نشریه علمی مدیریت اراضی/ جلد ۱۱ / شماره ۲ / ۱۴۰۲. ص۱۷۹-۱۹۳
https://doi.org/10.22092/lmj.2023.362680.335

جداسازی، غربالگری و شناسایی مولکولی باسیلوس‌های تولیدکننده آنزیم اوره آز از اراضی بایر جنوب ایران و بررسی توانایی آن‌ها در تثبیت خاک

سمیه فاضلی‌کیا، سیدعلی ابطحی*، محمدعلی کارگر و مجتبی جعفری‌نیا

دانش‌آموخته دکترای مدیریت حاصلخیزی و زیست‌فناوری خاک، گروه خاک‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
fazelikias@yahoo.com
استاد گروه خاک‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
seyedaliabtahi@yahoo.com
استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
microkargar@gmail.com
استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
jaafarinia33@gmail.com

دریافت: تیر ۱۴۰۲ و پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

چکیده

اوره آز میکروبی کاربردهای گسترده‌ای در بیوتکنولوژی، کشاورزی، پزشکی، ساخت‌وساز و مهندسی ژئوتکنیک دارد. فناوری رسوب کلسیت به‌واسطه تحریک میکروبی (MICP[1]) یک فرآیند اکولوژیکی مبتنی بر فعالیت اوره آز میکروبی است که به‌تازگی برای تثبیت خاک استفاده شده است. باسیلوس به دلیل قابلیت فروگشت و بقای بالا به‌عنوان کاندید مناسب برای کاربرد در فرآیند سیمانی شدن زیستی در نظر گرفته شده است. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی گونه‌های باسیلوس با پتانسیل MICP از اکوسیستم‌های ایران است. ۲۰۰ نمونه خاک از اکوسیستم‌های ایران جمع‌آوری شد و جهت شناسایی باسیلوس‌ها توسط روش‌های میکروبیولوژیکی فیزیولوژیک و مولکولی از جمله تکثیر PCR و آنالیز توالی ژن‌های gyrA و 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین توانایی تولید سیمان زیستی سویه‌ها، از آزمایش‌های رشد در حضور اوره، شوری، pH و دماهای مختلف، SEM، XRD بر روی خاک‌های تثبیت‌شده با سویه‌ها و آنالیز تونل باد استفاده شد. در مجموع ۱۲ سویه (۶٪) به‌عنوان باسیلوس اوره آز مثبت شناسایی شد که متعلق به چهار گونه مختلف شامل *باسیلوس پارامایکوئیدس* چهار سویه (۳۳/۳۳٪)، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* سه سویه (۲۵ ٪)، *باسیلوس ولزنسیس*سه سویه (۲۵ ٪) و *باسیلوس پاستوری* دو ایزوله (۱۶/۶۶٪) بودند. شرایط بهینه برای MICP توسط سویه‌ها ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH9 و شوری۶٪ است. پس از MICP، نسبت تلفات خاک در سرعت باد ۹۵ کیلومتر در ساعت، ۱۰۰ برابر کاهش نشان داد. نتایج نشان داد که باسیلوسها، توانایی بالقوه‌ای برای سازگاری با شرایط سخت محیطی را دارند، همچنین می‌توان با استفاده از باسیلوسهای تولیدکننده MICP در سطح خاک تأثیر به سزایی در کاهش تلفات خاک در اثر فرسایش بادی و افزایش کیفیت آن جهت کشاورزی را داشته باشیم.

واژه‌های کلیدی: سیمان زیستی، باسیلوس، اوره آز، بهبود خاک

---

*- آدرس ایمیل نویسنده مسئول:seyedaliabtahi@yahoo.com

[1]- Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه

در قرن حاضر، فرسایش به‌عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های موجود در راستای دستیابی به توسعه‌ی پایدار و مدیریت بهینه زمین‌های کشاورزی در اراضی خشک و نیمه‌خشک مطرح است. فرسایش یکی از جنبه‌های مهم تخریب اراضی در مناطق خشک و نیمه‌خشک به شمار می‌آید به‌گونه‌ای که حدود یک ششم مساحت اراضی دنیا را تحت تأثیر خود قرار داده است (Mozaffari et al., 2021). باد به علت نیروی زیاد و عملکرد در سطح وسیع، با مساعد بودن شرایط مناطق خشک و نیمه‌خشک برای فرسایش (نبود موانع و شرایط خاکی خاص) باعث می‌گردد که شدت هدر رفت خاک و میزان رسوب‌دهی در چنین مناطقی گاه تا چندین برابر فرسایش آبی باشد. اگرچه فرسایش بادی در مناطق خشک و نیمه‌خشک بسیار معمول است، اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد نواحی مرطوبی که همه بارش سالانه آن‌ها در قسمتی از سال تمرکزیافته و بقیه سال خشک و بدون باران هستند، نیز دارای فرسایش بادی خواهند بود. همچنین ماسه‌های بدون ساختمان ساحلی و خاک‌های سبک آلی باتلاقی نیز نسبت به فرسایش بادی حساس می‌باشند (Vågen and Winowiecki, 2019, Kopittke et al., 2019).

کشور ایران با مساحتی بیش از ۱۶۴ میلیون هکتار، در عرض جغرافیایی ۲۲ تا ۴۲ درجه شمالی واقع‌شده که در نوار خشک کره زمین قرار دارد. موقعیت ایران در منطقه خشک باعث شده تا علاوه بر مشکلات ناشی از فرسایش بادی در داخل، کشور، حرکت ماسه‌های روان از کشورهای همسایه نیز موجب بی‌نظمی در سیستم آب و هوایی کشور شود. در حال حاضر، فرسایش بادی و هجوم ماسه‌های روان به تأسیسات اقتصادی و منابع زیستی یکی از معضلات اصلی کشور است. یکی از مشکلاتی که اخیراً در اثر دخالت‌های بشری و استفاده غیرمنطقی از منابع طبیعی و تخریب آن‌ها در حال گسترش است، پدیده گردوغبار است. مناطق خشک با بیش از ۴۲ درصد سطح زمین، منبع مهمی از طوفان‌های گردوغبار در جهان هستند (Farashi and Shariati, 2017). مقیاس جهانی خطر فرسایش بادی کمتر از فرسایش آبی است، ولی گاهی ابعاد آن از فرسایش آبی بیشتر است. در سال‌های اخیر میزان فرسایش بادی در برخی مناطق ایران افزایش چشمگیری داشته و وسعت عرصه‌های تحت تأثیر فرسایش بالغ بر ۳۲ میلیون هکتار، یعنی حدود یک ششم کل وسعت ایران است. حدود ۱۲ میلیون هکتار از این ۳۲ میلیون هکتار را مناطق با حساسیت فرسایش شدید در برگرفته است که نیاز به عملیات کنترل و حفاظتی دارند. از طرفی کمی بارش و وجود مواد مادری آهکی سبب پیدایش و تحول خاک‌های آهکی در بخش وسیعی از کشور گردیده است. در خاک‌های مذکور به علت فراوانی کربنات کلسیم در نتیجه غلظت زیاد یون کلسیم و pH بالا، برخی از عناصر غذایی مانند فسفر، آهن و روی تثبیت‌شده و از دسترس گیاهان خارج می‌شود. به‌عبارت‌دیگر pH خاک نه تنها حلالیت و انتقال یون‌های عناصر مغذی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی را نیز کنترل می‌کند (Mohammadi et al., 2021).

