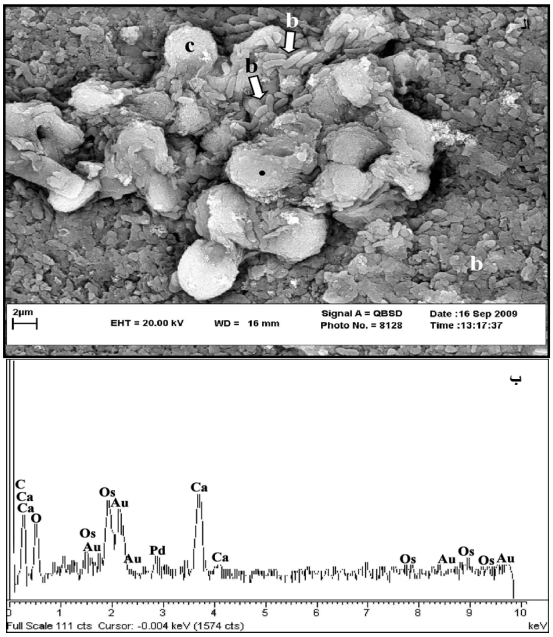
شکل۹: الف) محیط کشت جامد پورپلیت و بلورهای کروی کربنات کلسیم که در شرایطی کاملاً استریل و بعد از ۷ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد در داخل دستگاه انکوباتور رشد کردند. ب) تصویری با بزرگنمایی بالاتر از بلورهای کروی کربنات کلسیم است. بلورهای کربنات کلسیم در سطح محیط کشت جامد تشکیل شده‌اند که معرف فعالیت هوازی باکتری‌های کربنات ساز است. گوشه سمت چپ شکل الف نمونه‌های گزارش شده توسط نور و کرومباین (۲۰۰۰) جهت مقایسه با نمونه‌های حاصل از فعالیت میکروبی در این مطالعه ارائه شده است.



شکل۱۰: محیط کشت مایع نمونه های مورد مطالعه در تراف نانکای الف) باکتری ها در زمینه و بلور رومبوئدری کربنات کلسیم در مرکز شکل قابل مشاهده است. ب) بلورهای کروی و خوشه گندمی کربنات کلسیم به همراه میکرو ارگانیسم ها در زمینه دیده می شود. (A) بلور خوشه گندمی و (B) بلورهای کروی کربنات در محیط کشت مایع است. در گوشه سمت چپ شکل ب بلورهای خوشه گندمی، رومبوئدری و کروی کربنات کلسیم در نمونه‌های مطالعه شده توسط نور و کرومباین (۲۰۰۰). W = خوشه گندمی، r = رومبوئدری، s = کروی. تطابق صحت نتایج را نشان می‌دهد.



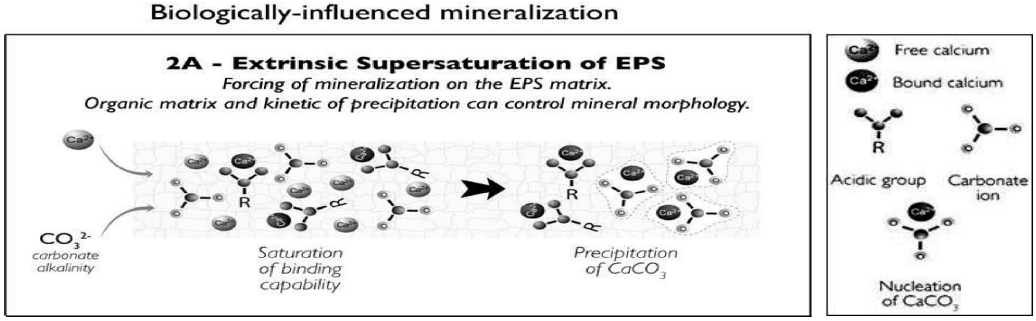
شکل۱۱:تصاویر SEM تهیه شده از محیط کشت مایع نمونه های مورد مطالعه، بلورهای کربنات و باکتری های کوکسی و باسیلی شکل قابل مشاهده هستند. الف) بلور Subhydral کربنات در نمونه های دریای شمال (Kremer *et al.* 2008). ب) بلورهای رومبوئدری و Subhydral در نمونه‌های مورد مطالعه که در محیط آزمایشگاهی رشد کرده اند. (Sub= بلورهای Subhydral کربنات در زمینه ای از باکتری های باسیلی شکل که با حرف b نشان داده شده است. ج) آنالیز EDSنشان دهنده وجود بلورهای کربنات کلسیم در محیط کشت مایع است.



