Journal of Microbial World
Volume 14, No. 2, August 2021

Original Article

Evaluation of effective factors in biocement production by Bacillus spp. isolated from lime soils of southern Iran

Somaye Fazelikia[1], Seyed Ali Abtahi[1], Mohammad Kargar [2], Mojtaba Jafarinia[3]

[1] Department of Soil Sciences, Marvdasht branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

[2] Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

[3] Department of Biology, Marvdasht branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Calcite precipitation by microbial stimulation (MICP) is the new method which used for soil stabilization and solidity. Biocementation is an ecological process based on microbial urease enzyme activity. The present study aimed to isolation and identification of Bacillus spp. with MICP potential from various ecosystems of Iran.

Materials & Methods: This cross-sectional study was conducted on 200 soil samples collected from arid and desert ecosystems of Iran. Bacillus were isolated and characterized by conventional microbiology tests and molecular methods include the amplification and sequences analysis of gyrA and 16S rRNA genes. Growth in presence of urea, different salinity, pH and temperature, also SEM, XRD and wind tunnel analysis were used to determine biocementation ability.

Results: A total of 5 Bacillus isolate with strong urease activity belonging to 4 different species include B. amyloliquefaciens, B. thuringiensis, B. carboniphilus and B. oleos were identified. Optimum conditions for MICP by isolates are 35°C, pH 8.8 and 6% salinity. Moreover, the results of wind tunnel after MICP showed a 100-fold reduction in soil loss at a flow rate of 100 km/h.

Conclusion: The results showed that indigenous *Bacillus* spp. have a significant potential to produce bio-cement. Therefore, its suggest the MICP process have been used to reduce soil losses due to wind erosion, stabilization of loose sands and ground consolidation in the desert soils of the country.

Keywords: Soil stabilization, MICP, Biocement, *Bacillus* spp.

Received: 15 February 2021 Revised: 9 June 2021 Accepted: 24 Aguguest 2021

Correspondence to: Mohammad Kargar
Tel: +98 9173149203
E-mail: microkargar@gmail.com

Journal of Microbial World 2021, 14(3): 20-31
DOI: 10.30495/jmw.2021.690434

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره دوم (پیاپی ٤٧) تابستان ١٤٠٠
صفحات ٣١-٢٠

Original Article

ارزیابی عوامل مؤثر در تولید بایوسمنت در باسیلوس‌های جدا شده از خاک‌های آهکی جنوب ایران

سیده سمیه فاضلی کیا[١]، سید علی ابطحی[١]، محمدکارگر*[٢]، مجتبی جعفری نیا[٣]

[١] گروه خاکشناسی، واحدمرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران. [٢] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. [٣] گروه زیست شناسی، واحدمرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: یکی از روش‌های جدید به منظور تثبیت و استحکام خاک رسوب کلسیت به واسطه تحریک میکروبی (MICP) است. تولید سیمان زیستی یک فرآیند اکولوژیکی مبتنی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز میکروبی است. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی گونه‌های باسیلوس دارای پتانسیل MICP از اکوسیستم‌های متنوع ایران انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی بر روی ٢٠٠ نمونه خاک جمع‌آوری شده از اکوسیستم‌های خشک ایران انجام شد. جدایه‌های باسیلوس با استفاده از آزمون‌های متداول میکروبیولوژی و روش‌های مولکولی از جمله تجزیه و تحلیل توالی SrRNA 16 و gyrA جداسازی وشناسایی شدند. برای تعیین توانایی تولید سیمان زیستی از آنالیز رشد در حضور اوره، مقادیرمختلف شوری، pH، دما وهمچنین آنالیز SEM، XRD و تونل باد استفاده شد.

یافته‌ها: از بین جدایه‌های باسیلوس شناسایی شده، ٥ سویه دارای فعالیت اوره‌آزی قوی متعلق به ٤ گونه مختلف باسیلوس آمیلولیکویفشنس، باسیلوس تورنژینسیس، باسیلوس کاربنیفیلوس و باسیلوس اولیوس شناسایی گردید. شرایط بهینه جدایه‌های منتخب برای انجام MICP حرارت ٣٥ درجه سلسیوس، pH= ٨/٨ و شوری ٦ درصد بود. همچنین نتایج تونل باد، کاهش ١٠٠ برابری تلفات خاک در سرعت جریان ١٠٠ کیلومتر در ساعت را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که جدایه‌های بومی باسیلوس پتانسیل قابل توجهی به منظور تولید سیمان زیستی دارند. از این رو استفاده ازفرایند MICP در سطح خاک به منظور کاهش تلفات خاک ناشی از فرسایش بادی، تثبیت شن‌های روان واستحکام زمین در خاک‌های صحاری کشور پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: تثبیت خاک، MICP، سیمان زیستی، باسیلوس.

