

جداسازی باکتری‌های کارا در رسوب زیستی کربنات کلسیم (MICP) و ارزیابی توانایی آنها در کنترل فرسایش بادی خاک‌های شور اطراف دریاچه ارومیه

مریم معین فر^۱ - میرحسن رسولی صدقیانی^۲ - محسن برین^{۳*} - فرخ اسدزاده^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۶

چکیده

در این پژوهش، به منظور شناسایی و جداسازی باکتری‌های بومی با توانایی رسوب زیستی کربنات کلسیم (MICP)، ۲۵ نمونه خاک از جنوب استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شدند. بعد از مراحل غربالگری اولیه باکتری‌ها، پنج باکتری بومی با توانایی بالای هیدرولیز اوره و همچنین مقاوم به شوری جداسازی شد. جهت بررسی کنترل فرسایش بادی آزمون‌ی به صورت فاکتوریل در قابل طرح کاملاً تصادفی در دو فاکتور و سه تکرار که فاکتور اول در هشت سطح (شامل پنج باکتری جداسازی شده (U3، U8، U16، U35، U40) و باسیلوس پاسته‌وری (شاهد مثبت)، تیمار بدون باکتری و بدون عامل سیمانی (به صورت موهومی) و تیمار بدون باکتری و دارای عامل سیمانی و فاکتور دوم شامل غلظت‌های مختلف محلول کلرید کلسیم به همراه اوره در سه سطح (۰/۱، ۰/۵ و ۱ مولار) ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های U3 و U16 دارای بیشترین مقدار هیدرولیز اوره و از نظر تحمل به شوری U16 دارای کمترین مقدار و U3 بیشترین تحمل به شوری بود. نتایج حاصل از آزمون تونل باد نشان داد که آستانه فرسایش بادی در نمونه‌های شاهد منفی در حدود ۹/۴ m/s و برای نمونه‌های MICP (رسوب میکروبی کربنات کلسیم) بسیار بالاتر از سرعت دستگاه تونل‌باد (۲۵ متر بر ثانیه) بود. حداکثر میزان مقاومت فروروی در نمونه تیمار شده با جدایه U3 و سطح یک مولار کلرید کلسیم ۱۳/۵ MPa و نمونه‌های شاهد منفی و دارای مواد سیمانی به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۷ بدست آمد. چنین استنباط می‌شود که می‌توان از فرایند MICP و باکتری‌های بومی توانمند در این پدیده برای کاهش فرسایش بادی استفاده نمود. که فاکتور اول در هشت سطح (شامل پنج باکتری جداسازی شده (U3، U8، U16، U35، U40)، باسیلوس پاسته‌وری (به عنوان شاهد مثبت که از مرکز کلکسیون میکروبی ایران تهیه گردید)، تیمار بدون باکتری و بدون عامل سیمانی (شاهد منفی) و تیمار بدون باکتری و دارای عامل سیمانی) و فاکتور دوم در سه سطح شامل غلظت‌های مختلف محلول کلرور کلسیم به همراه اوره (۰/۱، ۰/۵ و ۱ مولار) مورد ارزیابی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: باکتری تولید کننده اوره‌آز، سیمانی کننده بیولوژیکی، فرسایش بادی، مقاومت فروروی

مقدمه

ایران به دلیل پایین بودن محتوای رطوبتی، خاک‌ها در معرض فرسایش بادی بوده و اثرات مخرب فرسایش بادی جوامع ساکن شهر و روستا در مناطق مختلف ایران را مورد تهدید قرار می‌دهد (۵ و ۲۹). بررسی ویژگی‌های اقلیمی، خاک‌شناسی، زمین‌شناسی، ژئومورفولوژی و پوشش گیاهی در محدوده‌ی جغرافیایی کشور نشان می‌دهد که مجموع سطوح بیابانی برابر ۹۰۷۲۹۳ کیلومتر مربع است که این مقدار ۵۵ درصد از مساحت کل ایران را دربرمی‌گیرد (۱۲). توجه به مساحت سطوح بیابانی و همچنین مشاهدات بصری اهمیت توجه به پدیده‌ی فرسایش بادی و جستجوی راهکارهای مناسب در راستای مهار آن در کشور ما را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد.

مرور منابع نشان می‌دهد که تاکنون راهکارهای متعددی برای کنترل فرسایش بادی در مناطق مختلف ارائه شده است، که پایه‌ی اصلی این راهکارها بر مبنای استفاده از روش‌های زراعی به شکل

فرسایش بادی از مشکلات مهم زیست‌محیطی در مقیاس جهانی است که نمود آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک آشکار بوده و آثار سوء بسیاری مانند تشکیل طوفان‌های گرد و غبار، حرکت شن‌های روان، کاهش حاصلخیزی خاک‌ها از طریق تخلیه ذرات و همچنین مشکلات مربوط به افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی و شیوع بیماری‌ها را در پی دارد. در اقلیم‌های خشک و نیمه‌خشک مانند

۱، ۲، ۳ و ۴ - به ترتیب فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(Email: m.barin@urmia.ac.ir

*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jsw.v34i1.69069

تولید آنزیم اوره‌از) اهمیت ویژه‌ای داشته و مقدار آنزیم تولید شده می‌تواند سرعت و مقدار تشکیل رسوب زیستی را تحت تأثیر قرار دهد. سونگ (۲۱) براساس تحقیقات انجام شده بیان داشته است که، میکروارگانیسم‌های متعددی شامل (*Bacillus pasteurii*) و *Bacillus Planococcaceae*, *Sporosarcina pasteurii* و *Clostridium* در فرایند رسوب زیستی کربنات کلسیم می‌توانند نقش داشته باشند. به‌رغم مطالعات بسیار صورت گرفته در رابطه با روش رسوب میکروبی کربنات کلسیم، تاکنون کمتر به استفاده از پتانسیل باکتری‌های بومی خاک برای انجام این روش پرداخته شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی که توان تولید اوره‌از را داشته باشند، در عین حال که می‌توانند فرآیند رسوب زیستی کربنات کلسیم را بهبود بخشند، برای محیط زیست نیز سودمند بوده کمترین بار منفی زیست‌محیطی را بر اکوسیستم وارد می‌نمایند. از سوی دیگر باکتری‌های بومی خاک به دلیل سازگاری بهتر با محیط کارایی بیشتری نیز خواهند داشت (۲۴ و ۲۵).

