



مقایسه‌ی تأثیر نوع محیط کشت باکتری *Sporosarcina Pasteurii* بر میزان و نوع رسوبات کربنات کلسیم در جهت بهسازی خاک‌های دانه‌ای

محمدتقی بلوری‌بزاز، جعفر بلوری‌بزاز*، سیدمحسن کرابی

دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخچه داوری:

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۲
بازنگری: ۱۳۹۹/۰۲/۲۳
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۵
ارائه آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۱۰

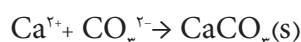
کلمات کلیدی:

بهسازی خاک‌ها
روش‌های بیولوژیکی
تجاری‌سازی
محیط کشت مناسب
ملاس چغندر قند.

خلاصه: استفاده از روش‌های مختلف بهسازی خاک‌ها، همواره با بررسی میزان تأثیر بر پارامترهای مقاومتی، هزینه و اثرات محیط‌زیستی ناشی از آن همراه بوده است. از آنجایی که روش‌های نو و سازگار با محیط‌زیست همراه با هزینه‌های اولیه زیاد می‌باشد، بهینه‌سازی این روش‌ها به منظور تجاری‌سازی آن‌ها در اولویت طرح‌های پژوهشی است. استفاده از روش‌های زیستی برای بهسازی خاک‌ها، با وجود سازگاری زیاد با محیط‌زیست در اغلب نقاط جهان از نقطه نظر اقتصادی مورد استقبال قرار نگرفته است و هنوز به عنوان یک روش آکادمیک و نه اجرایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. بهسازی خاک با استفاده از رسوب کربنات کلسیم، از جمله روش‌های زیستی سازگار با محیط‌زیست است. از جمله تأثیرگذارترین پارامترهای تولید سوسپانسیون باکتری برای ترسیب کربنات کلسیم، محیط کشت آن بوده که معمولاً Nutrient Broth یا Yeast Extract می‌باشد. محیط کشت جایگزین، یکی از روش‌های کاهش هزینه‌های تمام شده در بهسازی زیستی خاک است. در این پژوهش استفاده از ملاس چغندر قند که از ضایعات کارخانه‌های تولید قند و شکر است، به عنوان محیط کشت باکتری مناسب در روش بهسازی زیستی در کنار محیط کشت‌های دیگر مورد بررسی قرار گرفت. این ماده می‌تواند هزینه تولید محیط کشت مناسب را تا ۵۰۰ برابر کاهش دهد. موفقیت در بهسازی خاک پس از کشت باکتری در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفته است.



۲- رسوب کریستال‌های کربنات کلسیم در اثر واکنش یون کلسیم و کربنات:



در صورتی که فرآیند فوق در خاک رخ دهد، اتصال دانه‌های خاک به کمک کریستال‌های کربنات کلسیم انجام می‌شود [۵].

به منظور رشد یک باکتری در طبیعت و یا در آزمایشگاه، باید منبع انرژی، منبع کربن، دیگر مواد مغذی مورد نیاز باکتری و محدوده قابل قبولی از شرایط فیزیکی مانند غلظت اکسیژن، دما و pH در شرایط مطلوب باشند [۶]. از جمله مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر نحوه فعالیت و زیست میکروارگانیسم‌ها، محیط کشت آن‌ها می‌باشد.

۱- مقدمه

ژئوتکنولوژی میکروبی شاخه‌ای جدید در مهندسی ژئوتکنیک است که با استفاده از روش‌های میکروبیولوژیکی، به بررسی مواد زمین‌شناسی مهندسی می‌پردازد [۱]. در محیط‌های متخلخل، ذرات میکروبی معدنی، به راحتی بین ذرات دیگر گرفتار می‌شوند [۲]. هیدرولیز اوره یکی از اولین فرآیندهای همراه با رسوب کربنات ناشی از فرآیندهای میکروبی است که در اواخر قرن نوزدهم مورد بررسی قرار گرفت [۳]. فرآیند روسوب میکروبی شامل ۲ مرحله است [۴]:
۱- هیدرولیز اوره توسط باکتری اوره‌آز و تجزیه به یون‌های آمونیوم و کربنات:

* نویسنده عهده‌دار مکاتبات: bolouri@um.ac.ir



جهت تأمین تأخیر ناشی از فرآیند هیدراتاسیون و سیمانته شدن در باکتری *Sporosarcina Pasteurii* مورد بحث و بررسی قرار گرفته که نتیجه این پژوهش معرفی عصاره گوشت و استات سدیم به عنوان جایگزین مناسبی برای عصاره مخمر بوده است [۲۱].

ملاس چغندر قند، به عنوان یکی از پسماندهای کارخانه تولید قند و شکر، با توجه به هزینه پائین آن، از نقطه نظر اقتصادی از بهترین گزینه‌های تأمین کربن در محیط‌های کشت باکتری‌های خانواده باسیلوس^۲ کاربرد دارد.

در پژوهش‌های قبلی، بررسی اثر تزریق سوسپانسیون‌های باکتری کشت شده در محیط‌های مانند Nutrient Broth یا Yeast Extract انجام پذیرفته است. همچنین رسوبدهی باکتری‌های کشت شده از منبع تولید کربن ملاتس چغندر قند نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، تزریق سوسپانسیون حاصل از دو محیط کشت غیر شیمیایی ملاتس چغندر قند و عصاره سیب‌زمینی در مقایسه با دو محیط کشت موسوم به Nutrient Broth و Yeast Extract صورت پذیرفته است. استفاده از منبع کربنی چغندر قند و عصاره سیب‌زمینی صرفاً جهت بررسی دو منبع جدید با هزینه تولید پایین بوده تا در صورت پاسخگو بودن، در سایر پژوهش‌ها مورد بررسی قرار گیرد. همچنین جهت تحلیل دقیق نتایج از آزمون FTIR برای بررسی پیوندهای میان ترکیبات رسوب شده استفاده گردید.

از طرف دیگر، یکی از مهم‌ترین رخدادهای ژئوتکنیکی نشت، انتشار و نفوذ مواد هیدروکربنی در داخل خاک‌ها بخصوص خاک‌های دانه‌ای است که در مناطق مختلف احتمال رخداد آن وجود دارد. تأثیرات منفی مواد هیدروکربنی بر خواص ژئوتکنیکی و مقاومتی خاک‌ها در تحقیقات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است [۲۲-۲۴].

در این پژوهش پس از ارزیابی میزان موفقیت جایگزین‌های منبع کربن (مانند ملاتس چغندر قند یا عصاره سیب‌زمینی) فرآیند زیستی و استفاده از کریستال‌های کربنات کلسیم در خاک‌های آلوده به یکی از مشتقات هیدروکربنی مانند گازوئیل نیز مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین می‌توان نوآوری این پژوهش را به صورت زیر خلاصه نمود:

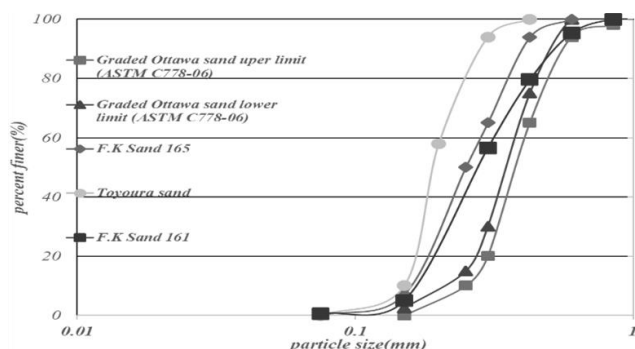
۱. عملکرد بهسازی زیستی خاک با دیدگاه میکروسکوپی بر اساس

تحلیل نتایج آزمون FTIR، XRD، SEM و EDS.

محیط کشت، جامد، مایع یا نیمه جامد است که برای حمایت از رشد میکروارگانیسم‌ها یا سلول‌ها طراحی شده است [۷]. عصاره مخمر، به عنوان یکی از رایج‌ترین منابع تأمین کربن در بسیاری از پژوهش‌ها به عنوان محیط کشت باکتری استفاده شده است [۸-۱۰]. بر بانک و همکاران در سال ۲۰۱۱، در پژوهشی از محیط کشت حاوی ملاتس چغندر قند در کنار محیط کشت فاقد آن و تزریق هم‌زمان هر دو محیط به خاک حاوی میکروارگانیسم‌های بومی استفاده کرده و تغییرات مقاومت نفوذ نوک در تغییر تعداد دفعات تزریق را بررسی نمودند [۱۰]. ون پیسن و همکاران در سال ۲۰۱۰، اقدام به بهسازی حدود ۱۰۰ متر مکعب خاک با استفاده از عصاره مخمر و کلرید آمونیوم کردند [۱۱]. محیط عصاره آمونیوم و مخمر نیز در برخی پژوهش‌ها به عنوان محیط کشت مورد استفاده قرار گرفته است [۱۲ و ۱۳]. استفاده از محیط‌های جایگزین دارای کربن، به عنوان محیط کشت باکتری، می‌تواند جانشین عصاره مخمر باشد [۱۴]. ملاتس چغندر قند به عنوان یکی از منابع تأمین کربن از خروجی کارخانه‌های تولید قند و شکر است که به دلیل قیمت پائین آن بسیار مورد استقبال است [۱۵]؛ ملاتس، به عنوان منبع تغذیه میکروارگانیسم‌ها در فرآیند زیست پالایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۶ و ۱۷]. پیش‌تر، استفاده از این منبع کربن در تولید موانع زیستی (بیو فیلم‌ها) صورت پذیرفته است [۱۸]. همچنین طبق تحقیقات بر بانک و همکاران [۱۰] استفاده از ملاتس چغندر قند به عنوان منبع تولید کربن، به دلیل وجود گلوکوز، فروکتوز و سقز در آن، برای بهسازی زیستی میکروبی مفید بوده و مولاریته و غلظت منبع کربن (ملاتس چغندر قند) تأثیری بر میزان تولید کربنات کلسیم ندارد. تأثیر محیط جانشین ملاتس چغندر قند برای عصاره مخمر توسط چنگ و همکاران [۱۹] نیز بررسی شده و بر همین مبنا میزان فعالیت اوره‌آزی^۱ در محیط عصاره مخمر بسیار بیشتر و تا حدود ده برابر بوده و میزان کربنات کلسیم تولید شده در منبع کربنی عصاره مخمر نیز افزایش یافته است؛ با این حال این پژوهش‌ها، پس از بررسی میزان اوره‌آزی کم ملاتس، نسبت به عصاره مخمر بر روی عصاره مخمر متمرکز شده است. گت و همکاران [۲۰] میزان ماندگاری بهسازی در اثر رسوب کربنات کلسیم در محیط‌های آبی، از محیط کشت ملاتس چغندر قند را مورد بررسی قرار داده‌اند. در پژوهشی دیگر، استفاده از محیط کشت با پایه منبع کربنی جایگزین،

2 Bacillus

1 Urease



شکل ۱. نمودار دانه‌بندی ماسه فیروزکوه ۱۶۱ در مقایسه با ماسه‌های استاندارد معمول در پژوهش‌ها

Fig. 1. Firuzkooch 161 sand grading diagram in comparison with standard sands in research

جدول ۱. مشخصات فیزیکی ماسه فیروزکوه

Table 1. Physical characteristics of Firuzkooch sand

Gs	γ_{max} (kN/m ³)	γ_{min} (kN/m ³)	D ₁₀ (mm)	D ₆₀ (mm)	Cc	Cu
2.658	17.86	13.44	0.167	0.40	1.01	2.39

۱ آمده است.