دریافت مقاله: ١٣٩٩/١١/٢٧ ویرایش مقاله: ١٤٠٠/٣/١٩ پذیرش مقاله: ١٤٠٠/٦/٢

مقدمه

زمین و خاک بسیار گران‌بها است و نقش مهمی در زندگی هر موجود زنده‌ای در این دنیا دارد. از بین رفتن خاک از سطح زمین در اثر فرسایش در سراسر جهان مشاهده می‌شود و تأثیر منفی بر بهره وری همه اکوسیستم‌ها و سلامت انسان و حیوانات دارد (١). همچنین فرسایش خاک به عنوان یک تهدید بزرگ برای امنیت غذایی و یک مشکل مهم برای توسعه پایدار شناخته شده است. همراه با افزایش جمعیت انسانی، فرسایش

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.
تلفن: ٠٩١٧٣١٤٩٢٠٣ پست الکترونیک: microkargar@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

خاک، کمبود انرژی، از دست دادن تنوع زیستی و در کمبود آب از مشکلات اصلی زیست محیطی در سراسر جهان هستند (۲). فرآیند فرسایش باعث تغییر خواص بیولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی خاک و در نتیجه کاهش بهره‌وری و حاصلخیزی خاک می شود(۳و٤). این امرباعث نگرانی محققان در زمینه‌های مختلف در مورد زیان‌ها و هزینه‌های مربوطه شده است. درسال‌های اخیر به منظور مدیریت اثرات فرسایش خاک در محل و خارج از محل فرسایش بر روی اکوسیستم‌های خاکی، راهبردهای کنترل مناسبی را برای کاهش فرسایش خاک پیشنهاد شده است (۵) .

رسوب کلسیت به واسطه تحریک میکروبی (Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation=MICP) یکی از روش‌های مناسب تثبیت خاک می‌باشد که امروزه مورد توجه جوامع مختلف قرار گرفته است (٦). رایج ترین نوع MICP رسوب غیر مستقیم است. در این روش pH به واسطه فعالیت میکروبی (هیدرولیز اوره) تغییر می‌کند و یون‌های بی کربنات تولید می‌شود و در نهایت باعث رسوب شیمیایی CaCo3 در حضور یون‌های کلسیم در بین فضای خالی ذرات خاک می‌شود (٦).

مهمترین عامل در کاربرد فرآیند MICP غربالگری و شناسایی باکتری‌های تولید کننده آنزیم اوره‌آز می‌باشد. انواع 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 (۷). باکتری‌های احیا کننده سولفات (SRB)، ارگانیسم‌های فتوسنتزکننده (سیانوباکتری‌ها و جلبک‌ها) و باکتری‌های تثبیت کننده ازت مهم‌تری گروه‌های موثر در فرآیند سیمان زیستی هستند (۸). باسیلوس‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک‌زی هستند و به دلیل فعالیت کاتابولیک قابل توجه و همچنین ماندگاری و بقا در شرایط نامساعد محیطی، یکی از مهمترین کاندیدهای فرآیند بیوسمانتاسیون می‌باشند (۹).

ایران کشوری در جنوب غربی آسیا با مساحتی بالغ بر ۱/٦٤ میلیون کیلومتر مربع است. تقریباً یک سوم کل مساحت ایران برای زمین‌های کشاورزی مناسب است، اما به دلیل خاک ضعیف و عدم توزیع کافی آب در بسیاری از مناطق، بیشتر آن زیر کشت نمی‌رود و تنها ۱۲ درصد از کل زمین زیر کشت است. اما به دلیل کشاورزی ناپایدار، تخریب ذخایر طبیعی چرای بی رویه، فرسایش خاک در ایران بسیار زیاد است به طوری که ۱۰ درصد از کل فرسایش خاک جهان را در سال از دست می‌دهد (۱۰). با این وجود با توجه به گستردگی و تنوع اکوسیستم‌ها در ایران، تنوع میکروارگانیسم‌ها با قابلیت‌های بیولوژیکی متفاوت از جمله تولید بیوسمان نیز در آن‌ها زیاد است. بنابراین، غربالگری و استفاده از گونه‌های میکروبی با فعالیت تولید سیمان زیستی، می‌تواند به افزایش و توسعه فناوری تثبیت خاک کمک کند (۱۱). هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی باسیلوس‌های تولید کننده سیمان زیستی از اکوسیستم‌های ایران و همچنین بررسی فعالیت آنزیمی و فیزیکی تثبیت خاک توسط این گروه از باکتری‌ها با روش جدید تونل هوایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت مقطعی بر روی ۲۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از ۱۲ محیط خشک و بیابانی ایران که دائماً در معرض عوامل فرساینده بودند از مهر ۱۳۹۹ تا آبان ۱٤۰۰، انجام شد. نمونه‌ها در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل و در محیط کشت اوره براث (شرکت مرک آلمان) حاوی ۱ مولار اوره به منظور غنی سازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم اوره‌آز کشت داده شدند و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند (۱۲). سپس از محیط غنی کننده به محیط اوره آگار حاوی ۱ مولار اوره به صورت خطی کشت و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤۲ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. خالص سازی نهایی جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱ مولار اوره انجام شد.

الف) شناسایی باکتری‌ها: جدایه‌های رشد کرده در محیط کشت اوره آگار با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، ایندول، سیترات، هیدرولیز ژلاتین،

احیای نیترات، اکسیداز، اوره‌آز و MR-VP شناسایی شدند (۱۳). شناسایی جنس و گونه جدایه‌ها با روش‌های مولکولی به شرح زیر پیگیری شد.