شکل۱۲: تصویر میکروسوپ الکترونی و آنالیز EDS نمونه‌های مورد مطالعه که در محیط آزمایشگاه رشد کردند. الف) بلورهای کروی کلسیت به همراه باکتری‌های کلسیت ساز باسیل شکل b= باکتری‌های باسیلی شکل، c= بلورهای کلسیت، ب) آنالیز EDS بلور کلسیت، پیک Os به دلیل آماده سازی نمونه‌ها جهت مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ظاهر شده است.

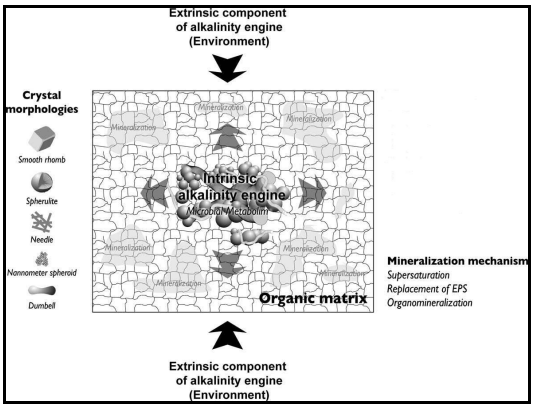
نتایج آزمایشگاهی به دست آمده و مشاهدات حاصل از آن با مکانیسم رسوب کربنات کلسیم در آب دریا مطابقت نشان می دهد. در واقع فرایندهای شیمیایی مشابه با آنچه در شرایط آزمایشگاهی روی می‌دهد در محیط های طبیعی نیز رخ می دهد. در مکانیسم رسوبگذاری کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی (Biologically-influenced Mineralization) محیط باید از وجود کاتیون ها اشباع باشد تا همه گروه‌های ویژه پلیمری از قبیل هیدروکسیل (R–OH)، اسیدهای کربوکسیلیک (R–COOH)، اسیدهای آمینه (R–NH2)، سولفاته- (R–O–SO3H)، سولفوناته- (R–SO3H) و سولفوهیدریل (R–SH) که از تشکیل دهنده های EPS هستند با کاتیون های موجود اشغال شده (Dupraz *et al.* 2009)، و شرایط محلی قلیایی ایجاد شود و در صورت حضور یون های آزاد Ca^{2+}، هسته سازی کربنات کلسیم بر روی ماتریکس EPS انجام شود (شکل ۱۳) (Obst *et al.* 2009). در واقع، هسته زایی کانی ها توسط ویژگی های EPS و میزان اشباع شدگی نسبت به میزان کربنات کنترل می شود (Trichet & Défarge 1995). از بین عوامل موثر در فوق اشباع شدن آب های منفذی نسبت به کربنات کلسیم، علاوه بر pH و آلکالینیته، باید به میزان غلظت Ca^{2+} اشاره کرد (Kermer *et al.* 2008). آب دریا حاوی غلظت فراوانی از کاتیون Ca^{2+} است. یون های Ca^{2+} توسط لایه‌های ضخیم و گاه نازک EPS جذب می شوند و بعد از گذشت ۴۵ ساعت از هسته سازی کلسیت، محیط نسبت به فاز کربنات کلسیم ۶ برابر اشباع می شود (Obst *et al.* 2009). اشکال متنوع بلور کلسیت به دلیل نوع منبع کربن موجود در محیط کشت مشابه با آب دریا است (Knorre and Krumbien, 2000). استات سدیم موجود در محیط کشت و هم چنین ترکیب شیمیایی ماتریکس EPS باکتری ها را می توان از جمله عوامل موثر در تشکیل مورفولوژی متنوع کلسیت نام برد (شکل ۱۴) (Dupraz *et al.* 2009). رسوبگذاری کربنات کلسیم توسط ماتریکس EPS در بیوفیلم ها طی مراحل زیرصورت می گیرد (Zavarzin 2002):

۱) افزایش محلی آلکالینیته و فوق اشباع شدن محیط میکروسکوپی اطراف باکتری، ۲) تشکیل ژل کلسیتی آمورف، ۳) تولید کره هایی در اندازه نانو از یک مخلوط کلسیت و ملکول های بزرگ اسیدی EPS و ۴) متبلور شدن کربنات پیرامون هسته های کروی شکل.



