**Research Article**

Iranian Journal of Range and Desert Research DOI: 10.22092/ijrdr.2024.130968

Vol. 30, No. 4, Page 557-570 (2024)

# Potential of urease producing bacteria on biological stabilization and prevention of soil erosion

**M. Teimouri [1*], L. Kashi Zenouzi [2] and T. Alizadeh [3]**

1*- Corresponding author, Assistant Prof., Forest Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agriculture, Research, Education and Extension Organization, (AREEO), Tehran, Iran. Email: mteimouri@rifr-ac.ir

2- Research Expert, Desert Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agriculture, Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- Research Expert, Forest Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agriculture, Research, Education and Extension Organization, (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 07/03/2023 Accepted: 02/05/2024

## Abstract

### Background and objective

Soil is considered one of the most valuable natural resources and the existence of life on the surface of the earth depends on the existence of soil in addition to water and air. Soil stability is an important factor in the health of the soil system and it is a prerequisite to perform processes such as the cycle of elements in the soil. Soil erosion is a serious problem and threat in different regions of the world, and therefore protecting and preventing soil erosion as a non-renewable natural resource is of high priority. To prevent soil erosion, there are various physical, mechanical, and chemical methods. Due to their high cost and harmful effects on the environment, today much attention is paid to biological methods that are friendly to the environment. This study aimed to investigate the potential of urease producing bacteria on biological stabilization and prevention of soil erosion.

### Methodology

Soil samples were collected from the Bazoft area in Chaharmahal va Bakhtiari provinces and transported to the laboratory. The enrichment and selective method was used to screen urease producing bacteria in the urea agar base culture medium. The activity of the urease was investigated by the electrical conductivity method and three strains with the highest urease activity were selected and used in further steps. The selected strains were identified by molecular methods, colony PCR by using 14f and 1492r universal primers, and sequencing. The compressive and shear strength was estimated in inoculated soils after 14 days. The wind erosion threshold velocity was measured in the wind tunnel. The soil loss was estimated at different wind speeds (17.3, 22.09, and 27/20 m/s) in the inoculated soils.

### Results

The urease-producing bacteria were identified by changing the color of the culture medium from yellow to pink. The results showed that the soils of this area have a high potential for urease producing bacteria. Three species were selected based on their urease activity and identified as *Bacillus thuringiensis* (RIFR-U3), *Bacillus* sp. (RIFR-U7), and *Exiguobacterium* sp. (RIFR-U10). The compressive and shear strength increased in soil inoculated with the selected bacteria compared to the control. The highest compressive (1.56± 0.241 kg/cm2) and shear strength (2.066±0.18 kg/cm$^2$) were detected in the soils inoculated with *Bacillus* sp. (RIFR-U7) and

*Exiguobacterium* sp. (RIFR-U10) strains, respectively. The wind erosion threshold velocity was 12.19 m/s. The soil loss was less in the inoculated soils with bacteria compared to control and *Bacillus* sp. (RIFR-U7) had the highest efficiency in preventing soil loss.

**Conclusion**
The increased compressive and shear strength showed that these selected strains are moderate to good stabilizers for increasing compressive strength and very good for increasing shear strength. The wind tunnel results showed that *Bacillus* sp. (RIFR-U7) inoculated soil was more resistant to wind erosion compared to the other two strains and controls. In conclusion, it seems that different strains or a combination of them can be used based on what characteristic of the soil is to be improved or the purpose of resistance against which erosion

**Keywords**: Calcium carbonate, Compressive strength, Erosion, Shear strength, Wind tunnel

# پتانسیل باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز در تثبیت زیستی و جلوگیری از فرسایش خاک

مریم تیموری [۱*]، لیلا کاشی زنوزی [۲] و طاهره علی‌زاده [۳]

۱-* نویسنده مسئول، استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ایران

پست‌الکترونیک: mteimouri@rifr-ac.ir

۲- کارشناس ارشد پژوهشی، بخش تحقیقات بیابان، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ایران

۳- کارشناس ارشد پژوهشی، بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

## چکیده

**سابقه و هدف**

خاک یکی از باارزش‌ترین منابع‌طبیعی محسوب می‌شود و وجود حیات بر سطح کره زمین علاوه بر آب و هوا به وجود خاک بستگی دارد. پایداری خاک، عامل مهمی در سلامت سیستم خاک بوده و پیش‌نیاز انجام فرایندهایی مانند چرخه عناصر در خاک است. فرسایش خاک یک مشکل و تهدید جدی در مناطق مختلف دنیا محسوب می‌شود، بنابراین حفاظت و جلوگیری از فرسایش خاک به‌عنوان یک منبع طبیعی تجدیدناپذیر از اولویت بالایی برخوردار است. برای جلوگیری از فرسایش خاک روش‌های متعدد فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی وجود دارد که با توجه به گران بودن و اثرهای زیانبار محیط‌زیستی آنها، امروزه توجه زیادی به روش‌های زیستی دوستدار محیط‌زیست می‌شود. در این مطالعه پتانسیل باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز در تثبیت زیستی و جلوگیری از فرسایش خاک بررسی شد.

**مواد و روش‌ها**

نمونه‌های خاک سطحی از منطقه بازفت در استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. از روش کشت انتخابی و غنی‌سازی برای جدا کردن باکتری‌های مولد اوره‌آز در محیط کشت تجاری افتراقی اوره آگار بیس استفاده شد. فعالیت آنزیم اوره‌آز در باکتری‌های جدا شده با روش تغییر در هدایت الکتریکی بررسی و سه باکتری که بالاترین فعالیت آنزیمی را داشتند انتخاب و در مراحل بعدی از آنها استفاده شد. برای شناسایی باکتری‌های انتخاب شده از روشColony PCR و پرایمرهای یونیورسال ۱۴f و ۱۴۹۲rاستفاده گردید. میزان مقاومت فشاری و برشی خاک، ۱۴ روز پس از تلقیح باکتری‌های منتخب با استفاده از پنترومتر جیبی و توروین اندازه‌گیری شد. پس از تعیین سرعت آستانه، خاک‌های تلقیح شده در معرض تونل باد قرار گرفته و میزان هدررفت خاک در سرعت‌های مختلف باد (۱۷/۳، ۲۲/۰۹ و ۲۷/۲۰ متر بر ثانیه) اندازه‌گیری شد.

