



Impact of microbial-induced calcium carbonate precipitation by native *Bacillus licheniformis* on enzymatic activity in Khuzestan sand dunes

Negin Pirhadi¹ | Bijan Khalilimoghadam² , Habiballah Nadian Ghomsheh³ | Hossein Motamedi^{4,5}

1. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran. E-mail: negin_pirhadi@yahoo.com
2. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran. E-mail: khalilimoghadam@asnrukh.ac.ir
3. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran. E-mail: nadian_habib@yahoo.com
4. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: motamedih@scu.ac.ir
5. Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: motamedih@scu.ac.ir

Article Info

Article type: Research Article

Article history:

Received: Feb. 28, 2025

Revised: July. 3, 2025

Accepted: July. 20, 2025

Published online: Oct. 2025

Keywords:

Catalase,
Dehydrogenase,
Urease,
Vvinasse

ABSTRACT

Bio and non-bio additives are considered effective approaches for increasing the stabilization of sand dunes, and one of the novel methods to achieve this is Microbial Carbonate Precipitation (MICP). This study aimed to investigate the effect of MICP using indigenous bacteria *Bacillus licheniformis* on the enzymatic activity of sand dunes. This study evaluated the impact of vinasse (a byproduct of sugarcane industries) as a culture medium, as well as the effect of vinasse pH, the addition of urea and calcium chloride, and incubation time on the activities of soil catalase, dehydrogenase, and urease enzymes. The results showed that the indigenous isolates of *B. licheniformis* were capable of generating enzymatic activity similar to or better than that of the indicator bacterium *S. pasteurii* in the soil. The highest catalase and dehydrogenase activities in soils treated with *B. licheniformis* were measured at 3.2 KMnO₄.g-1.h-1 and 7.609 µg TPF.g-1 dm.16h-1, respectively, while the highest urease activity was observed in the treatment with *S. pasteurii*, registering at 7.512 µgNH₄⁺.N. g-1.2h-1. In addition, the incubation time and initial pH of vinasse significantly influenced enzymatic activity. This research demonstrated that the use of indigenous bacteria in MICP processes could serve as a sustainable and economical method for improving soil characteristics and enhancing its structure.

Cite this article: Pirhadi, N., Nadian Ghomsheh, H. A., Khalili moghadam, B., & Motamedi, H. (2025). Impact of microbial-induced calcium carbonate precipitation by native *Bacillus licheniformis* on enzymatic activity in Khuzestan sand dunes, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 56 (8), 2285-2299. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.391238.669893>

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.391238.669893>



EXTENDED ABSTRACT

Introduction

Recently, there has been increasing emphasis on ecosystem-based and biological methods for soil conservation, such as stabilizing sand dunes, has led to innovative strategies that leverage soil microbial communities. The microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) method generates carbonate and ammonium ions through the hydrolysis of urea by microbes, resulting in calcium carbonate precipitates in the presence of calcium. Ureolytic bacteria are particularly suitable for biocement technology due to their straightforward processes. Selecting appropriate strains for MICP is crucial, with *Sporosarcina pasteurii* being the primary focus due to its effectiveness. Moreover, indigenous bacteria offer advantages over non-native strains, as they adapt better to local environments and can reduce costs. This study examines the enzymatic activity of sandy soils treated with vinasse and *Bacillus licheniformis* in comparison to *S. pasteurii*.

Material and methods

The sampling area features sandy soil with neutral pH and high electrical conductivity. Three isolates of *B. licheniformis* were obtained from sandy dunes as indigenous strains, while *S. pasteurii* served as a control. Bacterial inoculum reached approximately 10^9 CFU. Collected sands were sterilized and placed in experimental trays, with three types of vinasse applied, differing in pH. Treatments included acidic and neutral vinasses, supplemented with urea and calcium chloride as cementing agents. Sampling occurred at the end of first, third, and fifth weeks of incubation to measure enzymatic activities of catalase, dehydrogenase, and urease. Data analysis used a split-plot design and Duncan's multiple range test at a 5% significance level.

Results and discussion

The highest catalase activity was observed in the combination of *B. licheniformis* strain 1D2, vinasse from alcohol and yeast mixture, with acidic pH, along with urea and calcium chloride at the third week. The catalase enzyme activity indicates the activity of aerobic microorganisms and soil fertility. Studies show that microbial communities under oxidative stress (higher H_2O_2 production) have increased catalase concentrations. Some reports indicate increased catalase enzyme activity in soils irrigated with vinasse, leading to improved performance and growth of sugarcane seedlings.

Statistical analysis indicated that bacterial treatments and incubation time significantly affect dehydrogenase enzyme activity in sand dunes. *B. licheniformis* strain 1D1 and *S. pasteurii* exhibited the highest activity, respectively. The increase in dehydrogenase activity signifies a rise in microbial population and soil ecosystem dynamics. Dehydrogenases are important as indicators for assessing microbial activity in soil, and their activity has been documented in sandy soils. During the incubation period, dehydrogenase activity showed a downward trend due to the depletion of carbon sources.

The highest urease activity was observed with *S. pasteurii* and *B. licheniformis* strain 1S5 in neutral vinasse combined with calcium chloride and urea. Urease activity showed a decreasing trend from the first to the fifth week. *S. pasteurii* is one of the most common urease-producing bacteria, and urease activity has also been reported in *B. licheniformis* RC636. In this study, higher urease activity in sand dunes was noted when isolates grown in neutral vinasse, as these isolates prefer a pH higher than acidic. Urease activity was greater in treatments with urea and calcium chloride, leading to the production of ammonia and carbonate and the precipitation of calcium carbonate. The declining trend in enzyme activity was associated with cellular aging and the salinity of the vinasse environment.

Conclusions

The study results indicate that indigenous isolates performed better in tests, and selecting isolates with lower urease activity but a slower release rate promotes more effective bonding between particles (like sand). Field-scale investigations could yield even better results.

Author Contributions

Negin Pirhadi: Data collection, data analysis and interpretation, writing the original draft.

Habib Nadian: project administration, reviewing and editing the manuscript.

Bijan Khalili moghadam: Contribution to experimental design, reviewing and editing the manuscript, supervision,

Hossein Motamedi: Conceptualization, methodology, providing resources, reviewing and editing the manuscript,

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

This work is part of the doctoral dissertation of [Negin Pirhadi]. The authors would like to thank the reviewers and editor for their critical comments that helped to improve the paper. The authors gratefully acknowledge the support and facilities provided by the Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

The authors would like to thank all participants of the present study.

Ethical considerations

The authors refrained from engaging in data fabrication, falsification, plagiarism, and any form of misconduct.

Conflict of interest

The author does not declare any conflicts of interest.

تأثیر رسوب میکروبی کربنات کلسیم القا شده با باکتری بومی *باسیلوس لیچنیفورمیس* بر فعالیت آنزیمی شن‌های روان خوزستان

نگین پیرهادی^۱ | حبیب‌اله نادیان قمشه^۲ | بیژن خلیلی مقدم^۳ | حسین معتمدی^۴

۱. گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. رایانامه:

negin_pirhadi@yahoo.com

۲. گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. رایانامه:

nadian_habib@yahoo.com

۳. نویسنده مسئول، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. رایانامه:

khalilimoghadam@asnrukh.ac.ir

۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: motamedih@scu.ac.ir

۵. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: motamedih@scu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	افزودنی‌های زیستی و غیرزیستی، رویکردی مؤثر برای افزایش تثبیت شن روان به شمار رفته و یکی از روش‌های نوین در دستیابی به این امر، رسوب میکروبی کربنات کلسیم (MICP) است. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر رسوب میکروبی کربنات کلسیم با استفاده از باکتری‌های بومی <i>Bacillus licheniformis</i> بر فعالیت آنزیمی شن‌های روان انجام شد. در این پژوهش، تأثیر ویناس (پسماند تولیدی صنایع نیشکر) به عنوان محیط کشت و همچنین تأثیر پی‌اچ ویناس، افزودن اوره و کلرید کلسیم و زمان بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، دهیدروژناز و اوره‌آز شن‌های روان ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که جدایه‌های بومی <i>B. licheniformis</i> در مقایسه با باکتری شاخص <i>Sporosarcina pasteurii</i> قادر به ایجاد فعالیت آنزیمی مشابه یا بیشتر در شن‌های روان بودند. بیشترین فعالیت کاتالاز و دهیدروژناز به ترتیب با مقادیر $1.2/3 \text{ KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ و $1609/7 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{TPF} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ در شن‌های روان تیمار شده با <i>B. licheniformis</i> مشاهده شد. فعالیت اوره‌آزی بیشتر نیز در تیمار با <i>S. pasteurii</i> با مقدار $1.2\text{h} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \mu\text{gNH}_4^+ \cdot \text{N}^{-1}$ مشاهده گردید. علاوه بر این، زمان انکوباسیون و پی‌اچ اولیه ویناس تأثیر قابل توجهی بر فعالیت آنزیمی داشتند. این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از باکتری‌های بومی در فرآیندهای MICP می‌تواند به عنوان یک روش پایدار و مقرون به صرفه برای بهبود ویژگی‌های شن‌های روان و تقویت ساختار آن مطرح شود.
واژه‌های کلیدی: اوره‌آز، دهیدروژناز، کاتالاز، ویناس.	