اراضی بایر جنوب ایران، به دلیل خصوصیات اقلیمی و زمین‌شناسی منحصربه‌فرد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این مناطق، با داشتن شرایطی مناسب برای کشاورزی و دامداری، به‌عنوان یکی از منابع مهم تولید محصولات کشاورزی و دامی در ایران شناخته‌شده‌اند. بااین‌حال، به دلیل وجود چالش‌هایی مانند کمبود آب، شوری خاک و آلودگی زیستی، بهره‌وری از این اراضی ممکن است با مشکلاتی روبه‌رو شود. بهره‌وری از این اراضی، به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم در حوزه کشاورزی، می‌تواند با اتخاذ راهکارهای مناسب، مؤثر و اقتصادی، بهبود یابد. برای بهره‌وری بهینه از این اراضی، ابتدا باید به کنترل شوری خاک و کمبود آب و فرسایش خاک پرداخته شود. با توجه به اینکه این اراضی با فرسایش شدید خاک مواجه هستند، استفاده از روش‌هایی مانند آبیاری مناسب و استفاده از گیاهان شور مقاوم و همچنین استفاده از میکروب‌هایی با توانایی بالا در تثبیت خاک مانند

باسیلوس‌ها می‌تواند به کنترل شوری و فرسایش خاک و بهره‌وری بهتر از این اراضی کمک کند (Patault et al., 2021). بنابراین، بهره‌وری از اراضی بایر جنوب ایران، به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم در حوزه کشاورزی، نیازمند استفاده از راهکارهای مناسب و جامع در زمینه کنترل شوری، کمبود آب فرسایش خاک و آلودگی زیستی است. با استفاده از روش‌های بهینه آبیاری، استفاده از کودهای مناسب و گیاهان مقاوم به و میکروب‌های تثبیت‌کننده و تولیدکننده سیمان زیستی، می‌توان به بهره‌وری بهتر از این اراضی و افزایش تولید محصولات کشاورزی و دامی در این مناطق کمک کرد (Mohammadi et al., 2021).

پرورش گیاه و تولید محصولات در خاک‌های با pH پایین، همواره با مشکلاتی مواجه بوده است. این مشکلات به دلیل اینکه در pH پایین مواد غذایی حلالیت بالایی ندارد و از دسترس گیاه خارج می‌شوند همچنین در این شرایط برخی از عناصر کم‌مصرف، از دسترس گیاه خارج می‌شود به همین علت بخش کمی از کود مصرف‌شده، در اختیار گیاهان قرار می‌گیرد و کودهای مورداستفاده راندمان پایینی دارند. با این وجود در خاک‌هایی که در آن‌ها MICP انجام‌شده دارای خصوصیاتی است که می‌تواند رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد. یکی از عوامل مهم این خاک برای رشد گیاهان، موجودیت کربنات کلسیم است که سبب افزایش pH خاک می‌شود. مواد آلی در خاک‌های آهکی بر اثر قرار گرفتن کربنات کلسیم بر روی آن‌ها به‌طور فیزیکی محصور شده و بر اثر تشکیل توده سیمانی با کربنات کلسیم از دسترس بخش فعال خاک یعنی همان قسمت بالایی پروفیل خاک خارج می‌گردند. خاک‌های آهکی به‌طورکلی دارای کمبود ماده آلی، نیتروژن و فسفر هستند. همچنین در این خاک‌ها کمبود ریزمغذی‌ها به‌ویژه آهن و روی مشاهده می‌شود که به دلیل pH بالای این خاک‌ها است. خاک آهکی دارای مقدار زیادی پتاسیم، کلسیم و منیزیم و مقادیر کم آهن و منگنز است که این عناصر غذایی برای رشد گیاهان ضروری هستند. اما جذب این عناصر به دلیل ساختار بافت آهکی و رقابت این عناصر با کلسیم و منیزیم کمتر در دسترس گیاه قرار می‌گیرد. با این وجود به علت فرسایش شدید بادی در اراضی جنوب کشور، وجود کربنات کلسیم در خاک‌های آهکی باعث به هم پیوستن ذرات خاک شده و از پراکندگی ذرات خاک و در نتیجه فرسایش خاک جلوگیری می‌کند؛ بنابراین باعث ایجاد ساختار خاکدانه‌ای مناسب می‌شود که می‌تواند در بهبود شرایط کشت و کشاورزی در این اراضی مفید واقع شود (Patault et al., 2021).

تمایل به استفاده از فناوری‌های زیستی در مهندسی زمین‌شناسی و خاک‌شناسی در چند سال اخیر افزایش یافته است. یکی از این تکنیک‌های ارزشمند، تولید سیمان زیستی رسوب کلسیت به‌واسطه تحریک میکروبی (MICP[۲]) یا رسوب دادن باکتریایی کلسیت است. تولید سیمان زیستی در اثر MICP به دلیل تطبیق‌پذیری محیطی، اخیراً مورد توجه محققان علوم مهندسی در سراسر جهان قرار گرفته است. فرآیند تشکیل رسوب یا سیمان زیستی در حضور میکروارگانیسم‌ها را MICP می‌نامند(کاسترو-آلونسو و همکاران، ۲۰۱۹). MICP یک تکنیک بیولوژیکی است که به‌طور طبیعی انجام می‌شود که در آن متابولیسم باکتری‌ها به سمت سیمان سازی در محل به نام تولید کربنات کلسیم یا کلسیت هدایت می‌شود. MICPروش جدیدی برای نو سازی خاک بوده که از باکتری‌های مولد آنزیم اوره آز برای کنترل فرآیند شیمیایی و رسوب در خاک استفاده می‌شود. در این روش پس از تکثیر باکتری‌های مولد اوره آز، باکتری‌ها به خاک تلقیح می‌شوند. باکتری‌ها باعث هیدرولیز اوره شده و یون‌های کلسیم و کربنات به‌صورت کربنات کلسیم در خاک رسوب می‌کنند که در نتیجه اینکار خاک تثبیت‌شده، میزان pH آن بالا رفته و مواد غذایی آزاد در بافت خاک بیشتر می‌شود (Castro-Alonso et al., 2019).

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم اوره آز مهم‌ترین عامل در فرآیند MICP است. انواع

[2] -Microbiologically Induced calcite precipitation=MICP

مختلف گونه‌های میکروبی موجود در خاک و آب در اکوسیستم طبیعی کربنات‌ها را در محیط‌های قلیایی غنی از یون‌های Ca^{+2} با مکانیسم‌های مختلف رسوب می‌دهند. باکتری‌های احیاکننده سولفات، ارگانیسم‌های فتوسنتز کننده، سیانوباکتری‌ها و جلبک‌ها و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مهم‌ترین گروه‌های مؤثر در فرآیند سیمان زیستی هستند(Kalkan, 2020). باسیلوس‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک‌زی هستند و به دلیل فعالیت فروگشت قابل‌توجه و همچنین ماندگاری و بقا در شرایط نامساعد محیطی، یکی از مهم‌ترین کاندیدهای فرآیند تولید سیمان زیستی می‌باشند؛ بنابراین، غربالگری و استفاده از گونه‌های میکروبی با فعالیت تولید سیمان زیستی، می‌تواند به افزایش و توسعه فناوری تثبیت خاک کمک کند. ازاین‌رو هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی سویه‌های باسیلوس واجد توانایی MICP از اکوسیستم‌های ایران و بررسی توانایی تولید سیمان زیستی توسط آن‌ها است (Mutitu et al., 2019).

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت مقطعی از پاییز سال ۱۳۹۹ تا پاییز ۱۴۰۰ بر روی ۲۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از هشت کانون تولید ریزگرد در ایران که دارای شرایط خشک و بیابانی بودند و دائماً در معرض عوامل فرسایشی بودند انجام شد (جدول شماره ۱). نمونه‌ها در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل و در محیط کشت آبگوشت اوره شرکت مرک آلمان (حاوی اوره یک مولار به‌منظور غنی‌سازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم اوره آز) کشت داده شدند و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. سپس از محیط غنی کننده به محیط اوره آگار حاوی یک مولار اوره انتقال داده شد سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. خالص‌سازی نهایی سویه‌ها در محیط کشت نوترینت آگار حاوی یک مولار اوره انجام شد.