**نتایج**

باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز با تغییر رنگ محیط کشت از زرد کم‌رنگ به صورتی تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد که خاک‌های این منطقه پتانسیل بالایی از نظر حضور باکتری‌های مولد اوره‌آز دارند. سه گونه منتخب براساس روش مولکولی تحت عنوان *Bacillus thuringiensis*، *Bacillus* sp. و *Exiguobacterium* sp. شناسایی شدند. در خاک‌های تلقیح‌شده با باکتری‌های منتخب، مقاومت فشاری و برشی خاک در مقایسه با کنترل افزایش یافت. گونه‌های *Bacillua sp.* (RIFR-U7) و *Exiguobacterium* sp. (RIFR-U10) به‌ترتیب باعث بالاترین مقاومت فشاری (۱/۵۶ ۰±۲۴۱ kg/cm$^2$) و برشی (۲/۰±۶۶/۱۸ kg/cm$^2$) شدند. سرعت آستانه برای نمونه کنترل m/s ۱۲/۱۹تعیین شد. اندازه‌گیری هدررفت خاک در خاک‌های تیمار شده با باکتری‌های منتخب در سرعت‌های مختلف منجر به کاهش هدررفت خاک در مقایسه با خاک‌های کنترل شد. نتایج نشان داد که سویه *Bacillus* sp. (RIFR-U7) بالاترین کارایی را در جلوگیری از هدررفت خاک داشت.

**نتیجه‌گیری**

افزایش مقاومت فشاری و برشی در خاک‌های تیمار شده نشان داد که این باکتری‌ها جزء تثبیت‌کننده‌های متوسط تا خوب برای افزایش مقاومت فشاری و بسیار خوب برای افزایش مقاومت برشی قابل ارزیابی هستند. بررسی نتایج تونل باد نشان داد که تلقیح گونه *Bacillua* sp. (RIFR-U7) در مقایسه با دو باکتری دیگر می‌تواند مقاومت بیشتری در برابر فرسایش بادی داشته باشد. در مجموع، بنظر می‌رسد که براساس اینکه چه خصوصیتی از خاک بهبود یابد و یا هدف مقاومت در برابر چه نوع فرسایشی است، از گونه‌های مختلف و یا ترکیبی از آنها باید استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** تونل باد، فرسایش، کربنات‌کلسیم، مقاومت برشی، مقاومت فشاری.

## مقدمه

خاک یکی از باارزش‌ترین منابع‌طبیعی محسوب می‌شود و وجود حیات بر سطح کره زمین علاوه بر آب و هوا به وجود خاک بستگی دارد. پایداری خاک عامل مهمی در سلامت سیستم خاک بوده و پیش‌نیاز انجام فرایندهایی مانند چرخه عناصر در خاک است. فرسایش خاک یک مشکل و تهدید جدی در مناطق مختلف دنیا محسوب می‌شود. در گزارش سالانه منابع خاک جهان (World's Soil Resources Report) که در سال ۲۰۱۵ منتشر شده است، فرسایش خاک عامل اصلی در ممانعت از عملکرد صحیح خاک در نواحی مختلف دنیا ازجمله آفریقا، آسیا، آمریکای لاتین، شمال و خاور نزدیک آفریقا و آمریکای شمالی است (FAO & ITPS. 2015). فرسایش خاک در ایران نیز یکی از مشکلات جدی بوده و یکی از موانع اصلی در توسعه پایدار کشاورزی و منابع‌طبیعی محسوب می‌شود. میزان فرسایش در ایران در مقایسه با متوسط فرسایش جهانی خاک بالا و سالانه حدود ۱۶ تن در هکتار است، در حالی که در دنیا متوسط فرسایش خاک حدود ۶ تن در هکتار است. به‌علاوه میزان سالانه فرسایش خاک در جهان ۷۵ میلیارد تن برآورد شده است که سهم ایران از آن، بیش از دو میلیارد تن و حدود سه برابر فرسایش خاک در آسیا می‌باشد (Khajavi, 2015).

میزان خسارت‌های زیست‌محیطی فرسایش خاک و نیز ارزش اقتصادی آن بسیار زیاد است. مقدار خسارت ناشی از مجموعه عوامل تخریب در ایران حدود ۱۰ میلیارد دلار در سال برآورد شده است که ۶۵۰ میلیون دلار آن مربوط به فرسایش بادی است (World Bank, 2005). این خسارت ناشی از تخریب منابع‌طبیعی، کاهش حاصلخیزی خاک، کاهش تولید محصولات کشاورزی، آلودگی هوا، انتقال ذرات معلق و مزاحمت‌های ناشی از آن در شبکه‌های آبیاری و زهکشی و خسارت به تأسیسات و ماشین‌آلات به‌دنبال پدیده فرسایش خاک است که لزوم و اهمیت کنترل فرسایش خاک را نشان می‌دهد. از روش‌های مختلفی برای کنترل فرسایش خاک استفاده می‌شود که می‌توان به روش‌های شیمیایی (پاشیدن آب، نمک‌ها، ترکیبات شیمیایی و محصولات نفتی)، مکانیکی (افزایش مقاومت سطحی)، زراعی (افزایش پوشش سطحی) و تلفیقی از این روش‌ها اشاره کرد (Anderson *et al.*, 2014). اجرای روش زراعی بیشتر به‌دلیل خاک نامناسب، عدم امکان رشد گیاه، دوره طولانی رشد و نیاز به منابع آب برای رشد گیاهان به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک دشوار است (Maleki *et al.*, 2016). در روش‌های شیمیایی از موادی استفاده می‌شود که عمدتاً، به‌ویژه موادی که دارای اکریل‌آمید و یا پلی‌اورتان در ترکیب خود هستند، سمی بوده و باعث آلودگی محیط‌زیست می‌شوند. به‌علاوه اینکه هزینه روش‌های شیمیایی در مقایسه با روش‌های زیستی بیشتر است. هزینه برآورده شده برای مواد شیمیایی به‌ازای هر مترمکعب خاک ۲ تا ۷۲ دلار است اما همین هزینه برای روش‌های زیستی ۰/۵ تا ۰/۹ دلار برآورد می‌شود که بسیار کمتر از هزینه روش‌های شیمیایی است (Ivanov & Chu, 2008; Maleki *et al.*, 2016). امروزه روش‌های کنترل زیستی فرسایش خاک به‌عنوان روشی بی‌خطر و دوست‌دار محیط‌زیست مورد توجه هستند. در روش زیستی یا القاء