مطابق با جدول ۱، G_s ، e_{min} ، e_{max} ، Cc و Cu به ترتیب چگالی جامد دانه‌ها، وزن مخصوص بیشینه و کمینه، ضریب خمیدگی و ضریب یکنواختی است. همچنین D_{10} و D_{60} اندازه‌ای از ذرات هستند که به ترتیب ۱۰٪ و ۶۰٪ وزنی دانه‌ها از آن کوچک‌تر هستند.

۲-۲- کشت و رشد سویه باکتری

با توجه به فعالیت اوره‌آزی بالای خانواده باسیلوس، از باکتری‌های این خانواده برای فرآیند رسوب‌زایی زیستی استفاده شده است [۲۷]. سویه اصلی باکتری با اوره‌آزی بالا و با کد طبقه‌بندی آمریکایی ۱۱۸۹ با نام اسپوروسارسینا پاستوری^۱، از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران تهیه گردید. این گونه از باکتری، یکی از متداول‌ترین سویه‌های مورد استفاده جهت پژوهش‌های ترسیب زیستی است [۲۱]. ابتدا برای کشت تازه باکتری، محیط کشت جامد نوترینت آگار^۲ به همراه ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر $MnSO_4$ جهت افزایش اسپوردهی^۳ باکتری افزوده می‌شود. سپس به کمک فیلتر سورنگی، ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر اوره به محیط اضافه شده که نتیجه‌ی آن، ایجاد

۲. بدست آوردن و مقایسه پارامترهای مقاومتی و ژئوتکنیکی خاک بهسازی شده،

۳. امکان جایگزینی ماس چغندر قند (به عنوان منبع کربن) با سایر مواد گران‌قیمت به عنوان محیط کشت

۴. استفاده از تحلیل PD و GC به عنوان معیارهایی جهت مقایسه ماسه‌های بهسازی شده با ماسه سنگ‌های طبیعی، با بهره‌گیری از تصاویر SEM

۵. امکان‌سنجی استفاده از روش‌های زیستی با منبع کربن جایگزین (مانند ماس چغندر قند) در بهسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن (در پژوهش حاضر گازوئیل)

اهمیت این پژوهش هنگامی آشکار می‌شود که یکی از مهم‌ترین دلایل صنعتی نشدن روش‌های زیستی برای بهسازی خاک، هزینه‌بر بودن محیط‌های کشت مرسوم می‌باشد. حال آنکه استفاده از ماس چغندر قند بویژه در مناطقی که کشت این محصول فراوان است، سبب کاهش هزینه‌ها و به صرفه شدن فرآیند بهسازی زیستی گشته و امکان صنعتی سازی استفاده از روش‌های بهسازی زیستی مهیا خواهد شد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش، خاک دانه‌ای ماسه‌ای از منطقه فیروزکوه ایران، سویه باکتری *Spoorsarcina Pasteurii* و چهار نوع محیط کشت شامل Nutrient Broth، Yeast Extract، Spoonsarcina Pasteurii و چهار عصاره سیب‌زمینی و ماس چغندر قند بوده است. مواد و روش کلی بهسازی میکروبی با استفاده از رسوب کربنات کلسیم در ادامه شرح داده شده است.

۲-۱- خاک

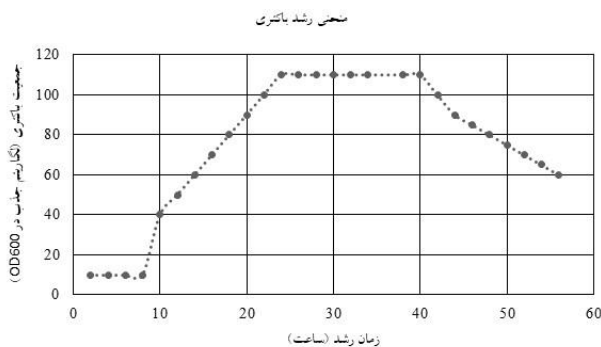
خاک مورد استفاده در پژوهش حاضر ماسه ۱۶۱ فیروزکوه ایران است که نمودار توزیع دانه‌بندی آن در مقایسه با ماسه‌های استاندارد در شکل ۱ نشان داده شده است (ASTM D422-63) [۲۵]. رده‌بندی این خاک، ماسه بد دانه بندی شده یا SP است [۲۶]. همچنین نتایج حاصل از طیف‌سنجی فلورسانس اشعه ایکس (XRF)، وجود حدود ۹۵٪ کوارتز و مجموعاً ۲/۵٪ اکسید آلومینیوم، منیزیم و آهن را در خاک نشان می‌دهد. سایر مشخصات این ماسه در جدول

1 ATCC11859 *Spoorsarcina Pasteurii*
2 Nutrient Agar
3 Spor

جدول ۲. فاز مایع کشت باکتری برای ۴ محیط کشت مختلف

Table 2. Bacterial culture liquid phase for 4 different culture media

نوع محیط کشت	ماده آلی (منبع کربن)	منبع نیتروژن	pH	(mM) NiCl ₂
محیط کشت اول (NB)	Nutrient Broth	اوره، آمونیوم کلرید و سدیم هیدروژن کربنات	۸/۳	-
محیط کشت دوم (YE)	Yeast Extract	اوره، آمونیوم کلرید	۹/۲۵	۱
محیط کشت سوم (PDB)	Potato Dextrose Broth	اوره، آمونیوم کلرید	۹/۲۵	۱
محیط کشت چارم (SBM)	Sugar Beet Molasses	اوره، آمونیوم کلرید	۹/۲۵	۱



شکل ۲. منحنی رشد باکتری

Fig. 2. Bacterial growth curve

نمونه، با توجه به وزن مخصوص خشک آن) و سپس تزریق محلول سیمان‌تاسیون که حاوی یک مولار کلسیم کلرید و اوره در یک لیتر آب مقطر استریل است، انجام شده که معادل حجم سوسپانسیون باکتری وارد شده به خاک در مرحله قبل است.

حجم سوسپانسیون باکتری در این پژوهش بر مبنای دو فاکتور معادل ۱۰٪ وزنی خاک تعیین شد:

ابتدا با توجه به وزن مخصوص خشک نمونه‌های ساخته شده، مقدار درصد رطوبت مایع متخلخل داخل نمونه در حالت اشباع تقریباً معادل ۱۹/۸٪ وزنی خاک است. در نتیجه، در بهترین حالتی که کل خلل و فرج نمونه قبل از بهسازی پر از مایعات مورد نیاز برای بهسازی شوند، معادل حدود ۲۰٪ وزنی کل خاک است.

پس از آن، مایع مور نیاز برای بهسازی، باید به نحوی به خلل و فرج خاک وارد شوند تا سوسپانسیون باکتریایی و محلول سیمان‌تاسیون در خلل و فرج خاک در کنار هم قرار بگیرند. در نتیجه پس از ورود ۱۰٪ سوسپانسیون باکتری، همین حجم سیمان‌تاسیون وارد خاک شده است.

فرآیند ورود باکتری به خاک به دو صورت انجام شده و دو روش

محیط با اسیدیته (pH) ۷/۵ است. پس از کشت باکتری، ظرف حاوی محیط کشت، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور^۱ قرار گرفت. در فاز مایع، برای کشت باکتری، در چهار ارلن مجزا، مقدار ۱۰۰ سی‌سی از محیط‌های کشت چهارگانه مورد مطالعه (Yeast Extract, Nutrient Broth)، عصاره سیب‌زمینی و ملاس چغندر قند) تهیه شده و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو^۲ می‌شود. در جدول ۲، فاز مایع کشت باکتری برای چهار محیط کشت مختلف و میزان اسیدیته محیط با افزودن سود (NaOH) نیز ارائه شده است. در بررسی تأثیر اسیدیته بر بهینه بودن بهسازی میکروبی، اسیدیته حدود ۹ توصیه شده است [۲۸].

به منظور اندازه‌گیری جمعیت باکتری از اندازه‌گیری کدورت نوری^۳ با دستگاه اسپکتوفوتومتر^۴ در طول موج ۶۰۰ نانومتر^۵ استفاده شده است. برای کشت در محیط‌های مایع، از کشت تازه باکتری، ۲۰ میلی گرم بر لیتر باکتری با OD₆₀₀=۱ در هر فلاسک ریخته شده و سپس ارلن‌ها داخل دستگاه شیکرانکوباتور به مدت ۴۸ ساعت و با سرعت دورانی ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرند. هنگامی که OD₆₀₀ محیط به ۲/۲۵ رسید، سوسپانسیون باکتری آماده تزریق شده و فرآیند بهسازی آغاز می‌شود.

نمودار شکل ۲، فازهای مختلف رشد باکتری را ارائه می‌دهد و در آن به ترتیب، فازهای لگاریتمی، سکون و زوال دیده می‌شود.

۲-۳- بهسازی به کمک رسوب کربنات کلسیم

در پژوهش حاضر، فرآیند بهسازی، با افزودن سوسپانسیون باکتری به خاک (معادل ۵۰٪ از درصد وزنی از رطوبت مورد نیاز برای اشباع

- 1 Incubator
- 2 Autoclave
- 3 Optical Density
- 4 Spectrophotometer
- 5 OD₆₀₀

جدول ۳. نحوه تعیین تعداد دفعات تزریق محلول سیمانناسیون

Table 3. How to determine the number of injections of cementation solution

q_u	N_i
۳۲۲	۳
۴۳۵	۴
۶۹۰	۵
۷۰۰	۷
۷۱۲	۸

در این جدول N_i تعداد دفعات تزریق (با فاصله ۴۸ ساعت هر بار معادل حجم سوسپانسیون) و q_u مقاومت تک‌محوره (کیلوپاسکال) نمونه‌های استوانه است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تزریق بیش از ۵ دفعه تأثیر چشمگیری روی پارامتر مقاومتی نمونه نداشته است (کمتر از یک و نیم درصد). بنابراین تعداد دفعات تزریق ۵ سری با فاصله ۴۸ ساعت معادل حجم سوسپانسیون انتخاب گردید.