در سال‌های اخیر با تشدید فرآیند خشکی دریاچه ارومیه و پیدایش عرصه‌های بیابانی در بستر این دریاچه، کانون‌های متعدد گرد و غبار در جای جای استان آذربایجان غربی به وجود آمده‌اند که توجه به این مناطق و مهار فرسایش بادی در آن‌ها امری ضروری است. در این پژوهش تلاش شده تا کارایی روش رسوب میکروبی کربنات کلسیم در کاهش فرسایش بادی و افزایش مقاومت خاک با کاربرد باکتری‌های بومی جدا شده از خاک منطقه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک

به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده اوره، ۲۵ نمونه خاک از استان آذربایجان غربی با کاربری‌های مختلف شامل خاک‌های ماسه‌ای ریزدانه، لوم سیلتی اطراف دریاچه ارومیه، خاک‌های کشاورزی، خاک‌های مستعد به فرسایش بادی و خاک‌های شور برداشت شده و به آزمایشگاه بیولوژی واقع در گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه انتقال داده شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

غنی‌سازی میکروبی و جداسازی و خالص‌سازی

باکتری‌های تولیدکننده اوره‌از

برای افزایش تعداد باکتری‌های اوره‌آزی نمونه‌های خاک، از محلول غنی‌سازی که شامل ۱۰ گرم بر لیتر عصاره‌ی مخمر، ۱ گرم بر لیتر پیتون، ۱۳/۶ گرم بر لیتر استات سدیم، ۱ گرم بر لیتر سدیم کلرید بود، استفاده شد. بعد از استریل کردن محیط، یک گرم از نمونه

افزایش پوشش گیاهی و همچنین افزودن بقایای زاعی به خاک، ایجاد موانع مکانیکی در مقابل جریان باد و در نتیجه کاهش قدرت فرسایش آن و در نهایت تثبیت لایه‌ی سطحی خاک با استفاده از انواع تثبیت‌کننده‌های شیمیایی و مواد پلیمری مختلف است (۳، ۷، ۱۰، ۱۳، ۲۲ و ۲۳).

روش‌های اشاره شده به‌رغم کارایی در مهار فرسایش بادی، خالی از اشکال نبوده و معایبی نیز به همراه دارند و یا اینکه در بسیاری از مناطق قابل اجرا نیستند. برای نمونه استفاده از روش‌های زراعی به دلیل نبود آب کافی در سطح وسیعی از اراضی مستعد فرسایش بادی قابل اجرا نیستند (۲۷). روش‌های مکانیکی و احداث بادشکن نیز به دلیل هزینه‌های اقتصادی بسیار بالا فقط به صورت موردی و در مقیاس کوچک برای حفاظت از محصولات و یا صنایع بسیار ارزشمند، مقرون به صرفه هستند (۲۰). در رابطه با استفاده از تثبیت‌کننده‌های شیمیایی نیز بایستی اشاره کرد که این تثبیت‌کننده‌ها در بیشتر موارد آثار سوء زیست‌محیطی نیز دارند که استفاده از آن‌ها را محدود می‌نماید که در این رابطه می‌توان به طور مشخص به آثار زیست‌محیطی مالچ‌های نفتی اشاره نمود (۱۵ و ۱۶).

در بین روش‌های مختلف کنترل فرسایش بادی، استفاده از روش‌هایی که بتوانند مقاومت لایه سطحی خاک را در مقابل جریان باد افزایش داده و مانع از حرکت ذرات خاک شوند، اهمیت ویژه‌ای داشته و عامل کلیدی در کنترل فرسایش بادی است. نکته مهم در این زمینه استفاده از روش‌هایی است که همزمان با افزایش مقاومت برشی لایه‌ی سطحی خاک، آثار زیست‌محیطی کمی نیز داشته باشند. در سال‌های اخیر یک فناوری بیولوژیکی سبز و سازگار با محیط زیست با نام رسوب میکروبی کربنات کلسیم به منظور به‌سازی خاک و افزایش مقاومت برشی آن پیشنهاد شده است. در این روش به‌سازی خاک از باکتری‌ها در جهت رسوب کربنات کلسیم و کاهش فرسایش بادی در خاک استفاده می‌شود (۱۴).

در فرآیند رسوب زیستی کربنات کلسیم، سلول‌های باکتریایی با استفاده از تولید آنزیم اوره‌از به عنوان کاتالیزور، یون‌های کربنات و آمونیوم را از منبع اوره آزاد می‌نمایند. یون‌های کربنات تولید شده در محیط در حضور یک منبع کلسیم به آسانی به کربنات کلسیم تبدیل شده و در بین ذرات خاک رسوب می‌نمایند این رسوب کربنات کلسیم همچون سیمانی طبیعی ذرات خاک را به هم متصل نموده و مقاومت برشی و استحکام آن را افزایش می‌دهند. این فرآیند به صورت خلاصه طی دو واکنش زیر قابل نمایش است (۲، ۱۱ و ۲۶).



در این روش وجود باکتری‌های هیدرولیز کننده اوره (از طریق

تعیین منحنی رشد سویه‌های برتر

برای تهیه منحنی رشد، کشت شبانه‌ای از جدایه‌های برتر از نظر فعالیت اوره‌آزی تهیه و به مقدار یک درصد در محیط کشت مایع مغذی (رفرنس محیط گذاشته شود)، افزوده و روی شیکرانکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس رشد باکتری (کدورت) با قرائت جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر به صورت هر ساعت یک بار برای ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت.

بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی در کاهش میزان فرسایش بادی (آزمون تونل باد)

جهت بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی در کاهش میزان فرسایش بادی، میزان مقاومت فروروی و نیز انتخاب جدایه‌های مناسب باکتری، آزمونی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور، که فاکتور اول در هشت سطح (شامل پنج باکتری جداسازی شده (U3، U8، U16، U35، U40)، باسیلوس پاسته‌اوری (به‌عنوان شاهد مثبت که از مرکز کلکسیون میکروبی ایران تهیه گردید)، تیمار بدون باکتری و بدون عامل سیمانی (به‌صورت موهومی) و تیمار بدون باکتری و دارای عامل سیمانی و فاکتور دوم در سه سطح شامل غلظت‌های مختلف محلول کلرور کلسیم به همراه اوره (۰/۱، ۰/۵ و ۱ مولار) مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از جداسازی باکتری‌ها به منظور آزمون تأثیر MICP بر افزایش مقاومت فروروی خاک در برابر فرسایش بادی، یک نمونه خاک شنی و کاملاً فرسایش‌پذیر از اطراف دریاچه ارومیه و محل کانون‌های گرد و غبار تهیه شد و در ادامه پژوهش بررسی‌ها با استفاده از این نمونه صورت گرفت. نمونه مورد نظر در سینی‌های مخصوص به ابعاد ۳۰×۲۰×۵ سانتی‌متر ریخته شد و سطح آن بطور کامل صاف و یکنواخت گردید. پس از برآورد، چگالی ظاهری به میزان ۱/۲ گرم بر سانتی‌متر مکعب و همچنین، متناسب با تخلخل (۰/۵۴) نمونه‌های ماسه درون سینی آماده‌سازی و سپس محلول‌پاشی صورت گرفت (شکل ۲). حجم محلول سیمان کننده و سوسپانسیون باکتری برابر با حجم تخلخل بود، به‌طوری که بتواند آن‌را کاملاً اشباع کند. نحوه تزریق بصورت $\frac{1}{4}$ محلول باکتری + $\frac{1}{4}$ محلول سیمان‌تاسیون + نیم ساعت استراحت + $\frac{1}{4}$ محلول باکتری + $\frac{1}{4}$ محلول سیمان‌تاسیون بود.