میکروبی، باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز قادرند با تجزیه اوره و قلیایی‌کردن محیط موجب تشکیل رسوب کربنات‌کلسیم شوند. کریستال‌های کربنات‌کلسیم پل‌هایی بین ذرات خاک ایجاد و پایداری خاک را افزایش می‌دهند که می‌تواند در جلوگیری از فرسایش خاک مؤثر باشد (Anderson *et al*., 2014). ۵۸ باکتری نمک‌دوست مولد آنزیم اوره‌آز از خاک‌های خوزستان جداسازی شد که از میان آنها ۶ سویه قادر به تولید رسوب کربنات کلسیم بودند (Haddadi & Ghezelbash, 2020). نتایج پایش باکتری‌های مولد سیمان زیستی بر بیش از ۲۸۰ نمونه خاک رویشگاه‌های کویری نشان داده است که بهینه‌سازی شرایط رشد به‌منظور استفاده کاربردی از این باکتری در تثبیت شن‌های روان ضروریست (Kargar & Kargar, 2018). در مطالعه مشابهی توان باکتری‌های جداشده از خاک‌های قلیایی شمال و مرکز ایران از نظر تولید آنزیم اوره‌آز و رسوب کلسیم‌کربنات بررسی شد. نتایج نشان داد که جدایه *Bacillus* sp. UTMC 2623 با تولید بیشترین مقدار رسوب کربنات کلسیم (۸/۵ گرم در لیتر) کاندیدای مناسبی برای تثبیت خاک است (Hamedi *et al*., 2018). مقاومت برشی در ماسه کربناته و ماسه سیلیسی به‌دنبال تلقیح *Sporosarcina pasteurii* و با گذشت زمان افزایش یافت (Ghaffari & Zomorodian, 2023). از خصوصیات فیزیکی مهم خاک که در مقاومت آن به فرسایش تأثیر دارند، مقاومت فشاری و برشی خاک است. پژوهش‌های متعدد نشان داده است که باکتری‌های مولد اوره‌آز قادرند با تولید رسوب کربنات‌کلسیم و بهبود مقاومت فشاری و برشی خاک باعث افزایش مقاومت خاک در برابر فرسایش شوند. عوامل متعددی مانند نوع میکروارگانیسم، سازگاری میکروارگانیسم با خاک، توزیع و تثبیت باکتری در خاک، غلظت محلول باکتری، غلظت محلول سیمانی‌کننده، اسیدیته محیط، دما، زمان و روش تزریق تأثیر دارند (Plan and Budget Organization, 2019; Zomorodian & Ghafari, 2017). مطالعات انجام شده در مورد تأثیر باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز در جلوگیری از هدررفت خاک نشان داده است که این باکتری‌ها قادرند با اتصال ذرات خاک به یکدیگر باعث کاهش هدررفت ناشی از وزش باد و افزایش مقاومت خاک در برابر فرسایش شوند (Moinfar *et al*., 2020; Douzali Joushin *et al*., 2017).

در این مطالعه باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز از رویشگاهی در استان چهارمحال و بختیاری جداسازی و توانایی آنها در تغییر برخی از خصوصیات خاک ازجمله مقاومت برشی و فشاری پس از تلقیح باکتری‌های جداسازی شده بررسی شد. میزان مقاومت خاک‌های تلقیح شده در مقابل هدررفت خاک در تونل باد نیز اندازه‌گیری شد.

## مواد و روش‌ها

بازفت یکی از بخش‌های شهرستان کوهرنگ در استان چهارمحال و بختیاری ایران و در ۱۹۰ کیلومتری شهرکرد، مرکز استان چهارمحال و بختیاری قرار دارد (شکل ۱). این منطقه در طول‌جغرافیایی ۴۹ درجه و ۳۵ دقیقه تا ۵۱ درجه و ۱۳ دقیقه طول‌شرقی و عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۳۲ درجه و ۳۹ دقیقه شمالی قرار دارد. اقلیم آن نیمه‌مرطوب تا خشک با تابستان‌های گرم و زمستان کمی سرد است. بیشترین بارش در بازفت در ماه‌های دی و آذر انجام می‌شود. میزان بارندگی سالیانه آن ۵۹۸ میلی‌متر است. حداکثر، حداقل و میانگین دما به‌ترتیب ۷/۳۴، ۱/۲− و ۱/۱۵ درجه سانتی‌گراد است. خاک‌های منطقه از نوع انتی‌سول (جوان، فاقد افق مشخص) و یا اینسپتی‌سول (خاک ویژه مناطق مرطوب و نیمه‌مرطوب) هستند (Agricultural Planning, Economic and Rural Development Research, 2000).

نمونه‌برداری از خاک سطحی عمق ۰−۲۰ سانتی‌متری انجام و نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه بخش جنگل مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور منتقل شدند. برای حذف بقایای گیاهی و ذرات درشت، خاک با الک ۲ میلی‌متری الک شد. برخی از خصوصیات شیمیایی خاک در جدول ۱ آورده شده است.

شکل ۱- موقعیت مکانی منطقه بازفت در استان چهارمحال و بختیاری

**Figure 1- The location of Bazoft area in Chaharmahal and Bakhtiari province**

جدول ۱- برخی از خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک

**Table1- Some chemical and physical properties of soil**

| Soil Texture | Total Nitrogen | Organic Carbon | Potassium | Available Phosphorous | Electrical Conductivity | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Loam-Sand | 0.18 % | 2.55% | 638 mg/kg | 30 mg/kg | 253 µSiemens/cm | 7.06 |