جدول ۱- موقعیت مکانی نمونه‌گیری خاک، نوع نمونه و خصوصیات شیمیایی نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده

Table 1- Location of soil sampling, type of sample and chemical properties of collected soil samples

محل‌های نمونه‌گیری (کانون ریزگرد)	تعداد نمونه از هر محل	نوع خاک	عمق خاک نمونه‌گیری	نوع پوشش گیاهی	K (mg/Kg)	P (mg/Kg)	pH	میزان هدایت الکتریکی (µS/cm)	میزان کربن آلی (%)	نیتروژن (mg/Kg)
هورالعظیم (کانون ۱)	25	Aridisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	252	0/5	6/4	121/9	3/4	35
خرمشهر (کانون ۲)	25	Mollisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	234	11	7/2	118	1/6	43
شرق اهواز (کانون ۳)	25	Aridisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	196	8	6/2	131/6	0/2	75
جنوب شرق اهواز (کانون ۴)	25	Aridisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	260	0/7	7/3	124	0/33	25
ماهشهر (کانون ۵)	25	Aridisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	250	0/1	6/8	118/3	0/12	24
امیدیه (کانون ۶)	25	Mollisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	214	32	7/9	145	6	65
هندیجان (کانون ۷)	25	Mollisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	185	12	6/8	110	2/3	45
ایلام (کانون ۸)	25	Aridisols	لایه سطحی خاک	خار و خاشاک	222	0/8	6/3	98/3	0/14	78
میزان خطا قابل پیش‌بینی					4/167	0/003	0/001	0/011	0/00002	0/222

شناسایی ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

سویه‌ها روی محیط کشت انتخابی اوره آگار، با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، ایندول، سیترات، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، اکسیداز، اوره آز و MR-VP شناسایی شدند. سپس جهت شناسایی دقیق جنس و گونه سویه‌ها از روش‌های مولکولی به شرح زیر استفاده شد (Celandroni et al., 2019).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

DNA کروموزومی ایزوله‌های باسیلوس با استفاده از روش جوشان به ترتیب زیر استخراج شد: برخی از کلنی‌های باکتری به ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris EDTA منتقل شدند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شدند و ۱۵ دقیقه در g× ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به میکروتیوب استریل منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه درg × ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در پایان DNA رسوب‌کرده به ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر اضافه شد و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Davarpanah et al., 2019).

با استفاده از پروتکل PCR اختصاصی بر اساس قطعه ۳۰۰ جفت باز از پرایمرهای اختصاصی ژن gyrA (gyrA F 5 '-TCTGCTCGTGAACGGTGCT-3 '; gyrA R 5 '-TTTCGCCTTATTTACTTGG-3 ') ایزوله‌ها در سطح جنس شناسایی شدند(Liu et al., 2022). برای شناسایی گونه ایزوله‌ها، از تکثیر و آنالیز توالی ژن 16SrRNA استفاده شد(Catia et al., 2008, Azadi and Shojaei, 2020). بدین ترتیب که محصولات PCR ژن 16SrRNAپس از خالص‌سازی از ژل توسط شرکت بیونیر کره جنوبی توالی یابی شد. توالی‌های حاصله با توالی‌های گونه‌های باسیلوس دریافت شد از پایگاه داده GenBankTM، هم‌تراز شدند و سپس با استفاده از برنامه jPhydit آنالیز شدند (Jeon et al., 2005). توالی‌های ژن هر کدام از گونه‌ها در سایت GenBankTM ثبت و کد رهگیری ثبت دریافت شد.

آنالیز تولید سیمان زیستی

تولید سیمان زیستی مربوط به رسوب CaCO3 است که از فعالیت میکروارگانیسم‌ها در سامانه‌ای غنی از یون‌های کلسیم تشکیل می‌شود. هیدرولیز اوره توسط آنزیم اوره آز می‌تواند یون‌های کربنات تولید کند، درحالی‌که این هیدرولیز در یک محیط غنی از کلسیم اتفاق می‌افتد، کربنات کلسیم (کلسیت) از محلول رسوب می‌کند و یک ماده کریستالی جامد (سیمان زیستی) ایجاد می‌کند؛ بنابراین آنالیز فعالیت اوره آز توسط سویه‌ها برای تولید سیمان زیستی ضروری است (Almajed et al., 2019).

بررسی فعالیت آنزیم اوره آز سویه‌ها

برای تعیین فعالیت آنزیم اوره آز از محیط کشت کریستین اوره آگار (UAB) (مرک – آلمان) استفاده شد. در مورد تمامی ایزوله‌ها تغییر رنگ محیط‌های کشت UAB به رنگ صورتی در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت (Whiffin et al., 2007). برای بررسی میزان فعالیت آنزیم اوره آز از روش هدایت الکتریکی استفاده شد. برای این منظور، یک میلی‌لیتر از محیط براث حاوی باکتری به شش میلی‌لیتر محلول اوره ۱/۱۱ مولار افزوده شد. ثبت نهایی هدایت الکتریکی پس از دو دقیقه گرما گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله جریان سنج الکتریکی (Omega Engineering-Germany) انجام شد. فعالیت اوره آز به‌واسطه میزان افزایش هدایت الکتریکی به‌صورت µSiemens/cm سنجش گردید (Achal et al., 2009) .

مقاومت در برابر شوری، pH و دما

بدین منظور ایزوله‌ها در محیط براث مغذی حاوی غلظت‌های مختلف نمک NaCl (۱، ۳، ۶، ۸ و ۱۰٪) و pH (۵، ۶، ۷، ۸ و ۹) کشت و در دماهای ۳۰، ۳۵، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس جهت بررسی رشد ایزوله‌ها، جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی تولید کربنات کلسیم

برای این منظور از محیط پایه شامل دو گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲/۲ مولار کلرید کلسیم و ۱٪ اوره ۱ مولار، ۱/۲۵ گرم بی‌کربنات سدیم و نه گرم در لیتر کلرید آمونیوم و ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری تکثیر یافته (غلظت نیم مک فارلند) استفاده شد (الثوادی و همکاران، ۲۰۰۸). میزان تولید کربنات کلسیم در محیط مایع در محدوده pH ۵/۵، ۷، ۸/۵ و ۱۰ و دمای، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد با سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC ۱۱۵۸۹ به‌عنوان کنترل مثبت بررسی گردید. سپس رسوب حاصل توسط دستگاه XRD (D8ADVANCE, Bruker-Germany) و SEM (TESCAN,Vega3- Czech Republic) مورد ارزیابی قرار گرفت (Gowthaman et al., 2019).

آنالیز تولید کربنات کلسیم توسط ایزوله با XRD and SEM

سه گرم از رسوب خشک‌شده برای آنالیز مورفولوژی و فاز کریستالی معدنی کربنات کلسیم تولیدی به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراش پودر اشعه ایکس (XRD) با تابش Co-Ku استفاده مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی توانایی تثبیت خاک توسط ایزوله‌ها

ایزوله‌های تولیدکننده کربنات کلسیم در محیط براث مغذی غنی‌شده با سولفات آمونیوم و استات سدیم (تثبیت‌کننده شرایط قلیایی) تلقیح شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد پنج میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح شده به‌آرامی به ستون خاک اضافه شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول تثبیت‌کننده باکتری حاوی دو گرم در لیتر عصاره مخمر، دو گرم در لیتر اوره و ۰/۰۵ مولار کلسیم به سینی اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. در ادامه برای تکمیل تولید کریستال‌های کربنات کلسیم، محلول تولید سیمان حاوی دو گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم در لیتر $CaCL_2$ و اوره، ۱/۲۵ گرم در لیتر $NaHCO_3$ و هفت گرم در لیتر NH_4Cl به‌آرامی در یک سینی آزمایش (۳۰×۳۰×۶۰ سانتی‌متر) اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت ذخیره گردید. از سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC ۱۱۵۸۹ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Ivanov and Chu, 2008).