شکل۱۳: طرح شماتیک از مکانیسم تشکیل کربنات های اتوژنیک. در مکانیسم رسوبگذاری کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی محیط باید از وجود کاتیون ها اشباع باشد تا همه گروه های ویژه پلیمری از قبیل اسیدهای کربوکسیلیک (R–COOH) که از تشکیل دهنده های EPS هستند با کاتیون های موجود اشغال

شده، از اینرو در این حالت شرایط محلی قلیایی به وجود آمده و در صورت حضور یون های آزاد Ca^{2+} هسته سازی کربنات کلسیم بر روی ماتریکس EPS انجام می شود(Dupraz *et al.* 2009).



شکل۱۴: باکتری ها با ایجاد تغییرات در محیط آب منفذی باعث تشکیل ذارت کربناته با اشکال بلوری متنوع می شوند (Dupraz *et al.* 2009). این شکل های بلوری نتایج بدست آمده از نمونه های مورد مطالعه در این پژوهش را تأئید می نماید. در این رابطه به اشکال ۹ ، ۱۰، ۱۱ب و ۱۲الف مراجعه نمائید. کانی سازی بیولوژیکی ارتباط نزدیکی با دو فاکتور آلکالینیته و ماتریکس EPS دارد و این در حالی است که کانی ها هسته سازی کرده و رشد می کنند. آلکالینیته می تواند با دو عامل کنترل شود: ۱) متابولیسم میکروبی و ۲) محیط. ماتریکس EPS بر شکل و ترکیب کانی تأثیر می گذارد.

بر مبنای نتایج بدست آمده از این پژوهش می توان نام ارگانومینرال را، که جزئی از فرایند کانی سازی بیولوژیکی (Organomineralization) از طریق کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی (Biologically-influenced mineralization) است، برای ذرات کربناته در تراف نانکای به کار برد. ارگانومینرال ها، هسته زایی بیولوژیک کلسیت در بیوفیلم های رسوبات دریایی تراف نانکای را به اثبات می‌رساند. به عبارت دیگر باکتری های هتروتروفیک موجود در شیب قاره‌ای در جنوب شرق ژاپن از طریق فرایند رسوبگذاری غیر فعال، رسوبات کربنات کلسیم را از خود بر جای می گذارند. مطالعات انجام شده توسط ژئومیکروبیولوژیست ها (Dupraz *et al.* 2009; Obst *et al.* 2009; Reitner & Thiel 2009; Defarg *et al.* 2009) بر درستی نتایج به دست آمده صحه می گذارد. این مطالعات بر لزوم فوق اشباع شدگی آب منفذی نسبت به فاز کربنات کلسیم در محیط به عنوان یک شرط اولیه جهت آغاز فرایند تشکیل کلسیت تأکید می نمایند.اکسیداسیون بی‌هوازی متان و احیاء سولفات در تراف نانکای می‌تواند فراهم کننده چنین شرایط اولیه‌ای باشد. وجود هیدرات متان در تراف نانکای به اثبات رسیده است (Matsumoto 2000). متان آزاد شده در بخش های زیرین و بسیار پائین تر از کف بستر از طرق مختلف، ازجمله خلل و فرج موجود در رسوبات و یا شکستگی ها و گسل ها به سمت بالا و اعماق کمتر مهاجرت می نماید (Chen 2005). در زون انتقال سولفات به متان، اکسیداسیون متان توسط آرکی باکتری ها و احیاء سولفات توسط باکتری های مربوط به شرایط کاملاً بی هوازی انجام می شود (Teske 2006). نتیجه تلاش میکروارگانیسم ها به ادامه حیات به ایجاد شرایط قلیائی می انجامد به طوری که pH سیالات موجود در رسوبات را به ۷/۹ می رساند (Soetaert *et al.* 2007). کلیه این اعمال منجر به افزایش آلکالینیته آب منفذی و تشکیل کربنات می‌شود.علاوه بر تأثیر باکتری‌ها در آلکالینیته محیط و همچنین نقش ساختار ویژه آنها به (خصوص EPS) در تشکیل کربنات، اکسیداسیون متان نیز در رابطه با تشکیل کربنات ها حائز اهمیت است که البته به شرایط محیطی نیز بستگی دارد. اکسیداسیون متان در محیط‌های هوازی منجر به تولید دی اکسید کربن و به دنبال آن با کاهش pH باعث انحلال کربنات می گردد در حالی که حضور میکرو ارگانیسم‌ها و اکسیداسیون متان تحت شرایط بی‌هوازی باعث افزایش آلکالینیته آب بین منفذی شده وبه تشکیل کربنات‌های اتوژنیک می انجامد (Aloisi *et al.* 2002). بنابراین، ارگانیسم‌ها به طور غیر مستقیم و با تغییر شرایط محیط باعث تشکیل کانی‌های اتوژنیک می‌شوند. درآب‌های منفذی متاثراز رسوبات سولفیدی نیز فرآیندهای میکروبی بر تغییر pH مؤثر است. احیاء کامل سولفات توسط باکتری‌ها منجر به افزایش آلکالینیته آب بین منفذی تا حدود ۳۰ برابرمیزان معمول آن می‌شود. به دنبال احیاء گسترده سولفات و افزایش بی کربنات، آب بین منفذی نسبت به $CaCO_3$ فوق اشباع می گردد (Rodriguez Navarro *et al.* 2007). درشرایط حاصل از فرایند های فوق کربنات کلسیم بر اساس معادلات زیر (Pohlman *et al.* 2008) در تراف نانکای درجنوب شرق ژاپن راسب می شود.