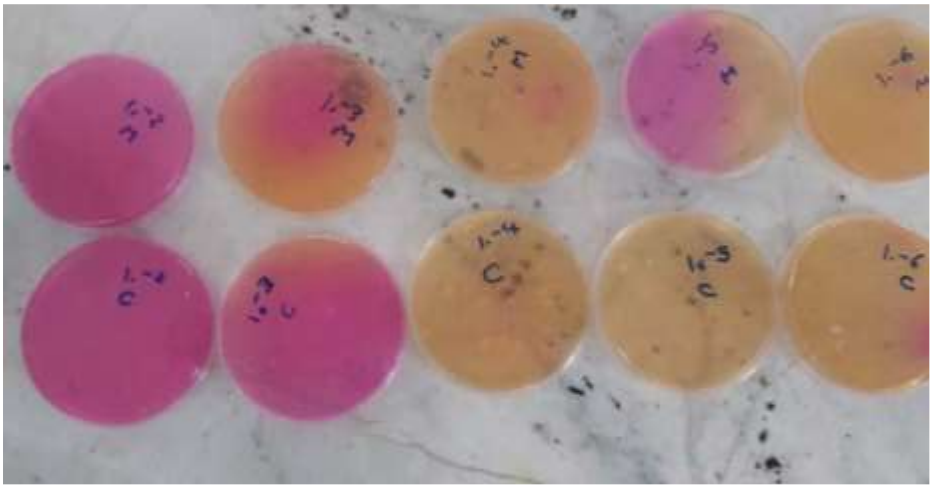
از روش کشت انتخابی و غنی‌سازی برای جدا کردن باکتری‌های مولد اوره‌آز در محیط کشت تجاری افتراقی اوره آگاربیس (حاوی پپتون گوشت ۱ گرم، D–گلوکز ۱۰ گرم، کلرید سدیم ۵ گرم، دی‌هیدرژن پتاسیم فسفات ۲ گرم، معرف فنل رد ۰/۰۱۲ گرم و ۱۲ گرم آگار–آگار در هر لیتر) ساخت شرکت مرک استفاده شد. پس از خنک‌شدن محیط‌کشت استریل، محلول اوره استریل‌شده با صافی ۴۰ میکرون به محیط‌کشت پایه اضافه شد. غلظت نهایی اوره در محیط کشت ۲٪ است. برای کشت، از نمونه خاک رقت‌های متوالی در محلول نرمال سالین (کلرید سدیم ۰/۹٪) تهیه و در محیط اوره آگار بیس کشت داده شد. پلیت‌های کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. باکتری‌های تولید کننده آنزیم اوره‌آز با تشکیل کلنی‌های صورتی رنگ شناخته می‌شوند. فعالیت اوره‌آزی در باکتری‌های جداشده با روش تغییر در هدایت الکتریکی بررسی و سه باکتری که بالاترین فعالیت آنزیمی را داشتند انتخاب و در مراحل بعدی از آنها استفاده شد. برای این‌منظور ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های جدا شده به ۹ میلی‌لیتر از محلول اوره با غلظت ۱/۱۱ مولار اضافه و تغییر میزان هدایت الکتریکی در مدت زمان ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد (Whiffin, 2004). برای شناسایی باکتری‌های انتخاب شده از روش Colony PCR و پرایمرهای یونیورسال 14f و 1492r استفاده شد. باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کشت داده شدند. از کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعته به اندازه ته سوزن ته‌گرد برداشته و به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دارای ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، دیونیزه اضافه شد. سوسپانسیون باکتریایی را ۳ دقیقه جوشانده و بعد در فریزر ۲۰– درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک تا دو دقیقه قرار داده شد. این فرایند دو بار تکرار شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با

دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید، از یک‌سوم فاز رویی به‌عنوان DNA باکتریایی در PCR استفاده شد (Bergkessel & Guthrie, 2013). واکنش PCR در مخلوط حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix آماده ®GoTaq، ۱ میکرولیتر از هریک از پرایمرهای 14f و 1429r با غلظت ۲۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر DNA و ۹ میکرولیتر آب‌مقطر دیونیزه استریل (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) در ترموسایکلر Biorad انجام شد. برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در PCR به‌شرح زیر بود: واسرشتی اولیه در دمای $95\ C^{\circ}$ به‌مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه واسرشتی در $95\ C^{\circ}$، اتصال در دمای $55C^{\circ}$، به‌مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای $72C^{\circ}$، به‌مدت ۱ دقیقه، گسترش نهایی در دمای $72C^{\circ}$، به‌مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR توالی‌یابی شده و بعد توالی‌ها در سایت NCBI، با استفاده از Blast نوکلئوتیدی و همترازی شناسایی می‌شوند. برای تعیین مقاومت فشاری و برشی، درون ظروف پلاستیکی به ابعاد ۱۳/۵×۱۹/۵ سانتی‌متری خاک با بافت شنی ریخته شد. با محاسبه درصد رطوبت اشباع خاک (Mahmoudi & Hakimian, 1984)، میزان منافذ خاک مورد استفاده ۲ سانتی‌متری سطح آن محاسبه شد. با توجه به میزان منافذ خاک، ۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های کشت شده در محیط کشت نوترینت براث ($3\times10^{8}CFU/ml$) و ۲۵ میلی‌لیتر از محلول سیمانی‌کننده حاوی اوره (۱ مولار)، کلرید کلسیم (۱ مولار)، استات سدیم (۰/۱۷ مولار)، کلرید آمونیوم (۰/۰۱۲۵ مولار) و نوترینت‌براث (۱۳ گرم در لیتر) به سطح خاک اسپری شدند. برای نمونه‌های کنترل، فقط از محلول سیمانی‌کننده و محیط کشت نوترینت‌براث استفاده شد. این کار ۴ روز و هر روز ۲ بار تکرار شد. ۱۴ روز پس از تلقیح باکتری‌ها، مقاومت برشی با دستگاه توروین و مقاومت فشاری با پنترومتر جیبی اندازه‌گیری گردید (Weaver *et al.*, 2011). برای بررسی مقاومت خاک‌های تیمار شده در برابر سرعت‌های مختلف باد، خاک با بافت شنی در ظروف به ابعاد ۲۹ × ۴۹ سانتی‌متری ریخته شد. سطح خاک کاملاً صاف شد. به سطح خاک ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری در محیط کشت نوترینت‌براث ($3\times10^{8}CFU/ml$) و ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول سیمانی‌کننده اسپری گردید. به سطح خاک نمونه‌های کنترل فقط نوترینت-براث و محلول سیمانی‌کننده اسپری شد. پس از اینکه سطح خاک‌های تیمارشده و کنترل خشک گردید، به‌منظور تعیین میزان بادبردگی از تونل باد با ۸ اتاق آزمون به طول ۲ متر و ابعاد مقطع ۸۰ ×۸۰ سانتی‌متر دارای چهار موتور الکتریکی هریک با قدرت ۱۶ کیلووات و دارای یک عدد پیتوت و یک عدد فشارسنج الکترونیکی و دستگاه کنترل سرعت با استفاده از کنترل دور موتور به منظور تنظیم سرعت باد استفاده شد (شکل ۱). ابتدا سرعت پایه برای بلندشدن ذرات خاک از سطح نمونه‌های کنترل توسط تونل باد تعیین شد. سپس میزان بلندشدن ذرات خاک در ۳ سرعت بالاتر از سرعت پایه یعنی ۱۷/۳، ۲۲/۰۹ و ۲۷/۲۰ متر بر ثانیه در ۵ دقیقه تعیین شد. در هریک از سرعت‌های قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض، وزن خاک اندازه‌گیری شد تا میزان هدررفت خاک مشخص شود.