بررسی مقاومت نمونه‌های خاک تثبیت‌شده در برابر فرسایش بادی

برای بررسی مقاومت نمونه‌های خاک تثبیت‌شده در برابر فرسایش باد از روش تونل باد با سرعت‌های مختلف استفاده شد. دستگاه تونل باد مورد استفاده در این تحقیق به طول ۱۰ متر و از سه قسمت تشکیل شده است: مولد باد، سطح آزمایش، نمونه‌بردار خاک و رسوب. این دستگاه قادر است سرعت بادهای مختلف را تا حداکثر ۱۰ متر در ثانیه در ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری (۱۰۰ کیلومتر در ساعت) ایجاد کند.

خاک تثبیت‌شده درون سینی که سطح آن‌ها به اندازه‌های سه و پنج سانتی‌متر اشباع‌شده بود درون دستگاه تونل باد قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در معرض سرعت‌های مختلف باد قرار گرفتند. نمونه‌گیر واقع در انتهای تونل باد، ذرات خاک جداشده از سطح نمونه تثبیت‌شده را از هوا جمع‌آوری کرد، سپس ذرات خاک جمع‌آوری‌شده اندازه‌گیری شدند. مقدار فرسایش بادی با استفاده از نسبت جرم رسوب تولیدشده به جرم کاهش‌یافته از سطح نمونه در معرض فرسایش محاسبه شد. برای ارزیابی مقاومت نمونه‌ها در برابر فرسایش بادی، پارامترهای نوع محیط (محیط بیرونی و آزمایشگاهی) و مدت زمان در فرآیند خشک کردن (دوره ۳-۱ ماهه) مورد بررسی قرار گرفت. در پایان میزان تولید سیمان زیستی و اتصال ذرات خاک توسط دستگاه XRD و SEM مورد بررسی قرار گرفت (Hazirei et. al. 2017).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

به‌منظور تحلیل داده‌ها از نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری Man witney استفاده شد. سطح اختلاف ۰/۰۵> p مرز معنادار بودن اختلاف در نظر گرفته شد. همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان نتیجه ارائه گردید.

نتایج

pH و دمای ثبت‌شده برای نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده به ترتیب در محدوده ۵ تا ۷ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تا ۴۴ درجه سانتی‌گراد بود. مقدار سدیم، پتاسیم کل و رسانایی الکتریکی ثبت‌شده نمونه‌ها به ترتیب در محدوده ۰/۱ تا ۱/۲ mg/kg ، ۵ تا ۲۰ mg/kg و ۱۲۰ تا ۱۴۵ µS/cm بود (جدول ۱).

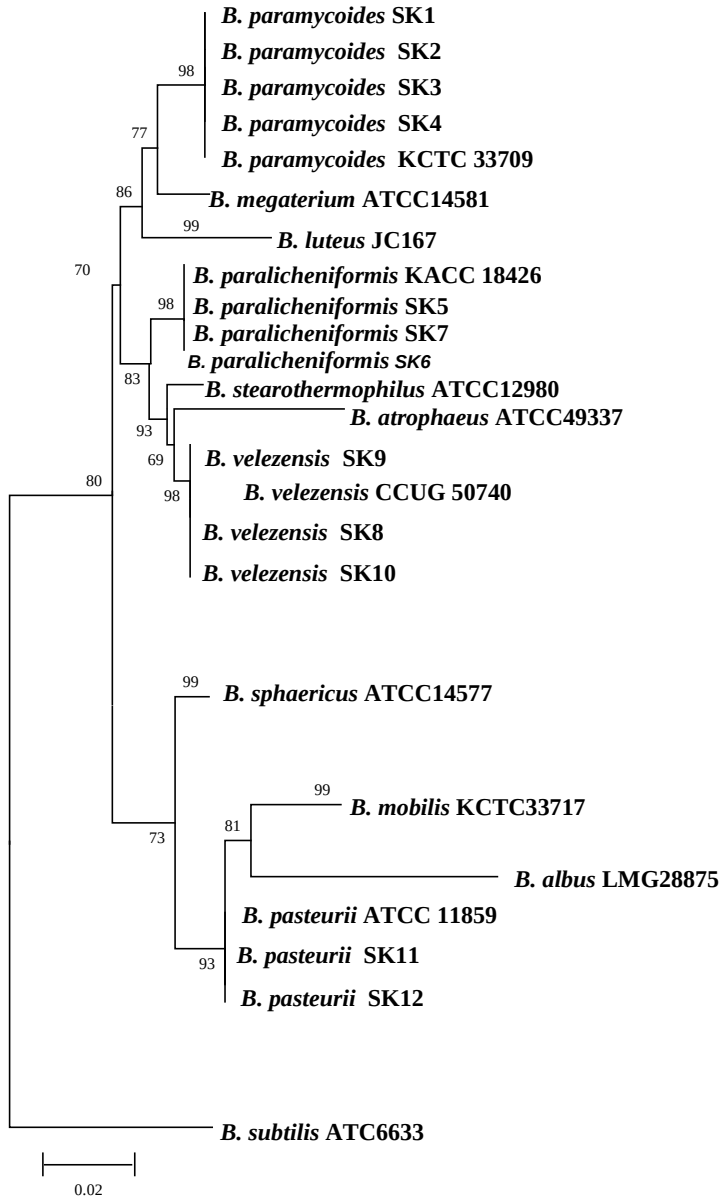
از میان ۲۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده تعداد ۱۲ سویه (۶٪) با استفاده از تست‌های ریخت‌شناسی، کشت و بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی شامل PCR ژن gyrA و PCR و تعیین توالی ژن 16SrRNA به‌عنوان باسیلوس-های اوره آز مثبت شناسایی شد، این سویه‌ها متعلق به چهار گونه مختلف شامل *باسیلوس پارامایکوئیدس* چهار سویه (۳۳/۳۳٪)، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* سه سویه (٪ ۲۵)، *باسیلوس ولزنسیس*سه سویه (٪ ۲۵) و *باسیلوس پاستوری* دو ایزوله (۱۶/۶۶٪) بودند (جدول ۲). توالی‌های سویه‌های باسیلوس مورد بررسی در این مطالعه در پایگاه GenBank با شماره‌های دسترسی *باسیلوس پارامایکوئیدس* (ON834526)، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* (ON834493)، *باسیلوس ولزنسیس* (ON834525) و *باسیلوس پاستوری* (ON834547) ثبت شد.

ارتباط بین سویه‌های ما و گونه‌های استاندارد باسیلوس با استفاده از درخت فیلوژنتیکی با ارزش بوت استرپ بالای ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزار MEGA 8، با استفاده از روش همسایگی با ماتریکس میانگین تفاوت‌های جفت بازی ترسیم شد. (شکل ۱).