در کف ظرف نمونه چند سوراخ به‌منظور زهکش تعبیه شد و یک کاغذ صافی به‌منظور فیلتر در داخل آن قرار می‌گیرد. شایان ذکر است در دو تیمار شاهد منفی (دارای محلول باکتری و بدون محلول سیمانی کننده) و تیمار بدون باکتری و دارای مواد سیمانی کننده تزریق به همان روال ذکر شده صورت گرفت ولی به ترتیب محلول

خاک را داخل ارلن مایر محتوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط مذکور اضافه و داخل شیکرانوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت تکان دادن ۱۲۰ rpm (دور بر دقیقه) به مدت ۳۶ ساعت انکوبه شد.

بعد از مرحله‌ی غنی‌سازی، برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های بومی اوره‌آزی اقدام به تهیه سری رقت از نمونه‌ها شد و از رقت‌های مناسب (10^{-2} تا 10^{-4}) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط‌کشت جامد اختصاصی انتقال داده شد. محیط‌کشت اختصاصی شامل ۵ گرم بر لیتر پیتون، ۳ گرم بر لیتر بیف‌اکسترکت، ۳ گرم بر لیتر سدیم کلرید، ۲۰ گرم بر لیتر آگار و ۲٪ اوره می‌باشد (۲). پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت کلونی‌های با ویژگی متفاوت از نظر مورفولوژی و تغییر رنگ محیط جدا شده و در محیط‌کشت اختصاصی کشت داده شدند. در طی کشت‌های متوالی به روش کشت خطی، ۴۴ تک کلونی جداسازی و خالص‌سازی گردیدند.

انتخاب سویه‌های برتر

با توجه به اهمیت ترشح آنزیم اوره‌آز توسط باکتری در پدیده MICP^۱، میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز با اندازه‌گیری میزان هیدرولیز اوره ارزیابی می‌شود. بدین منظور برای انتخاب مناسبترین جدایه از محیط کشت مایع استفاده شد. ابتدا باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار کشت داده شدند، سپس از تک کلنی برای مایه‌زنی محیط مایع شامل ترکیبات ۲۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم بر لیتر کلرید آمونیوم، ۲۴/۰ گرم بر لیتر مایع مغذی و ۲۴/۰ گرم بر لیتر کلرید نیکل با pH ۵/۸ می‌باشد استفاده شد. محیط کشت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول سوسپانسیون باکتری به ۹ میلی‌لیتر محلول اوره ۱۱/۱ مولار افزوده شده و هدایت الکتریکی آن بعد از گذشت ۵ دقیقه قرائت شده و فعالیت اوره‌آزی با رابطه (معادله ۱) زیر محاسبه گردید (۱۱ و ۲۸).

$$11/1 \times \text{هدایت الکتریکی (dSm}^{-1}\text{)} = \text{فعالیت اوره‌آزی (mM urea min}^{-1}\text{)}$$

آزمون بیوشیمیایی سویه‌های برتر

آزمون‌های بیوشیمیایی مانند آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، متحرک بودن باکتری، آزمون اکسیداسیون یا تخمیر گلوکز (O/F)، آزمون استفاده از سیترات، آزمون هیدرولیز نشاسته، آزمون کاتالاز، آزمون تحمل به شوری و آزمون فلورسانس بودن باکتری‌ها بر جدایه‌های برتر مورد بررسی قرار گرفت.

1- Microbial induced calcite precipitation (MICP)

مدت ۵ دقیقه در معرض جریان باد قرار گرفت. کاهش جرم نمونه پس از جریان باد به عنوان مقدار خاک فرسایش یافته در نظر گرفته شد (۲).

نتایج و بحث

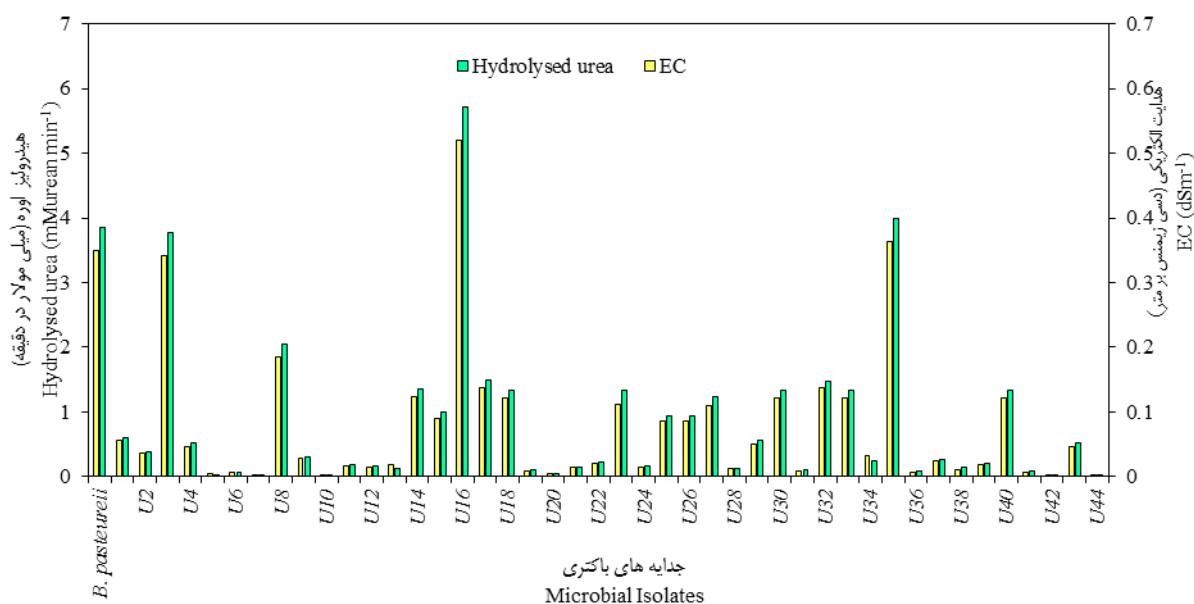
غربالگری، جداسازی و انتخاب سویه برتر اوره آزی

در این پژوهش از ۲۵ نمونه خاک مورد مطالعه ۴۴ جدایه باکتری جداسازی و غربالگری شد (شکل ۱). از بین جدایه‌های مختلف، ۵ جدایه باکتری (U3، U8، U16، U35، U40) دارای حداکثر توان فعالیت آنزیم اوره آزی بودند (جدول ۱). در بین باکتری‌های مختلف جدایه U16 دارای پتانسیل اوره آزی بالاتری (۵/۷۱۸۹ میلی‌مول اوره بر دقیقه) نسبت به *باسیلوس پاسته اوری* (شاهد مثبت) بود (شکل ۱). جدایه U40 با وجود اینکه از نظر هیدرولیز اوره با برخی از جدایه‌ها مانند (U14، U17، U18، U32، U33) تقریباً یکسان بود اما به دلیل اینکه از خاک‌های مستعد به فرسایش بادی جداسازی شده بود، مورد آزمون قرار گرفته است. هرچه مقدار فعالیت باکتری بالاتر باشد رسوب در زمان کمتری تشکیل می‌شود و به عبارتی دیگر به محض ترکیب مواد واکنش دهنده عمل رسوبگذاری آغاز می‌شود (۶، ۸، ۱۸ و ۲۸).