## نتایج

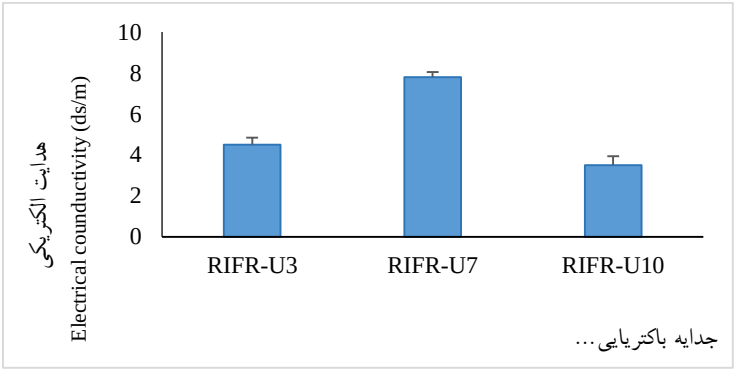
در شکل ۳ تصویری از باکتری‌های مولد اوره‌آز جداسازی‌شده آورده شده است. این باکتری‌ها با تغییر رنگ محیط‌کشت از زرد کم‌رنگ به صورتی تشخیص داده شدند. با هیدرولیز اوره در اثر فعالیت آنزیم اوره‌آز و تولید آمونیوم که منجر به تغییر pH محیط از خنثی به قلیایی می‌شود، معرف فنل رد تغییر رنگ داده و صورتی می‌شود.

شکل ۲- تصویر تونل باد
**Figure 2- Image of the wind tunnel**



شکل ۳- تغییر رنگ محیط کشت در اثر فعالیت باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز
**Figure 3- The change of culture medium, affected by Urease bacteria**

۱۰ عدد باکتری از خاک مورد آزمایش جداسازی و به‌شکل زیر نامگذاری شدند. RIFR-U1, RIFR-U2, RIFR-U3, RIFR-U4, RIFR-U5, RIFR-U6, RIFR-U7, RIFR-U8, RIFR-U9, RIFR-U10 بررسی فعالیت آنزیم اوره‌آز نشان داد که از میان باکتری‌های ذکرشده، ۳ باکتری RIFR-U3، RIFR-U7 و RIFR-U10 در مقایسه با بقیه باکتری‌ها از فعالیت اوره‌آزی بالاتری برخوردار بودند و به‌عنوان گونه‌های منتخب در مراحل بعدی از آنها استفاده شد. فعالیت اوره‌آزی این ۳ باکتری در شکل ۴ آورده شده است.



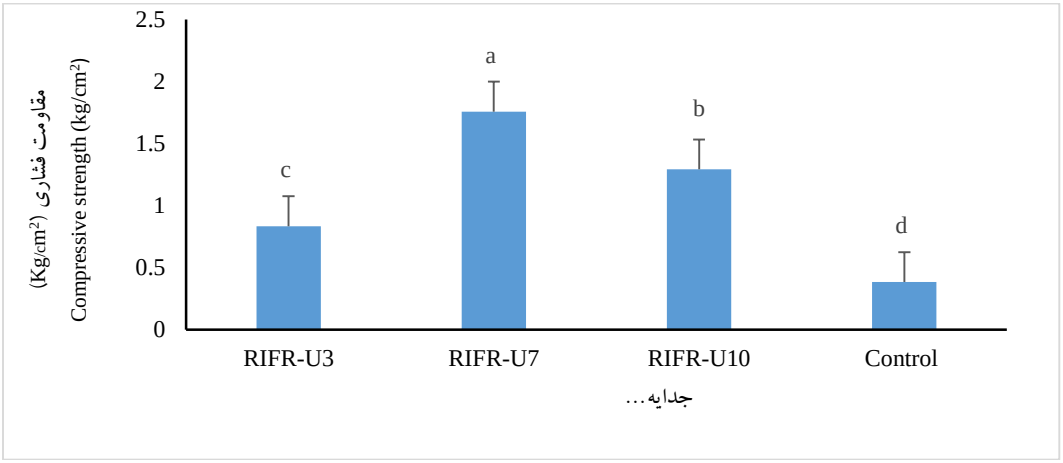

شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در جدایه‌های منتخب

**Figure 4- Urease activity in selected strains**

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس مقاومت فشاری و برشی خاک‌های تلقیح شده

**Table 2- The mean of squares of compressive and shear strength in inoculated soils**

| Source | Freedom | Mean of squares | | Significance | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Compressive strength | Shear strength | Compressive strength | Shear strength |
| Bacteria | 3 | 0.0881 | 0.0749 | 0.007 | 0.037 |
| Error | 8 | 0.277 | 0.430 | | |
| Total | 12 | 12.565 | 0.789 | | |

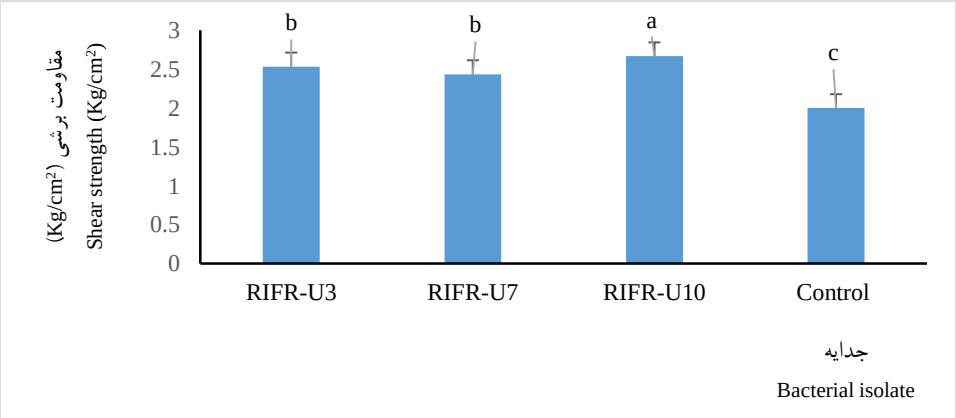



شکل ۵- مقایسه میانگین مقاومت فشاری خاک‌های تیمارشده با جدایه‌های منتخب

**Figure 5-The mean comparision of compressive strength in soils treated with selected species.**

باکتری‌های RIFR-U3، RIFR-U7 و RIFR-U10 به‌ترتیب تحت عنوان *Bacillus thuringiensis*، *Bacillus* sp. و *Exiguobacterium* sp. شناسایی شدند. جدول آنالیز واریانس یک‌طرفه مقاومت فشاری و مقاومت برشی خاک تیمارشده با باکتری‌های منتخب در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که بین باکتری‌ها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ($p<0.01$) وجود دارد (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که باکتری RIFR-U7 (جنس *باسیلوس*) موجب بالاترین مقاومت فشاری شده است، در حالی که کمترین مقاومت در خاک‌های کنترل مشاهده شد (شکل ۵).