$$❶ CH_4 + SO_4^{2-} \rightarrow HCO_3^- + HS^- + H_2O$$
$$❷ Ca^{2+} + HCO_3^- \rightarrow CaCO_3\downarrow + CO_2\uparrow + H_2O$$

در جوامع باکتریایی هتروتروف، وجود مواد آلی برای رسوبگذاری کربنات مورد نیاز بوده و شرایط غذایی معین نقش اصلی را در رابطه بین باکتری ها و بلورهای در حال رشد ایفا می نماید. در تراف نانکای به دلیل وجود مواد آلی، باکتری های هتروتروف قادر به ادامه زندگی بوده و فعالیت متابولیک این میکرو ارگانیسم‌ها می‌تواند به ایجاد شرایط لازم برای ته نشست بلورهای کربناته با مورفولوژی و کانی شناسی خاص آن منجر گردد. نقش پتانسیلی باکتری‌های هتروتروفیک، در تولید ماتریکس خارج سلولی [EPS] به اثبات رسیده است (Bosak & Newman 2005).

این نوع باکتری ها را در تراف نانکای می توان باکتری های کربنات ساز (Calcinogenic Bacteria) نامید که به همراه باکتری های احیاء کننده سولفات و به شکل بیوفیلم در رسوبات این حوضه قابل مشاهده

هستند. هر دو نوع باکتری مزوفیل (رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد) هستند با این تفاوت که باکتری‌های کربنات ساز در شرایط هوازی و باکتری‌های احیاء کننده سولفات در شرایط بی‌هوازی قادر به ادامه فعالیت هستند. در بخش‌های هوازی رسوبات کلسیت توسط باکتری‌های کربنات ساز (Calcinogenic Bacteria) و در قسمت های بی‌هوازی رسوبات پیریت اتوژنیک توسط باکتری‌های احیاء کننده سولفات تشکیل می‌شود.

باکتری های کربنات ساز (Calcinogenic Bacteria) در دیگر حوضه‌های رسوبی از قبیل خلیج فارس و دریای خزر که دارای مخازن هیدرات متان هستند، می‌توانند وجود داشته باشند. مکانیسم باکتری-های کربنات ساز در این دو حوضه نیز می‌تواند به طور مشابه با تراف نانکای باعث رسوب کربنات‌ها گردد که البته به مطالعات دقیق‌تری در این زمینه نیاز است.