۳- برنامه آزمون‌ها

آزمون‌های انجام شده در تحقیق حاضر شامل سه گروه است:
گروه اول: آزمون‌های کلاسیک مکانیک خاک شامل مقاومت فشاری تک‌محوره (UCS^2)، آزمون برش مستقیم (DS^3) و آزمون نفوذپذیری (PER^4).

گروه دوم: آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی شامل پراش اشعه ایکس (XRD^5)، طیف‌نگاری پراش انرژی پرتو ایکس (EDS^6)، طیف‌نگاری تبدیل فوریه مادون قرمز ($FTIR^7$) و تحلیل شیمی تر (WCA^8). لازم به یادآوری است کلیه این آزمون‌ها بر روی نمونه‌های رسوب خالص (بدون خاک) و خاک بهسازی انجام شده است.

گروه سوم: عکس برداری به کمک میکروسکوب الکترونی روبشی (SEM^9).

برای نام‌گذاری نمونه‌ها ابتدا کد محیط کشت مایع به عنوان اولین حرف آمده است. به این ترتیب که برای محیط کشت Nutrient

برای بهسازی خاک به شرح زیر انتخاب شده است. لازم به ذکر است که دمای محیط حین انجام آزمایش ثابت و در دوره نگهداری حدود ۲۰ درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شده است [۱۲].

- روش تزریق دو مرحله‌ای

- تزریق سوسپانسیون باکتری تهیه شده به خاک (سرعت تزریق باکتری از بالا به پایین، به صورت ثقلی و ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه)
 - دو ساعت گذر زمان جهت تثبیت شدن باکتری بین دانه‌ها و ذرات خاک (تثبیت در این متن به معنای عدم حرکت محلول باکتریایی در خاک و نشست آن بر روی دانه‌های خاک است؛ در واقع، پس از گذر زمان تثبیت، حرکت محلول در خاک و اعماق آن مشاهده نمی‌شد).

- تزریق محلول سیمانناسیون

- تکرار مرحله قبل پس از ۴۸ ساعت تا پنج نوبت [۲۹].

- بازکردن قالب نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق محلول سیمانناسیون جهت اکسیژن‌دهی.

- روش اختلاط فلوکه باکتری

- تهیه فلوکه باکتری با افزودن مقدار ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید در یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری انجام می‌شود که کلسیم کلرید سبب تجمع و انعقاد سلول‌های باکتری شده و در نهایت باعث رسوب باکتری‌ها در انتهای ظرف می‌شود [۲۹].

- حذف ۸۵٪ از محلول شناور رویی (سوپرناتانت^۱) پس از ته‌نشست فلوکه باکتری [۲۹].

- مخلوط کردن خاک و فلوکه باکتری به روش خیساندن

- دو ساعت گذر زمان جهت تثبیت شدن باکتری بین دانه‌ها و ذرات خاک

- تزریق محلول سیمانناسیون

- تکرار مرحله قبل پس از ۴۸ ساعت تا پنج نوبت [۲۹].

- بازکردن قالب نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق محلول سیمانناسیون جهت اکسیژن‌دهی.

انتخاب ۵ سری تزریق سیمانناسیون معادل سوسپانسیون باکتری ورودی به خاک (با روش دوفازی و یا اختلاط) بر این مبنا بوده که ساخت نمونه‌های تک‌محوره در قسمت بررسی‌های اولیه، طبق جدول ۳ و به شرح زیر انجام و نتایج گزارش شده است.

2 Uniaxial Compressive Strength
 3 Direct Shear
 4 Permeability
 5 X-Ray Diffraction
 6 Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy
 7 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
 8 Wet Chemical Analyses
 9 Scanning Electron Microscope

1 Supernatant

جدول ۴. تعداد آزمایش‌ها
Table 4. Number of experiments

نام آزمون	UCS	DS	PER	XRD	WCA	SEM	FTIR
تعداد	۸×۳	۹×۳	۹	۶	۴۰	۱۰	۴

- خارج نمودن نمونه ماسه بهسازی شده از قالب بدون هیچ‌گونه دست‌خوردگی.
- قراردادن نمونه‌ها در دمای کنترل شده و شرایط آزمایشگاهی به مدت ده روز.
- برش عرضی نمونه‌ها در ارتفاع و اصلاح ارتفاع آن از بالا و پائین به ۱۲ سانتی‌متر.

جدول ۵ نمایشی از وزن مخصوص خشک نمونه‌های ساخته شده، پس از فرآیند بهسازی، حاصل از ۴ محیط کشت مختلف، با استفاده از دو روش تزریق دوفازی و اختلاط فلوکه باکتری است. شکل‌های ۳ و ۴ به ترتیب نمونه ماسه ای بهسازی شده قبل و پس از آزمون را نمایش می‌دهد. همچنین تغییرات تنش- کرنش کلیه نمونه‌ها در چهار محیط کشت متفاوت و با دو روش ورود باکتری در شکل ۵ نشان داده شده است.

۴-۲ - آزمون برش مستقیم

- به منظور تعیین پارامترهای مکانیکی آزمون برش مستقیم مطابق با آزمون استاندارد (ASTM-D2166) که مراحل آن در زیر شرح داده شده است [۳۰]، بر روی ماسه معمولی و بهسازی شده با وزن مخصوص $17/1 \text{ kN/m}^3$ (قبل از بهسازی) انجام شده است.
- قالب ساخت نمونه برش مستقیم (با ابعاد $10 \times 10 \times 2/5$ سانتی‌متر)، به صورت مدفون در میانه لایه‌های خاک با تراکم مشخص در ظرف با ابعاد بزرگتر قرار داده شده است.
- فرآیند ورود باکتری که در روش فلوکه از قبل با خاک آمیخته شده است، و تزریق محلول سیمان‌تاسیون معادل حجم باکتری مورد استفاده انجام می‌شود.
- قالب برش مدفون از داخل خاک، ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق محلول سیمان‌تاسیون مطابق شکل ۶ بیرون آورده می‌شود.
- نمونه‌ها در دمای کنترل شده و شرایط آزمایشگاهی به مدت ده روز قرار داده می‌شود.

Broth حرف N، محیط کشت Yeast Extract حرف Y، محیط کشت Potato Dextrose Broth حرف P و محیط کشت Sugar Beet Molasses حرف M استفاده شده است. سپس بر مبنای روش بهسازی، برای نمونه‌هایی که ورود باکتری با تزریق محلول سوسپانسیون است، حرف S و برای نمونه‌هایی که ورود باکتری با اختلاط خاک همراه با فلوکه باکتری است، حرف F کدگذاری شده است. همچنین برای آزمون‌های کلاسیک مکانیک خاک شامل برش مستقیم، تک‌محوره و نفوذپذیری به ترتیب از حروف D، U و H قبل از همه کدهای ذکر شده استفاده شده است. تعداد آزمون‌های انجام شده در جدول ۴ گزارش شده است.

۴-۴ نتایج آزمون‌ها

همان‌گونه که بیان شد، آزمون‌های انجام شده در این پژوهش در سه گروه دسته‌بندی شده‌اند که نتایج آزمون‌های هر گروه به تفکیک در زیر ذکر شده است.

۴-۱- آزمون تک‌محوری

- برای ارزیابی میزان مقاومت فشاری محدود نشده مطابق با آزمون استاندارد (ASTM-D2166)، نمونه‌های استوانه‌ای با قطر و ارتفاع $6/3$ و 12 سانتی‌متر و وزن مخصوص $17/1 \text{ kN/m}^3$ (قبل از بهسازی) تهیه شده‌اند [۳۰]. ساخت نمونه‌های مورد آزمایش به شرح زیر است:
- برش طولی لوله PVC به قطر $6/3$ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و تقسیم آن به دو نیم استوانه (در جهت یال).
- متصل کردن دو نیمه به یک‌دیگر با استفاده از بست.
- مسدود کردن بستن انتهای لوله بست خورده و آب بند نمودن آن.
- سوراخ کردن انتهای نمونه به منظور ایجاد قابلیت زهکشی مایعات تزریقی.
- ریختن خاک به داخل لوله بست خورده و کوبش خاک تا رسیدن به وزن مخصوص خشک مشخص شده.
- تزریق محلول سیمان‌تاسیون (معادل حجم باکتری مورد استفاده، که در این پژوهش معادل 10% وزنی خاک اولیه بوده است).
- قرار دادن نمونه در هوای آزمایشگاه، ۴۸ ساعت پس از آخرین مرحله از تزریق محلول سیمان‌تاسیون به منظور اکسیژن‌دهی به ماسه حاوی سیمان‌تاسیون و تکمیل فرآیند رسوب‌زایی کربنات کلسیم.

جدول ۵. تغییرات پارامترهای وزنی - حجمی خاک پس از بهسازی به روش‌های مختلف

Table 5. Changes in soil weight-volume parameters after improvement in different ways

میزان تخلخل پس از بهسازی	میزان تخلخل اولیه	وزن مخصوص خشک پس از بهسازی (kN/m^3)	وزن مخصوص خشک اولیه (kN/m^3)	نوع ورود باکتری به خاک	نوع محیط کشت
۰/۳۸۶		۱۸/۸۱		تزریق دوفازی	محیط کشت اول (NB)
۰/۳۶۳		۱۹/۳۲		اختلاط فلوکه باکتری	محیط کشت اول (NB)
۰/۴۰۶		۱۸/۵۶		تزریق دوفازی	محیط کشت دوم (YE)
۰/۳۶۷		۱۹/۰۷		اختلاط فلوکه باکتری	محیط کشت دوم (YE)
۰/۵۲۵	۰/۵۲۵	۱۷/۱۲	۱۷/۱	تزریق دوفازی	محیط کشت سوم (PDB)
۰/۵۲۵		۱۷/۱۳		اختلاط فلوکه باکتری	محیط کشت سوم (PDB)
۰/۴۲۳		۱۸/۳۳		تزریق دوفازی	محیط کشت چارم (SBM)
۰/۴۰۵		۱۸/۵۵		اختلاط فلوکه باکتری	محیط کشت چارم (SBM)



شکل ۴. نمونه شکسته شده پس از آزمون تک محوری
Fig. 4. Broken uniaxial specimen

تنش‌های قائم ۰/۵، ۱ و ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع در شکل ۷ آمده است.