در ارتباط با مقاومت برشی، آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمار باکتری‌ها بر مقاومت برشی خاک معنی‌دار بوده است. اما میانگین داده‌ها نشان داد که مقاومت برشی در خاک‌های تیمارشده با باکتری RIFR-U10 بیش از دو باکتری دیگر و کنترل است (شکل ۶).




**شکل ۶- مقایسه میانگین مقاومت برشی خاک‌های تیمارشده با جدایه‌های منتخب**

**Figure 6- The mean comparision of shear strength in soils treated with selected species**

سرعت آستانه برای نمونه کنترل ۱۲/۱۹ m/s تعیین شد. در جدول ۳ کاهش وزن خاک در تیمارهای انجام شده با باکتری‌های منتخب نشان داده شده است. میزان فرسایش خاک (هدررفت خاک) در نمونه‌های کنترل بیش از نمونه‌های تیمار شده بود. در سرعت ۱۷/۳ m/s، میزان خاکی که در اثر باد جابه‌جا شد در نمونه کنترل (بدون تیمار میکروبی) ۱۸۰ گرم (۱/۳۵٪) بود، در حالی که همین سرعت باعث هدررفت خاک به‌ترتیب به‌میزان ۴۰، ۳۰ و ۱۱۰ گرم برابر ۰/۲۸، ۰/۲۳ و ۰/۷۴ درصد در خاک‌های تیمار شده با باکتری‌های RIFR-U3، RIFR-U7 و RIFR-U10 شد. در سرعت بعدی (۲۲/۰۹ m/s)، تیمار خاک با باکتری‌های RIFR-U3، RIFR-U7 و RIFR-U10 باعث هدررفت خاک به‌میزان ۲۵۰، ۲۱۰ و ۲۵۰ گرم برابر ۱/۷۹، ۱/۴۳ و ۰۱/۸۳ درصد شد، در حالی که در خاک تیمارنشده این میزان ۵۳۰ گرم (۴/۰۴٪) بود. در بالاترین سرعت آزمایش شده (۲۷/۲۰ m/s) در خاک تیمارنشده، میزان هدررفت خاک ۲۳۰۰ گرم (۱۸/۲۶٪) بود، در حالی که تیمار خاک با باکتری‌های منتخب RIFR-U3، RIFR-U7 و RIFR-U10 باعث هدررفت خاک به میزان ۵۳۰، ۳۹۰ و ۶۴۰ گرم برابر ۳/۴۹، ۲/۶۸ و ۴/۳ درصد شد. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد تیمار با باکتری RIFR-U7 می‌تواند باعث کاهش جابه‌جایی خاک شده و در جلوگیری از فرسایش خاک مؤثر باشد.

**جدول ۳- میزان هدررفت (کاهش وزن خاک) در سرعت‌های مختلف باد**

**Tabe 3- Soil errosion (weight loss) in different wind speed**

| Species | Speed (m/S) | First weight (Kg) | Second weight (kg) | Soil loss (Kg) | Soil loss (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| RIFR-U3 | 17.3 | 14.05 | 14.01 | 0.04 | 0.28 |
| | 22.09 | 13.93 | 13.68 | 0.25 | 1.79 |
| | 27.20 | 15.18 | 14.65 | 0.53 | 3.49 |
| RIFR-U7 | 17.30 | 13.00 | 12.97 | 0.03 | 0.23 |
| | 22.09 | 14.05 | 13.84 | 0.210 | 1.49 |
| | 27.20 | 14.55 | 14.160 | 0.390 | 2.68 |
| RIFR-U10 | 17.30 | 14.77 | 14.660 | 0.110 | 0.74 |
| | 22.09 | 13.60 | 13.350 | 0.250 | 1.83 |
| | 27.20 | 14.86 | 14.220 | 0.640 | 4.3 |
| Control | 17.30 | 13.30 | 13.120 | 0.18 | 1.35 |
| | 22.09 | 13.12 | 12.590 | 0.53 | 4.04 |
| | 27.20 | 12.59 | 10.290 | 2.3 | 18.26 |

## بحث

مقاوم‌سازی زیستی خاک، ازجمله روش‌های در حال توسعه برای افزایش مقاومت خاک در برابر فرسایش است. نتایج این مطالعه در غربالگری اولیه خاک‌های نواحی رویشی زاگرس واقع در استان چهارمحال و بختیاری نشان‌دهنده پتانسیل کم و بیش بالای این خاک‌ها در میزبانی از باکتری‌های مولد اوره‌آز است. محققانی که در زمینه تولید رسوب کلسیت میکروبی کار می‌کنند باور دارند که وجود این باکتری‌ها و مناسب بودن شرایط برای فعالیت آنها می‌تواند موجب استحکام خاک شده و در جلوگیری از فرسایش آن مؤثر باشد (Whiffin *et al.*, 2007 و Al-Thawadi, 2008).

تولید آنزیم اوره‌آز اگرچه اولین صفت در غربالگری به‌منظور استفاده از باکتری‌ها برای جلوگیری از فرسایش خاک با سازوکار تولید رسوب کلسیت است اما میزان فعالیت اوره‌آز نیز باید بررسی شود. عوامل متعددی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نقش دارند که می‌توان به دما، اسیدیته، غلظت فلزات سنگین و سایر عوامل محیطی را نام برد (Ma *et al.*, 2019). از میان گونه‌های جدا شده بیشترین فعالیت آنزیم اوره‌آز اندازه‌گیری‌شده با روش تغییر در هدایت الکتریکی به‌میزان (ms/cm ۷/۸) در گونه RIFR-U7 (*Bacillus* sp.) مشاهده شد که همراه با دو گونه دیگر یعنی RIFR-U3 و RIFR-U10 فعالیت اوره‌آزی بالایی داشتند و در مراحل بعدی از آنها استفاده شد. بین فعالیت آنزیم اوره‌آز و تغییر (افزایش) هدایت الکتریکی رابطه مستقیم و مثبت وجود دارد (Krishnan *et al.*, 2023). به‌نحوی‌که هر چقدر میزان افزایش هدایت الکتریکی در طول زمان بالاتر باشد نشان‌دهنده فعالیت بالای آنزیم اوره‌آزی باکتری مورد نظر است (Krishnapriya *et al.*, 2015). فعالیت آنزیم اوره‌آز در *اسپوروسارسینا پاستوری* ds/m ۰/۳۸۲ تا۶/۲۲۴ (Eryürük, 2022) و ds/m ۴/۵ (Hammad et al., 2013) گزارش شد که نشان می‌دهد گونه‌های منتخب فعالیت اوره‌آزی بالایی دارند. در مطالعه‌ای دیگر بالاترین فعالیت آنزیم اوره‌آزی در *اسپوروسارسینا پاستوری*، ds/m ۲/۷۵ گزارش شده است (Kargar & Kargar, 2018) که تأکیدی بر فعالیت بالای اوره‌آزی باکتری‌های جداشده و استفاده از فلور بومی یک منطقه در تثبیت خاک به‌روش زیستی است. مقاومت فشاری اندازه‌گیری شده در این مطالعه بین $kg/cm^2$ ۰/۷۵ تا ۱/۵ متغیر بوده است که با کارایی باکتری *اسپوروسارسینا پاستوری* (باکتری شناخته‌شده در