نتیجه گیری

مطالعات آزمایشگاهی انجام شده بر روی رسوبات تراف نانکای همراهی باکتری ها و ذرات کربناته در محیط کشت جامد و مایع را نشان داده، و دخالت باکتری ها را در رسوب این کانی به اثبات می‌رساند. باکتری‌ها در نمونه‌های رسوبی تراف نانکای از نوع هتروتروف، مزوفیل (رشد باکتری کربنات ساز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد) و هوازی اجباری بوده و از طریق رسوبگذاری یا کربناتوژنز غیر فعال می‌توانند منجر به رسوب کربنات‌ها گردند. مورفولوژی و کانی شناسی ذرات کربناته در محیط کشت مایع و جامد مطابق با مکانیسم رسوبگذاری کانی سازی تحت نفوذ بیولوژیکی (Biologically-influenced mineralization) است. مورفولوژی کربنات‌ها به ترتیب شامل کره‌ای، رومبوئدری و خوشه گندمی است. در این نوع رسوبگذاری باکتری‌ها محیط بیوژئوشیمیایی اطراف خود را توسط فرایندهای فیزیولوژیکی تغییر داده، آلکالینیته آب منفذی را افزایش می‌دهند و به صورت فرایندهای خارج سلولی ذرات کربناته شکل می‌گیرند. کانی کربنات کلسیم یک ارگانومینرال است. ماتریکس آلی اطراف سلول‌های باکتریایی (EPS) در ته نشست کربنات‌ها نقش مهمی را ایفا می‌نماید. بنابراین، فاکتورهای اصلی کانی سازی بیولوژیکی در رسوبات دریایی عمیق تراف نانکای شامل آلکالینیته و ماتریکس آلی (EPS) می‌شود. آلکالینیته متأثر از متابولیسم میکروبی بوده و شرایط محیطی از قبیل اکسیداسیون بی-هوازی متان و احیاء سولفات بطور هم‌زمان و همراه با فعالیت باکتری-های متانوژنز بر روی شاخص اشباع شدگی کربنات کلسیم تأثیر گذارده و ازعوامل موثر در تشکیل کربنات اتوژنیک در تراف نانکای محسوب می شوند.

منابع:

Aloisi G., Bouloubassi I. , Heijs K. , Pancost D. , Pierre C., Sinninghe Damste S.,Gottschal C. ,Forney J. , Rouchy J. 2002: CH4-consuming microorganisms and the formation of carbonate crusts at cold seeps. *Earth and Planetary Science Letters* **203**: 195-203.

Bhaskar P.V., Bhosle N.B. 2005: Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* **88**: 45–53.

Bosak T., Newman D.K. 2005: Microbial kinetic controls on calcite morphology in supersaturated solutions. *Journal of Sedimentary Research* **75**: 190–199.

Braissant O., Decho A.W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K.M., Visscher P.T. 2007: Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* **5**: 401–411.

Castnier S., Metayer-Levrel G. L., Perthuisot J. P. 2000: Bacterial Calcification, Microbial Sediments. Springer-Verlag Berlin Heideberg. pp. 32-39.

Chen Y., 2005: Methane-derived carbonate from the Gulf of Mexico and the Nankai Trough: Are related to gas hydrate dissociation? Thesses of Ph.d, university of Tokyo.

Colwell F., Matsumoto R., Ree d 2004: A review of the gas hydrates, geology, and biology of the Nankai Trough Chemical. *Geology* **205**:391– 404.

Costerton J.W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J Indust Microbiol Biotech* **15**: 137- 140.

Défarge C., Gautret P., Reitner J., Trichet J. 2009: Defining organominerals: Comment on 'Defining biominerals and organominerals: Direct and indirect indicators of life' by Perry *et al*.(2007, *Sedimentary Geology*, **201**: 157–179), *Sedimentary Geology* **213**: 152-155.

Dupraz C., Pamela Reid R. , Braissant O. , Decho. W., Norman R. , Visscher T. 2009: Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* **96:** 141-162.