با ترسیم دواير مور- کلمب و به دست آوردن پوش گسیختگی نمونه‌ها، نتایج آزمون برش مستقیم در شکل‌های ۸ و ۹ که میزان زاویه اصطکاک داخلی و چسبندگی را نمایش می‌دهد، ارائه شده است.

۴-۳- آزمون نفوذپذیری

به منظور بررسی تأثیر رسوب کربنات کلسیم بر میزان نفوذپذیری



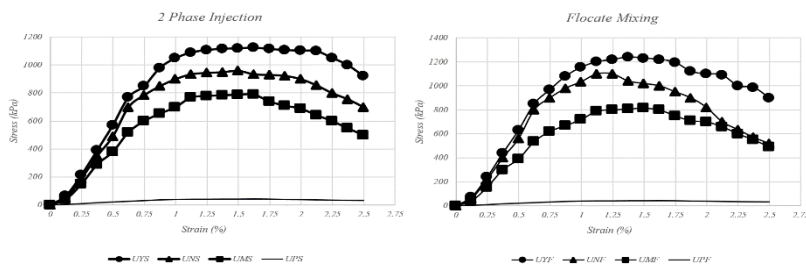
شکل ۳. نمونه‌های ماسه‌ای بهسازی شده در محیط آزمایشگاه پس از تکمیل فرآیند رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم

Fig. 3. Sand samples improved in the laboratory after the completion of the induced microbial deposition process of calcium carbonate

- انتقال نمونه به فک پایینی دستگاه برش مستقیم و دستگاه برای انجام آزمایش آماده می‌شود.

- تنش قائم ۰/۵، ۱ و ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع و اعمال نیروی برشی با سرعت ۱ میلی‌متر بر دقیقه اعمال می‌شود.

تغییرات تنش برشی - کرنش در نمونه‌های بهسازی شده به دو روش مختلف ورود باکتری و محیط‌های کشت ۴ چهارگانه، در



شکل ۵. نمودار نتایج آزمون فشاری تک‌محوره بر روی نمونه بهسازی شده به روش MICP در چهار محیط کشت مختلف
Fig. 5. Diagram of the results of uniaxial compression test on a sample improved by MICP method in four different culture media

حجم آن، مایع سیمانتاسیون به آن اسپری می‌شود. رسوبات تشکیل شده پس از ۱۰ روز، توسط آزمون XRD پراش شده و نتایج آن در شکل‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴ ارائه شده است. لازم به ذکر است، به دلیل حجم بسیار پائین رسوب محیط کشت سیب‌زمینی، نمونه‌ای برای آزمون XRD تهیه نشده است. در آنالیز نمونه‌ها نیز از اشعه X با طول موج $1/54182$ انگستروم و محدوده 2θ بین ۲۰ تا ۸۰ درجه استفاده شده است.



شکل ۶. نمونه دست نخورده آماده شده در قالب و آماده انتقال به قالب اصلی دستگاه برش مستقیم
Fig. 6. Intact sample prepared in the mold and ready to transfer to the main mold of the direct cutting machine

۴-۵- آزمون طیف‌نگاری تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پر قدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی به کار می‌رود. همچنین این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی استفاده می‌شود، زیرا طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده بوده و دارای تعداد زیادی نقاط بیشینه و کمینه هستند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ای به کار گرفته شوند. به منظور شناخت بهتر ترکیبات موجود در رسوبات فرآیند میکروبی سوسپانسیون و محلول سیمانتاسیون، نمونه‌هایی از رسوب حاصل از محیط‌های کشت مورد مطالعه تهیه و آزمون FTIR انجام شده است. نتایج این آزمون برای محیط‌های کشت Yeast، Nutrient Broth، Extract و ملاس چغندر قند به ترتیب در شکل‌های ۱۵ تا ۱۷ آورده شده است.

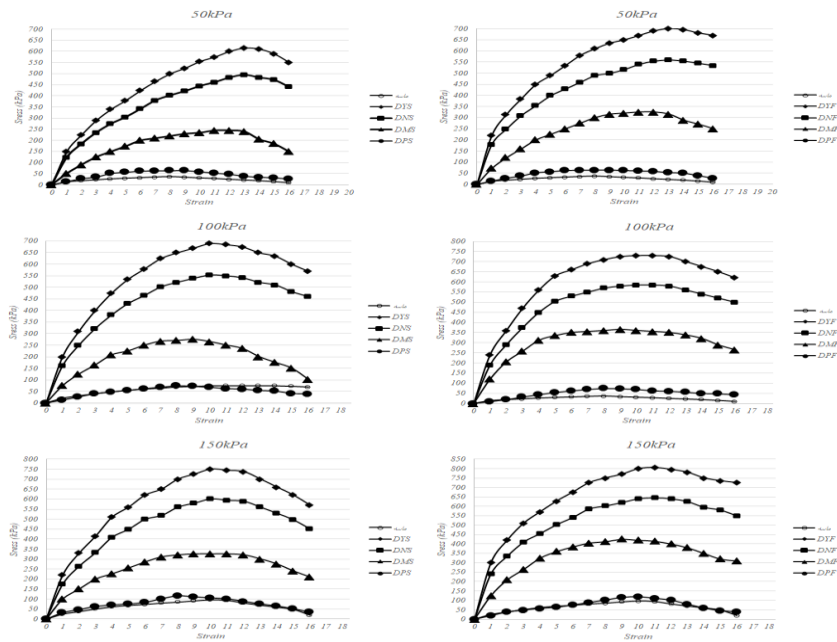
۴-۶- آزمون شیمی تر

شیمی تجزیه شاخه‌ای از دانش بنیادین شیمی است که به

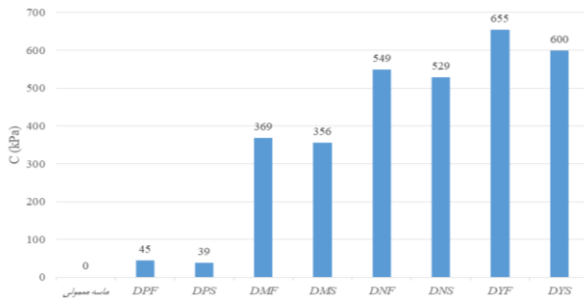
نمونه بهسازی شده، از آزمون استاندارد هدایت هیدرولیکی (ASTM-D5084) استفاده شده است [۳۱]. شکل ۱۰ تأثیر بهسازی به روش میکروبی در چهار محیط کشت مختلف را بر میزان نفوذپذیری نمونه‌های بهسازی شده مختلف نمایش می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نفوذپذیری تمام نمونه‌ها به دلیل تشکیل رسوب کریستال‌های کلسیم، به طور نسبی کاهش یافته است.

۴-۴- آزمون پراش اشعه ایکس (XRD)

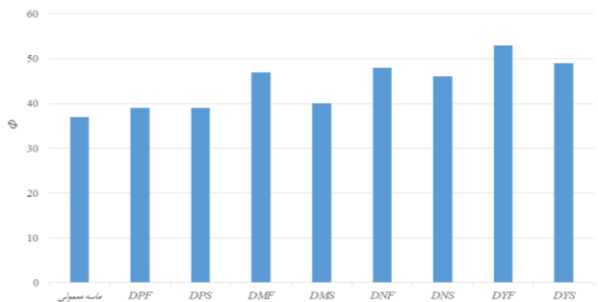
به طور کلی در پراش اشعه ایکس به کریستال، شدت اشعه ایکس بازتابیده از کریستال، که در هر اتم به صورت الاستیک و بدون تغییر طول موج پراکنده شده‌اند، در زوایای خاصی بیشینه است و در باقی‌مانده زوایا، شدت اشعه پراشیده شده مقدار قابل ملاحظه‌ای ندارد. اطلاعات به دست آمده از پراش یک کریستال شامل زاویه قله‌ها، شدت نسبی قله‌ها و همچنین پهنای هر قله می‌باشد. به این منظور و مطابق با شکل ۱۱، محیط کشت مایع داخل پتری و هم



شکل ۷. تغییرات تنش برشی - کرنش در نمونه‌های بهسازی شده به دو روش مختلف ورود باکتری و محیط‌های کشت چهارگانه
 Fig. 7. Shear-strain stress changes in samples improved by two different methods of bacterial entry and quadruple culture media



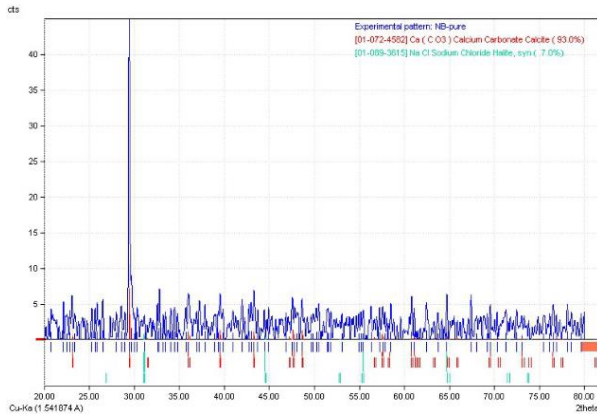
شکل ۹. تغییرات چسبندگی ماسه معمولی در مقایسه با سایر نمونه‌های بهسازی شده به روش MICP در چهار محیط کشت
 Fig. 9. Changes in the adhesion of ordinary sand compared to other samples improved by MICP method in four culture media



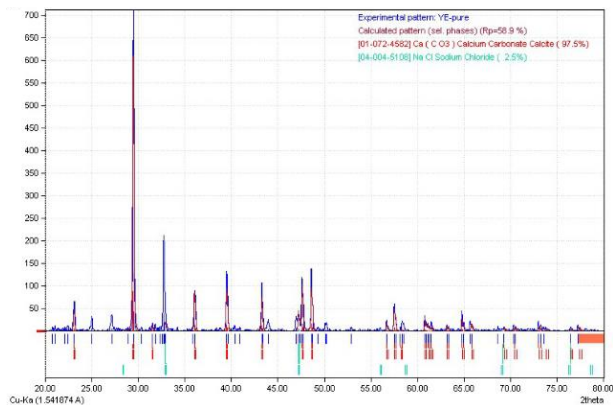
شکل ۸. تغییرات زاویه اصطکاک داخلی ماسه معمولی در مقایسه با سایر نمونه‌های بهسازی شده به روش MICP در چهار محیط کشت
 Fig. 8. Changes in the internal friction angle of ordinary sand compared to other samples improved by MICP method in four media

تعیین می‌شود. روش‌های تجزیه به دو دسته روش‌های کلاسیک و روش‌های دستگامی تقسیم می‌شوند. روش‌های کلاسیک که به روش‌های شیمی تر هم شهرت دارند از ابزار یا سامانه‌های سنجش چندان پیشرفته‌ای بهره نمی‌برند. اصلی‌ترین انواع روش‌های کلاسیک روش‌های وزن‌سنجی و روش‌های تیتراسیون هستند. در پژوهش حاضر برای تعیین میزان رسوب کربنات کلسیم، از روش تیتراسیون استفاده شده است.