حوزه تثبیت میکروبی خاک) در افزایش مقاومت فشاری خاک قابل مقایسه است (Mir Mohammad Sadegh *et* al., 2016). با توجه به میزان افزایش مقاومت فشاری این باکتری-ها، می‌توان جزء تثبیت‌کننده متوسط تا خوب ارزیابی کرد که می‌توانند مقاومت مناسبی را در خاک ایجاد کنند بدون آنکه مانع از جوانه‌زنی گیاهان شوند (Plan and Budget Organization, 2019). با توجه به اینکه عوامل متعددی مانند نوع محیط‌کشت، غلظت مواد مورد استفاده در ترکیب محلول سیمانی‌کننده در میزان مقاومت فشاری مؤثرند، امکان بهینه کردن گونه‌ها از نظر بهبود مقاومت فشاری خاک بدون داشتن اثرهای منفی وجود دارد (Ghaffari & Zomorodian, 2023). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که عوامل متعددی ازجمله تعداد باکتری، غلظت اوره و کلریدکلسیم، زمان تیمار، دما و نحوه تزریق باکتری به خاک در میزان افزایش مقاومت فشاری تأثیر دارد و می‌توان با استفاده از این عوامل میزان مقاومت فشاری را بهینه کرد، به‌نحوی‌که بدون تأثیرات منفی از آن در تثبیت خاک استفاده نمود (Phang *et* al., 2018; Ghasemi *et al.*, 2019). میزان مقاومت برشی در خاک‌های تیمار شده با گونه‌های منتخب حداکثر $kg/cm^2$ ۲/۷ و حداقل ۲/۴ بود که نشان می‌دهد این باکتری‌ها توانایی بالایی در ایجاد مقاومت برشی داشته و می‌توان آنها را جزء تثبیت‌کننده بسیار خوب ارزیابی کرد (Plan and Budget Organization, 2019). البته هرچه مقاومت برشی بیشتر باشد، خاک از چسبندگی و استحکام بالاتری برخوردار است. به‌عبارت‌دیگر، استحکام خاک با مقاومت برشی رابطه مستقیمی دارد (Plan and Budget Organization, 2019). Zomorodian و Ghafari (۲۰۱۷) در مطالعه مشابهی میزان مقاومت برشی در خاک‌های ماسه‌ای (با منشأ کربناته و سیلسی) را $kg/cm^2$ ۰/۴۹ و ۰/۶۹ گزارش کردند. Douzali Joushin و همکاران (۲۰۲۰) نیز در مطالعه مشابهی مقادیر مقاومت برشی را $kg/cm^2$ ۱ و ۰/۶۵ به‌دنبال تلقیح باکتری *اسپرورسارسینا* در یک خاک ماسه‌ای (حاوی سیلیس ۶۲٪، اکسیدآلومینیوم ۱۲٪، اکسیدکلسیم ۱۲٪ و اکسیدآهن ۴٪) گزارش کردند که نشان‌دهنده توان بالای باکتری‌های جداشده در این مطالعه است. نتایج به‌دست‌آمده از تونل باد نشان می‌دهد که تیمار خاک با سویه‌های مولد آنزیم اوره‌آز علاوه بر افزایش مقاومت فشاری و برشی، مقاومت آن را در برابر جریان باد افزایش داده و باعث کاهش هدررفت خاک می‌شود که به‌دلیل تشکیل رسوب کربنات‌کلسیم در بین حفره‌های خاک و ایجاد یک لایه سخت در سطح خاک است که مانع از بلندشدن ذرات خاک در اثر باد می‌شود. نتایج به-دست‌آمده در این مطالعه، با نتایج Moinfar و همکاران (۲۰۲۰) و Douzali Joushin و همکاران (۲۰۱۷) مبنی کاهش هدررفت خاک در نمونه‌های تیمارشده با باکتری‌های مولد آنزیم اوره‌آز مطابقت دارد.

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که خاک-های ناحیه رویشی زاگرس در استان چهارمحال و بختیاری پتانسیل بالایی از نظر وجود باکتری‌های مولد اوره‌آز و تثبیت خاک از طریق تولید رسوب کربنات‌کلسیم دارند. اتصال ذرات خاک به یکدیگر که منجر به مقاوم‌شدن سطح خاک به‌دنبال رسوب کربنات‌کلسیم توسط باکتری‌های مولد اوره‌آز می‌شود، می‌تواند باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در فرسایش خاک شود بدون آنکه پیامدهای زیست‌محیطی زیانباری داشته باشد. این مطالعه در سطح آزمایشگاهی، در مقیاس کوچک و شرایط کنترل‌شده انجام شده است و نتایج آن مثبت و امیدوارکننده است، اما با توجه به هدف اصلی این پژوهش که تثبیت خاک و جلوگیری از فرسایش در نقاطی است که با این معضل روبرو هستند، لازم است آزمایش‌های مشابهی در شرایط عرصه (صحرایی) انجام شود تا بتوان در مورد کارایی آنها برای تثبیت در مقیاس‌های بزرگتر اظهارنظر کرد.

## منابع مورد استفاده

- Al-Thawadi, S.M., 2008. High strength in situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Ph.D. thesis, Murdoch University, Perth.
- Anderson J., Bang S., Bang S.S., Lee S.J., Choi S.R. and Dho, N.Y., 2014. Reduction of wind erosion potential using microbial calcite and soil fibers. Geo-Congress. Geo-characterization and Modeling for

Reperta, 7 (1):37-45. https://doi.org/10.29252/nbr.7.1.37

-Hamedi, J., Koochakzade, S., Labafzade. M.S. and Moghimi, H., 2019. Evaluating the potential of alkalophilic bacteria to enhance concrete durability. Biology of Microorganisms, 8 (29): 65-81. https://doi.org/10.22108/BJM.2018.110446.1124 (In Persian with English summary)

-Hammad, I.A., Talkhan, F.N. and Zoheir, A.E., 2013. Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. Journal of Applied Science Research, 9 (3): 1525-1533.