استناد: پیرهادی، نگین؛ نادیان قمشه، حبیب‌اله؛ خلیلی مقدم، بیژن؛ و معتمدی، حسین (۱۴۰۴). تأثیر رسوب میکروبی کربنات کلسیم القا شده با باکتری بومی *باسیلوس لیچنیفورمیس* بر فعالیت آنزیمی شن‌های روان خوزستان، *مجله تحقیقات آب و خاک ایران*، ۵۶ (۸)، ۲۲۸۵-۲۲۹۹.



<https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.391238.669893>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2025.391238.669893>

مقدمه

استفاده از افزودنی‌های زیستی و غیرزیستی برای تثبیت شن، به عنوان یکی از روش‌های مؤثر حفاظتی، می‌تواند آستانه برداشت شن‌های روان را افزایش دهد. در سال‌های اخیر، توجه پژوهشگران به رویکردهای بوم‌سازگانی و زیستی در حفاظت از منابع خاک، منجر به شکل‌گیری رویکردی نوین برای بهره‌گیری از قابلیت‌های بی‌شمار جامعه میکروبی خاک در حفظ و احیای پایدار بوم‌سازگان‌ها شده است. در روش رسوب میکروبی کربنات کلسیم (MICP)، مینی بر هیدرولیز اوره توسط سلول‌های میکروبی یا آنزیم اوره‌آز، یون‌های کربنات و آمونیوم تولید می‌شوند. یون‌های کربنات تولید شده در حضور یک منبع کلسیم به آسانی موجب تشکیل رسوب کربنات کلسیم می‌گردند (Harkes et al., 2010; Irfan et al., 2019; Tang et al., 2020; Liu et al., 2021). به دلیل سادگی و عدم تولید پروتون اضافی، از باکتری‌های هیدرولیز کننده اوره در بسیاری از کاربردهای فناوری سیمان زیستی تا به امروز استفاده شده است (Whiffin et al., 2007).

اتصال باکتری به شن تحت تاثیر عوامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلف قرار دارد. انتخاب سویه‌های مناسب برای پیاده‌سازی مؤثر روش MICP از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا بیشتر پژوهش‌های مرتبط با هیدرولیز آنزیمی اوره به دلیل توانایی بالای هیدرولیز اوره، بر سویه *Sporosarcina pasteurii* متمرکز شده‌اند (Lin et al., 2016). بنابراین، جداسازی، شناسایی و بررسی باکتری‌های بالقوه تولیدکننده اوره‌آز از جنس *باسیلوس* ضروری است، چرا که این باکتری‌ها قابلیت استفاده در شرایط آب و هوایی و شرایط محیطی مختلف را دارند (Leeprasert et al., 2022). عوامل متعددی وجود دارند که می‌توانند باکتری‌های معرفی شده به خاک را با چالش کاهش جمعیت و عدم کارایی مواجه کنند. تنش‌های ناشی از عوامل غیرزیستی، از جمله پی‌اچ، فشار اسمزی، دما و در دسترس بودن مواد غذایی، از جمله این عوامل هستند. این چالش‌ها ممکن است از طریق استفاده یا بهینه‌سازی باکتری‌های بومی برطرف شوند (Burbank et al., 2011).

Burbank et al. (2013) در پژوهش خود نشان دادند که غنی‌سازی باکتری‌های بومی هیدرولیزکننده اوره با استفاده از ملاس در شرایط آزمایشگاهی سبب رسوب مقدار زیادی کلسیت از سطح به عمق حدود ۵۰ سانتی‌متری ستون تهیه شده از شن ساحلی می‌شود. این یافته به این معناست که نیازی به کشت باکتری‌های خارجی نیست، که این خود منجر به کاهش هزینه‌ها و آسیب نرساندن به محیط زیست می‌گردد. علاوه بر آن، باکتری‌های بومی اورئولیتیک به‌خوبی با محیطی که از آن جدا شده‌اند سازگارند و در این شرایط، می‌توانند ماندگاری طولانی‌مدت را تضمین کنند (Imran et al., 2019). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سویه‌های بومی به اندازه باکتری شاخص *S. pasteurii* توانایی رسوب CaCO_3 را دارند (Imran et al., 2019; Leeprasert et al., 2022; Sohail et al., 2022). Nayanthara et al. (2019) بیان نمودند که یک رویکرد موفق‌تر، تقویت خاک با استفاده از باکتری‌های اورئولیتیک بومی است که در محیط‌های کشت آزمایشگاهی از قبل غنی‌سازی شده‌اند.

انتخاب روش مناسب برای یک مکان خاص در مقیاس وسیع کار دشواری است، اما به نظر می‌رسد که یک رویکرد ترکیبی شامل تقویت خاک و سپس تحریک زیستی، روشی مؤثر باشد (Graddy et al., 2021). چالش اصلی در MICP، افزایش جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز و تحریک آن‌ها برای تولید مقادیر کافی از این آنزیم است. یکی از راه‌حل‌های مؤثر برای دستیابی به این هدف، افزودن محیط‌های کشت مناسب به خاک می‌باشد. با این حال، مشکل اصلی محیط‌های کشت میکروبی رایج، هزینه‌های بالای آن‌هاست. برای اقتصادی کردن این روش در عمل، استفاده از ضایعات آلی پیشنهاد می‌شود (Nikseresht et al., 2020). ویناس، که یکی از پسماندهای آلی حاصل از کارخانجات کشت و صنعت نیشکر است و در خوزستان به وفور یافت می‌شود، می‌تواند به عنوان یک محیط غذایی مناسب برای رشد ریزجانداران هدف مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به اینکه بیشتر پژوهش‌ها بر تأثیرات MICP بر ساختار فیزیکی و یا فعالیت‌های شیمیایی بسترهای مورد نظر متمرکز شده‌اند و نمودهای مرتبط با ریزموجودات مورد استفاده و فعالیت متابولیکی آن‌ها پس از اعمال تیمارها به‌ندرت مورد توجه قرار گرفته است، این پژوهش به‌منظور بررسی فعالیت آنزیمی شن‌های روان تحت تیمار با محلول‌های تهیه شده از ویناس و باکتری بومی *Bacillus licheniformis* در مقایسه با باکتری شاخص *S. pasteurii* در فرایند MICP طی دوره‌های زمانی مشخص انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

منطقه نمونه‌برداری به مختصات $31^{\circ} 28' 6'' \text{N}$ - $53^{\circ} 8' 31'' \text{E}$ و $48^{\circ} 15' 18'' \text{N}$ - $48^{\circ} 23' 55'' \text{E}$ در شمال غرب شهرستان اهواز

واقع شده است. بافت خاک این منطقه شنی با پی‌اچ خنثی و قابلیت هدایت الکتریکی زیاد و برابر با $7/5 \text{ mS/cm}$ بود.

تهیه مایه تلقیح باکتریایی

از سه جدایه باکتریایی *B. licheniformis* که از شن‌های روان منطقه نمونه‌برداری جداسازی شده‌اند، به‌عنوان جدایه‌های اورثولیتیک بومی استفاده شد. اطلاعات مربوط به این جدایه‌ها با شماره‌های دسترسی MZ057842، MZ057843 و OP329211، که به ترتیب به نام‌های *B. licheniformis* 1S5، *B. licheniformis* 1D1 و *B. licheniformis* 1D2 در پایگاه داده به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov موجود است، ثبت شده‌اند (پیرهادی و همکاران، ۱۴۰۳؛ Pirhadi et al., 2024). همچنین، باکتری شاخص *S. pasteurii* PTCC 1645 نیز از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تأمین شد تا عملکرد آن در آزمایش‌ها با جدایه‌های بومی مقایسه شود. به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی از محیط کشت NB استفاده شد. مقداری از کلونی باکتری در محیط کشت مذکور تلقیح و برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. پس از کشت باکتری‌ها درون ویناس در زمان‌های ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از انکوباسیون، سری رقت 10^{-1} - 10^{-9} با استفاده از سرم فیزیولوژیک (0.9% NaCl) تهیه و درون پلیت‌های نوترینت آگار کشت داده شد. پس از ۲۴-۱۸ ساعت از انکوباسیون، شمارش کلونی صورت گرفت و زمانی که جمعیت به 10^9 CFU/mL رسید، محلول برای تزریق به سینی شن مناسب در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی تیمارهای MICP

شن‌های جمع‌آوری شده در آون با دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت استریل شده و سپس در سینی‌های آزمایشی با ابعاد $5 \times 35 \times 10.5$ سانتی‌متر ریخته شدند.

از سه نوع ویناس حاصل از الکل، خمیرمایه و مخلوط الکل و خمیرمایه با غلظت ۱:۱ برای محلول‌پاشی روی سطح سینی‌های حاوی شن استفاده شد. برای هر نوع ویناس، دو تیمار در نظر گرفته شد: ویناس‌های با پی‌اچ اسیدی و ویناس‌هایی که پی‌اچ آن‌ها با استفاده از NH_4OH ۱ نرمال بر روی ۷ تنظیم و خنثی گردید. در مرحله بعد، ویناس‌های اسیدی و خنثی در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. سپس از مایه تلقیح باکتریایی هر جدایه به اندازه ۱۰ درصد ویناس به هر لیتر ویناس تلقیح و برای مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای هر تیمار، یک کنترل بدون تلقیح نیز در نظر گرفته شد. در زمان اعمال تیمارها، به نیمی از ویناس‌های تلقیح‌شده، اوره و کلرید کلسیم به عنوان مواد سیمانی‌کننده به اندازه دو درصد (Naeimi et al., 2023) از ویناس، افزوده شده و پس از مخلوط شدن، به طور یکنواخت بر روی سینی‌های حاوی شن اسپری شدند. لازم به ذکر است که افزودن ویناس و اعمال تیمارها در یک روز و یکبار صورت گرفت. نمونه‌ها سپس در معرض هوای آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شوند. نمونه‌برداری در سه تکرار و در سه زمان (یک، سه و پنج هفته پس از انکوباسیون) برای اندازه‌گیری پارامترهای مربوطه انجام گرفت.