پاشی با همان حجم به جای محلول سیمانی کننده در تیمار شاهد منفی و در تیمار بعدی به جای محلول باکتریایی به همان نسبت از آب استریل استفاده شد. و سپس به منظور خشک شدن نمونه، سینی‌ها در هوای آزاد قرار گرفتند (۲۱).

مقاومت فروروی لایه‌ی سطحی خاک به عنوان یک شاخص ساده از مقاومت در برابر فرسایش بادی محسوب می‌شود. به منظور بررسی اثر MICP بر روی مقاومت فروروی نمونه‌ها از دستگاه ریزفروسنج اتوماتیک مدل MP11 استفاده شد. این دستگاه دارای یک میله کوچک با نوک مخروطی است که مقدار فشار لازم برای فرورفتن میله مذکور در نمونه را ثبت می‌کند. مقاومت فروروی نمونه‌ها در سه نقطه از سطح هر نمونه تعیین شده، و به منظور مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

به منظور بررسی اثر فرایند MICP در افزایش مقاومت نمونه‌ها در مقابل فرسایش بادی از دستگاه تونل باد استفاده و سرعت آستانه باد برای حرکت ذرات خاک تعیین گردید. تونل باد مورد استفاده در این فرایند از نوع تونل باد مدار باز دمنده بوده که دارای حداکثر سرعت ۲۵ متر بر ثانیه و با طول ۴ متر بود. اتاق آزمون، دیفیوزر، نازل، اتاق آرامش و فن از جمله اجزای اصلی تونل باد بودند. در این آزمایش سینی‌های حاوی نمونه‌های درون دستگاه تونل باد قرار داده شد و به



شکل ۱- باکتری‌های غربال شده بر اساس هیدرولیز اوره (mMurea.min^{-1}) و هدایت الکتریکی (dS.m^{-1})

U1 الی U44 جدایه‌های باکتریایی می باشند

Figure 1- Screened bacteria in terms of urea hydrolysis (mMurea.min^{-1}) and electrical conductive (dS.m^{-1}) U1 until U44 are bacteria isolation.

جدول ۱- باکتری‌هایی با توانایی بالای هیدرولیز اوره (انتخاب شده از شکل ۱)
 Table 1- Highly ability bacteria in terms of urea hydrolysis (selected from Figure 1)

	<i>B. pasteurii</i>	U3	U8	U16	U35	U40
هدایت الکتریکی EC(dS.m ⁻¹)	0.3505	0.342	0.1857	0.520	0.3634	0.122
هیدرولیز اوره (mM urea.min ⁻¹)	3.855	3.763	2.043	5.719	3.997	1.342

U3, U8, U16, U35 و U40 جدایه‌های باکتری با توانایی بالای هیدرولیز اوره
 U3, U8, U16, U35 and U40 bacteria isolation with highly ability in urea hydrolysis

آزمون بیوشیمیایی جدایه‌های برتر

پس از غربالگری اولیه، برخی صفات بیوشیمیایی جدایه‌های برتر مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه خاک‌های حاشیه دریاچه که در اثر خشکی دریاچه در معرض فرسایش بادی قرار دارند، اغلب شور هستند، بنابراین باکتری‌ها از منظر تحمل به شوری در چهار سطح (۱/۵، ۳، ۶ و ۱۰ درصد) مورد ارزیابی قرار گرفتند. این جدایه‌ها

توانایی تحمل به شوری بالا (۵۰ dS.m⁻¹) را داشتند. جدایه (U3) نسبت به بقیه جدایه‌ها (حتی باسیلوس پاسته‌اوری)، تحمل به شوری بالایی (115 dS.m⁻¹) داشته است (تا ۱۰٪) که می‌توان از این جدایه در مناطق مستعد به فرسایش بادی و همچنین شور استفاده نمود (جدول ۲).

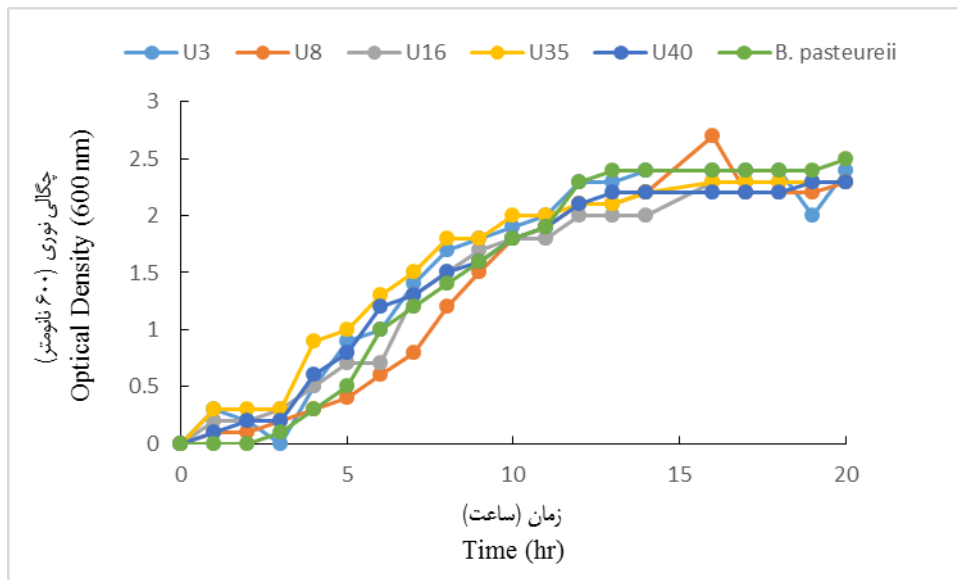
جدول ۲- آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری
 Table 2- Biochemical Tests of isolated bacteria