DNA کروموزومی جدایه‌های 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 5000g سانتریفیوژ شدند. مایع روماند به میکروتیوب استریل منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در 8000g سانتریفیوژ شد. در پایان رسوب DNA به ۵۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد (۱٤).

با استفاده از پروتکل PCR اختصاصی بر اساس قطعه ۳۰۰ جفت باز از پرایمرهای اختصاصی ژن gyrA (gyrA F 5'-TTTCGCCTTATTTACTTGG-3' ،gyrA R 5'-TCTGCTCGTGAACGGTGCT-3') سطح جنس باسیلوس‌های محیطی در این مطالعه تایید شد (۱۵). همچنین برای شناسایی گونه، از تکثیر و آنالیز توالی ژن 16 S rRNA استفاده شد (۱۳و۱٦). پس از خالص سازی DNA از ژل، نمونه‌ها به شرکت بیونیر کره جنوبی به منظور توالی یابی ارسال شد. توالی‌های حاصله با توالی‌های باسیلوس دریافت شده از پایگاه‌داده GenBankTM، هم تراز شدند و سپس با استفاده از برنامه jPhydit آنالیز شدند (۱۷). سپس توالی‌های ژن هر کدام از جدایه‌های شناسایی شده در سایت GenBankTM ثبت گردید.

ب) سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز: برای تعیین میزان فعالیت و شناسایی آنزیم اوره‌آز از محیط کشت کریستین اوره آگار (UAB) (مرک – آلمان) استفاده شد. در مورد تمامی جدایه‌ها تغییر رنگ محیط‌های کشت UAB به رنگ صورتی در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و۳۵ درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). برای بررسی فعالیت آنزیم اوره‌آز از روش هدایت الکتریکی استفاده شد. برای این منظور، یک میلی‌لیتر از محیط براث حاوی باکتری به ٦ میلی‌لیتر محلول اوره ۱/۱۱ مولار افزوده شد. ثبت نهایی هدایت الکتریکی پس از ۲ دقیقه گرماگذاری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به وسیله جریان سنج الکتریکی (Omega Engineering- Germany)انجام شد. فعالیت اوره‌آز به واسطه میزان افزایش هدایت الکتریکی به صورت mS/min سنجش گردید (۱۹).

ج) بررسی تولید کربنات کلسیم: برای این منظور از محیط پایه شامل ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲/۲ مولار کلرید کلسیم و اوره، ۱/۲۵ گرم بی کربنات سدیم و ۹ گرم در لیتر کلرید آمونیوم و ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری تکثیر یافته (غلظت نیم مک فارلند) استفاده شد. میزان تولید کربنات کلسیم در محیط مایع در محدوده pH 5/5، ۷، ۸/۵ و ۱۰ و دمای ۲۵، ۳۰ و۳۵ درجه سلسیوس با سویه استاندارد اسپوروسارسینا پاستوریی ATCC 11589 به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید. سپس رسوب حاصل توسط دستگاه XRD (D8ADVANCE, Bruker -Germany) و SEM (TESCAN,Vega3- czech republic) مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۰).

د) مقاومت در برابر شوری، pH و دما: جدایه‌ها در محیط براث مغذی حاوی غلظت‌های مختلف نمک (۱، ۳، ٦، ۸ و ۱۰٪) و pH (۵تا۹) کشت و در دماهای ۳۰، ۳۵، ٤۵ و ۵۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. سپس به منظور بررسی رشد، جذب نوری محیط کشت در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

ز) آنالیز مورفولوژی و کریستال کربنات کلسیم: ۳ گرم از رسوب خشک شده برای آنالیز مورفولوژی و فاز کریستالی معدنی کربنات کلسیم تولیدی به ترتیب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل TESCAN,Vega3 (کشورجمهوری چک) و پراش اشعه ایکس (XRD) مدل D8ADVANCE , Bruker (کشور آلمان) با تابش Co-Ku آنالیز شدند.

ر) بررسی توانایی تثبیت خاک: جدایه‌های تولید کننده کربنات کلسیم و سویه استاندارد اسپوروسارسینا پاستوریی ATCC 11589 در محیط براث مغذی غنی شده با سولفات آمونیوم و استات سدیم تلقیح شد و سپس به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. در مرحله

بعد ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح شده به آرامی به ستون خاک اضافه شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول تثبیت کننده باکتری حاوی ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم در لیتر اوره و کلسیم ۰/۰۵ مولار به ستون 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 ۲ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۵ گرم در لیتر CaCL2 و اوره، ۱/۲۵ گرم در لیتر NaHCO3 و ۷ گرم در لیتر NH4Cl به آرامی در یک ستون اضافه به مدت ۴۸ ساعت ذخیره گردید (۲۱).