جدول ۲- مشخصات نمونه گیری، خصوصیات بیوشیمیایی و تشخیص مولکولی سویه‌های باسیلوس

Table 2- Sampling characteristics, biochemical characteristics and molecular diagnosis of Bacillus strains

آنالیز تعیین توالی ژن 16SrRNA سویه‌ها			خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌ها											مشخصات سویه‌های باسیلوس	
تشخیص نهایی	تفاوت در تعداد توالی	میزان شباهت**(%)	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز ژلاتین	تجزیه زانتین	Voges–Proskauer	احیای نیترات	تولید اسید از گلوکز	اندول	سیترات	رشد در حضور 7%NaCl	دمای مناسب رشد(^{0}C)	کانون رنگ‌گرد	مشخصات سویه‌ها
B. paramycoides	2/800	99/96	-	-	-	+	+	+	+	-	+	30	کانون ۲ و ۴	SK1, SK2, SK3 and SK4
B. paralicheniformis	0/952	100	-	-	-	-	+	+	+	-	-	30	کانون ۱ و ۵	SK5, SK6 and SK7
B. velezensis	0/740	100	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	کانون ۳و ۶	SK8, SK9 and SK10
B. pasteurii	0/845	100	-	-	-	-	+	-	-	-	-	30	کانون ۷	FK11 and FK12



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی سویه‌های باسیلوس مورد مطالعه و سویه‌های مرجع باسیلوس روش Neighbor- joining و ضریب Botstrap هزار

(*باسیلوس سوبتیلیس* به‌عنوان خارج گروه در نظر گرفته شده است)

Figure 1- Phylogenetic tree of studied Bacillus strains and Bacillus reference strains by Neighbor-joining method and Botstrap coefficient of 1000 (*Bacillus subtilis* is considered as an outgroup)

بررسی فعالیت MICP توسط سویه‌ها

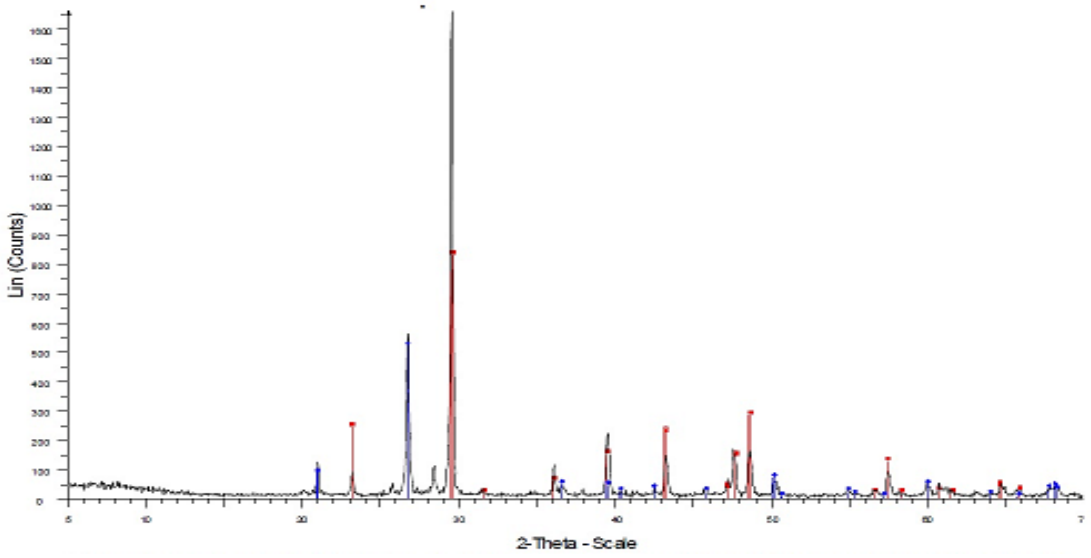
برای تعیین فعالیت آنزیم اوره آز و تولید کربنات کلسیم سویه‌های انتخابی، EC و OD سویه‌ها در محیط‌های حاوی اوره مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد سویه‌های SK1, SK2, SK3 و SK4 که به‌عنوان

باسیلوس پارامایکوئیدس شناسایی شدند با ۴/۴۰×۱۰^{۳} واحد در لیتر اوره آز و ۲۴/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کربنات کلسیم، بیشترین فعالیت آنزیم اوره آز و تولید کربنات کلسیم را داشتند. پس از آن سویه‌های SK11 و SK12 به‌عنوان *باسیلوس پاستروئی* شناسایی شدند با ۳/۹۳×۱۰^{۳} واحد در لیتر اوره آز و ۲۲/۸۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کربنات کلسیم، سویه‌های SK5, SK6 و SK7 که به‌عنوان *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* شناسایی شدند با ۳/۴۳ ×۱۰^{۳} واحد در لیتر اوره آز و ۱۸/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کربنات کلسیم و سویه‌های SK8, SK9 و SK10 که به‌عنوان *باسیلوس ولزنسیس* شناسایی شدند با ۲/۶ ×۱۰^{۳} واحد در لیتر اوره آز و ۱۶/۴۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کربنات کلسیم دارای فعالیت MICP بودند.

نتایج مطالعه ما نشان داد که بیشترین نرخ رشد و شرایط بهینه برای فعالیت اوره آز و تولید کربنات کلسیم (MICP) سویه‌های مورد بررسی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۹ و شوری ۶ ٪ و کمترین نرخ رشد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد pH ۵ و شوری ۱٪ رخ می‌دهد.

نتایج تثبیت خاک

بررسی میزان تثبیت خاک توسط فرآیند MICP به‌وسیله سویه‌های مورد بررسی، توسط کشت سویه‌ها درون خاک فرسوده شده و آنالیز آن توسط XRD و SEM انجام شد و نتایج نشان داد که میزان MICP در خاک فرسایش یافته توسط باسیلوس‌های جداسازی شده در مقایسه با سویه کنترل دارای اختلاف معناداری بود. نتایج همچنین نشان داد که بیشترین میزان فرآیند MICP و تثبیت خاک به ترتیب در *باسیلوس پارامایکوئیدس*، *باسیلوس پاستیوری*، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* و *باسیلوس ولزنسیس* مشاهده گردید.



Sampel-1 Administrator - File: sampel-12 .raw -Type: 2 Th /Th locked - Start: 5 .000 ° - End: 70. 00 0 ° - Step: 0.0 5 0 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 0s - 2 -The ta: 5.0 0 0 ° - Theta: 2.5 0 0 ° - Chi: Operations: Import

24 -0027(D) - Calcite - $CaCO_3$ - Y: 50.00% - dxb y: 1. - WL: 1 .5406 - Hexagonal (Rh) - a 4.99 000 - b 4.99000 - c17 .00200 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 1 2 0.0 0 0 - Primitive - R-3 c (167) -6-366.633-I/Ic

46-1045 (*) - Quartz, syn- SiO2-Y: 50.00% - dxb y: 1. - W L: 1.5406 - Hexagonal - a 4.91344 -b4.91344 - c5.40524 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 120.000 - Primitive - P3221 (154) -3 -113.010 -I/IcPD

شکل ۲- آزمون XRD تولید کربنات کلسیم در محیط خاک سویه باسیلوس پارامایکوئیدس

Figure 2- XRD test of calcium carbonate production in the soil environment of Bacillus paramycoides strain

بررسی مقاومت خاک‌های تیمار شده در برابر فرسایش بادی

نتایج تست تونل باد نشان داد که میزان مقاومت خاک تیمار شده در برابر فرسایش بادی در تونل باد، بین نمونه شاهد منفی و خاک تیمار شده با سویه‌های تولیدکننده سیمان زیستی در محیط و زمان‌های مختلف شامل محیط بیرونی و آزمایشگاهی و زمان یک تا سه ماه (بر سطح احتمال ۱٪) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان شار اتلاف خاک (فرسایش) در نمونه‌های خشک‌شده با *باسیلوس ولزنسیس* محیط آزمایشگاهی با ۵۶/۴ درصد تلفات خاک، درحالی‌که کمترین میزان شار اتلاف خاک در نمونه‌های خشک‌شده با باکتری *باسیلوس پارامایکوئیدس* در فضای باز با ۳۹/۹ درصد تلفات مشاهده شد. بیشترین میزان فرسایش خاک در نمونه‌های تیمار شده با باسیلوس ولزنسیس یک‌ماهه با ۵۰/۳۱ درصد و کمترین میزان فرسایش خاک در نمونه‌های تیمار شده سه‌ماهه با ۴۱/۸۴ درصد تلفات مشاهده شد. با توجه به افزایش سرعت باد، نرخ فزاینده فرسایش خاک در نمونه‌های تیمار شده با باکتری‌های مولد سیمان زیستی نسبت به نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p\leq0.03$). (جدول ۳)