آزمون‌ها Tests		<i>B. pasteurii</i>	U3	U8	U16	U35	U40
آزمون تحمل به شوری Salt tolerance test	1/5%	+	+	+	+	+	+
	3%	+	+	+	+	+	+
	6%	+	+	+	-	+	-
	10%	-	+	-	-	-	-
آزمون سیترات Citrate test		+	-	+	+	+	+
آزمون هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis test		-	-	-	-	-	-
رنگ‌آمیزی گرم Gram staining		+	-	+	+	+	+
آزمون اکسیداسیون یا تخمیر (O/F) test	O/F بدون پارافین Without parafilm	سبز Green	زرد Yellow	زرد Yellow	سبز Green	زرد Yellow	آبی Blue
	O/F با پارافین With parafilm	آبی Blue	سبز Green	سبز Green	سبز Green	زرد Yellow	آبی Blue
آزمون کاتالاز Catalase test		+	+	+	+	+	+
آزمون فلورسانس Fluorescence test		-	-	-	-	-	-

منحنی رشد جدایه‌های برتر

منحنی رشد جدایه‌های باکتری‌های مورد بررسی نشان داد (شکل ۲) که بیشترین میزان فعالیت و جمعیت میکروبی در بازه‌ی زمانی ۱۳-۱۶ ساعت است که بیانگر بهترین زمان مورد استفاده از محلول باکتریایی در فرآیند MICP می‌باشد. نکته قابل توجه در این امر این است که افزایش فعالیت آنزیم اوره‌آزی وابسته به حضور خود آنزیم و در حقیقت وابسته به وجود باکتری در محیط است. منحنی رشد باکتری نشان می‌دهد که رشد و فعالیت باکتری در چه بازه‌ی زمانی حداکثر، در چه زمانی حداقل و در چه بازه‌ی وارد فاز مرگ می‌شود که با توجه به این اطلاعات می‌توان مشخص کرد که در چه بازه‌ی زمانی فعالیت آنزیم اوره‌آز در حداکثر مقدار خود قرار می‌گیرد (۱).

آزمون سیترات نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها بجز (U3) توانایی تجزیه سیترات را داشته و با قلیایی کردن محیط کشت در حضور معرف BTB، محیط کشت از رنگ سبز به رنگ آبی تغییر کرد. بررسی آزمون نشاسته گویای آن بود که در هیچ یک از موارد هاله‌ای کدر در اطراف جدایه‌ها مشاهده نشد. نتایج حاصل رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که همه جدایه‌ها بجز جدایه (U3)، گرم مثبت بوده با مشاهده جدایه‌ها در زیر میکروسکوپ، تمام جدایه‌ها به شکل باسیل بودند. آزمون کاتالاز نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌ها هوازی بودند. نتایج حاصل از فلورسانس بودن جدایه‌ها نشان داد که بعد از کشت باکتری در محیط King B و قرار دادن در نور لامپ UV هیچ تغییر رنگ مشاهده نشد و بیانگر عدم وجود خاصیت فلورسانس در جدایه‌ها می‌باشند (جدول ۲) (۱۹).



شکل ۲- منحنی رشد جدایه‌های میکروبی
Figure 2- Growth curve of microbial isolates

داده شده است. خاک مورد استفاده دارای بافت شن، غیر شور (۱/۶۸ دسی‌زیمنس بر متر)، pH حدود خنثی و با مقدار کربن آلی (۰/۴۳ درصد) کم بود.

بررسی مقاومت فروروی و آزمون فرسایش بادی
برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بستر مورد استفاده در بررسی مقاومت فروروی و آزمون فرسایش بادی در جدول ۳ نشان

جدول ۳- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بستر مورد استفاده
Table 3- Some physical and chemical properties of the studied soil

بافت خاک Soil texture	pH	هدایت الکتریکی EC	تخلخل Prosity	رس Clay	سیلیت Silt	شن Sand
		(dS.m ⁻¹)	%	%	%	%
شنی Sandy	7.1	1.68	54	0	0	100

الف) مقاومت فروروی

شیمیایی را کاتالیز کنند و در نتیجه مواد معدنی را رسوب داده و خصوصیات مکانیکی خاک را دچار تغییر سازند ولی در غیر این صورت با افزایش عمق، میزان مقاومت و نیز درصد کربنات کلسیم تشکیل شده کاهش می‌یابند. همچنین نتایج نشان داد که دو محلول باکتری با اوره و کربنات کلسیم در کنار هم تأثیر چشمگیری در افزایش مقاومت و کاهش فرسایش بادی داشتند. همچنین افزایش مقاومت ناشی از به‌سازی زیستی تنها به مقدار کلسیت تشکیل شده بستگی ندارد بلکه محل تشکیل رسوب، تعداد پیوندها و سایر متابولیت‌های آزاد شده در اثر فعالیت باکتری نیز مؤثرند (۱۷).

ب) فرسایش بادی

نتایج مربوط به مقدار خاک فرسایش یافته در تیمارهای مختلف و همچنین در سرعت‌های مختلف باد حاصل از تونل باد نشان داد (شکل ۳) که با افزایش سرعت باد از ۱ تا ۹ متر بر ثانیه، میزان فرسایش بادی در همه نمونه یکسان و صفر بوده است اما با افزایش سرعت باد از ۹/۴ متر بر ثانیه، در نمونه شاهد (بدون باکتری و بدون عامل سیمانی) فرسایش بادی اتفاق افتاد و باد با این سرعت توانست ذرات ماسه را حرکت دهد پس می‌توان نتیجه گرفت که حد آستانه فرسایش بادی برای این تیمار ۹/۴ متر بر ثانیه بود.

نتایج حاصل از مقاومت فروروی نشان داد (جدول ۴) که اثر اصلی تیمار میکروبی و غلظت کلرید کلسیم و اثر متقابل آنها بر مقاومت به فروروی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. در همه سطوح استفاده از دو محلول باکتری و عامل سیمانی تأثیر معنی‌داری در افزایش مقاومت فروروی نسبت به شاهد داشتند (جدول ۵). افزایش مقاومت فروروی در نمونه حاوی MICP می‌تواند به دلیل تشکیل رسوب کربنات کلسیم در لایه سطحی خاک باشد (۹). مقاومت فروروی در تیمار شاهد (بدون باکتری و بدون محلول سیمانتاسیون) بطور میانگین ۰/۰۰۰۱ مگاپاسکال و همچنین در تیمار (بدون باکتری ولی دارای محلول عامل سیمانی) بطور میانگین ۰/۹۷ مگاپاسکال در غلظت ۰/۱ مولار برآورد شد. همچنین در غلظت ۰/۱ مولار جدایه U8 بیشترین مقاومت را داشته که مناسب برای خاک‌هایی با شوری کم می‌باشد. در غلظت ۰/۵ مولار جدایه U40 دارای بهترین عملکرد و مقاومت به فروروی (۱۳/۲۴ مگاپاسکال) و در غلظت‌های ۱ مولار جدایه U3، بهترین پاسخ را داشت (۱۳/۵۶ مگاپاسکال) که می‌توان یک جدایه مناسب برای خاک‌های مناطق شور به‌ویژه مناطق اطراف دریاچه ارومیه در نظر گرفت. زمانی که مواد غذایی مناسب برای میکروارگانیسم‌ها فراهم باشد می‌توانند در زیرسطح، واکنش‌های