ه) بررسی مقاومت نمونه‌های خاک تثبیت شده در برابر فرسایش بادی: برای بررسی مقاومت نمونه‌های خاک تثبیت شده 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، نمونه بردار 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. ستون‌های خاک تثبیت شده که سطح آن‌ها به اندازه‌های ۳ و ۵ سانتی‌متر اشباع شده بود، ابتدا توزین و در داخل سینی آزمایش (۳۰×۳۰×۶۰ سانتی‌متر) قرار گرفتند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در معرض سرعت‌های مختلف باد قرار گرفتند. نمونه‌گیر واقع در انتهای تونل باد، ذرات خاک جدا شده از سطح نمونه تثبیت‌شده را از هوا جمع‌آوری کرد، سپس ذرات خاک جمع آوری شده اندازه‌گیری شدند. مقدار فرسایش بادی با استفاده از نسبت جرم رسوب تولید شده به جرم کاهش یافته 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.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تحلیل داده‌ها از نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر استفاده شد. مرز معنی دار در $p \pm ۰/۰۵$ قرار داده شد. همچنین ارتباط بین جدایه‌ها با استفاده از یک درخت فیلوژنتیکی با ارزش بوت استرپ بالا ژن 16 S rRNA توسط نرم‌افزار MEGA 8، با استفاده از روش Neighbor-joining با میانگین حسابی ماتریس تفاوت‌های زوجی نشان داده شد.

نتایج

الف) جداسازی و شناسایی جدایه‌ها: ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ثبت شده نمونه‌های خاک در این مطالعه شرایط: pH ۹-۵، دما ۱۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس، سدیم 2/1-1/0 ppm، پتاسیم 20-5 ppm و هدایت الکتریکی نمونه 120-20 mS/min بود (جدول ۱).

از مجموع ۲۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، تعداد ۱۲۰ سویه باکتری جداسازی شد، که از این تعداد ۵ جدایه بر اساس خواص مورفولوژیکی، کشت، بیوشیمیایی و آنزیمی بر اساس آزمون‌های متداول بیوشیمیایی و مولکولی (ژن gyrA) به عنوان گونه باسیلوس اوره‌آز مثبت شناسایی شدند. همچنین آنالیز توالی‌های ژن 16 S rRNA نشان داد که جدایه‌های باسیلوس متعلق به ۴ گونه مختلف باسیلوس آمیلولیکوفاشنس ۲ سویه (۴۰٪)، باسیلوس تورنژینسیس ۱ سویه (۲۰٪)، باسیلوس کاربنیفیلوس ۱ سویه (۲۰٪)، و باسیلوس اولیوس ۱ سویه (۲۰٪) می‌باشند (جدول ۱).

توالی‌های جدایه‌های مورد بررسی پس از تایید در GenBank با شماره‌های دسترسی : B. amyloliquefaciens (OP432791), B. thuringinsis (OP434617) و B. carboniphilos (OP434622) و B. aeolius (OP434616) به ثبت رسید.

درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن 16 S rRNA با روش Neighbor -joining، ضریب Botstrap هزار و با استفاده از نرم افزار MEGA8 رسم شد (شکل ۱).

ب) سنجش صفات فیزیولوژیکی جدایه‌ها: نتایج نشان داد که بیشترین میانگین رشد و شرایط بهینه برای فعالیت اوره‌آز و تولید کربنات کلسیم جدایه‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، pH ۸/۸ و شوری ۶٪ رخ می‌دهد. همچنین کمترین میزان رشد

جدول ۱: مشخصات نمونه، ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی ایزوله‌های باسیلوس جداسازی شده از اکوسیستم‌های ایران B

مشخصات نمونه		تست های بیوشیمیایی								16S rRNA analysis		
نام ایزوله	محل نمونه گیری	دمای رشد مناسب	رشد در محیط NaCl7%	سیترات	اندول	Voges–Proskauer	تجزیه کازئین	هیدرولیز ژلاتین	هیدرولیز نشاسته	درصد (%) مشابهت	تفاوت در جفت باز	تشخیص
FK26 andFK27	ایلام	۳۵	+	-	+	+	-	-	-	۱۰۰	۰/۷۴۸	*B. amyloliquefaciens*
FK28	اهواز	۳۰	-	-	-	-	+	+	-	۱۰۰	۰/۶۸۰	*B. thuringiensis*
FK29	ایذه	۳۰	-	+	+	-	-	-	-	۱۰۰	۰/۷۸۴	*B. carboniphilus*
FK30	شوشتر	۳۵	-	-	-	-	-	+	+	۱۰۰	۰/۸۲۳	*B. aeolius*

[a] شباهت؛ ٪ شباهت به نزدیکترین گونه تایید شده.

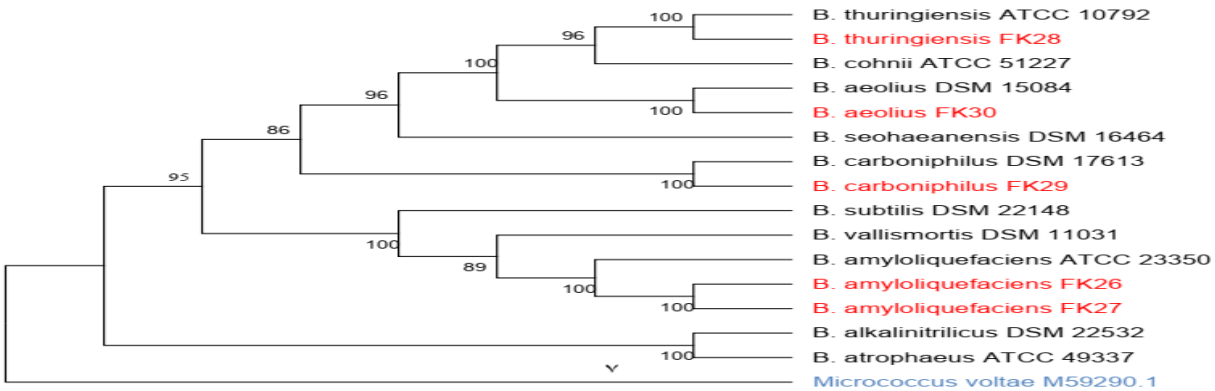
[b] تفاوت‌های جفت باز: تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی بین جدایه‌ها و نزدیک‌ترین گونه‌های تایید شده.