طرح آماری

در این آزمایش پنج عامل مورد بررسی قرار گرفت: عامل ویناس دارای سه سطح ویناس الکل (V1)، ویناس خمیرمایه (V2) و مخلوط ویناس الکل و خمیرمایه (V3)، عامل باکتری دارای پنج سطح بدون تلقیح (B0) و تیمارهای تلقیح‌شده از جمله *B. licheniformis* 1S5، *B. licheniformis* 1D1 (B2)، *B. licheniformis* 1D2 (B3) و *S. pasteurii* (B4)، عامل پی‌اچ دارای دو سطح پی‌اچ اسیدی (N0) و پی‌اچ خنثی (N1)، عامل افزودن اوره و کلرید کلسیم در دو سطح همراه با اوره و کلرید کلسیم (I1) و بدون این مواد (I0). و نیز عامل زمان به این شکل که تغییرات فعالیت آنزیمی در سه دوره زمانی شامل یک هفته (T1)، سه هفته (T2)، و پنج هفته (T3) از آغاز انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

طرح آماری به کار رفته، فاکتوریل اسپلیت بود، زیرا در آن چند عامل در سطح‌های مختلف به صورت همزمان بررسی شده و در بخش‌های جداگانه اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون مقایسه میانگین‌های چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SAS 9.1 و نمودارها توسط Excel 2016 رسم شدند. تحلیل این تغییرات می‌تواند به درک بهتر اثرات متغیرهای مختلف بر یکدیگر و بر فعالیت آنزیمی کمک نموده و عوامل مؤثر بر عملکرد میکروبی را شناسایی کند.

فعالیت آنزیمی شن‌های روان

برای بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در شن‌های روان از روش Johnson و Temple (1964) استفاده شد که در آن، فعالیت کاتالاز معادل با

تجزیه H_2O_2 بوده و به صورت $KMnO_4$ ۰/۱ نرمال مصرفی در هر گرم شن روان در ساعت بیان می‌شود. اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز شن‌های روان مطابق با Schinner و همکاران (2012) با سوبسترای TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) و بر اساس میکروگرم تری فنیل فورمازان تولید شده به ازای هر گرم شن طی ۱۶ ساعت انجام شد. از روش غیربافری Schinner و همکاران (2012) برای سنجش فعالیت اوره‌آز در شن‌های روان استفاده گردید. مقدار آن بر اساس میکروگرم نیتروژن آمونیومی آزاد شده در هر گرم طی دو ساعت گزارش شد.

نتایج و بحث

نتایج آماری داده‌های حاصل از فعالیت‌های آنزیمی شن‌های روان در جداول (۱) و (۲) ارائه شده است.

فعالیت کاتالاز شن‌های روان

طبق جدول (۱)، بررسی اثرات عوامل در فعالیت کاتالازی شن روان در حالت مستقل و برخی حالت‌های متقابل نشان‌دهنده وجود ارتباط معنی‌دار در سطح معنی‌داری یک درصد ($p < 0.0001$) و ضریب تعیین ($R^2 = 0.99$) بود. اما به‌طور کلی، اثر تکرار در تمام عوامل مورد بررسی، معنی‌دار نگردید. عوامل مستقل معنی‌دار به ترتیب شامل تیمارهای باکتریایی (B)، زمان انکوباسیون (T)، پی‌اچ ویناس (N)، نوع ویناس (V) و مواد سیمانی‌کننده نظیر اوره و کلرید کلسیم (I) بودند. جدول (۲) نتایج مقایسه میانگین فعالیت کاتالاز شن روان را در پنج کلاس مختلف برای تیمارهای باکتریایی، سه کلاس برای زمان انکوباسیون و دو کلاس برای انواع ویناس، خنثی‌سازی پی‌اچ ویناس و افزودن اوره و کلرید کلسیم به تصویر می‌کشد. همچنین، مهم‌ترین اثرات متقابل عوامل دخیل در فعالیت کاتالازی شن روان در گراف‌های موجود در شکل (۱) ارائه شده است. تحلیل‌ها نشان داد که بیشترین مقدار فعالیت کاتالاز به تیمار B3 (*B. licheniformis* سویه 1D2)، ویناس مخلوط الکل و خمیرمایه (V3)، با پی‌اچ اسیدی (N0)، همراه با اوره و کلرید کلسیم (I1) در هفته سوم (T2) اختصاص داشت و این ترکیب از مؤلفه‌ها به‌طور چشمگیری فعالیت کاتالاز شن روان را افزایش داد. کمترین فعالیت کاتالازی در هفته اول انکوباسیون و در زمانی حاصل شد که تیمار B4 (*S. pasteurii*)، در ویناس‌های الکل (V1) یا خمیرمایه (V2) با پی‌اچ خنثی (N0) تلقیح شده و بدون ماده سیمانی‌کننده (I0) بود. مقدار فعالیت کاتالاز در شن روان تلقیح‌شده با جدایه‌های بومی *B. licheniformis* در این پژوهش در دامنه $2/7$ تا $3/2 \text{ KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ مستند گردید. در حالی که برای *S. pasteurii* اندازه فعالیت کاتالازی برابر با $2/6 \text{ KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ بوده است.

آنزیم کاتالاز (هیدروژن پراکسید اکسیدوردوکتاز) یکی از حیاتی‌ترین آنزیم‌های درون‌سلولی در ریزجانداران هوازی و بی‌هوازی اختیاری به شمار می‌رود. این آنزیم قادر است به‌طور مؤثری با پراکسید هیدروژن، که یک ترکیب سمی و عامل تنش اکسیداتیو برای سلول‌ها محسوب می‌شود، مقابله کند. کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن، از آسیب‌های ناشی از این ترکیب خطرناک جلوگیری می‌کند. منابع ایجاد پراکسید هیدروژن به‌عنوان یک متابولیت ثانویه، شامل فرآیندهای فتوسنتزی و تنفسی هستند و همچنین عوامل محیطی مانند پرتو فرابنفش می‌تواند تولید این ترکیب را افزایش دهد. به عبارت دیگر، این ترکیب می‌تواند در نتیجه فعالیت‌های بیوشیمیایی سلول‌ها و تأثیرات خارجی مانند پرتوهای UV به وجود آید، که در نهایت سبب افزایش سطح پراکسید هیدروژن در سلول‌ها می‌شود (Chabot et al., 2020).

فعالیت کاتالاز به دو عامل اصلی، یعنی حاصلخیزی خاک و تعداد ریزموجودات هوازی، وابسته است (Trasar-Cepeda et al., 1999). Li و همکاران (2014) فعالیت آنزیم کاتالاز را در کاربردهای مختلف مورد بررسی قرار دادند و مقادیر آن را در دامنه‌ای بین ۱/۸ (در جنگل طبیعی) و $2/1 \text{ KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (در تراس‌های پلکانی کشاورزی) گزارش کردند که این مقادیر با نتایج ما مطابقت دارد. همچنین یافته‌های ما به نتایج Johnson و Temple (1964) که فعالیت کاتالاز را در خاک‌های مختلف، با یا بدون مواد آلی، بین $3/5$ (در خاک‌های اسیدی) تا $9/8 \text{ KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (در خاک‌های رسی) برآورد کردند نیز نزدیک است. با توجه به پژوهش Chabot و همکاران (2020)، جوامع میکروبی بومی در مناطق با تنش اکسیداتیو بالا، غلظت کاتالاز درون‌سلولی بیشتری دارند. این به این معناست که ریزموجودات برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو مکانیسم‌های دفاعی قوی‌تری را توسعه می‌دهند. تنش‌های محیطی اکسیداتیو شامل عواملی همچون دماهای بالا، آلاینده‌ها، شوری، خشکسالی و تابش UV هستند (Xie et al., 2019).