Horsfield B., Schenk H.J., Zink K., Ondrak R., Dieckmann V., Kallmeyer J., Mangelsdorf K., di Primio R., Wilkes H., Parkes R.J., Fry J., Cragg B. 2006: Living microbial ecosystems within the active zone of catagenesis: Implications for feeding the deep biosphere. *Earth and Planetary Science Letters* **246**: 55–69.

Kastner M. 2001: Gas hydrates in convergent margins: formation,occurrence, geochemistry, and global significance. Natural Gas Hydrates: Occurrence, Distribution and Detection. *Geophysical Monograph*, vol. **124**. American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 67–86.

Knorre H.V. , Krumbien W. E. 2000: Bacterial Calcification, Microbial Sediments. Springer-Verlag Berlin Heideberg. pp. 26-31.

Kremer B., Kazmierczak, J., AND Stal, L. J., 2008. Calcium carbonate precipitation in cyanobacterial mats from sandy tidal flats of the North Sea. *Geobiology*, **6**: 46–56.

Marshall K.,C. 1992: Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News*, **58**:202- 207.

Martin V., Henry P., Nouze´ H., Noble Ashi M., Pascal G. 2004: Erosion and sedimentation as processes controlling the BSR-derived heat flow on the Eastern Nankai margin. *Earth and Planetary Science Letters* **222** : 131– 144.

Matsumoto R. 2000: Methane hydrate estimates from the chloride and oxygen isotopic anomalies – examples from the Blake Ridge and Nankai Trough sediments. Ann. New York Acad. *Sci*. **912**: 39–50.

Obst M., Dynes J.J., Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Benzerara K., Karunakaran1 C., Kaznatcheev K., Tyliszczak T., Hitchcock A. P. 2009: Precipitation of amorphous CaCO3 (aragonite-like) by cyanobacteria: a STXM study of the influence of EPS on the nucleation process. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **"in press".**

Plee K., Ariztegi D., Martini R., Davaud E. 2008: Unravelling the microbial role in ooid formation – results of an *in situ* experiment in modern freshwater Lake Geneva in Switzerland. *Geobiology*,**6**: 341–350.

Pohlman J.W., Ruppel C., Hutchinson D.R., Downer R., Coffin R.B. 2008: Assessing sulfate reduction and methane cycling in a high salinity pore water system in the northern Gulf of Mexico, *Marine and Petroleum Geology*, **25** : 942–951.

Reitner J., Thiel V. (eds.).2009: Organomineralization. *Encyclopedia of Geobiology*.

Rodriguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodriguez-Navarro A., Gonzales-Munoz M.T., Rogriguez-Gllego M. 2007: Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochemica et Cosmochimica Acta.* **71**:1197-1213.

Soetaert K., Hofmann A., Middelburg J., Meysman J.R., Greenwood J. 2007. The effect of biogeochemical processes on pH. *Marine Chemistry*, **105**: 30–51.

Stolz J.F. 2000: Structural of Microbial Mats and Biofilm, Microbial Sediments. Springer-Verlag Berlin Heideberg. pp. 32-45.

Sugiyama Y. 2007: Segmentation of the western Taiwan active fault zone inferred from its structural analogy to the Nankai trough region, southwest Japan. *Journal of Asian Earth Sciences* **31**: 197–203.

Teske A.P. 2006: Microbial community composition in deep marine subsurface sediments of ODP Leg 201: sequencing surveys and cultivations. *In* Jørgensen, B.B., D'Hondt, S.L., and Miller, D.J. (Eds.), *Proc. ODP, Sci. Results,* 201, 1–19 [Online]. Available from World Wide Web: <http://www-odp.tamu.edu/.

Toffin L. , Webster G. , Weightman J. , Fry C. ,Prieur D. 2004: Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program FEMS *Microbiology Ecology* **48** : 357–367.

Trichet J., Défarge C. 1995: Non-biologically supported organomineralization. *Bulletin de l'Institut Océanographique (Monaco) Numéro Spécial* **14**: 203–236.

Tsuji Y., Ishida H., Nakamizu M., Matsumoto R., Shimizu S. 2004: Overview of the MITI Nankai Trough wells: a milestone in the evaluation of methane hydrate resources. *Resource Geol*. **54**: 3–10.

Zavarzin G.A. 2002: Microbial geochemical calcium cycle. *Microbiology* **71**: 5–22.

www.jamstec.go.ir