جدول ۲: نتایج فعالیت تولید سیمان زیستی ایزوله‌های ایرانی و اثر MICP آنها بر روی نمونه‌های خاک.

	خواص فیزیکی و شیمیایی					بررسی اثر MICP بر روی نمونه های خاک								توانایی تثبیت خاک	
						قبل از تیمار				بعد از تیمار					
ایزوله	هدایت الکتریکی (mm/hos)	تولید کربنات کلسیم (OD660 nm)	pH. بهینه	شوری بهینه (%)	دمای بهینه C°	کربن عالی	C/N* نسبت	TNV**	وزن مخصوص	کربن عالی	C/N* نسبت	TNV**	وزن مخصوص	زمان بهینه (ساعت)	محیط بهینه
B. amyloliquefaciens	۱۲۰-۶۰	0.072190225	۹	۶%	۳۵	0.0016	7.48	130.78	0.67	0.20	9.78	59.32	2.71	۳	محیط بیرون
B. thuringiensis	۷۰-۹۶	0.065668721	۸/۸	۶%	۳۵	0.0018	7.32	125.62	0.75	0.16	8.17	64.2	2.66	۳	محیط بیرون
B. carboniphilus	۴۵-۱۱۰	0.064498062	۸/۳	۶%	۳۵	0.0022	6.87	115.36	0.58	0.17	8.45	67.3	2.53	۳	محیط بیرون
B. aeolius	۵۵-۸۳	0.066704751	۷/۹	۶%	۳۰	0.0017	6.56	125.32	0.9	0.18	7.85	70.2	2.61	۳	محیط بیرون

*نسبت کربن به نیتروژن

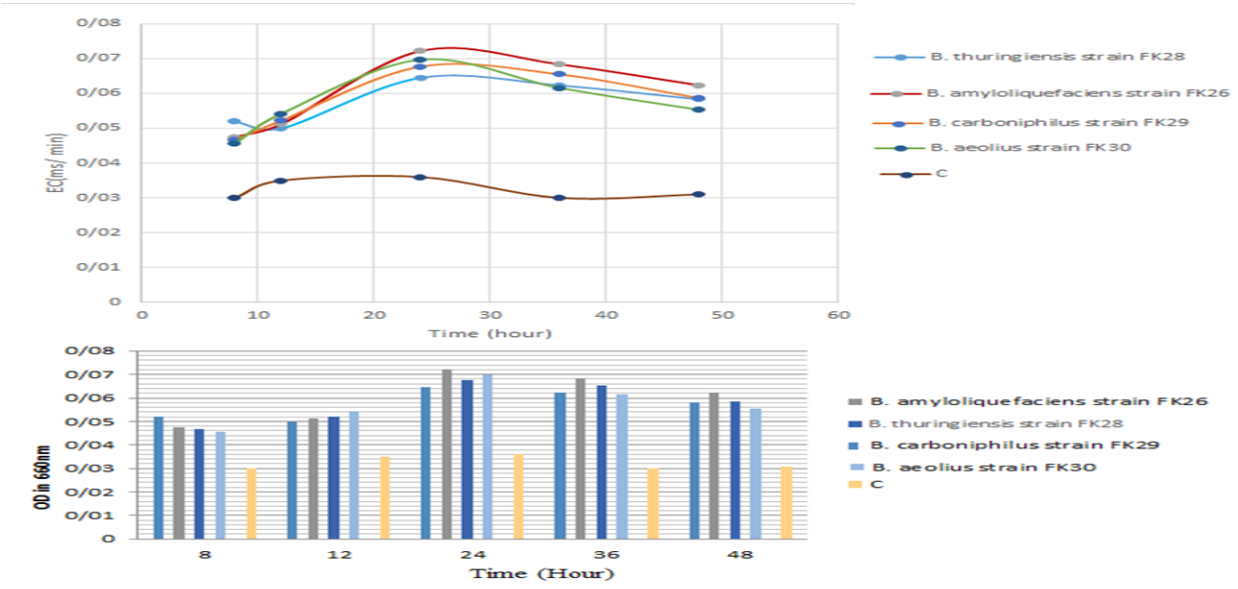
**درصدی از سنگ آهک که قادر به خنثی کردن اسید است.



شکل ۱: درخت فیلوژنتیکی و درصد تشابه باسیلوس‌های فعال در تولید سیمان زیستی با روش Neighbor -joining و ضریب Botstrap هزار (میکروکوکوس به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است).