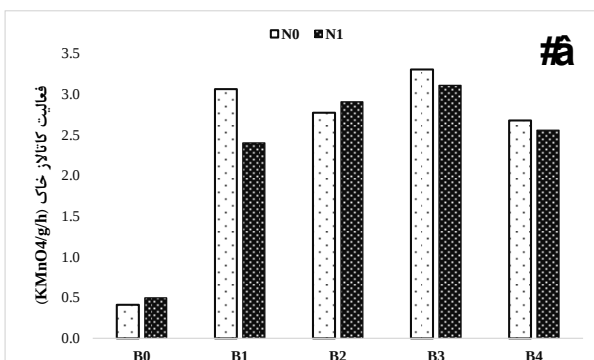
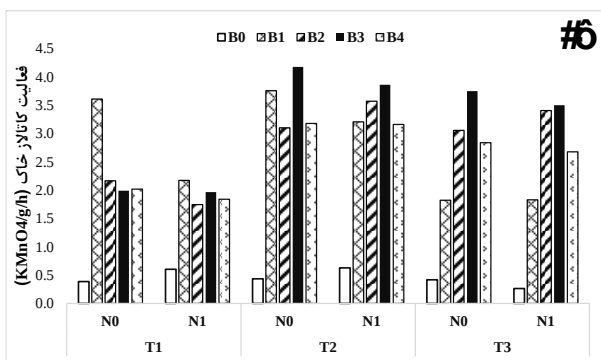
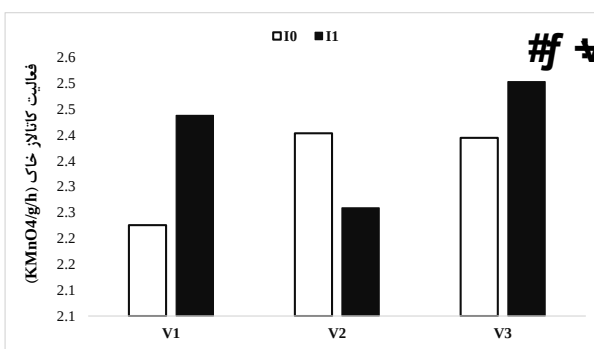
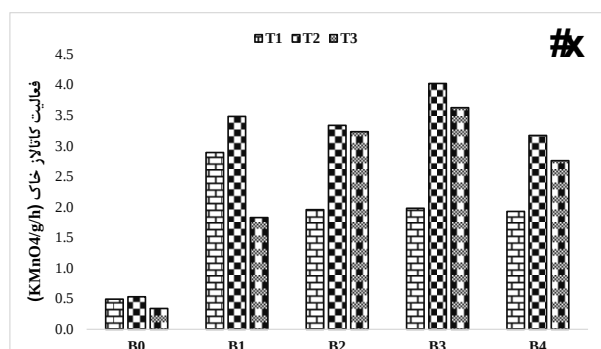
جدول ۱: آنالیز واریانس (ANOVA) اثرات نوع ویناس (V)، تیمارهای باکتریایی (B)، پی‌اچ ویناس (N)، افزودن اوره و کلریدکلسیم (I)، تکرا (R) و زمان (T) بر فعالیت کاتالاز، دهیدروژناز و اوره‌آز شن‌های روان

میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	کاتالاز ($\text{KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	دهیدروژناز ($\mu\text{gTPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm} \cdot 16\text{h}^{-1}$)	اوره‌آز ($\mu\text{gNH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$)
V	۲	۰/۸ ^{**}	۰/۱۱۳ ^{ns}	۰/۳۴۳ ^{ns}
B	۴	۱۲۹/۳ ^{**}	۱۰۹۳/۶۵ ^{**}	۶۸۰/۲۹۹ ^{**}
N	۱	۳/۱ ^{**}	۳/۰۹۹ ^{ns}	۲۱/۷۵۸ ^{**}
I	۱	۰/۵ ^{**}	۰/۲۴۵ ^{ns}	۳۸/۲۸ ^{**}
V*B	۸	۰/۳ ^{**}	۱/۰۹۶ ^{ns}	۰/۴۲۳ ^{ns}
V*N	۲	۰/۶ ^{**}	۴/۳۱۵ ^{**}	۱/۱۹۲ ^{**}
V*I	۲	۱/۵ ^{**}	۱/۰۹۸ ^{ns}	۰/۳۴۱ ^{ns}
B*N	۴	۲/۷ ^{**}	۴/۹۵۴ ^{**}	۱/۳۷۶ ^{**}
B*I	۴	۰/۳ ^{**}	۱/۰۸۹ ^{ns}	۳/۸۶۴ ^{**}
N*I	۱	۱ ^{**}	۳۱/۶۴۷ ^{**}	۳۶/۱۷۷ ^{**}
V*B*N	۸	۰/۶ ^{**}	۲/۳۸۳ ^{**}	۰/۱۹۱ ^{ns}
V*B*I	۸	۰/۵ ^{**}	۳/۰۴۱ ^{**}	۰/۴۳۶ ^{ns}
V*N*I	۲	۰/۲ ^{**}	۲/۱۱۰ ^{ns}	۰/۱۳۸ ^{ns}
B*N*I	۴	۰/۴ ^{**}	۶/۷۰۷ ^{**}	۲/۵۵۷ ^{**}
V*B*N*I	۸	۰/۵ ^{**}	۱/۰۶۴ ^{ns}	۰/۱۵۸ ^{ns}
R*V*B	۱۶	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۲۳۹ ^{ns}	۰/۰۷۱ ^{ns}
R*V*N	۴	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}	۰/۰۶۶ ^{ns}
R*V*I	۴	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۲۸۱ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}
R*B*N	۸	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۴۲۳ ^{ns}	۰/۲۲۷ ^{ns}
R*B*I	۸	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۵۰۷ ^{ns}	۰/۱۳۹ ^{ns}
R*N*I	۲	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۱۴۹ ^{ns}	۰/۱۶۲ ^{ns}
R*V*B*N	۱۶	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۴۰۴ ^{ns}	۰/۱۱۱ ^{ns}
R*V*N*I	۴	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۱۷۷ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}
R*B*N*I	۸	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۲۴۵ ^{ns}	۰/۰۹۴ ^{ns}
R*V*B*N*I	۳۲	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۴۰۹ ^{ns}	۰/۰۴۵ ^{ns}
Time	۲	۵۰/۴ ^{**}	۸۷/۴۰۱ ^{**}	۵۲/۸۵۶ ^{**}
Time*V	۴	۰/۳ ^{**}	۰/۷۷۴ ^{ns}	۰/۲۵۶ ^{ns}
Time*B	۸	۱۳/۳ ^{**}	۱۵/۹۷۲ ^{**}	۳/۹۰۵ ^{**}
Time*N	۲	۱/۶ ^{**}	۷/۱۸۶ ^{**}	۱/۹۶۶ ^{**}
Time*I	۲	۰/۵ ^{**}	۰/۸۰۵ ^{ns}	۰/۳۷۱ ^{ns}
Time*V*B	۱۶	۰/۵ ^{**}	۱/۳۸۱ ^{**}	۰/۲۳۷ ^{ns}
Time*V*N	۴	۰/۵ ^{**}	۱/۶۱۷ ^{ns}	۰/۲۵۴ ^{ns}
Time*V*I	۴	۰/۴ ^{**}	۰/۲۴۹ ^{ns}	۰/۱۸۴ ^{ns}
Time*B*N	۸	۱/۵ ^{**}	۲/۲۹۹ ^{**}	۰/۷۲۳ ^{**}
Time*B*I	۸	۰/۸ ^{**}	۰/۵۸۷ ^{ns}	۰/۵۱۵ ^{**}
Time*N*I	۲	۰/۳ ^{**}	۱/۰۴۹ ^{ns}	۰/۳۷۸ ^{ns}
Time*V*B*N	۱۶	۰/۹ ^{**}	۱/۰۹۳ ^{**}	۰/۲۴۳ ^{ns}
Time*V*B*I	۱۶	۰/۵ ^{**}	۰/۶۷۳ ^{ns}	۰/۱ ^{ns}
Time*V*N*I	۴	۰/۱ ^{**}	۰/۸۴۹ ^{ns}	۰/۱۶۷ ^{ns}
Time*B*N*I	۸	۰/۷ ^{**}	۲/۳۰۴ ^{**}	۰/۵۵۵ ^{**}
Time*V*B*N*I	۱۶	۰/۳ ^{**}	۰/۹۱۹ ^{ns}	۰/۳۰۱ ^{ns}
Error	۲۴۰	۰/۰۰۱	۰/۳۵۴	۰/۱۰۸
CV%	—	۱/۵	۱۰/۷۶۸	۷/۵۸۳
R ²	—	۹۹/۰	۹۸۳/۰	۹۹۲/۰

توضیحات: ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ معنی‌دار هستند

جدول ۲: مقایسه میانگین اثرات نوع ویناس (V1، V2، V3)، تیمارهای باکتریایی (B0، B1، B2، B3، B4)، پی‌اچ ویناس (N0، N1)، افزودن کلرید کلسیم و اوره (I0، I1) و زمان (T1، T2، T3) بر فعالیت کاتالاز، دهیدروژناز و اوره‌آز شن‌های روان

تیمارها	کاتالاز ($\text{KMnO}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	دهیدروژناز ($\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{dm} \cdot 16\text{h}^{-1}$)	اوره‌آز ($\mu\text{gNH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$)
B0	۰/۵ ^e	۰/۰۶۴ ^d	۰/۱۵۹ ^e
B1	۲/۷ ^c	۷/۶۰۹ ^a	۵/۳۷۳ ^b
B2	۲/۸ ^b	۵/۴۲۳ ^c	۴/۰۸۲ ^d
B3	۳/۲ ^a	۶/۹۳۷ ^b	۴/۴۵۹ ^c
B4	۲/۶ ^d	۷/۶۰۶ ^a	۷/۵۱۳ ^a
V1	۲/۳ ^b	۵/۵۳۲ ^a	۴/۳۲۴ ^a
V2	۲/۳ ^b	۵/۵۵۱ ^a	۴/۲۷۳ ^a
V3	۲/۴ ^a	۵/۵۰۱ ^a	۴/۳۵۴ ^a
N0	۲/۴ ^a	۵/۶۰۴ ^a	۴/۰۶۱ ^b
N1	۲/۳ ^b	۵/۴۵۳ ^b	۴/۵۷۳ ^a
I0	۲/۳ ^b	۵/۵۰۶ ^a	۴/۰۹۵ ^b
I1	۲/۴ ^a	۵/۵۴۹ ^a	۴/۵۳۹ ^a
T1	۱/۸ ^c	۶/۱۳۳ ^a	۴/۸۸۵ ^a
T2	۲/۹ ^a	۵/۶۸۵ ^b	۴/۲۶۷ ^b
T3	۲/۴ ^b	۴/۷۶۶ ^c	۳/۷۹۸ ^c