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار اثر محیط، زمان و جنس باکتری بر میزان مقاومت خاک به فرسایش بادی در تونل بادی در پنج تیمار موردمطالعه

Table 3- Analysis of Variance Results for the Effects of Treatment, Environment, Time, and Bacterial Strain on Soil Wind Erosion Resistance in Wind Tunnel in Five Studied Treatments

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
محیط	1	4094/68	4094/68**
زمان	2	1293/06	646/53**
محیط* زمان	2	51/46	25/73**
باکتری	5	157172/16	31434/43**
محیط* باکتری	5	1281/71	256/34**
زمان* باکتری	10	407/06	40/71**
محیط* زمان*باکتری	10	87/98	8/80**
خطا	72	18/67	0/26

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

بحث

خاک عنصر کلیدی اکوسیستم‌های زمین است، به‌طوری‌که تأمین‌کننده کالاها، منابع و خدمات برای بشریت است که کلید دستیابی به تمدن‌های پایدار است. فرسایش خاک به دلیل اختلال در چرخه‌های طبیعی و تولید محصولات کشاورزی، تهدیدی بزرگ برای سلامت انسان و کره زمین است (Vågen and Winowiecki, 2019). ازاین‌رو، جوامع بشری برای غلبه بر این تهدید، از روش‌های تثبیت مختلفی مانند فشرده‌سازی، کسری، خشک‌کردن یا انجماد، عملیات حرارتی و عملیات الکتریکی خاک استفاده کردند. بااین‌حال، این رویکردها سازگار با محیط‌زیست و مقرون به‌صرفه نیستند و ممکن است باعث آسیب بیشتر به خاک شوند و حتی در برخی موارد سرعت فرسایش را افزایش دهند (Afrin, 2017). یافتن یک روش سریع و مؤثر تثبیت خاک می‌تواند تغییری در ارتقای سلامت محیط‌زیست و عمومی ایجاد کند. در سال‌های اخیر استفاده از MICP توسط باکتری‌های هیدرولیز اوره به‌عنوان یک روش جایگزین برای تثبیت خاک پیشنهاد شده است و اخیراً به‌سرعت توسعه یافته است (Anbu P, 2016).

باکتری‌های مولد اوره آز ساکنان معمولی خاک در محیطی با عرضه منظم اوره هستند. علاوه بر این، نتایج مطالعه ما و سایر مطالعات نشان داد که باکتری اورئولیتیک بومی به‌دست‌آمده از محیط‌های خشن ایران، احتمالاً در فرکانس‌های پایین در نمونه‌های اولیه وجود دارد، اما به دلیل وجود اوره کم، غیرقابل شناسایی است (Stabnikov

et al., 2013, Seifan and Berenjian, 2019). با این وجود، پس از تلقیح نمونه‌ها در محیط‌های حاوی اوره، می‌توان گونه‌های مختلف باکتری‌های اورئولیتیک را جداسازی و شناسایی کرد و آن‌ها را برای رشد در شرایط محیطی شدید سازگار کرد. اجرای روش‌های جدید جداسازی و شناسایی مانند کشت اختصاصی و توالی یابی ژن‌های مختلف در محیط‌های بکر و ناشناخته، اطلاعات مهم‌تری در مورد ترکیب جمعیت میکروبی این محیط به ما می‌دهد (Stabnikov et al., 2013, Seifan and Berenjian, 2019). در این مطالعه ۲۰۰ نمونه خاک مورد بررسی قرار گرفت، و تعداد ۱۲ سویه (۶٪) باسیلوس اوره آز مثبت جداسازی شد. این سویه‌ها متعلق به ۴ گونه مختلف شامل سویه‌های *باسیلوس پارامایکوئیدس* ۴ سویه (۳۳/۳۳٪)، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس* ۳ سویه (٪ ۲۵)، *باسیلوس ولزنسیس*۳ سویه (٪ ۲۵) و *باسیلوس پاستوری* ۲ ایزوله (۱۶/۶۶٪) بودند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که شرایط بهینه انجام فرآیند MICP توسط سویه‌ها ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۹ و شوری شش درصد است. جهت کنترل سویه‌ها از سویه استاندارد *اسپوروسارسینا پاستورویی* ATCC ۱۱۸۵۹ به‌عنوان سویه کنترل استفاده گردید. این نتایج با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد که در آن‌ها شایع‌ترین گونه‌های باسیلوس جداشده به *ترتیب باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس مگاتاریوم و باسیلوس پاستوری* بودند. نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات نشان داد که فراوانی باسیلوس اوره آز مثبت در مقایسه با جنس‌های دیگر بالا است. این احتمال وجود دارد که تمام شرایط محیطی و تغذیه‌ای برای زنده ماندن و رشد جنس باسیلوس در مقایسه با سایرین در دوران سکون مساعد باشد (Stabnikov et al., 2013, Elmanama and Alhour, 2013, Ramanathan et al., 2016).

علاوه بر این، میزان جداسازی کلی گونه‌های باسیلوس واجد اوره آز در این مطالعه (۶٪) درصد بود که در محدوده نرخ گزارش‌شده توسط مطالعات هند و صربستان قرار داشت که به ترتیب دارای ۱۵ درصد و ۱۳/۸ درصد جداسازی بودند (Anitha et al., 2018, Burbank et al., 2012, Šovljanski et al., 2021). بااین‌حال، این میزان در مقایسه با نتایج گزارش‌شده از ایالات متحده آمریکا، چین و ژاپن که به ترتیب دارای ۶٪ و ۵٪ درصد جداسازی بودند، بالا بود (Yang et al., 2020, Gowthaman et al., 2019).

نتایج مطالعه ما مطابق با سایر مطالعات انجام شده بر روی ویژگی‌های زیستی جنس باسیلوس نشان داد که انواع مختلف باسیلوس‌ها به دلیل مقاومت ذاتی بالا در برابر شرایط سخت محیطی، توانایی تکثیر و رشد در محیط‌های مختلف را دارند؛ مانند غلظت بالای نمک و آمونیوم؛ بنابراین می‌توانند در شرایط نامساعد محیطی به فعالیت و رشد خود ادامه دهند و آنزیم‌های مختلفی از جمله آنزیم هیدرولیتیک اوره آز تولید کنند که فرآیندهای بیولوژیکی مانند MICP را انجام می‌دهند (Sohail et al., 2022, Mutitu et al., 2019a).