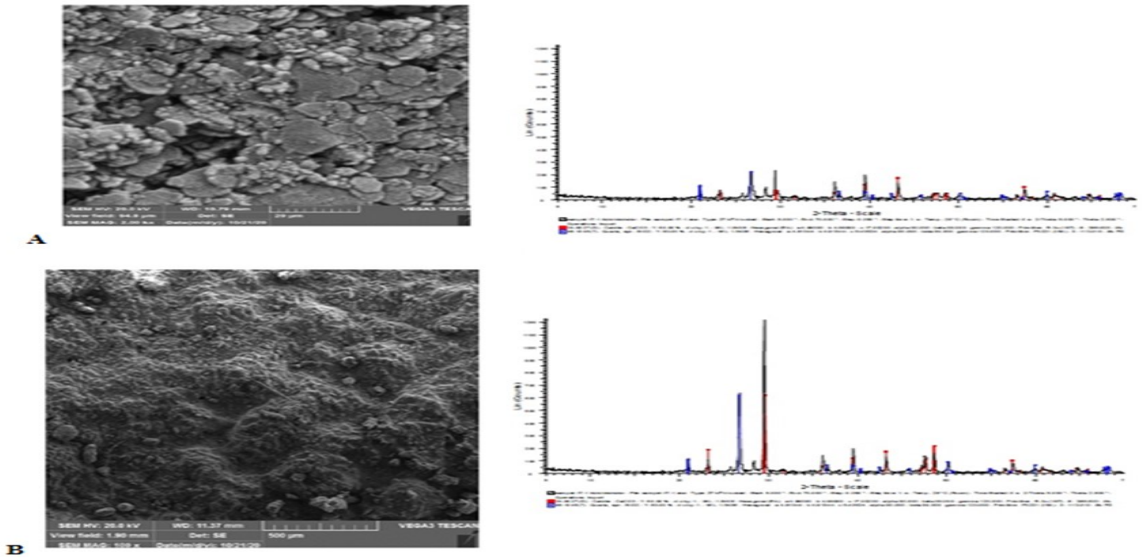
به ترتیب در دمای ۵۰ درجه سلسیوس، pH ۵/۵ و شوری ۱ درصد رخ می‌دهد. با ارزیابی قدرت تجزیه اوره جدایه‌ها مشخص گردید که باسیلوس آمیلولیکوفاشنس، باسیلوس تورنژینسیس، باسیلوس کاربنیفیلوس و باسیلوس اولیوس به ترتیب بیشترین فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید کربنات کلسیم را داشتند. همچنین مورفولوژی و فاز کریستالی معدنی کربنات کلسیم تولید شده توسط SEM و XRD بررسی و تایید گردید. ارزیابی ترشح کربنات کلسیم باسیلوس‌های جداسازی شده در شرایط بهینه نشان دهنده اختلاف معنی داری میزان ترشح کربنات کلسیم در مقایسه با سویه کنترل بود. تولید کربنات کلسیم در باسیلوس آمیلولیکوفاشنس پس از ۲۴ساعت ۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و میزان باقی مانده کلرید کلسیم پس از ۲۴ سا عت ۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط کشت مایع بود. اما در سویه استاندارد اسپوروسارسینا پاستوریی پس از ۲۴ساعت ۲۰ میلی‌گرم در میلی لیتر و میزان باقی مانده کلرید کلسیم پس از ۲۴ سا عت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط کشت مایع مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز و میزان تولید CaCO3 جدایه‌های مورد بررسی در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است (شکل۲).

ج) *بررسی مقاومت نمونه‌های خاک تثبیت شده در برابر فرسایش بادی:* نتایج نشان داد که میزان مقاومت خاک در برابر فرسایش بادی در تونل‌های باد، بین نمونه شاهد منفی و خاک تیمار شده با جدایه‌های تولید کننده سیمان زیستی در محیط‌ها و زمان‌های مختلف (محیط بیرونی و آزمایشگاهی و زمان ۱ تا ۳ ماه)، بر (سطح احتمال ۱٪) تفاوت معنی داری وجود دارد ($p\leq0.02$). بیشترین میزان فرسایش (شار اتلاف خاک) در نمونه‌های خشک شده درمحیط آزمایشگاهی با۶۰/۴٪ و کمترین میزان فرسایش خاک در نمونه‌های خشک شده در فضای باز با ۳۵/۴٪ درصد تلفات مشاهده شد. بیشترین میزان فرسایش خاک در نمونه‌های تیمار شده یک ماهه با ۵۳/۳۱٪ و کمترین میزان فرسایش خاک در نمونه‌های تیمار شده سه ماهه با ۳۶/۴۲٪ تلفات مشاهده شد (جدول ۲). همچنین نتایج نشان داد که بیشترین میزان تثبیت خاک به ترتیب توسط *باسیلوس آمیلولیکوفاشنس، باسیلوس تورنژینسیس، باسیلوس کاربنیفیلوس* و *باسیلوس اولیوس انجام می‌گیرد*. نتایج SEM و



شکل ۲: منحنی فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید $CaCO_3$ توسط جدایه‌های مورد بررسی. الف) نمودار EC پس از ۴۸ ساعت رشد در محیط اوره. ب) OD جدایه‌ها پس از رشد در محیط حاوی اوره.