شکل ۱: اثر MICP بر فعالیت کاتالاز در شن‌های روان: الف) اثر متقابل افزودن اوره و کلرید کلسیم (I) و نوع ویناس (V)، ب) اثر متقابل باکتری (B) و زمان (T)، ج) اثر متقابل باکتری (B) و پی‌اچ ویناس (N)، د) اثر متقابل باکتری (B)، پی‌اچ ویناس (V) و زمان (T)

نتایج (جدول ۲) نشان داد که کمترین مقدار فعالیت کاتالاز در هفته اول اندازه‌گیری شده است. سپس در هفته سوم افزایش محسوسی در فعالیت کاتالاز مشاهده شد و در هفته پنجم انکوباسیون کاهش اندکی داشت. با این حال، مقدار فعالیت کاتالاز در هفته پنجم همچنان بیشتر از مقدار آن در هفته اول بود. این افزایش در فعالیت کاتالاز در نتیجه تولید بیشتر H_2O_2 توسط باکتری‌ها در شن روان است و نشان‌دهنده پاسخ باکتری‌ها به تنش‌های اکسیداتیوی است که با توجه به شرایط محیطی ایجاد می‌شود. در پژوهش انجام شده توسط

Ferreira و همکاران (2020) است، که در آن نیز فعالیت کاتالاز در روزهای ششم، نهم و دوازدهم از انکوباسیون چارج *Pleurotus sajor-Caju* در محیط کشت ویناس انجام شد، ترتیب فعالیت کاتالاز از بیشترین به کمترین مربوط به روز دوازدهم، نهم و سپس ششم بود. در پژوهش ما به طور مشابه مقدار فعالیت کاتالاز در هفته اول انکوباسیون پایین بوده که نشان‌دهنده تأثیر اولیه شرایط انکوباسیون بر فعالیت آنزیم است. در پژوهش Ferreira، فعالیت کاتالاز از روز ششم به بعد به طرز قابل توجهی افزایش می‌یابد. مشابه این نتایج، در پژوهش ما نیز مشاهده شد که پس از هفته اول، فعالیت کاتالاز به تدریج افزایش پیدا کرد و بیشترین اندازه آن در هفته سوم ثبت شد. این افزایش فعالیت به وجود ترکیب‌های فنولیک و رنگی مقاوم و محصولات تخریبی تولید شده توسط آنزیم‌های لیگنینولیتیک نسبت داده شده است (Ferreira et al., 2020). این هم‌راستایی در نتایج ممکن است نشان‌دهنده یک روند کلی در فعالیت کاتالاز در شرایط مشابه باشد و ممکن است به تأثیر شرایط محیط کشت و زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیمی اشاره کند. در پژوهش ما، فعالیت کاتالاز در هفته پنجم نسبت به هفته سوم کاهش یافت که دلیل آن را می‌توان به کاهش رطوبت، کم شدن مواد مغذی، پیری سلولی، تجمع متابولیت‌ها و پتانسیل تولید آنزیم در باکتری‌ها نسبت داد که باعث می‌شود قالب محیط به‌نحوی تغییر کند یا مکانیسم‌های تنظیمی باکتری‌ها به گونه‌ای باشد که در نتیجه آن فعالیت آنزیمی کاهش یابد.

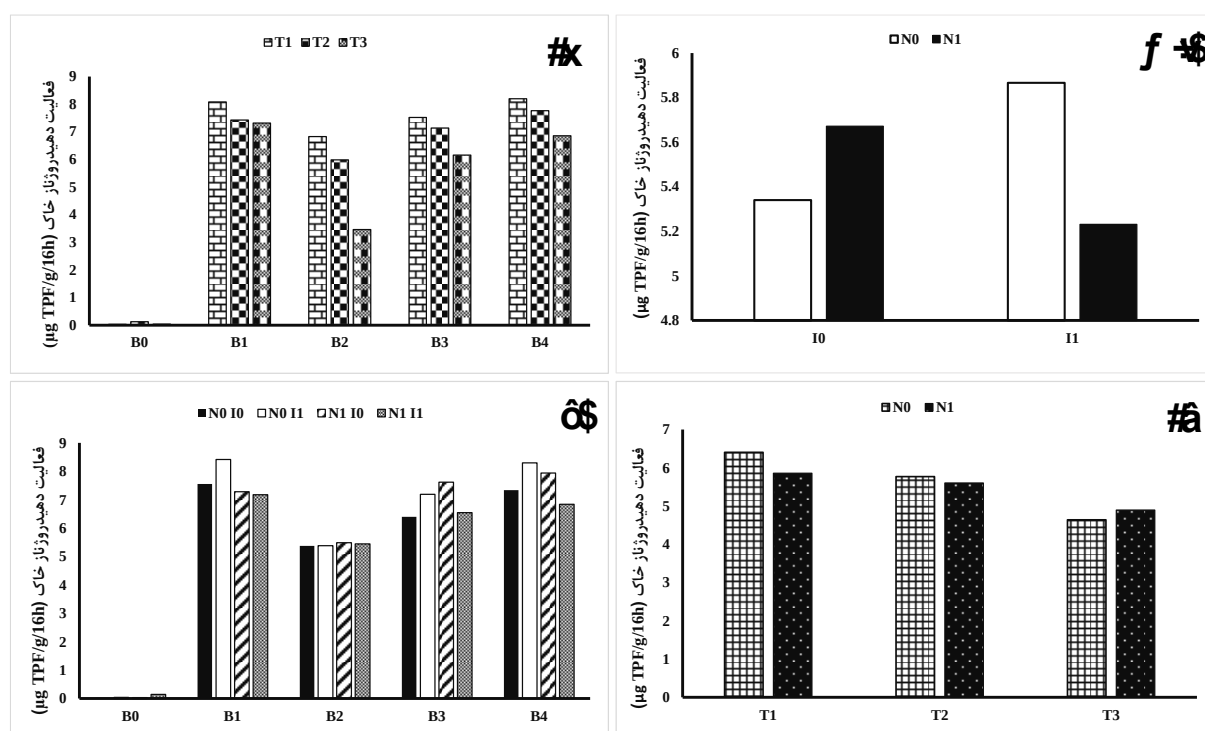
در این بخش، تأثیر رسوب میکروبی کربنات کلسیم القا شده با سویه‌های بومی *B. licheniformis* بر فعالیت آنزیم کاتالاز در شن‌های روان خوزستان بررسی شد تا نشان دهد MICP در بهبود سلامت محیط زیست در نواحی دچار تنش می‌تواند مورد توجه باشد. اهمیت فعالیت کاتالاز از آن جهت است که معیاری از توانایی باکتری برای مقابله با تنش‌های اکسیداتیو و بهبود شرایط محیطی به شمار می‌آید. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که باکتری‌های جنس *Bacillus*، قادر به ترشح کاتالاز هستند و می‌توانند به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و بهبود آنتی‌اکسیداسیون کمک کنند (Ni et al., 2001; Paar et al., 2001; Abdelhamid et al., 2020; Shaeer et al., 2021; Yuan et al., 2021; Torres et al., 2023). لذا، استفاده از این گونه باکتری (*B. licheniformis*) در رسوب میکروبی کربنات کلسیم می‌تواند تأثیر مثبت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشته و به افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر شرایط محیطی نامطلوب کمک کند و در نتیجه، عملکرد کلی اکوسیستم خاک و گیاهان را بهبود بخشد. به عنوان مثال، در پژوهشی، تلقیح هلو با *B. licheniformis* سبب افزایش مقاومت میوه در برابر بیماری با توانایی حذف رادیکال‌های آزاد و افزایش تولید آنزیم کاتالاز شد (Wang et al., 2023). گزارشی دیگر حاکی از افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در خاک‌های آبیاری شده با ویناس و افزایش عملکرد و رشد نهال‌های نیشکر است (Wang et al., 2006). علاوه بر این، Sen و همکاران (2011) شبیه‌سازی، بیان و خالص‌سازی کاتالاز از *B. licheniformis* ترموآلکالیفیلک را انجام دادند و آن را برای کاربردهای صنعتی معرفی کردند که مؤید توانمندی این گونه در زمینه تولید کاتالاز است.