ساده‌ترین و معمول‌ترین مکانیسم برای تشکیل رسوبی میکروبی کربنات استفاده از باکتری‌های اورئولیتیک به‌عنوان کاتالیزور واکنش‌های بیوشیمیایی است که این باکتری در محیط کشت آزمایشگاهی کشت و به درون خاک تزریق می‌شود که می‌تواند باعث سیمانی شدن قابل کنترل در زمان بسیار سریع در مقایسه با سیمانی شدن شیمیایی شود (Bibi et al., 2018). بیشترین مطالعات رسوب میکروبی کربنات از طریق هیدرولیز اوره با استفاده از باکتری *باسیلوس پاستورویی* ATCC ۶۴۵۳ بوده که امروزه تحت عنوان *اسپوروسارسینا پاستورویی* طبقه‌بندی‌شده است. فعالیت آنزیمی بالا و عدم لخته شدن از جمله دلایل گسترده جهت استفاده از این باکتری می‌توان اشاره کرد (Sohail et al., 2022, Mutitu et al., 2019a).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که خاک موجود در مناطق مختلف ایران حاوی تنوع بالایی از گونه‌های باسیلوس واجد فعالیت اوره آز است به‌طوری‌که از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده تعداد ۱۲ سویه باسیلوس که متعلق به چهار گونه مختلف شامل *باسیلوس پارامایکوئیدس*، *باسیلوس پارالیکنیفورمیس*، *باسیلوس ولزنسیس*، *باسیلوس پاستوری* بودند همگی شرایط اوره آز

را داشتند. نتایج این مطالعه در راستای دیگر مطالعات انجام شده از جمله مطالعات زیر قرار داشت: Gowthaman و همکاران در ژاپن که در سال ۲۰۱۹ با تثبیت خاک شیب که با استفاده از باکتری‌های مولد MICP انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که باکتری*Psychrobacillus* sp اورئولیتیک بومی موجود در خاک شیب دارای فعالیت اوره آز بسیار بالا در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای MICP را دارا است. در این مطالعه از سه منطقه ۹ باکتری به ترتیب Bacillus (۲ مورد)، *Psychrobacillus* sp (۲ مورد) *Lysinibacillus* sp(۲ مورد) *Sporosarcina* sp، (۲ مورد) و *Viridibacillus* arvi و *Lysinibacillus xylanilyticus* هرکدام ۱ مورد جداسازی شدند (Yang et al., 2020, Gowthaman et al., 2019 فو و همکاران در کره جنوبی که در سال ۲۰۲۳ از دو سویه *S. pasteurii* و*S. saprophyticus* جهت رسوب کلسیتی استفاده کردند. در این مطالعه *S. saprophyticus* پنج برابر بیشتر از *S. pasteurii* در شرایط یکسان pH 5 و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درجه فعالیت و رسوب‌گذاری بیشتری را از خود نشان دادند (Fu et al., 2023).

همچنین در این مطالعه، کارایی فرآیند MICP به‌عنوان یک روش افزایش مقاومت خاک در مقابل تنش برشی جریان باد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده ازMICP در سطح خاک می‌تواند اثر بسیار قابل‌توجهی در کاهش تلفات خاک ناشی از فرسایش بادی به‌ویژه در سرعت‌های بالای جریان باد داشته باشد به‌طوری‌که استفاده از تیمار MICP، نسبت تلفات خاک را در مقایسه با نمونه شاهد در سرعت جریان برابر با ۵۵ کیلومتر بر ساعت، در حدود ۱۰۰ برابر کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد افزایش مقاومت لایه سطحی نمونه‌ها در اثر تولید سیمان بیولوژیک ناشی از فناوری MICP دلیل اصلی در کاهش تلفات خاک است

در مطالعه Chen و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیان کردند کارایی روش تثبیت خاک به کمک MICP تابعی از نوع اختلاط باکتری و قرارگیری و توزیع آن در محیط خاک است و این امر در خاک‌هایی با بافت متفاوت یکسان نیست، تزریق باکتری در خاک‌های درشت بافت مانند ماسه و شن کارایی روش تیمار MICP و تولید کلسیت بهبود می‌بخشد. همچنین ظرفیت باکتری برای تولید کلسیت با اندازه ذرات خاک مورد آزمایش رابطه دارد میزان کلسیت مورد نیاز در این آزمایش در خاک رسی کمتر از خاک شنی بود همچنین این مطالعه بیان می‌کند که افزایش مقاومت خاک نسبت به روانی و فرسایش با میزان ایجاد پل‌های کلسیت در بین ذرات خاک رابطه مستقیم دارد که با نتایج مورفولوژی نمونه سیمانی شده بیولوژیکی MICP توسط SEM که در آن کریستال‌های کلسیت در بین ذرات خاک تشکیل‌شده در مطالعه حاضر همخوانی داشت .(Chen et al., 2021).

با توجه به توانایی باسیلوس‌های تولیدکننده اوره آز در مصرف نیتروژن و تولید سیمان زیستی در خاک، می‌توان از این باکتری‌ها در تثبیت و بهسازی خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی استفاده کرد. به‌عنوان‌مثال، با استفاده از باسیلوس‌های تولید کننده اوره آز، می‌توان به کاهش نیاز به کودهای شیمیایی به دلیل مصرف و تبدیل فرم‌های مختلف نیتروژن در خاک و به دست آوردن عملکرد بهتر محصولات کشاورزی کمک کرد. در نتیجه، استفاده از باسیلوس‌های تولیدکننده اوره آز در بهسازی خاک و کاهش نیاز به کودهای شیمیایی، می‌تواند به بهبود کیفیت خاک و افزایش عملکرد محصولات کشاورزی در اراضی بایر جنوب ایران کمک کند. این نتایج می‌تواند به توسعه پایدار و بهره‌وری بیشتر در کشاورزی و دامداری در این منطقه کمک کند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که باسیلوسها، توانایی بالقوه‌ای برای سازگاری با شرایط سخت محیطی را دارند، همچنین با استفاده از باسیلوس‌های تولیدکننده MICP در سطح خاک می‌توان تأثیر بسزایی در تثبیت و کاهش تلفات خاک در اثر فرسایش را داشت، همچنین این پدیده می‌تواند سبب افزایش مواد درون خاک و بهبود کیفیت آن در پی فعالیت‌های میکروبی گردد.

Reference

1. Mozaffari H, Rezaei M, Ostovari Y. Soil sensitivity to wind and water erosion as affected by land use in southern Iran. Earth. 2021;2(2):287-302.
2. Vågen T-G, Winowiecki LA. Predicting the spatial distribution and severity of soil erosion in the global tropics using satellite remote sensing. Remote Sensing. 2019;11(15):1800.
3. Kopittke PM, Menzies NW, Wang P, McKenna BA, Lombi E. Soil and the intensification of agriculture for global food security. Environ Internat. 2019;132:105078.
4. Farashi A, Shariati M. Biodiversity hotspots and conservation gaps in Iran. J nature conserv. 2017;39:37-57.
5. Mohammadi S, Balouei F, Haji K, Khaledi Darvishan A, Karydas CG. Country-scale spatio-temporal monitoring of soil erosion in Iran using the G2 model. Internat J Digital Earth. 2021;14(8):1019-39.
6. Patault E, Ledun J, Landemaine V, Soulignac A, Richet J-B, Fournier M, et al. Analysis of off-site economic costs induced by runoff and soil erosion: Example of two areas in the northwestern European loess belt for the last two decades (Normandy, France). Land Use Policy. 2021;108:105541.
7. Castro-Alonso MJ, Montañez-Hernandez LE, Sanchez-Muñoz MA, Macias Franco MR, Narayanasamy R, Balagurusamy N. Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts. Frontiers in Materials. 2019;6:126.
8. Kalkan E. A Review on the Microbial Induced Carbonate Precipitation MICP for Soil Stabilization. Internat J Earth Sci Knowl Applic. 2020;2(1):38-47.
9. Mutitu KD, Munyao MO, Wachira MJ, Mwirichia R, Thiong'o KJ, Marangu MJ. Effects of biocementation on some properties of cement-based materials incorporating Bacillus Species bacteria–a review. J Sust Cem-Bas Mater. 2019;8(5):309-25.
10. Celandroni F, Vecchione A, Cara A, Mazzantini D, Lupetti A, Ghelardi E. Identification of Bacillus species: Implication on the quality of probiotic formulations. PloS one. 2019;14(5):e0217021.
11. Davarpanah M, Azadi D, Shojaei H. Prevalence and molecular characterization of non-tuberculous mycobacteria in hospital soil and dust of a developing country, Iran. Microbiology. 2019;165(12):1306-14.
12. Liu Y, Stefanic P, Miao Y, Xue Y, Xun W, Shen Q, et al. Housekeeping gene gyrA, a potential molecular marker for Bacillus ecology study. bioRxiv. 2022.
13. Catia A, Miranda C, Martins OB, Clementino MM. Species-level identification of Bacillus strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. Antonie van Leeuwenhoek. 2008;93(3):297.
14. Azadi D, Shojaei H. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenol and sodium sulfate by *Nocardia* species isolated and characterized from Iranian ecosystems. Scientific reports. 2020;10(1):1-12.
15. Jeon Y-S, Chung H, Park S, Hur I, Lee J-H, Chun J. jPHYDIT: a JAVA-based integrated environment for molecular phylogeny of ribosomal RNA sequences. Bioinformatics. 2005;21(14):3171-3.
16. Almajed A, Tirkolaei HK, Kavazanjian E, Hamdan N. Enzyme induced biocementated sand with high strength at low carbonate content. Scientific reports. 2019;9(1):1-7.
17. Whiffin VS, Van Paassen LA, Harkes MP. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal. 2007;24(5):417-23.