جدول ۴- تجزیه واریانس مقاومت فروروی

Table 4- Analysis of variance of soil penetration resistance

منبع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean square
مقاومت فروروی Penetration resistance		
(a) Microbial treatment تیمار میکروب	7	175.37**
(b) Concentration غلظت	2	37.62**
a×b	14	15.36**
Error اشتباه	48	0.21

ns و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

ns and **, non- significant and significant at 1% probability levels

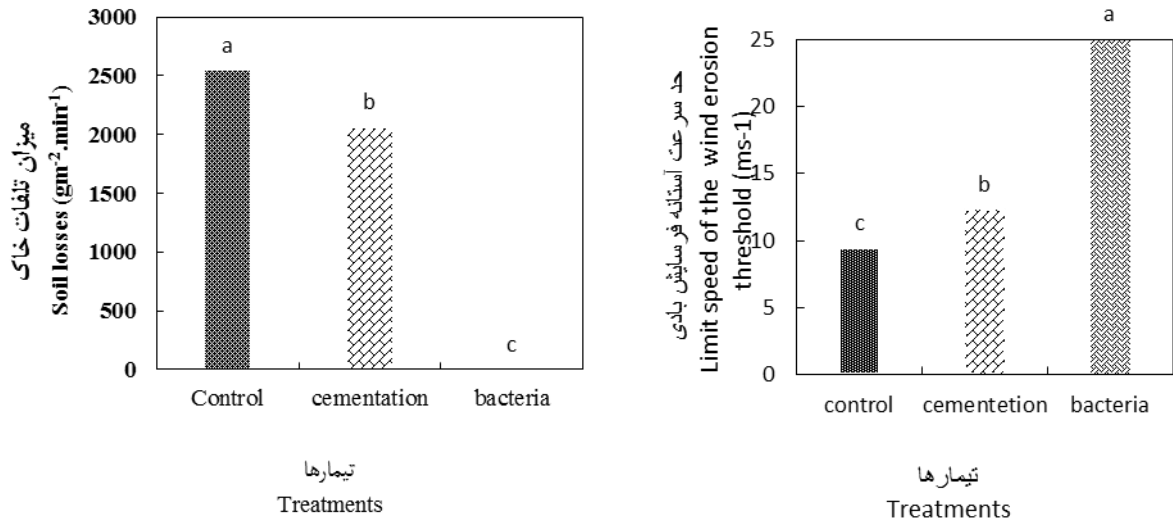
جدول ۵- نتایج حاصل از مقاومت فروروی (بر حسب مگاپاسکال) در ۵ سانتی متری از سطح خاک

Table 5- The results of soil penetration resistance at 5 cm of soil depth

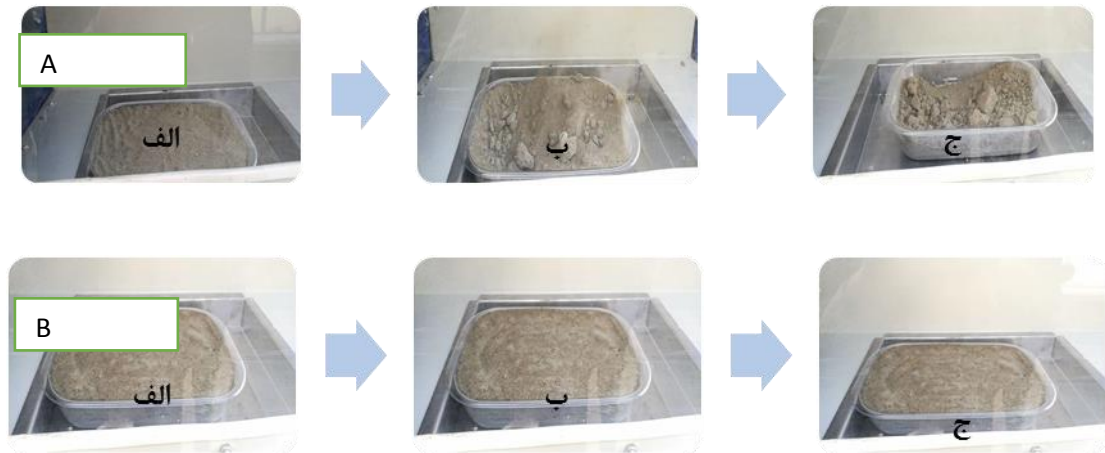
باکتری Bacteria	سطوح مختلف کلرید کلسیم به همراه اوره (مولار) Different levels of calcium chloride and urea (molar)		
	0.1	0.5	1
<i>B. pasteurii</i>	7.29 ^f	9.03 ^e	6.27g
U3	9.08e	10.26cd	13.56a
U8	12.94a	10.7bcd	6.04g
U16	4.63h	5.83g	1.21ij
U35	6.56fg	10.84bc	1.87i
U40	9.99d	13.24a	11.16b
Control	0.0001k	0.0001k	0.0001k
Cementation agent	0.97j	1.13ij	0.0001k

تیمار بدون باکتری اما با محلول عامل سیمانی به ترتیب ۲۵۴۲ و ۲۰۵۷ گرم بر متر مربع در دقیقه بدست آمد. این در حالی است که در نمونه‌های MICP، پس از انجام آزمون تونل باد، میزان تلفات خاک برابر صفر گرم بر متر مربع در دقیقه بود (شکل ۴). پس می‌توان بیان داشت که سرعت آستانه فرسایش بادی برای نمونه‌های MICP بالاتر از حداکثر سرعت تونل باد (۲۵ متر بر ثانیه) می‌باشد (۸ و ۹).

همچنین تیمار بدون باکتری اما با محلول عامل سیمانی، با افزایش سرعت باد از ۱۲/۳ متر بر ثانیه، فرسایش بادی شروع شد و باد با این سرعت توانست ذرات ماسه را حرکت دهد پس می‌توان نتیجه گرفت که حد آستانه فرسایش بادی برای این تیمار ۱۲/۳ متر بر ثانیه بود (شکل ۳). میزان ذرات ماسه از دست رفته در اثر فرسایش بادی در نمونه شاهد (بدون باکتری و بدون محلول سیمانی‌کننده) و



شکل ۳- حد سرعت آستانه فرسایش بادی (ms⁻¹) و میزان تلفات خاک (gm².min⁻¹) در سطوح مختلف تیمار میکروبی
Figure 3- Limit speed of the wind erosion threshold (ms⁻¹) and Soil losses (gm².min⁻¹) at different levels of microbial treatments



شکل ۴- نتایج حاصل از تونل باد؛ A: نمونه شاهد، B: نمونه MICP،
الف: سرعت باد ms⁻¹ . ب: سرعت باد ۹/۴ ms⁻¹ (باد آهسته)، ج: سرعت باد
۲۵ms⁻¹ (باد شدید)