فعالیت دهیدروژناز شن‌های روان

نتایج تجزیه و تحلیل آماری عوامل مؤثر بر فعالیت دهیدروژناز شن‌های روان (جدول ۱) نشان‌دهنده معنی‌داری اثرات مستقل تیمارهای باکتریایی (B) و زمان انکوباسیون (Time) در سطح یک درصد ($p < 0.0001$) و ضریب تعیین ($R^2 = 0.983$) بود. نتایج در مورد روابط متقابل مربوط به اثرات دو و سه‌گانه عوامل اصلی و زمان متفاوت بود. در جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، فعالیت آنزیم دهیدروژناز توسط تیمارهای مختلف باکتریایی به ۴ کلاس تقسیم‌بندی شده است. B1 (*B. licheniformis* سویه 1D1) و B4 (*S. pasteurii*) با مقدار به ترتیب ۷/۶۰۹ و ۷/۶۰۶ میکروگرم تری‌فنیل‌فورمازان تولیدی به ازای هر گرم شن روان طی مدت‌زمان ۱۶ ساعت در یک گروه قرار گرفته و بیشترین فعالیت دهیدروژناز در شن روان را سبب شدند. پس از آن، B3 (*B. licheniformis* سویه 1D2) با مقدار ۶/۹۳ و B2 (*B. licheniformis* سویه 1S5) با $5/42 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{dm} \cdot 16\text{h}^{-1}$ در رتبه‌های سوم و چهارم قرار گرفتند. شکل (۲) عوامل مؤثر بر فعالیت دهیدروژناز در شن روان را در قالب گراف‌هایی نشان می‌دهد. نتایج آماری نشان‌دهنده اهمیت بیشتر برخی عوامل تأثیرگذار نسبت به سایرین بر روی یکدیگر و بر روی فعالیت آنزیمی است.

نقش دهیدروژنازها شامل اکسیداسیون زیستی مواد آلی در خاک با انتقال هیدروژن از بستر آلی به گیرنده‌های معدنی است، لازم به ذکر است که این آنزیم‌ها ممکن است نه تنها از مولکول‌های اکسیژن به‌عنوان گیرنده الکترون استفاده کنند، بلکه از ترکیب‌های دیگری که در سلول‌های ریزموجودات بی‌هوازی وجود دارد (مانند نیترات، سولفات، دی‌اکسیدکربن) نیز بهره ببرند (Kaczyńska et al., 2015). کما اینکه شیخلو و رسولی صدقیانی (۱۳۹۵) اذعان نمودند که فعالیت آنزیم دهیدروژناز رابطه قوی با اندازه کربن آلی خاک دارد. این آنزیم در در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی باکتری‌های زنده وجود دارد و به تنهایی بدون میزبان میکروبی عمل نمی‌کند. بنابراین، فعالیت دهیدروژناز در خاک می‌تواند نشانه‌ای از حضور ریزموجوداتی چون باکتری‌ها باشد (Mambu, 2014; Navnage et al., 2018). Çakmakçı و

همکاران (2023) و Gu و همکاران (2023) فعالیت دهیدروژنازی تعدادی از گونه‌های *Bacillus* در خاک را ارزیابی کردند. گزارشاتی از فعالیت این آنزیم در گونه *B. licheniformis* نیز وجود دارد (Lo et al., 2011; Çakmakçı et al., 2023). تاکنون گزارش معتبری در مورد فعالیت آنزیم دهیدروژناز در *S. pasteurii* به دست نیامده است، اما این به معنای فقدان آنزیم دهیدروژناز در این باکتری خاص نیست. اندازه‌گیری فعالیت دهیدروژناز خاک اغلب به منظور تخمین هرگونه اختلال ناشی از کودها، فلزهای سنگین و سایر روش‌های اصلاح خاک (برای مدیریت) یا به‌طور فوری برای ارزیابی درجه عملکرد میکروبی خاک استفاده می‌شود (Bandyopadhyay & Kumar, 2021). به این ترتیب، فعالیت دهیدروژنازها مقدار دگرگونی‌های رخ داده در خاک را منعکس می‌کند (Kaczyńska et al., 2015). طی هفته اول تا هفته پنجم انکوباسیون، مقدار فعالیت دهیدروژناز در نمونه‌ها روند نزولی داشت که احتمالاً دلیل آن به کاهش جمعیت باکتری‌ها در طول زمان و نیز کاهش منابع آلی در دسترس مربوط می‌شود.



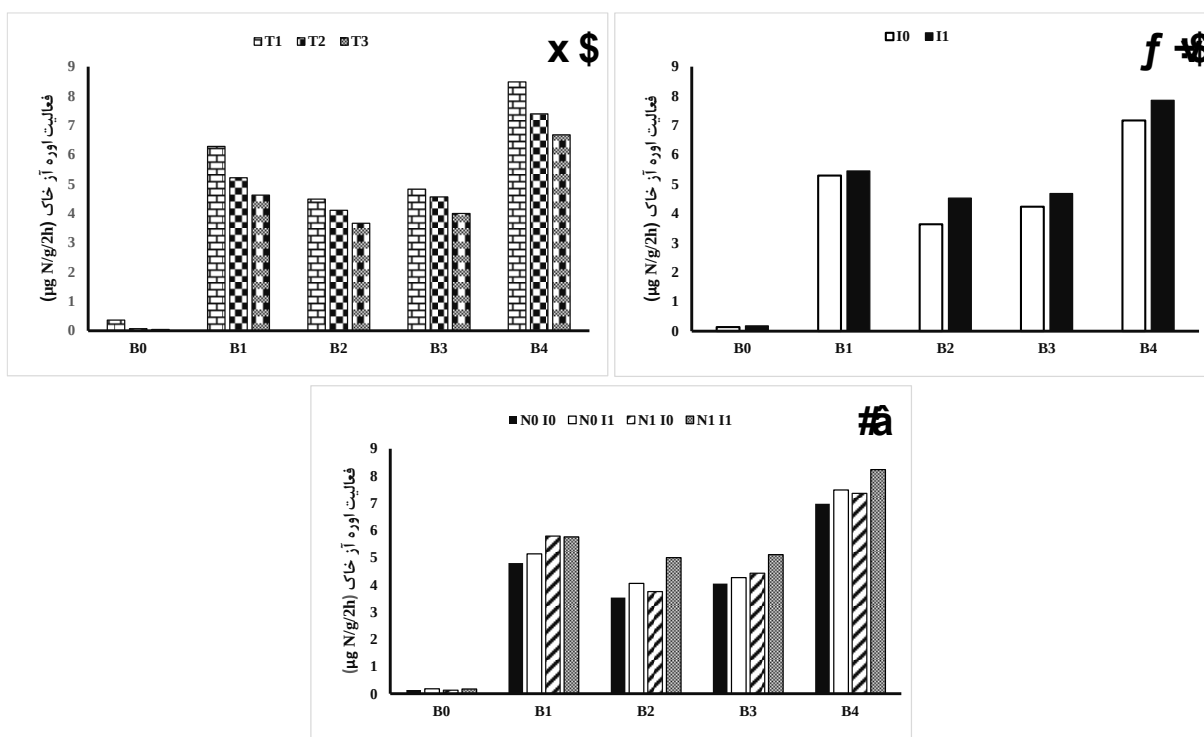
شکل ۲: اثر MICP بر فعالیت دهیدروژناز در شن‌های روان: الف) اثر متقابل افزودن اوره و کلرید کلسیم (I) و پی‌اچ ویناس (N)، ب) اثر متقابل باکتری (B) و زمان (T)، ج) اثر متقابل پی‌اچ ویناس (N) و زمان (T)، د) اثر متقابل باکتری (B)، پی‌اچ ویناس (N) و افزودن اوره و کلرید کلسیم (I)

فعالیت اوره‌آز شن‌های روان

در بررسی آماری نتایج حاصل از فعالیت اوره‌آزی در شن روان، با توجه به جدول (۱)، اثرات به ترتیب تیمارهای باکتریایی (B)، زمان (Time)، افزودن عوامل سیمانی‌کننده (I) و خنثی‌سازی پی‌اچ (N) در سطح یک درصد معنی‌دار شدند ($p < 0.0001$ و $R^2 = 0.992$). در مقایسه میانگین عوامل مؤثر بر فعالیت اوره‌آز در شن روان (جدول ۲)، بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به تیمار *S. pasteurii* (B4) با مقدار ۷/۵۱۲ و جدایه بومی *B. licheniformis* 1S5 با ۵/۳۷۲ بر حسب $\mu\text{gNH}_4^+ \cdot \text{N} \cdot \text{g}^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$ در پی‌اچ خنثی ویناس (N1) و همراه با کلرید کلسیم و اوره (I1) بود. در طی دوره انکوباسیون، فعالیت اوره‌آز از هفته اول (T1) تا پنجم (T3) روند کاهشی داشت. شکل (۳) شامل برخی گراف‌هایی است که در آن‌ها اثرات متقابل متغیرها بر هم و بر فعالیت اوره‌آز لحاظ آماری معنی‌دار شده است. در این پژوهش، بستر شن استریل شده و فعالیت اوره‌آزی معمولاً با حرارت دادن نمونه و ضدعفونی‌سازی آن از بین می‌رود. بنابراین، عامل ایجاد این فعالیت آنزیمی در نمونه‌ها صرفاً باکتری‌های مورد استفاده و تلقیح شده به شن روان بودند.