XRD نشان داد که میزان تثبیت خاک توسط باسیلوس‌های منتخب جدا شده در مقایسه با سویه کنترل افزایش معنی داری دارد (شکل۳).



شکل ۳: تصاویر آنالیز نمونه‌های خاک توسط دستگاه SEM و XRD. قبل از تیمار با باکتری مولد بیوسمان (A) و پس از تیمار با باکتری مولد سیمان زیستی(B).

بحث

در سال‌های اخیر، روش MICP توسط باکتری‌های هیدرولیز کننده اوره، به عنوان یک روش جایگزین برای تثبیت خاک مطرح شده و به سرعت توسعه یافته است. در همین راستا یافتن باکتری مولد آنزیم اوره‌آز مهمترین فاکتور برای کاربرد موفق MICP در تثبیت خاک می‌باشد (۲۲). در مطالعات مختلف بسیاری از باکتری‌هایی مانند آلکانیوراکس، سودوموناس، رودوکوکوس، اسینتوباکتر و باسیلوس‌ها به دلیل داشتن فعالیت اوره‌آزی به طور موثری به منظور MICP مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این وجود، جنس باسیلوس به دلیل فعالیت کاتابولیک وسیع و مقاومت بالا به شرایط نامساعد محیطی کاندید مناسب تری برای استفاده در فرآیند MICP می باشند (۹). به همین دلیل اجرای روش‌های جدید جداسازی و شناسایی مانند کشت در محیط‌های اختصاصی و پایش مولکولی در محیط‌های بکر و ناشناخته می‌تواند نقش موثری در استفاده کاربردی این باکتری‌ها داشته باشد (۲۳).

براساس شواهد یاد شده در مطالعه حاضر، با توجه به فعالیت بالا آنزیم اوره‌آز باسیلوس و با توجه به دوام بالا در محیط‌های سخت مانند اکوسیستم‌های با شرایط قلیایی، نمکی و بیابانی، روش‌های جداسازی و شناسایی و بررسی فعالیت تولید سیمان زیستی گونه‌های باسیلوس به عنوان باکتری‌های تولید کننده کربنات کلسیم و تثبیت کننده خاک از منابع محیطی موجود در اکوسیستم‌های دست نخورده و بکر ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، از مجموع ۲۰۰ نمونه خاک جمع آوری شده، ۱۶/۴٪ جدایه‌ها بر اساس خواص مورفولوژیکی، کشت، بیوشیمیایی و آنزیمی و مولکولی به عنوان گونه باسیلوس اوره‌آز مثبت شناسایی شدند. میانگین جداسازی در پژوهش حاضر از میانگین جداسازی باسیلوس اوره‌آز مثبت گزارش شده گزارش شده از کشورهای هند و ایالات متحده آمریکا (به ترتیب ۱۵ و ۱۲ درصد بودند) کمتر بود (۲۴و۲۵)، با این حال، این میزان در مقایسه با نتایج گزارش شده از چین و ژاپن (به ترتیب ۲٪ و ۱٪) بیشتر بود (۲۰و۲۶).

در این پژوهش از کلرید کلسیم به عنوان منبع کلسیم به منظور

تولید کربنات کلسیم در محیط مایع استفاده شد. بر این اساس نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمامی جدایه‌ها فعالیت اوره‌آزی و رسوب کربنات کلسیم داشتند و پتانسیل کاربردی MICP در خاک را داشتند همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که بیشترین سرعت رشد و شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید کربنات کلسیم توسط جدایه‌ها مربوط به شرایط: دمای ۳۵ درجه سلسیوس، pH 8.8 و شوری ٦ درصد می‌باشد. این نتایج با سایر پژوهش‌ها که نشان داده بودند دمای بهینه و pH مناسب برای فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید کربنات کلسیم توسط جدایه‌ها به ترتیب حرارت ۳۰-۳۵ درجه سلسیوس و pH ۸-۹ می باشد، هم خوانی داشت (۲۷و۲۸).

الطاوادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ و وان پاسان و همکاران در سال ۲۰۰۹ با ارزیابی عوامل موثر بر تولید CaCo3 موفق به تولید ۱٤۲ میلی‌گرم کلسیت را در هر گرم شن در غلظت ۰/۵ مولار شدند. همچنین محققین یاد شده نشان دادند که تولید کربنات کلسیم در غلظت‌های بالاتر اوره و کلرید کلسیم اثر مهارکنندگی بر فعالیت اوره‌آز دارد که این نتایج نیز با یافته ما هم خوانی داشت (۲۹و۳۰).

درمورد جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده اوره تحقیقات محدودی انجام شده است. در پژوهش حاضر، با هدف جداسازی باکتری‌های بومی اکوسیستم‌های خاص کشور به منظور استفاده از آن‌ها در تثبیت خاک و کنترل ریزگردها در پژوهش‌های تکمیلی، پایش باکتری‌های تجزیه کننده اوره انجام شد. الطاوادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ با روش مشابه باکتری‌های دارای فعالیت اوره‌آز را مورد ارزیابی قرار دادند و موفق به جداسازی ۲ سویه از خاک محلی شدند که آنزیم‌های اوره‌آز بسیار قوی داشتند (۲۹).