Figure 4- Result of the wind tunnel; A: control samples, B: MICP samples,
a: wind speed (0 ms⁻¹), b: wind speed (9/4 ms⁻¹)

نتیجه‌گیری

تواند به دلیل فعالیت جدایه‌های باکتری، فعل و انفعالات شیمیایی و تشکیل رسوب کربنات کلسیم در بین حفرات خاک باشد که سبب ایجاد یک لایه سخت شده است. همچنین مقاومت به‌دست آمده با استفاده از باکتری‌های جداسازی شده، بیانگر این مطلب است که میکروارگانیسم‌های ناشناخته بسیاری وجود دارند که می‌توانند سیمانته‌شدن زیستی به واسطه رسوب میکروبی کربنات کلسیم را هر چه بهتر و مقاوم‌تر حتی نسبت به *باسیلوس پاسته‌آوری* انجام دهند و احتمالاً با توجه به بومی بودن، استقرارپذیری بهتری خواهند داشت این در حالی است که کاهانی و همکاران (۱۳۹۱)، که از باکتری *باسیلوس پاسته‌آوری* به‌منظور به‌سازی زیستی کربنات کلسیم استفاده استفاده کرده بود، که از طریق تزریق تک فازی محلول‌های باکتری و سیمانتاسیون و بعد از گذشت ۲۸ روز میزان مقاومت فروری نمونه‌ها ۸۰۰ کیلو پاسکال گزارش کردند (کاهانی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین میزان مقاومت فروری در نمونه‌های MICP که توسط ملکی کالکر و همکاران (۱۳۹۴) صورت گرفته است، برابر با ۵۶ کیلو پاسکال گزارش شد.

طبق نتایج بدست آمده، تفاوت در مقدار فرسایش بین تیمارهای شاهد (بدون باکتری و بدون محلول عامل سیمانی)، تیمار بدون باکتری ولی با محلول عامل سیمانی و تیمارهای MICP (حضور باکتری و محلول سیمانی کننده) ارتباط مستقیمی با حضور محلول باکتری در خاک دارد. به‌طوری‌که مقدار فرسایش خاک در تیمار MICP در سرعت باد ۲۵ متر در ثانیه به صفر رسید که این نشان دهنده تأثیر بسیار چشمگیر MICP در کنترل فرسایش بادی به‌ویژه در سرعت‌های بالای باد دارد در حالیکه جعفری شالکوهی و همکاران (۱۳۹۴)، که از مواد پلیمری (نظیر پلیمر امولسیون سلولوزی) برای تثبیت ریزدانه‌ها برای مقابله با فرسایش بادی استفاده کرده بودند، میزان فرسایش خاک به‌طور میانگین ۱۵۲ گرم بر متر در دقیقه گزارش شد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده، اعمال تیمارهای MICP در سطح خاک علاوه بر اینکه مقاومت آن را در برابر تنش برشی جریان باد افزایش داده، مقاومت خاک در مقابل نیروی فروری را نیز بالا برده است. افزایش مقاومت فروری تیمارهای MICP می

منابع

- 1- Alhour M.T. 2013. Isolation, Characterization and Application of Calcite Producing Bacteria from Urea Rich Soils. The Master thesis of science in biotechnology. Islamic University – Gaza.
- 2- Al-Thawadi S.M. 2008. High Strength In-situ Biocementation of Soil by Calcite Precipitating Locally Isolated Ureolytic Bacteria. Ph.D thesis for Biological Sciences & Biotechnology, Faculty of Murdoch University, Perth, Western Australia. (In Persian with English abstract)
- 3- Cornelis W.M., and Gabriels D. 2005. Optimal windbreak design for wind-erosion control. *Journal of Arid Environments* 61(2): 315-332.
- 4- DeJong J.T., Mortensen B.M., Martinez B.C., and Nelson D.C. 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering* 36: 197-210.
- 5- Ekhtesasi M.R., and Sepehr A. 2009. Investigation of wind erosion process for estimation, prevention, and control of DSS in Yazd–Ardakan plain. *Environmental Monitoring and Assessment* 159: 267–280.
- 6- Goudie A.S. 2009. Dust storms: recent developments. *Journal of Environmental Management* 90: 89–94.
- 7- Azimzadeh H., and Fotouhi F. 2014. The study on the effects of desert pavement on wind erodibility (Case study: Yazd- Ardakan plain). *Iranian Journal of Rangeland and Desert Research* 20(4): 695-705. (In Persian)
- 8- Hoshmand A. 2012. Laboratory evaluation of effective factors on bacterial deposition of calcium carbonate in sand. The theses of sahand industrial University. Faculty of civil Engineering.
- 9- Kahani M., Kalantari F., Bazzazzadeh R., and Mirzaii B. 2012. Biological calcium carbonate sedimentation in sandy soils and its effect on increasing soil resistance. *Journal of Environmental Science and Engineering* 52: 11-19. (In Persian with English abstract).
- 10- Li J., Okin G.S., Alvarez L., and Epstein H. 2007. Quantitative effects of vegetation cover on wind erosion and soil nutrient loss in a desert grassland of southern New Mexico, USA. *Biogeochemistry* 85(3): 317-332.
- 11- Maleki Kakler M., Ebrahimi S., Asadzadeh F., and Emami Tabrizi M. 2016. Evaluation efficiency of carbonate for stabilization of sandy soils. *Iran Water and soils Research*. 47(2): 407-415. (In Persian with English abstract)
- 12- Khosroshahi M., Abtahi M., Kashki M.T., Lotfinasab S., Dargahian F., and Ebrahimi Z. 2017. Determining deserts domain of Iran aspect of natural environmental factors. *Iranian Journal of Rangeland and Desert Research* 24(2): 404-417. (In Persian)
- 13- Ekhtesasi M.R., and Hazirei F. 2015. Effects of cement mulch combinations on sand dunes fixation. *Journal of Rangeand Watershed Management* 68(4): 739-750. (In Persian)