اوره‌آز نقش حیاتی در چرخه نیتروژن دارد و برای اولین بار توسط سامنر در سال ۱۹۲۶ به صورت بلور خالص بررسی شد. این آنزیم از اوره به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و آن را به آمونیاک و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌سازد (Koçak, 2020). در میان باکتری‌های تولیدکننده اوره‌آز، *S. pasteurii* شاخص بوده و می‌تواند با اوره‌آز، هیدرولیز اوره را به یون‌های کربنات و آمونیوم کاتالیز کند. یون‌های

کربنات حاصل می‌توانند با یون‌های کلسیم خارج سلولی واکنش داده و رسوب کربنات کلسیم را تشکیل دهند (Pei et al., 2021). علاوه بر این، *S. pasteurii* در مقادیر بالای پی‌اچ بهترین رشد را داشته و تحمل بالایی نسبت به غلظت‌های بالای NH_3 و نمک‌ها از خود نشان می‌دهد (Carter et al., 2023). MICP وابسته به اوره‌آز در گونه‌های دیگر از جمله *Sporosarcina ureae*، *Sporosarcina* spp.، *Bacillus sereus*، *Bacillus licheniformis* و... گزارش شده است و به‌طور کلی، رابطه تکاملی نزدیکی بین جنس‌های *B. licheniformis* و *Sporosarcina* وجود دارد (Carter et al., 2023). Çakmakçı و همکاران (2023) اندازه فعالیت اوره‌آز در *B. licheniformis* RC636 را حدود $7/1 \mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{soil} \cdot \text{h}^{-1}$ گزارش کردند که به مراتب بالاتر از فعالیت آنزیمی سویه‌های *B. licheniformis* در پژوهش ما می‌باشد. بازم به ذکر است که پژوهش‌گران دریافته‌اند که انتخاب جدایه‌های باکتری با فعالیت اوره‌آزی کمتر، با روند آهسته‌تر، منجر به پیوندهای کارآمدتر بین ذرات نمونه (مانند شن) می‌شود. این امر توزیع کربنات کلسیم را در نمونه یکنواخت‌تر کرده و مقاومت آن را افزایش می‌دهد و در نتیجه، فرایند MICP را موفقیت‌آمیز و پایدار می‌کند (Konstantinou et al., 2021).



شکل ۳: اثر MICP بر فعالیت اوره‌آز در شن‌های روان: الف) اثر متقابل باکتری (B) و افزودن اوره و کلرید کلسیم (I)، ب) اثر متقابل باکتری (B) و زمان (T)، ج) اثر متقابل باکتری (B)، پی‌اچ ویناس (N) و افزودن اوره و کلرید کلسیم (I)

پی‌اچ خاک یکی از عوامل موثر در فعالیت اوره‌آز می‌باشد (Kumari et al., 2017). در پژوهش حاضر، فعالیت اوره‌آزی بیشتر زمانی مشاهده شد که جدایه‌های رشد یافته در ویناس با پی‌اچ خنثی به شن روان افزوده شدند. این موضوع مستقیماً با فعالیت اوره‌آزی جدایه‌ها مرتبط می‌باشد، زیرا همانگونه که در بسیاری از پژوهش‌ها اشاره شده است، باکتری‌های هیدرولیزکننده اوره پی‌اچ‌های خنثی یا کمی بالاتر را برای فعالیت اوره‌آزی خود ترجیح می‌دهند (Kim et al., 2018; Oualha et al., 2020; Rajasekar et al., 2024). پژوهش Hu و همکاران (2025) مؤید این نتیجه است که پی‌اچ اسیدی سبب مهار فعالیت اوره‌آز شده و علاوه بر آن مانع از تبدیل NH_3 به NH_4^+ و OH^- می‌شود و تولید کربنات کلسیم را به تأخیر می‌اندازد. با افزایش دوره انکوباسیون، مقدار فعالیت آنزیم اوره‌آز کاهش یافت. از دلایل این کاهش می‌توان به پیری سلولی و کاهش تکثیر سلول‌ها نسبت به میزان مرگ و میر اشاره کرد (Zhang et al., 2014). علاوه بر این، رسوب کربنات کلسیم با ایجاد لایه‌ای بر روی سطح یاخته‌های باکتری (De Muynck et al., 2010) می‌تواند بر فعالیت باکتری‌ها اثر گذاشته و سبب کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز شود. یکی دیگر از دلایل کاهش فعالیت اوره‌آز با گذشت زمان، ماهیت ویناس است که به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از مواد مغذی، محیط کشتی مطلوب برای میکروب‌ها به شمار می‌رود. ماده آلی موجود در ویناس به راحتی توسط ریزموجودات تجزیه می‌شوند (Possignolo-vitti et al., 2017). بنابراین احتمال افزایش غلظت یون‌های حاصل از معدنی

شدن ویناس وجود دارد که متعاقباً می‌تواند تأثیر منفی بر رشد و فعالیت باکتری‌ها داشته باشد. این افزایش غلظت یون‌ها به دلیل ایجاد سمیت خاص یونی برای سلول‌ها، احتمال واسرشت شدن آنزیم‌های خارج سلولی را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، محافظت نشدن آنزیم‌ها و پروتئولیز نیز می‌تواند به این وضعیت دامن بزند (Zhang et al., 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های بومی *B. licheniformis* می‌توانند به طور قابل توجهی خصوصیات زیستی شن روان را در خلال فرآیند MICP بهبود بخشند. حفظ و تقویت فعالیت‌های میکروبی در شن روان در طول زمان می‌تواند به بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن منجر شود. جدایه‌های بومی مورد بررسی در این پژوهش به وضوح نشان‌دهنده عملکرد آنزیمی بهتر یا نزدیک به سویه شاخص در شرایط آزمایشگاهی بودند. با توجه به اینکه این باکتری‌ها به‌طور خاص برای محیط‌های بومی سازگار شده‌اند، انتظار می‌رود که در شرایط طبیعی عملکردی فراتر از حد انتظار داشته باشند و نتایج مطلوبی به دست دهند؛ لذا، پیشنهاد می‌شود که شرایطی فراهم شود تا عملکرد این جدایه‌های بومی در مقیاس صحرایی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد؛ این امر می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در اختیار ما قرار دهد. در نهایت، استفاده از باکتری‌های بومی در فرآیندهای MICP می‌تواند به عنوان یک استراتژی پایدار و مقرون به صرفه برای بهبود ویژگی‌های شن روان و در پی آن تقویت ساختار آن پیشنهاد شود. با توجه به چالش‌هایی که امروزه در مدیریت و بهبود شن‌های روان و خاک‌های کشاورزی تخریب‌شده با آن‌ها مواجه هستیم، این رویکرد می‌تواند راه‌حل‌های موثری را برای جلوگیری از فرسایش، حفظ رطوبت و افزایش حاصلخیزی آن‌ها فراهم کند. از این رو، پژوهش‌های بیشتر در این زمینه برای درک عمیق‌تر مکانیسم‌ها و تأثیرات بلندمدت این روش‌ها می‌تواند بسیار مفید واقع شود.

"هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

منابع

پیرهادی، نگین. (۱۴۰۳). جداسازی باکتری‌های بومی و بررسی میزان توانایی آنها برای تولید سیمان زیستی در راستای تثبیت شن‌های روان جنوب غرب ایران. رساله دکتری. به راهنمایی حبیب‌اله نادیان و بیژن خلیلی‌مقدم. اهواز: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده کشاورزی.

شیخلو، فاطمه و رسولی صدقیانی، میرحسن (۱۳۹۵). تأثیر کاربری‌های زراعی و جنگلی بر فعالیت برخی آنزیم‌های خاک. تحقیقات آب و خاک ایران، ۲۰۵-۲۱۶: (۱)۴۷.

REFERENCES

- Abdelhamid, M. A., Meligy, A. M., Yeo, K. B., Lee, C. S., & Pack, S. P. (2020). Silaffin-3-derived pentalysine cluster as a new fusion tag for one-step immobilization and purification of recombinant *Bacillus subtilis* catalase on bare silica particles. *International journal of biological macromolecules*, 159, 1103-1112.
- Bandyopadhyay S, & Kumar Maiti S. (2021). Different soil factors influencing dehydrogenase activity in mine degraded lands—state-of-art review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(9), 1-10.
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Green, T. L., Williams, B. C., & Crawford, R. L. (2011). Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soils. *Geomicrobiology Journal*, 28(4), 301-312.
- Burbank, M., Weaver, T., Lewis, R., Williams, T., Williams, B., & Crawford, R. (2013). Geotechnical tests of sands following bioinduced calcite precipitation catalyzed by indigenous bacteria. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 139(6), 928-936.
- Çakmakçı, R., Haliloglu, K., Türkoğlu, A., Özkan, G., Kutlu, M., Varmazyari, A., Molnar, Z., Jamshidi, B., Pour-Aboughadareh, A. & Bocianowski, J. (2023). Effect of different Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on biological soil properties, growth, yield and quality of oregano (*Origanum onites* L.). *Agronomy*, 13(10), 1-17.
- Carter, M. S., Tuttle, M. J., Mancini, J. A., Martineau, R., Hung, C. S., & Gupta, M. K. (2023). Microbially induced calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii*: a case study in optimizing biological CaCO_3 precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(8), 1-17.
- Chabot, M., Morales, E., Cummings, J., Rios, N., Giatpaiboon, S., & Mogul, R. (2020). Simple kinetics, assay, and trends for soil microbial catalases. *Analytical Biochemistry*, 610, 1-11.
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological engineering*, 36(2), 118-136.
- Ferreira, L. F. R., Torres, N. H., de Armas, R. D., Fernandes, C. D., da Silva Vilar, D., Aguiar, M. M., Pompeo,