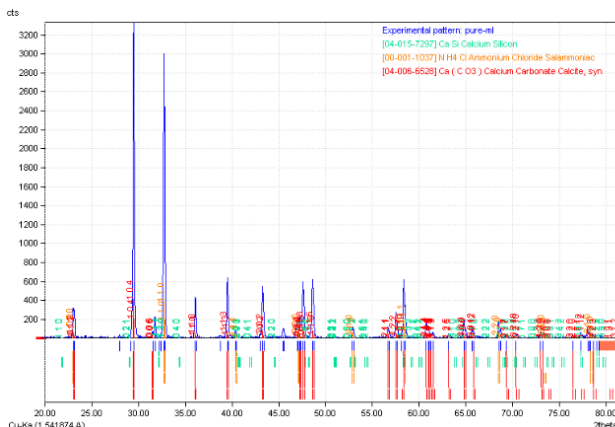
مطالعه روش‌های جداسازی، شناسایی و بررسی کمی اجزای طبیعی یا مصنوعی یک ماده می‌پردازد. انواع آنالیز و تجزیه و تحلیل که در این دانش به کار گرفته می‌شوند در یک نگاه کلی به دو دسته کمی و کیفی تقسیم می‌شوند. در تجزیه کیفی نوع اجزای موجود در نمونه تعیین می‌شود و در تجزیه کمی مقدار یا غلظت هر یک از این اجزا تعیین می‌شود. در حالت کلی آنالیز کیفی بر آنالیز کمی تقدم دارد در واقع ابتدا نوع اجزا و سپس مقادیر کمی آن‌ها



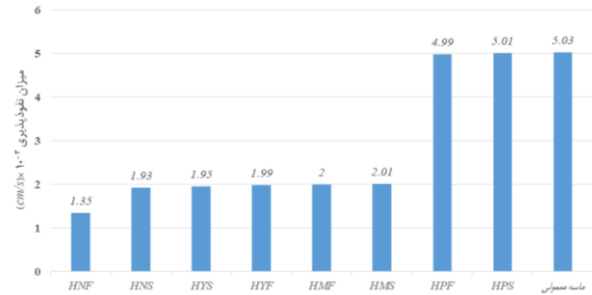
شکل ۱۲. نمودار XRD رسوب حاصل از محیط کشت Nutrient Broth
Fig. 12. XRD diagram of sediment from Nutrient Broth culture medium



شکل ۱۳. دیاگرام XRD رسوب حاصل از محیط کشت Yeast Extract
Fig. 13. XRD diagram of sediment from Yeast Extract medium



شکل ۱۴. دیاگرام XRD رسوب حاصل از محیط کشت Molasses
Fig. 14. XRD diagram of sediment from Molasse medium



شکل ۱۰. میزان نفوذپذیری ماسه معمولی در مقایسه با سایر نمونه‌های بهسازی شده به روش MICP در چهار محیط کشت مختلف

Fig. 10. Permeability of ordinary sand in comparison with other samples improved by MICP method in four different culture media



شکل ۱۱. رسوبات ته‌نشین شده جهت ارائه نمونه آزمون XRD
Fig. 11. Deposited sediments to present the XRD test sample

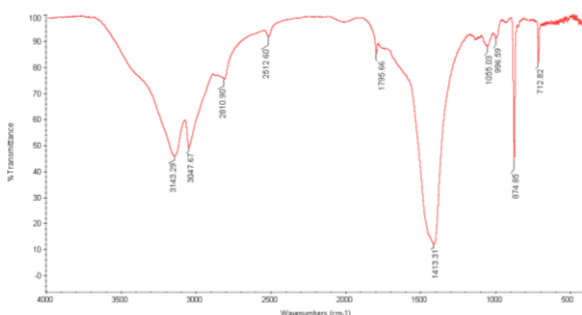
۴-۷- تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌نگاری پراش انرژی پرتو ایکس و تحلیل پراش اشعه ایکس به منظور تحلیل بهتر نمونه‌ها، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌نگاری پراش انرژی پرتو ایکس انجام شده است. شکل ۱۸ نمایشی از تصاویر SEM و نمودار EDS مربوط به رسوبات ناشی از چهار نوع محیط کشت مختلف است.

۵- تحلیل و بررسی نتایج

اثبات کارایی استفاده از روش‌های زیستی در کنار آزمون‌هایی مانند مقاومت برشی تک‌محوری، نفوذپذیری و برش مستقیم، نیازمند نتایجی همسو از سایر آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی است که می‌توان با استفاده از آن‌ها به جزئیات سازوکار بین دانه‌های خاک پس از ترسیب کربنات کلسیم پی برد.

۵-۱- آزمون FTIR

برای شناسایی کیفی یک نمونه مجهول، نوع گروه‌های عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های آن، ابتدا طیف مادون قرمز نمونه را رسم نموده و سپس با استفاده از جداول مربوط، طول موج یا



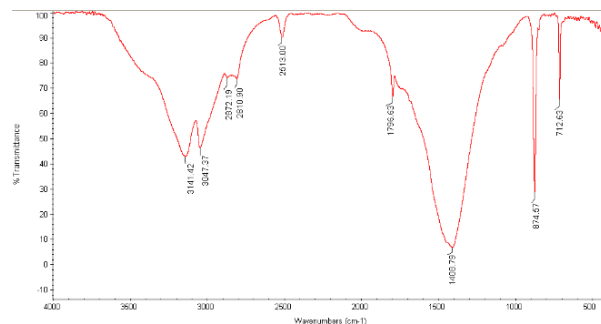
شکل ۱۷. طول موج‌های FTIR حاصل از رسوب ناشی از محیط کشت Molasses

Fig. 17. FTIR wavelengths from sediment from Molasse medium

3145 cm^{-1} و 3047 cm^{-1} مربوط به ارتعاش متقارن پیوند CH از حلقه کینولین آروماتیک است. ارتعاشات کششی C-H آلیفاتیک نیز در طول موج 2810 cm^{-1} به صورت قله ظاهر شده است. قله 2508 cm^{-1} نیز مربوط به ارتعاش متقارن C-H در گروه‌های متیل می‌باشد. ارتعاش واضحی نیز در 1712 cm^{-1} ظاهر شده که مربوط به ارتعاش پیوند N-H در گروه NH_2 است. برآورد و تفسیر رسوبات ناشی از محیط کشت ملاس، نشان از باند جذبی 3143 cm^{-1} و 3047 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-H در حلقه آروماتیک دارد؛ به این معنا که گروه آروماتیک در ترکیبات هستند. این پیوند، باند جذبی در 2810 cm^{-1} را نیز شامل می‌شود. ارتعاش با شدت کم نیز در 2512 cm^{-1} ، مربوط به گروه کربنات است. دو باند جذبی باریک در 1712 cm^{-1} و 874 cm^{-1} نیز در طیف وجود دارند که نشانه بارزی از وجود گروه کربنات کلسیم می‌باشد (دو پیک مورد نظر مربوط به پیوندهای C-O و C=O هستند). با توجه به تفسیرهای انجام شده، ترکیبات کربنات کلسیم، به صورت واضح در پیک‌های آزمون FTIR مشاهده می‌شوند. به خصوص این‌که در مورد رسوبات محیط کشت ملاس چغندر قند، وجود کریستال‌های کربنات کلسیم مورد تأیید قرار گرفتند.

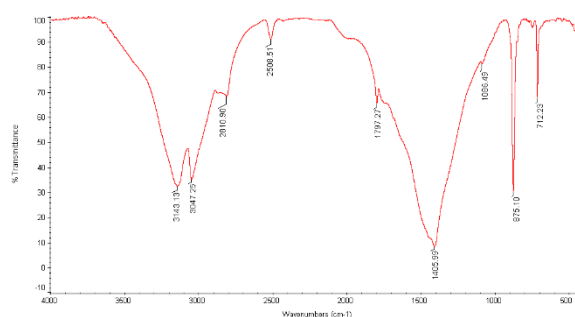
۵-۲- آزمون XRD و شیمی تر

پیک‌های برگرفته شده از تفسیر داده‌های XRD در دو نمونه حاصل از محیط کشت Nutrient Broth و Yeast Extract به ترتیب نشان از ترسیب ۹۳٪ و ۹۷/۵٪ از کریستال کربنات کلسیم و مابقی کلرید سدیم دارد. همچنین رسوب کربنات کلسیم در تفسیر



شکل ۱۵. طول موج‌های FTIR حاصل از رسوب ناشی از محیط کشت Yeast Extract

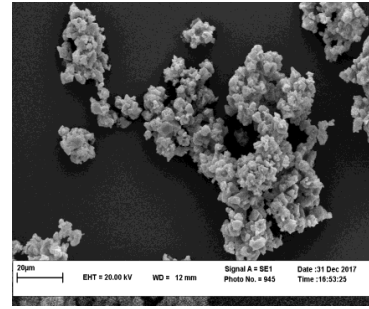
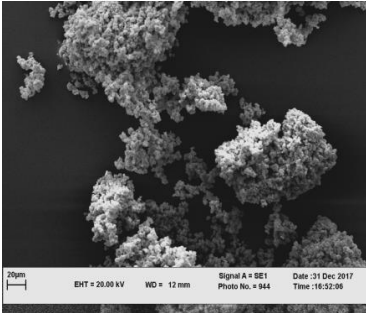
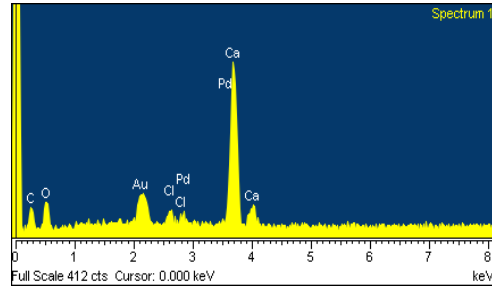
Fig. 15. FTIR wavelengths from sediment from Yeast Extract medium