18. Achal V, Mukherjee A, Basu P, Reddy MS. Strain improvement of Sporosarcina pasteurii for enhanced urease and calcite production. J indus Microbiol Biotechnol. 2009;36(7):981-8.

19. Gowthaman S, Iki T, Nakashima K, Ebina K, Kawasaki S. Feasibility study for slope soil stabilization by microbial induced carbonate precipitation (MICP) using indigenous bacteria isolated from cold subarctic region. applied sciences. 2019;1(11):1-16.

20. Ivanov V, Chu J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. Rev Environ Sci BioTechnol. 2008;7(2):139-53.

21. Afrin H. A review on different types soil stabilization techniques. Internat J Transport Engin Technol. 2017;3(2):19-24.

22. Anbu P KC, Shin YJ ,So JS. . . Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus. 2016 5(1):1-26.

23. Seifan M, Berenjian A. Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world .Appl microbiol biotechnol. 2019;103(12):4693-708.

24. Stabnikov V, Jian C, Ivanov V, Li Y, Biotechnology. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. World Journal of Microbiology. 2013;29(8):1453-60.

25. Xu J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. Mol Ecol. 2006;15(7):1713-31.

26. Elmanama AA, Alhour MJJoAS. Isolation, characterization and application of calcite producing bacteria from urea rich soils. Engineering Research. 2013;3(4):388-99.

27. Ramanathan G, Kumar TV, Rama R, Vijayalalitha R. Isolation of cement degrading bacteria and screening of their efficacy for biocementation. Pharm Chem Biol Sci. 2016.۲۷-۳:۵۱۸;

28. Anitha V, Abinaya K, Prakash S, Seshagiri Rao A, Vanavil. *Bacillus cereus* KLUVAA mediated biocement production using hard water and urea. Chemical biochem engin q. 2018;32(2):257-66.

29. Burbank MB, Weaver TJ, Williams BC, Crawford RLJGJ. Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. Geomicrobiol J. 2012;29(4):389-95.

30. Šovljanski O, Pezo L, Stanojev J, Bajac B, Kovač S, Tóth E, et al. Comprehensive profiling of microbiologically induced CaCO3 precipitation by ureolytic Bacillus isolates from alkaline soils. Microorganisms. 2021;9(8):1691.

31. Yang Y, Chu J, Cao B, Liu H, Cheng L. Biocementation of soil using non-sterile enriched urease-producing bacteria from activated sludge. J Clean Produc. 2020;262:121315.

32. Sohail MG, Al Disi Z, Zouari N, Al Nuaimi N, Kahraman R, Gencturk B, et al. Bio self-healing concrete using MICP by an indigenous Bacillus cereus strain isolated from Qatari soil. Construction and Building Materials. 2022;328:126943.

33. Mutitu KD, Munyao MO, Wachira MJ, Mwirichia R, Thiong'o KJ, Marangu MJ. Effects of biocementation on some properties of cement-based materials incorporating Bacillus Species bacteria–a review. Journal of Sustainable Cement–Based Materials. 2019;8(5):309-25.

34. Bibi S, Oualha M, Ashfaq MY, Suleiman MT, Zouari N. Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. RSC Advances. 2018;8(11):5854-63.

35. Fu T, Saracho AC, Haigh SK. Microbially induced carbonate precipitation (micp) for soil strengthening: a comprehensive review. Biogeotechnics. 2023:100002.

36. Chen L, Song Y, Huang J, Lai C, Jiao H, Fang H, et al. Critical review of solidification of sandy soil by microbially induced carbonate precipitation (MICP). Crystals. 2021;11(12):1439.

37. Skevi L, Reeksting BJ, Hoffmann TD, Gebhard S, Paine K. Incorporation of bacteria in concrete: The case against MICP as a means for strength improvement. Cement and Concrete Composites. 2021;120:104056.

38. Mondal S, Ghosh AD. Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete. Construction and Building Materials. 2019;225:67-75.

39. Al-Thawadi SM. High strength in situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Ph.D. thesis. Perth Western Australia. Mudroch University; 2008, 264.

40. Hazirei F, Zare Ernani M. Investigation of effect of clay-lime mulch for sand dunes fixation. Water and Soil. 2013 Jun 22;27(2):373-80.

Isolation and Molecular Identification of Urease Producing Bacilli from Iranian Soils for Biocement Production

S. Fazelikia, S. A. Abtahi*, M. Kargar, and M. Jafarinia

Ph.D. graduate, Soil fertility and biotechnology management, Department of Soil Sciences, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran. **fazelikias@yahoo.com**

Professor, Department of Soil Sciences, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran. **seyedaliabtahi@yahoo.com**

Professor, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. **microkargar@gmail.com**

Assistant Prof., Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran. **jaafarinia33@gmail.com**

Received: June 2023 and Accepted: August 2023

Abstract

Microbial urease has found applications in biotechnology, agriculture, medicine, construction industry, and geotechnical engineering. Microbially-Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) technology is an ecological process based on microbial urease activity that has recently been used for soil stabilization. Due to its catabolic ability and high survival rate, Bacillus is considered to be a suitable candidate for use in the biocementation process. It was the objective of the present study to isolate and identify different Bacillus strains with MICP potential from various ecosystems in Iran. For this purpose, 200 soil samples were collected from different regions in Iran and subjected to microbiological and molecular analyses including PCR amplification and sequence analysis of gyrA and 16S rRNA genes in order to isolate and identify bacillus strains. Moreover, tests were performed on the strains to examine their growth in the presence of urea and under different salinity, pH, and temperature levels while soils stabilized with selected strains were also subjected to SEM and XRD examinations and wind tunnel analyses to determine the ability of the isolates to produce biocement. A total of 12 isolates (6%) were identified as urease-positive bacilli belonging to four different species, including four strains of *Bacillus paramycoides* (33.33%), three of *Bacillus paralicheniformis* (25%), three of *Bacillus velezensis* (25%), and two of *Bacillus Pasteuri* (16.66%). The optimal conditions for MICP by the isolates included a temperature of 30 °C, a pH level of 9, and a salinity of 6%. After MICP, the ratio of soil loss at a flow rate of 95 km/h was found to be 100-fold. The results showed that bacilli possess the inherent ability to adapt to harsh environmental conditions. It was also found that MICP-producing bacilli applied on soil surface can significantly contribute to reduced soil loss to erosion.

Keywords: Biocement, Bacillus, Urease, Soil improvement

*- Corresponding author's email: seyedaliabtahi@yahoo.com