اگرچه در سایر پژوهش‌ها نیز ترشح کلسیت به واسطه تولید آنزیم اوره‌آز اسپوروسارسینا پاستوریی نیز گزارش شده است، اما با توجه به ترشح مقادیر قابل توجه کربنات کلسیم در جدایه‌های انتخابی، امکان بهینه سازی تولید در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی امکان تولید صنعتی حتی در شرایط غیر استریل وجود دارد (۳۱).

نتایج مطالعه ما در تطابق با نتایج دیگر مطالعات نشان داد که وجود بی کربنات سدیم می‌تواند شرایط لازم به منظور تشکیل کلسیت را فراهم سازد.

از این رو می‌توان فرض کرد که کربنات کلسیم در صورتی تشکیل می‌شود که یون‌های سدیم و کلسیم موجود باشند. به نظر می‌رسد که این فرایند تا زمان فراهم سازی کلرید کلسیم به میزان کافی ادامه خواهد یافت (٤و٢٦).

نتایج حاصل از تأثیر تیمار MICP توسط جدایه‌ها بر روی نمونه‌های خاک نشان داد که مدت زمان تیمار ۳ ماه و قرار دادن نمونه‌های تیمار شده در محیط بیرون باعث افزایش معنادار مقاومت نمونه‌های خاک در برابر فرسایش بادی در تونل باد می‌شود. بدین ترتیب که نسبت تلفات خاک در مقایسه با نمونه‌های شاهد در سرعت ۱۰۰ کیلومتر در ساعت، کاهش ۱۰۰ برابری را نشان داد.

این یافته‌ها با تحقیقات انجام شده در مورد روش MICP در کشورهای چین، ژاپن و هند که کاهش تلفات خاک در مقابل سرعت‌های مختلف باد را بین ۷۰٪ تا ۱۰۰٪ را گزارش نموده بودند، نیز هم خوانی داشت (۲۰و۲۳و۳۲).

نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که اکوسیستم‌های مختلف ایران تنوع بالایی از گونه‌های باسیلوس‌های تولید کننده سیمان زیستی موثر در تثبت شن‌های روان و ریزگرد دارد همچنین نتایج نشان داد که استفاده از MICP در سطح خاک می‌تواند تأثیر بسیار چشمگیری در کاهش تلفات خاک ناشی از فرسایش بادی داشته باشد، به طوری که پیشنهاد می‌شود از این باکتری‌ها در تثبیت شن‌های روان واستحکام زمین‌های کشاورزی و آثار باستانی استفاده گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از پرسنل بخش خاک شناسی و زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت به دلیل حمایت‌های اجرایی کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Shahsavari N, Kafilzadeh F, Kargar M. Isolation and identification of thermophiles bacteria from one of the hottest places on the planet (Lut Desert, Iran) and measuring their enzyme activities. Geomicrobiology Journal. 2021;38(10):850-8.
5. Ahmad NSBN, Mustafa FB, Didams G. A systematic review of soil erosion control practices on the agricultural land in Asia. Internat Soil and Water Conserv Res. 2020;8(2):103-15.
6. 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.
7. 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.
8. Ali M, Mukhtar H, Dufossé L. Microbial calcite induction: a magic that fortifies and heals concrete. Internat J Environ Sci Technol. 2022:1-22.
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. Farashi A, Shariati M. Biodiversity hotspots and conservation gaps in Iran. J nature conserv. 2017;39:37-57.

11. 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.
12. Wang T, Wang S, Tang X, Fan X, Yang S, Yao L, et al. Isolation of urease-producing bacteria and their effects on reducing Cd and Pb accumulation in lettuce (Lactuca sativa L.). Environ Scie Pollut Res. 2020;27(8):8707-18.
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. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Whiffin VS, Van Paassen LA, Harkes MP. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal. 2007;24(5):417-23.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Ekrem. K. A Review on the Microbial Induced Carbonate Precipitation MICP for Soil Stabilization. . Inter J Earth Sci Knowl Applic. 2020 30;2(1):38-47.
23. Cheng L SM. Microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. Ecological wisdom inspired restoration engineering. Springer, Singapore. 2019;1:47-68.
24. 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.

25. 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.

26. 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.

27. Omoregie AI KG, Senian N, Ong DE, Nissom PM. . Experimental optimisation of various cultural conditions on urease activity for isolated Sporosarcina pasteurii strains and evaluation of their biocement potentials. Ecological Engineering 2017 Dec;1;109::65-75.

28. Imran MA NK, Evelpidou N, Kawasaki S. Factors affecting the urease activity of native ureolytic bacteria isolated from coastal areas. Geomech Eng. 2019 Jan;1;17(5):421-7.

29. Al-Thawadi S. High strength in-situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria: Murdoch University; 2008.

30. Van Paassen LA. Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation. 2009.

31. Kargar M, Kargar M. Monitoring of biocement-and biogrout-producing bacteria in desert habitats of Iran. Journal of Microbial World. 2018;11(1):51-60.

32. Mujah D SM, Cheng L. State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. Geomicrobiology Journal 2017 Jul 3;34 (6):524-37.