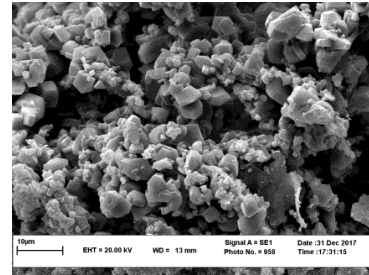
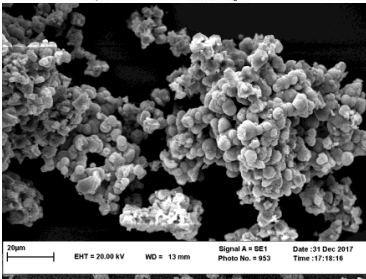
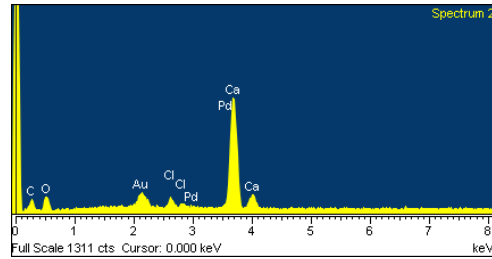
شکل ۱۶. طول موج‌های FTIR حاصل از رسوب ناشی از محیط کشت Nutrient Broth

Fig. 16. FTIR wavelengths from sediment from Nutrient Broth medium

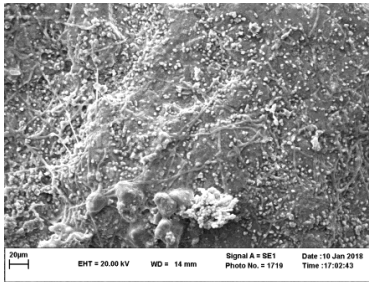
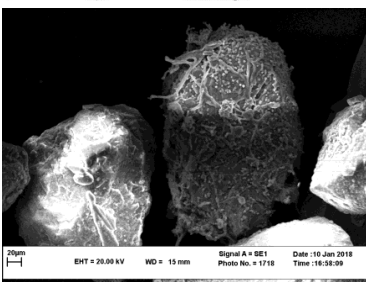
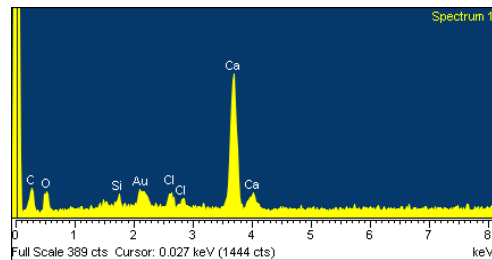
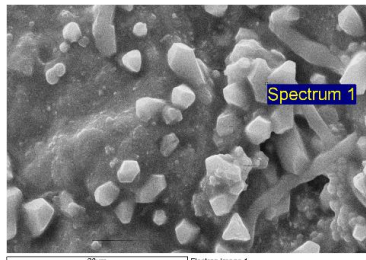
عدد موج گروه‌ها و پیوندها، شناسایی می‌شوند. در مورد رسوب ناشی از محیط کشت Nutrient Broth، پیک‌های جذبی در طول موج‌های 3141 cm^{-1} و 3047 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی C-H در حلقه کینولین هستند. دو پیک کوچک رخ داده در طول موج‌های 2810 cm^{-1} و 2872 cm^{-1} ، مربوط به ارتعاشات کششی متقارن CH_2 می‌باشند. باند مشاهده شده در 2513 cm^{-1} ، مربوط به ارتعاش ترکیب کربنات کلسیم بوده که این ترکیب در پیک 874 cm^{-1} نیز تکرار شده است. پیک 1796 cm^{-1} به ارتعاش گروه کربونیل استر (COOR) مرتبط است. پهن‌ترین پیک موجود نیز مربوط به ارتعاشات قیچی‌وار گروه CH_2 است. طول موج 1712 cm^{-1} نیز ارتعاش پیوند C-H در ترکیبات آروماتیک را نمایش می‌دهد. مشابه رسوبات ناشی از محیط کشت Nutrient Broth، رسوبات محیط کشت مایع عصاره مخمر (Yeast Extract) نیز دارای پیک‌های تقریباً متناظر هستند. دو پیک



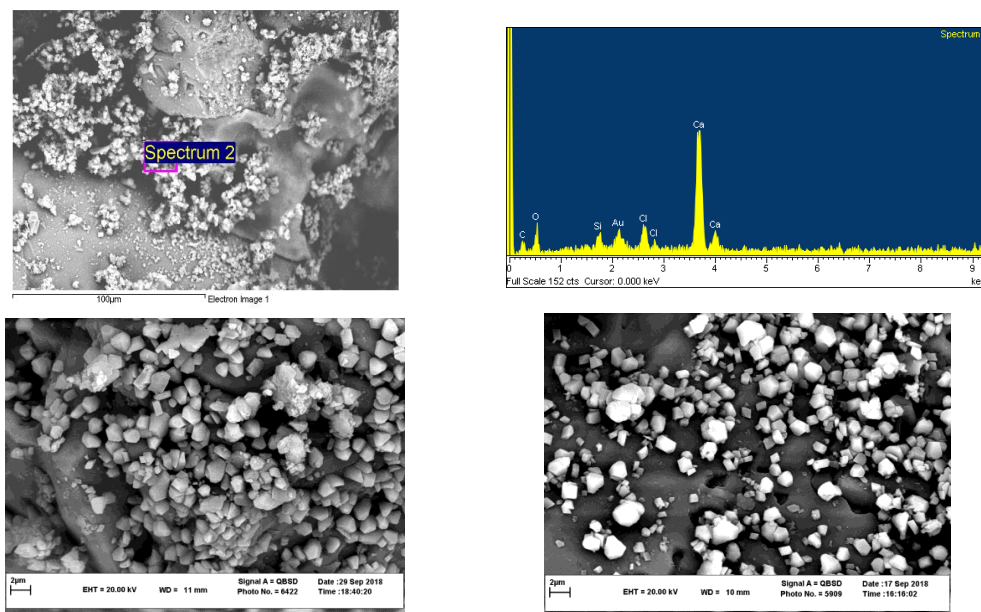
(الف) تصاویر SEM و نمودار EDS مربوط به رسوبات ناشی از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت NB



(ب) تصاویر SEM و نمودار EDS مربوط به رسوبات ناشی از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت YE



(پ) تصاویر SEM و نمودار EDS مربوط به رسوبات ناشی از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت PDB



(ت) تصاویر SEM و نمودار EDS مربوط به رسوبات ناشی از باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت M

شکل ۱۸. تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف نگاری پراش پرتو ایکس از رسوبات ناشی از چهار نوع محیط کشت

Fig. 18. Scanning electron microscopy and X-ray diffraction spectroscopy of sediments from the four types of culture medium discussed

به راحتی بین ذرات گیر افتاده و فقط افزایش نرخ جریانات تزریق می‌تواند به افزایش مسافت تحرک آن در طول نمونه کمک کند و بالعکس، کاهش نرخ جریان و یا دانسیته سوسپانسیون تزریقی سبب محبوس شدن باکتری در ابتدای مسیر حرکت خود می‌شود [۳۳]. در فرآیند رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم، در جایی که مواد سیمانتاسیون به محلول باکتریایی (باکتری) برسند، فرآیند شروع به انجام می‌کند، در نتیجه برای بهسازی عمیق تر و مؤثرتر، باید به دو مورد توجه داشت، اول اینکه باکتری باید به اعماق بیشتری برسد؛ حرکت باکتری در بین دانه‌ها، با افزایش نرخ جریان سریع تر و راحت تر خواهد بود. دوم اینکه با شروع فرآیند القایی، نفوذپذیری کاهش و حرکت جریان باکتریایی و یا محلول سیمانتاسیون ضعیف خواهد شد. از این رو، نحوه پخش شدن به خصوص در محیط‌های غیراشباع، به شدت نامنظم، تابع سرعت تزریق و نحوه ورود باکتری خاک است. در روش اختلاط فلوکه باکتری، با توجه به اینکه نمونه تا حد امکان همگن و نشست باکتری در تمام نقاط همسان است، همگنی در طول مسیر جریان بیشتر است. گرچه در مورد روش اختلاط نیز، با تزریق محلول سیمانتاسیون، فیلم‌های زیستی و رسوبات کربنات کلسیم به سرعت در اطراف نقطه تزریق تشکیل شده و رسوب در اطراف نقطه

داده‌های رسوب حاصل از محیط کشت ملاس چغندر قند نیز ملاحظه می‌شود.

استفاده از گونه‌های اوره‌آز مثبت باکتری، سبب آزادسازی کلسیت و بسته شدن شبکه‌های خلل و فرج خاک و ترک سنگ‌ها می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان کربنات کلسیم تولید شده، حاصل از فرآیند زیستی، آزمون شیمی تر بر روی نمونه‌های مختلف انجام گرفت. میزان بلورهای ترسیب شده در دو محیط کشت Nutrient Yeast extract و Broth، به لحاظ درصد جرمی، کمی بالاتر از بلورهای ترسیب شده توسط باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت حاوی ملاس بوده است، که بالاتر بودن میزان اوره‌آزی در محیط‌های دیگر دلیل ترسیب بیشتر آن است [۱۹]. با اندازه‌گیری میزان کربنات کلسیم در نقاط مختلف یک نمونه استوانه‌ای، برای چهار نوع محیط کشت، بیشترین درصد وزنی ترسیب، حدود ۹/۹٪ و برای محیط کشت Yeast Extract بود. در مقطع مشخص برای نمونه‌ای که با استفاده از محیط کشت ملاس چغندر قند بهسازی شده بود، ۶/۸٪ رسوب کربنات کلسیم رخ داد. همچنین میزان رسوب در نقطه تزریق نسبت به سایر نقاط بیشتر و با افزایش فاصله از آن کاهش می‌یابد [۳۲]. در واقع گونه باکتری *Sporosarcina Pasteurii*،

تزریق محلول سیمان‌تاسیون بیشتر شده است. با این وجود، نمونه‌های همگن‌تری به لحاظ میزان ترسیب در کل نمونه، از روش اختلاط نسبت به روش تزریق سوسپانسیون (تزریق دوفازی) به دست آمده است. به هر ترتیب، چالش رسیدن به توزیع مناسب رسوب حین فرآیند بهسازی زیستی، همواره در مسیر این روش برقرار بوده است [۳۴]. برخی پژوهشگران، ایجاد جریان چرخشی برای رسوب همگن را پیشنهاد می‌کنند [۳۵].