- Ivanov, V. and Chu, J., 2008. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7: 139-153. https://doi.org/10.1007/s11157-007-9126-3

- Kargar, M. and Kargar, M., 2018. Monitoring of biocement- and biogrout- producing bacteria in desert habitats of Iran. Journal of Microbial World, 11 (1): 51-60. https://doi.org/20.1001.1.20083068.1397.11.34.4.6 (In Persian with English summary)

- Khajavi, E., Arab Khedri, M., Mahdian, M.H. and Shadfar, S., 2015. Investigation of water erosion and soil loss values with using the measured data from Cs-137 method and experimental plots in Iran. Journal of Watershed Management Research, 6 (11):137-151. (In Persian with English summary)

- Krishnapriya, S., Venkatesh Babu, D.L. and Prince Arulraj, G., 2015. Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. Microbiological Research, 174: 48-55. https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.009

- Krishnan, V., Khodadadi Tirkolae, H. and Kavazanjian Jr., E., 2023. An improved method for determining urease activity from electrical conductivity measurements. ACS Omega, 8 (15): 13791–13798. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c08152

- Ma, X., Qi, M., Li, Z., Zhao, Y., Yan. P., Liang, B., and Wang, A., 2019. Characterization of an efficient chloramphenicol-mineralizing bacterial consortium. Chemosphere, 222: 149-155. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.131

- Mahmoudi, S., and Hakimian, M., 1984. Fundamentals of Soil Science. Tehran University Publication, Tehran, 714p. (In Persian)

- Maleki M., Ebrahimi S., Asadzade F. and Emami Tabrizi, M., 2016. Performance of microbial-induced carbonate precipitation on wind erosion control of sandy soil. International. Journal of Environmental Science and Technology, 13: 937-944. Sustainability. The United States of America, 23-26 February: 1664-1673.

- Agricultural Planning, Economic and Rural Development Research., 2000. Soil Report, 6th Volume, Ministry of Agriculture and Jihad, Deputy of the plan and Budget. Agricultural Planning, Economic and Rural Development Research Publication, Tehran, 250 p. (In Persian)

- Bergkessel, M. and Guthrie, C., 2013. Colony PCR. Methods in Enzymology. 529: 299-309. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2

- Cheng, L., Shahin, M. A., Cord-Ruwisch, R., Addis, M., Hartanto, T. and Elmsm, C., 2014. Soil stabilisation by microbial-induced calcite precipitation (micp): investigation into some physical and environmental aspects. 7th International Congress on Environmental Geotechnics. Australia, 10-14 November: 1105-1112.

- Douzali Joushin, F., Badv, K. and Barin, M. and Sultani Jige, H., 2017. Inhibition of wind erosion by SBR polymer and *Bacillus pasteurii* microorganism (Case study: Jabal Kandy region). Iranian Journal of Soil and Water Research, 49 (4): 795-806. (In Persian with English summary). https://doi.org/10.22059/IJSWR.2018.237063.667721

- Douzali Joushin, F., Badv, K. and Barin, M., 2020. Efficiency of microbial-induced carbonate precipitation on surface strength of Jabalkandi dune sand. Water and Soil Resources Conservation, 9 (2): 141-156 (In Persian with English summary)

- Eryürük, K., 2022. Investigating the urease activity of *Sporosarcina pasteurii* for potential usage of microbially induced calcium carbonate precipitation. European Journal of Science and Technology, 34: 1-4. https://doi.org/ 10.31590/ejosat.1061497

- FAO & ITPS. 2015. Status of the world's soil resources – main report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils. Rome, 649 p.

- Ghasemi, P., Zamani, A. and Montoya, B., 2019. The effect of chemical concentration on the strength and erodibility of MICP treated sands: Eighth International Conference on Case Histories in Geotechnical Engineering, Geo-Congress, The United States of America, 24-28 March.

- Ghaffari, H. and Zomorodian, S. M. A., 2023. Investigating performance of biocementation method in stabilization sand dunes for dealing with wind erosion. Modares Civil Engineering journal, 22 (1):35-51. (In Persian with English summary)

- Haddadi, M. and Ghezelbash, G.R., 2020. The isolation of halophilic urease-producing bacteria and the study of their nano-crystal production. Nova Biologica

https://doi.org/10.1007/s13762-015-0921-z
- Mir Mohammad Sadeghi, M., Sotoudehfar, A.R. and Mokhtar, E., 2016. Evaluation of bio-grouting method in strengthening sandy soil. Journal of Water and Soil Science, 20 (77): 71-83. https://doi.org/10.18869/acadpub.jstnar.20.77.71 (In Persian with English summary)
- Moinfar, M., Rasouli-Sadaghiani, M.H., Barin, M. and Asadzadeh, F., 2020. 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. Journal of Water and Soil, 34: 143-154. https://doi.org/10.22067/jsw.v34i1.69069 (In Persian with English summary)
- Phang, I.R.K, Wong, K.S., Chan, Y.S., and Lau, S.Y., 2018. Effect of microbial-induced calcite precipitation towards tropical organic soil: AIP Conference Proceedings. Malaysia, 5–6 September: 2020, 020011. https://doi.org/10.1063/1.5062637
- Plan and Budget Organization., 2019. Technical instruction to evaluate the efficiency of soil stabilizers (Mulch). Plan and Budget Organization Publication, 167 p. (In Persian)
- Weaver, T., Burbank, M., Lewis, A., Lewis, R., Crawford, R. and Williams, B., 2011. Bio-induced calcite, iron, and manganese precipitation for geotechnical engineering applications. Geo-Frontiers Congress. The United States of America, 13-16 March: 3975-3983.
Whiffin, V. S., 2004. Microbial CaCO3 precipitation for the production of biocement. Ph.D. thesis, Murdoch University, Perth, 254 p.
Whiffin, V.S., van Paassen, L. and Harkes, M.P., 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. Geomicrobiology Journal, 24 (5): 417-423. https://doi.org/10.1080/01490450701436505
World Bank., 2005. Islamic Republic of Iran cost assessment of environmental degradation Report No. IR–32043. Rural Development. Water and Environment Department. Middle East and North Africa Region. 86 p.
- Zomorodian, S.M.A. and Ghafari, H., 2017. Evaluation of shear strength of soil stabilized by microbiological method. Iranian Journal of Soil and Water Research, 48(4): 737-748. https://doi.org/10.22059/ijswr.2017.214313.667526 (In Persian with English summary)