- G. B., Monteiro, R. T. R., Iqbal, H. M. N., Bilal, M., Bharagava, R. N. (2020). Fungal lignin-modifying enzymes induced by vinasse mycodegradation and its relationship with oxidative stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 1-9.
- Graddy, C. M., Gomez, M. G., DeJong, J. T., & Nelson, D. C. (2021). Native bacterial community convergence in augmented and stimulated ureolytic MICP biocementation. *Environmental Science & Technology*, 55(15), 10784-10793.
- Gu, P., Ma, Q., Zhao, S., Li, Q., & Gao, J. (2023). Alanine dehydrogenases from four different microorganisms: Characterization and their application in L-alanine production. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 1-16.
- Harkes, M. P., Van Paassen, L. A., Booster, J. L., Whiffin, V. S., & van Loosdrecht, M. C. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, 36(2), 112-117.
- Imran, M. A., Kimura, S., Nakashima, K., Evelpidou, N., & Kawasaki, S. (2019). Feasibility study of native ureolytic bacteria for biocementation towards coastal erosion protection by MICP method. *Applied Sciences*, 9(20), 1-15.
- Irfan, M. F., Hossain, S. M. Z., Khalid, H., Sadaf, F., Al-Thawadi, S., Alshater, A., Hossain, M. M. & Razzak, S. A. (2019). Optimization of bio-cement production from cement kiln dust using microalgae. *Biotechnology Reports*, 23, 1- 10.
- Johnson J L, & Temple K L. (1964). Some variables affecting the measurement of "catalase activity" in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 28(2), 207-209.
- Kaczyńska, G., Borowik, A., & Wyszowska, J. (2015). Soil dehydrogenases as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-11.
- Kim, G., Kim, J., & Youn, H. (2018). Effect of temperature, pH, and reaction duration on microbially induced calcite precipitation. *Applied Sciences*, 8(8), 1-10.
- Koçak, B. (2020). Importance of urease activity in soil. In *Proceedings of the International Scientific and Vocational Studies Congress—Science and Health*, 12, 51-60.
- Konstantinou, C., Wang, Y., Biscontin, G., & Soga, K. (2021). The role of bacterial urease activity on the uniformity of carbonate precipitation profiles of bio-treated coarse sand specimens. *Scientific Reports*, 11(1), 1-17.
- Kumari, J. A., Rao, P. C., Padmaja, G., & Madhavi, M. (2017). Effect of physico-chemical properties on soil enzyme urease activity in some soils of Ranga reddy district of Telangana State, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied*, 6, 1708-1714.
- Leeprasert, L., Chonudomkul, D., & Boonmak, C. (2022). Biocalcifying potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair. *Microorganisms*, 10(5), 1-15.
- Li, Q., Liang, J. H., He, Y. Y., Hu, Q. J., & Yu, S. (2014). Effect of land use on soil enzyme activities at karst area in Nanchuan, Chongqing, southwest China. *Plant, Soil and Environment*, 60(1), 15-20.
- Lin, H., Suleiman, M. T., Brown, D. G., & Kavazanjian Jr, E. (2016). Mechanical behavior of sands treated by microbially induced carbonate precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 142(2), 1-13.
- Liu, P., Zhang, Y., Tang, Q., & Shi, S. (2021). Bioremediation of metal-contaminated soils by microbially-induced carbonate precipitation and its effects on ecotoxicity and long-term stability. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 1-8.
- Lo, H. F., Su, J. Y., Chen, H. L., Chen, J. C., & Lin, L. L. (2011). Biophysical studies of an NAD (P)⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*. *European Biophysics Journal*. 40, 1131-1142.
- Mambu, S. M. (2014). Soil Dehydrogenase Activity: A Comparison Between the TTC and INT Method. A review. *Jurnal Ilmiah Sains*, 87-94.
- Naeimi, M., Chu, J., Khosroshahi, M., & Zenouzi, L. K. (2023). Soil stabilization for dunes fixation using microbially induced calcium carbonate precipitation. *Geoderma*, 429, 1-12.
- Navnage, N. P., Patle, P. N., & Ramteke, P. R. (2018). Dehydrogenase activity (DHA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. *International Journal of Chemical Studies*, 6(1), 456-458.
- Nayanthara, P. G. N., Dassanayake, A. B. N., Nakashima, K., & Kawasaki, S. (2019). Microbial induced carbonate precipitation using a native inland bacterium for beach sand stabilization in nearshore areas. *Applied Sciences*, 9(15), 1-24.
- Ni, J., Tokuyama, S., Sogabe, A., Kawamura, Y., & Tahara, Y. (2001). Cloning and high expression of catalase gene from *Bacillus* sp. TE124. *Journal of Bioscience Bioscience and Bioengineering*, 91(4), 422-424.
- Nikseresht, F., Landi, A., Sayyad, G., Ghezlbash, G. R., & Schulín, R. (2020). Sugarcane molasse and vinasse added as microbial growth substrates increase calcium carbonate content, surface stability and

- resistance against wind erosion of desert soils. *Journal of Environmental Environmental Management*, 268, 1-8.
- Oualha, M., Bibi, S., Sulaiman, M., & Zouari, N. (2020). Microbially induced calcite precipitation in calcareous soils by endogenous *Bacillus cereus*, at high pH and harsh weather. *Journal of Environmental Management*, 257, 1-10.
- Paar, A., Costa, S., Tzanov, T., Gudelj, M., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2001). Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. *Journal of Biotechnology*, 89(2-3), 147-153.
- Pei, D., Liu, Z., Wu, W., & Hu, B. (2021). Transcriptome analyses reveal the utilization of nitrogen sources and related metabolic mechanisms of *Sporosarcina pasteurii*. *PLoS One*, 16(2), 1-22.
- Pirhadi, N. (2024). Isolation of native bacteria and evaluation of their ability to produce Biocement for sand stabilization of southwestern of Iran (Doctoral dissertation). Supervised by Habiballah Nadian and Bijan Khalilimoghadam, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Faculty of Agriculture, Ahvaz. (In Persian).
- Pirhadi, N., Nadian, H., Khalilimoghadam, B., & Motamedi, H. (2024). The effect of vinasse as a carbon source on the activity of urease-producing bacteria in the microbially induced calcite precipitation (MICP) approach. *Desert*, 29(1), 53-70.
- Possignolo-Vitti, N. V., Bertocini, E. I., & Vitti, A. C. (2017). Decomposition of the organic matter of natural and concentrated vinasse in sandy and clayey soils. *Water Science and Technology*, 76(3): 728-738.
- Rajasekar, A., Zhao, C., Wu, S., Murava, R. T., & Wilkinson, S. (2024). Synergistic biocementation: harnessing *Comamonas* and *Bacillus ureolytic* bacteria for enhanced sand stabilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(7), 1-15.
- Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. eds. (2012). *Methods in soil biology*. New York: Springer Science & business media.
- Sen, A., Ozkarsli, M., Dogan, N. M., Semiz, A., & Arslan, S. (2011). Cloning, expression, purification and characterization of *Bacillus licheniformis* catalase from Pamukkale Hot Springs. *Current Opinion in Biotechnology*, (22), 1-39.
- Shaer, A., Aslam, M., & Rashid, N. (2021). Structural and functional analyses of a novel manganese-catalase from *Bacillus subtilis* R5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 222-233.
- Sheikhloo, F., & Rasouli Sadaghiani, M. (2016). Effects of different agronomic and forest land uses on soil enzyme activity. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 47(1), 205-216. (In Persian).
- Sohail, M. G., Al Disi, Z., Zouari, N., Al Nuaimi, N., Kahraman, R., Gencturk, B., Rodrigues, D. F. & Yildirim, Y. (2022). Bio self-healing concrete using MICP by an indigenous *Bacillus cereus* strain isolated from Qatari soil. *Construction and Building Materials*, 328, 1-10.
- Tang, C. S., Yin, L. Y., Jiang, N. J., Zhu, C., Zeng, H., Li, H., & Shi, B. (2020). Factors affecting the performance of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) treated soil: a review. *Environmental Earth Sciences*, 79, 1-23.
- Torres, M. A., Valdez, A. L., Angelicola, M. V., Raimondo, E. E., Pajot, H. F., & Nieto-Peñalver, C. G. (2023). Vinasse as a substrate for inoculant culture and soil fertigation: Advancing the circular and green economy. *Science of The Total Environment*, 887, 1-10.
- Trasar-Cepeda, C., Camiña, F., Leirós, M. C., & Gil-Sotres, F. (1999). An improved method to measure catalase activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(3), 483-485.
- Wang Y. D., YunChuan, M., WeiHao, W., YangRui, L. Y., & YanPing, Y. (2006). Effect of vinasse irrigation on the activity of three enzymes and agronomic characters at seedling stage of sugarcane. *Journal Sugar Tech*, 8, 264-267.
- Wang, X., Zhu, J., Wei, H., Ding, Z., Li, X., Liu, Z., Wang, H. & Wang, Y. (2023). Biological control efficacy of *Bacillus licheniformis* HG03 against soft rot disease of postharvest peach. *Food Control*, 145, 1-27.
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A., & Harkes, M. P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., & Cai, Y. (2019). The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed Research International*, 1-11.
- Yuan, F., Yin, S., Xu, Y., Xiang, L., Wang, H., Li, Z., Fan, K., & Pan, G. (2021). The richness and diversity of catalases in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-11.
- Zhang, T., Wan, S., Kang, Y., & Feng, H. (2014). Urease activity and its relationships to soil physiochemical properties in a highly saline-sodic soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(2), 304-315.