۳-۵- آزمون نفوذپذیری

کاهش نفوذپذیری پس از بهسازی، از مهم‌ترین نتایج مشترک بین پژوهش‌هایی است که آزمون نفوذپذیری پس از بهسازی میکروبی در آنها، انجام پذیرفته است [۳۶-۳۹]. پیشتر نیز اشاره شد که کاهش نفوذپذیری به واسطه ترسیب کربنات کلسیم بین ذرات است و بدیهی است هرچه تراکم و میزان ترسیب بیشتر باشد، اثر کاهش نفوذپذیری بهتر دیده می‌شود. از طرفی دیگر، کم بودن میزان ترسیب در نمونه‌های ساخته شده از محیط کشت عصاره سیب‌زمینی، تغییر چندانی در میزان نفوذپذیری ایجاد نکرده است. همچنین، نمونه‌های HN و HY دارای نفوذپذیری تقریباً یکسانی هستند که این موضوع با توجه به نتایج نزدیک به دست آمده از آزمون‌های مقاومتی نیز توجیه‌پذیر است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، میزان نفوذپذیری در نمونه‌های HM که حاصل از محیط کشت مایع عصاره چغندر قند (ملاس) است، به نمونه‌های دارای محیط کشت شیمیایی Nutrient Yeast Extract و Broth نزدیک است.

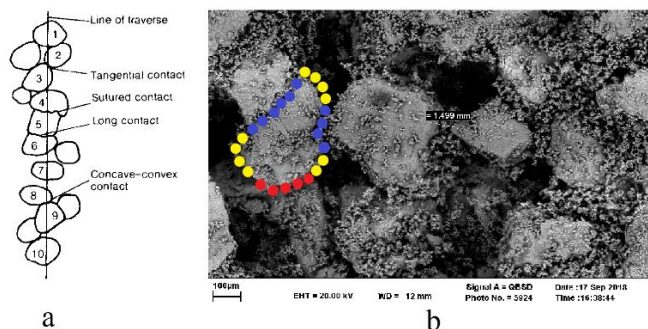
۴-۵- آزمون مقاومت فشاری محدود نشده

استفاده از روش‌های بهسازی میکروبی، در مورد ساختار خاک‌های دانه‌ای مانند ماسه که فاقد چسبندگی هستند، مقاومت فشاری محدود نشده آن‌ها را به صورت چشم‌گیری افزایش می‌دهد [۴۰-۴۲].

میزان بهبود پارامترهای ژئوتکنیکی پس از بهسازی بیولوژیکی وابسته به عوامل مختلفی مانند دانه‌بندی، وضعیت دما، نحوه ورود باکتری و همچنین سایر موارد محیطی دیگر مانند وجود یا عدم وجود عامل تأثیرگذار بر عملکرد ترسیب میکروبی داخل نمونه خاک، مانند انواع آلاینده‌های خاک است، اما تحلیل نمودارهای حاصل از دو روش بهسازی، روش ورود باکتری به خاک که فقط تفاوت در محیط

کشت باکتری رسوب‌زا است، نشان‌دهنده تأثیر بسزای محیط کشت به خصوص منبع تولید کربن می‌باشد؛ تا جایی که مقاومت تک‌محوری نمونه‌های حاصل از باکتری رشد یافته در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی، به میزان ۵٪ از مقاومت نمونه‌های حاصل از باکتری رشد یافته در محیط کشت عصاره مخمر نیز نمی‌رسند. از طرفی دیگر، پاسخ منبع تولید کربن ارزان قیمت ملاس چغندر قند، پس از ترسیب، مقاومتی تا حدود ۶۵٪ ترسیب باکتری‌های رشد یافته در محیط کشت عصاره مخمر بوده که نشان از کارآمد بودن این محیط کشت دارد. نکته قابل اشاره این است که محیط ملاس چغندر قند در نمودارهای نشان داده شده در شکل ۴ و همچنین آزمون‌های تکرار شده، در هر دو روش ورود باکتری، مقاومت‌های تک‌محوره یکسان را نشان می‌دهد. می‌توان دلیل این موضوع را کم بودن سرعت فرآیند شروع ترسیب در باکتری‌های رشد یافته در محیط ملاس چغندر قند دانست. چراکه پس از تزریق دو فازی، به دلیل عدم نفوذ مناسب باکتری در عمق‌های دورتر از نقطه ترسیب، بهسازی میکروبی انجام نشده و ضمن به وجود آمدن نمونه ناهمسان، معمولاً مقاومت نمونه‌های ساخته شده، نسبت به نمونه‌های روش اختلاط فلوکه کمتر است. با توجه به اینکه، تزریق در نمونه‌ها سبب گرفتگی سطوح آن می‌شود، معمولاً یکنواختی توزیع باکتری و تولید کربنات کلسیم ناهمسان است [۴۳]. به همین جهت در صورتی که سوسپانسیون باکتری فلوکه شده و محلول سوسپانسیون باهم در یک ظرف ریخته شوند، فرآیند انعقاد یا پلاگ^۱ شدن رخ می‌دهد؛ اگر این فرآیند، اختلاط فلوکه باکتری و سوسپانسیون بدون وجود و حضور خاک، برای هر دو نمونه عصاره مخمر و ملاس چغندر قند صورت پذیرد، مشاهده می‌شود که پلاگ در ظرف حاوی باکتری رشد یافته از ملاس بسیار دیرتر از ظرف حاوی سوسپانسیون فلوکه باکتری رشد یافته از عصاره مخمر رخ خواهد داد. بنابراین در مورد عصاره مخمر، پس از تزریق سوسپانسیون، فرآیند ترسیب سریع‌تر رخ داده، قسمت‌های بالایی و نزدیک‌تر به نقطه تزریق دارای باندهای اتصال کربنات کلسیم بیشتر و قوی‌تر بوده و سهم قسمت‌های دورتر کمتر و در نتیجه نمونه ناهمگن و مقاومت کمتر را نسب به نمونه‌های مخلوط شده با فلوکه باکتری از خود نشان می‌دهد. به عنوان یک نتیجه‌گیری و با مقایسه مقادیر مقاومت‌های تک‌محوره به دست آمده، مشخصاً می‌توان نمونه‌های بدست آمده

1 Plugging



شکل ۱۹. مفهوم تراکم بسته بندی، الف. تعریف انواع تماس بین دانه ها و خط گذرنده برای به دست آوردن PD و ب. تصویر SEM با آشکارساز QBSD برای محاسبه PD در خاک بهسازی شده با استفاده از محیط کشت ملاس چغندر قند

Fig. 19. Concept of packing density, a. Defining the types of contacts between grains and the passing line to obtain PD and b. SEM image with QBSD detector to calculate PD in soil improved using sugar beet molasses medium

شوند. مقدار GC برای ماسه بهسازی شده در محیط کشت حاوی ملاس چغندر قند ۵۸٪ است. جهت مقایسه، ماسه Waterstones در انگلستان دارای مقادیر PD و GC به ترتیب ۷۹٪ و ۵۸٪ و ماسه Coina Sand در پرتغال، ۶۲٪ و ۴/۵٪ می باشند [۴۴]. محاسبات مذکور نشان از مقایسه درست و بجای ماسه بهسازی شده با ماسه سنگ ها و تحلیل رفتاری مشابه آن ها می دهد.

۵-۵- آزمون برش مستقیم

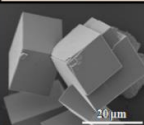
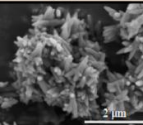
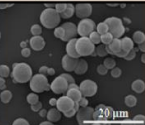
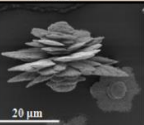
همان طور که پیشتر اشاره شد، خاک های ماسه ای فاقد چسبندگی بوده و زاویه اصطکاک داخلی آن در شرایط بهسازی نشده، ۳۷ درجه است. محققین به صورت مشترک، افزایش پارامترهای مقاومت برشی خاک را پس از بهسازی زیستی تأیید می کنند [۴۸-۵۱].

فرآیند آزمون برش مستقیم به نحوی است که با اعمال سطح برش اجباری بر نمونه، در قسمت های مختلف برش خورده آن، سه حالت مختلف پدید می آید؛ حالت اول، برش از محل تماس دانه ماسه بر روی دانه ماسه، حالت دوم، برش از محل شکست بلورهای کربنات کلسیم و حالت سوم جداشدگی دانه ماسه از بلور کربنات کلسیم. در واقع بهترین حالت مقاومتی، شکست دانه ماسه حین برش است که به دلیل تفاوت مقاومتی دانه و محیط کربنات کلسیم، محقق نمی شود. در مواد مرکب که از بیش از یک کانی تشکیل شده اند، تغییرات و شکل پذیری مواد، به سهم هر کدام از کانی ها، نحوه قرارگیری و شکل آن ها بستگی دارد

از سه محیط کشت Nutrient Broth، Yeast Extract و ملاس چغندر قند را در رده ماسه سنگ های ضعیف در نظر گرفت [۴۴]. اندازه گیری تأثیر کانی شناسی و ساختار بر میزان مقاومت و شکل پذیری ماسه سنگ ها بسیار مشکل است [۴۵]. با استفاده از تکنیک های میکروسکوپی، می توان برخی ویژگی های ساختاری میکروسکوپی ماسه سنگ ها را با یکدیگر مقایسه نمود. چگالی یا تراکم بسته بندی (PD) و درصد تماس دانه ها (GC) از همین ویژگی های ساختاری میکروسکوپی می باشند [۴۴]. کن [۴۶] تراکم بسته بندی را نسبت مجموع طول های تماس بین دانه ها، که یک خط مستقیم، از روی محل های اتصال آن می گذرد، به طول خط مستقیم گذرنده تعریف می کند؛ انواع تماس بین دانه ها نیز توسط پتی جان و همکاران تعریف شده اند [۴۷]. درصد تماس بین دانه ها یا GC نیز، برای هر دانه تعریف شده و طبق تعریف نسبت مجموع طول های اتصال یک دانه به دانه های مجاور، به محیط آن دانه است. شکل ۱۹ مفهوم تراکم بسته بندی را نمایش می دهد. GC و PD بر حسب درصد و برای یک تصویر با حداقل ۱۰۰ دانه، برای کلیه دانه ها محاسبه و میانگین گیری می شود؛ باید دقت نمود، هنگام تهیه تصویر، برای اندازه گیری PD باید از آشکارساز الکترونی القایی پشت سرهم (QBSD) استفاده کرد [۴۴]. به همین منظور تراکم بسته بندی برای نمونه حاصل از محیط کشت ملاس چغندر قند محاسبه شده است.