- 14- Mortensen B.M., and DeJong J.T. 2011. Strength and stiffness of MICP treated sand subjected to various stress paths. In *Geo-Frontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering*. (pp. 4012-4020).
- 15- Movahedan M., Abbasi N., and Keramati M. 2012. Wind erosion control of soils using polymeric materials. *Eurasian Journal of Soil Science* 1(2): 81-86.
- 16- Nordstrom K.F., and Hotta S. 2004. Wind erosion from cropland in the USA: a review of problems, solutions and prospects. *Geoderma* 121(3-4): 157-167.
- 17- Rezaei Banafsheh M., Zeraei I., and Zanganeh S. 2013. Study the effects of dust storms on human life and the environment. *First National Geography Conference, Tehran*. page 76-86. (In Persian with English abstract)
- 18- Shafabakhsh K., and Ebrahimi S. 2009. *Guide for fixing pavement layers and roads*. Transportation Research Institute publication. Second edition.
- 19- Sharifi M. 1994. *Interpretation and principles of biochemical tests in medical bacteriology*. first edition. Tabriz publication.
- 20- Skidmore E.L., and Hagen L.J. 1977. Reducing wind erosion with barriers. *Transactions of the ASAE*, 20(5): 911-0915.
- 21- Song H.W. 2007. Corrosion monitoring of reinforced concrete structures-A review. *International Journal of Electrochem. Science* 2: 1-27.
- 22- Tibke G. 1988. Basic principles of wind erosion control. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 22: 103-122.
- 23- Toure A.A., Rajot J.L., Garba Z., Marticorena B., Petit C., and Sebag D. 2011. Impact of very low crop residues cover on wind erosion in the Sahel. *Catena* 85(3): 205-214.
- 24- Van Paassen L.A., Harkes M.P., Van Zwieten G.A., Van der Zon W.H., Van der Star W.R.L., and Van Loosdrecht M.C.M. 2009. Scale up of BioGrout: a biological ground reinforcement method. *Proceedings of the 17th International conference on soil mechanics and geotechnical engineering, Alexandria, Egypt*, Pp: 2328-2333.
- 25- Van Paassen L.A., Daza C.M., Staal M., Sorokin D.Y., Van der Zon W., and Van Loosdrecht M.C.M. 2009. Potential soil reinforcement by biological denitrification. *Ecological Engineering In Press, Corrected Proof*.
- 26- Whiffin V.S. 2004. *Microbial CaCO₃ Precipitation for the production of Biocement*. Ph.D thesis for Biological Sciences & Biotechnology, Faculty of Murdoch University, Perth, Western Australia.
- 27- Young D.L., and Schillinger W.F. 2012. Wheat farmers adopt the undercutter fallow method to reduce wind erosion and sustain profitability. *Soil and Tillage Research* 124: 240-244.
- 28- Yua J.J., Smithson S.L., Thomasa P.W., Kirklandb T.N., and Cola G.T. 1997. Isolation and characterization of the urease gene (URE) from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Gene* 198: 387-391.
- 29- Zamani S., and Mahmoodabadi M. 2013. Effect of particle-size distribution on wind erosion rate and soil erodibility. *Archives of Agronomy and Soil Science* 59(12): 1743-1753.

Isolation of Efficient Bacteria in Microbial-induced Calcite Precipitation and Evaluation of their Ability in Control of Windy Erosion of Saline Soils around Urmia Lake

M. Moinfar¹- M.H. Rasouli-Sadaghiani²- M. Barin^{3*}- F Asadzadeh⁴

Received: 08-07-2019

Accepted: 27-11-2019

Introduction: Dust is one of the most important destructive phenomena in the world, that annually causing damage to human health and the environment. This issue ranks after two major challenges of climate change and water scarcity as the third most important challenge facing the world in the 21st century that is considered. Microbial-induced calcite precipitation (MICP) is a relatively green and sustainable soil improvement technique. It utilizes biochemical process that exists naturally in soil to improve engineering properties of soils. The calcite precipitation process is uplifted by the mean of injecting higher concentration of urease positive bacteria and reagents into the soil. In this process, the enzyme present in the bacteria hydrolyzes the urea in the environment and through reacting with the calcium ion, leads in the deposition of calcium carbonate. The main objective of this study is isolation native ureolytic bacteria from different soil of around Urmia Lake and then, the evaluation their efficiency in the MICP for stabilization of sandy soils and reduce windy erosion.

Materials and Methods: In order to isolate ureolytic bacteria, 25 soil samples were taken from different land use in West Azarbaijan province, Iran. To increase the number of ureolytic bacteria in soil samples were used from the enrichment solution and then ureolytic bacteria were isolated and purified. These isolates were subjected to various biochemical tests, as well as the growth curve and urease activity were determined. In order to investigate the potential for soil improvement, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with two factors including microbial treatment in eight levels (including five isolated bacteria (U3, U8, U16, U35 and U40) and *Bacillus pasteurii* (as control Positive), non-bacterial and non-cementation (as control negative) and non-microbial but with cementation solution treatments) and another factor including different concentrations of calcium chloride solution with urea at three levels (0.1, 0.5 and 1 molar), in three replications. After injection of cementation solution and bacterial solution to soil, penetration resistance and windy erosion rates in sandy soil were assessed

Results and Discussion: In study, overall 45 isolates of the bacteria were isolated and purified. Among of 44 isolates, five bacterial isolates (U3, U8, U16, U35 and U40) had the highest urease activity. The growth curve of bacterial isolates showed that the highest urease activity and microbial population were in the time period of 13 to 16 hours after microbial culture, which it is represents the best time use bacterial solution in the MICP process. According to the results of soil improvement tests, the amount of soil erosion in the MICP treatment at a wind speed of 25 m/s was zero and the rate of penetration resistance was averaged over 13 MPa, which has a very impressive impact on MICP in controlling wind erosion, especially at high speeds of wind. The results showed that U3 and U16 isolates had the highest amount of urea hydrolysis and also U16 and U3 had the lowest and the highest tolerance to salinity, respectively. The results of the wind tunnel showed that the wind erosion threshold in negative control samples (non-bacterial and non-cementation) were 9.4 m/s and for MICP samples (including five isolated bacteria and *Bacillus pasteurii*) were much higher than the wind tunnel speed in the wind tunnel machine in Urmia university (25 m/s). The maximum penetration resistance (13.5 MPa) was obtained in the sample treated with U3 isolate and 1 molar calcium chloride, but negative control treatments (non-bacterial and non-cementation) as well non-microbial but with cementation solution treatments were 0 and 97.0 MPa, respectively.

Conclusion: The amount of soil wind erosion was zero in MICP treatment with the wind tunnel speed 25 m/s that indicates very important effects MICP to control wind erosion of sandy soils to compare control treatments (non-bacterial and non-cementation and non-microbial but with cementation solution) in high wind speeds. The application of MICP treatment in the soil, in addition to increasing its wind erosion resistance, also increased penetration resistance in the soil. Increasing the penetration resistance of MICP treatments (including five

1, 2, 3 and 4- Graduated M.Sc., Professor, Assistant Professor and Associate Professor Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: m.barin@urmia.ac.ir)

DOI: 10.22067/jsw.v34i1.69069

isolated and *Bacillus pasteurii*) can be due to the activity of bacterial isolates, chemical interactions, and the formation of calcium carbonate precipitation into soil cavities, which causes to form a hard layer in soil. Also, obtained resistance by using isolated bacteria indicates that there are many unknown microorganisms that can carry out MICP better than *Bacillus pasteurii* and probably they will be better compatible and establish because they are native.

Keywords: Biological cementation, Penetration resistance, Ureolytic bacteria, Windy erosion