در دانه مشخص شده در شکل ۱۹، برای محاسبه PD، طول اتصال های امتداد نقاط آبی رنگ، که یکی از انواع اتصال طولانی (long contact)، مشابه اتصال دانه ۵ و ۶ در شکل ۱۹- الف، و دیگری اتصال محدب- مقعر (concave - convex contact)، مشابه اتصال ۸ و ۹ در شکل ۱۹- الف، برای تمام دانه ها منقطع شده توسط خط گذرنده به طول ۱/۵ میلی متر با یکدیگر جمع و بر طول کل خط تقسیم می شوند. محاسبه میانگین PD برای امتداد مسیرهای دانه های متصل شده به یکدیگر در یک تصویر مشتمل بر حداقل ۱۰۰ دانه خاک، عدد ۵۲٪ را نشان می دهد. همچنین برای محاسبه GC هر دانه، به عنوان مثال برای دانه مشخص شده در شکل ۱۹- ب، باید مجموع طول اتصال نقاط آبی و قرمز به یکدیگر بخش بر محیط دانه، مجموع طول اتصال نقاط آبی، قرمز و زرد به یکدیگر محاسبه

- 1 Packing Density
- 2 Grain Contact
- 3 Quadrant Back-Scattered electron Detector

	Cubic	Rod	Sphere	Flower
CaCO ₃ shapes				
A	2-20 μm	2.1-3 μm	0.2-5 μm	20-100 μm
B	Calcite (β-CaCO ₃)	Aragonite (α-CaCO ₃)	Vaterite (γ-CaCO ₃)	Vaterite (γ-CaCO ₃)
C	Rhomboedric	Orthorhombic	Hexagonal	Hexagonal

شکل ۲۰. شکل عمومی بلورهای کربنات کلسیم (A). قطر ذرات، B. فاز کریستالی و C. سیستم کریستالی

Fig. 20. General shape of calcium carbonate crystals (A. particle diameter, B. crystalline phase and C. crystal system)

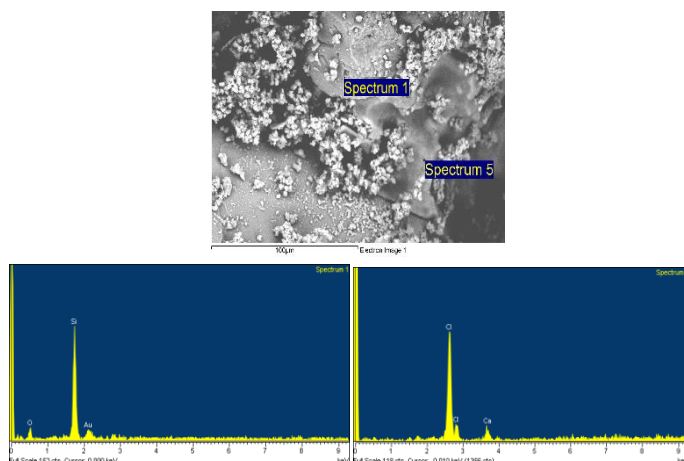
در مورد سه محیط کشت دیگر، تبلور کریستال‌های کربنات کلسیم به صورت مکعبی و یا تیز گوشه آراگونیت است. با توجه به پایداری ترمودینامیکی بیشتر آراگونیت نسبت به واتریت، زمان تشکیل بلور نسبت واتریت کمتر است. در واقع تشکیل بلورهای آراگونیت به زمان بیشتری برای تشکیل نیاز دارد و از طرفی دیگر طبق پژوهش‌ها، وجود برخی مواد مازاد حین تشکیل بلور کربنات کلسیم می‌تواند در شکل‌گیری پلیمر آراگونیت مؤثر باشد؛ به عنوان مثال سان و همکاران [۵۸] به این نتیجه رسیدند که وجود کاتیون Mg^{2+} به عنوان افزودنی در نسبت‌های بالای آن (نسبت به کاتیون Ca^{2+}) می‌تواند سبب تشکیل کریستال با پلیمورفولوژی آراگونیت نسبت به کلسیت در دمای اتاق شود. از آنجایی که از $MnSO_4$ به عنوان افزودنی برای اسپوردهی بهتر استفاده شده، وجود کاتیون Mn^{2+} در کنار SO_4^{2-} می‌تواند سبب تشکیل آراگونیت شوند [۵۹]. از دیگر عوامل تأثیرگذار بر نوع و میزان هر کدام از پلیمرهای کربنات کلسیم، میزان محدودشدگی^۱ آن‌هاست [۶۰]. زنگ و همکاران [۵۹] تشکیل آراگونیت را در شرایط یکسان برای فضای محدود نشده و سه مدل فضای محدود شده ۲۵ نانومتر، ۱۰۰ نانومتر و ۲۰۰ نانومتر بررسی کردند تا جایی که درصد تشکیل آراگونیت در فضای محدود نشده، ۷٪ از کل فضا و برای فضاهای محدود شده تا ۱۰۰٪ بلورهای تشکیل شده از نوع آراگونیت بود. در مقابل، معمولاً پلیمورفولوژی آراگونیت بسته به مقدار pH و درجه حرارت در عرض یک روز شروع به تغییر شکل به کلسیت می‌نماید [۶۱ و ۶۲]. به همین دلیل نیز مورفولوژی آراگونیت و کلسیت در سایر رسوب‌ها با هم دیده می‌شوند. به طور کلی شکل‌گیری متراکم و پر حجم رسوبات کربنات کلسیم در باکتری‌های مورد کشت در محیط Yeast Extract و Nutrient Broth می‌تواند یکی از دلایل بیشتر بودن مقاومت نمونه‌های ساخته شده در آزمون‌های مقاومتی نیز باشد.

[۴۵]. کوپ و اتکینسون [۵۲] دریافتند که در مواد سیمانته شده، مهم‌ترین عامل، کاهش حجم مخصوص در نتیجه افزایش تعداد ذرات ریزدانه است. این موضوع به شدت بر میزان مقاومت بیشینه (مقاومت پیک) و همچنین نمودارهای تنش-کرنش تأثیرگذار است. بنابراین آن‌چه بر افزایش بیشتر میزان مقاومت برشی کمک می‌کند، افزایش مقاومت اتصال دانه و بلورهای رسوبین کربنات کلسیم است. هرچه ترسیب بلور متراکم‌تر و حجیم‌تر باشد، میزان پارامترهای مقاومت برشی خاک بیشتر افزایش می‌یابد.

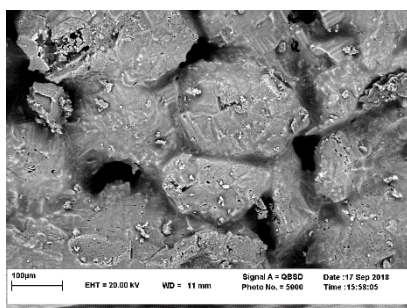
۵-۶- تحلیل تصاویر SEM و EDS

بر مبنای پژوهش‌های کاستا و همکاران [۵۳]، شکل ۲۰ کریستال‌های کربنات کلسیم را نشان می‌دهد.

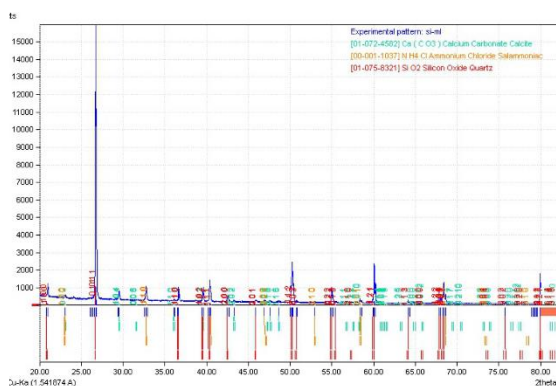
CaCO₃ دارای سه فرم کریستالی واتریت، آراگونیت و کلسیت است که به لحاظ ترمودینامیکی پایداری کلسیت بیشتر از آراگونیت و همه آن‌ها بیشتر از واتریت می‌باشد [۵۴]. در واقع فرم‌گیری کریستال کربنات کلسیم و شروع حیات زیستی آن به شدت تابع ترکیبات آلی نیتروژنی آن‌ها است [۵۵]. عملاً افزودنی‌ها حین تشکیل کریستالوگرافی، تأثیر بسزایی در پلیمورفولوژی دارد [۵۶]. شکل عمومی کریستال‌های ناشی از رسوبات محیط کشت Yeast Extract به صورت کروی با فاز کریستالی واتریت و سیستم هگزائگونال است. فرم کریستالی واتریت نسبت به فرم‌های دیگر، معمولاً نایاب‌تر است، در حالی که کلسیت و آراگونیت، معمولاً در سنگ‌ها یا مواد بیومعدنی دیده می‌شوند. رشد کریستال‌های واتریت نه به صورت استاتیک، که به صورت کاملاً پویا است و به گونه‌ای شبکه‌وار، از یک نقطه شروع به تبلور به چند جهت می‌نماید. این نحوه رشد کمکی در تحلیل چرایی بهتر بودن پاسخ محیط کشت عصاره مخمر نسبت به سایر محیط‌ها در آزمون‌های مقاومتی است. البته طبق مشاهدات رسوبات محیط کشت عصاره مخمر، در کنار فاز واتریت، کریستال‌های کلسیت مکعب نیز وجود دارد. ال توادی و رویش [۵۷] شکل‌گیری اسپیرولیت‌های (مارپیچ) کلسیت را با استفاده از باکتری‌های اوره‌آز در یک فرآیند بهسازی میکروبی بررسی کردند. آن‌ها پیش‌بینی کردند که در ابتدا، کریستال‌های واتریت شکل کروی شکل گرفتند، اما به تدریج تجزیه و پس از نه ساعت به کلسیت شش وجهی تبدیل شدند، که به شکل کروی کره‌های واتریت اولیه تبدیل می‌شدند [۵۷].



شکل ۲۱. آنالیز EDS مربوط به قرارگیری پوسته کلریدی، کریستال‌های کربنات کلسیم و دانه سیلیسی ماسه
Fig. 21. EDS analysis of chloride crust, calcium carbonate crystals, and silica sand grains



شکل ۲۲. شکل پوسته کلریدی بر روی دانه‌های ماسه
Fig. 22. Chloride crust shape on sand grains



شکل ۲۳. نمودار XRD نمونه ماسه بهسازی شده در رسوب باکتری کشت شده در ملاس چغندر قند
Fig. 23. XRD diagram of improved sand samples in bacterial sediment cultured in sugar beet molasses

بحث در قسمت ۳-۲، خاک آلوده شده به ۶ درصد جرمی گازوئیل، بهسازی با روش دوفازی و اختلاط فلوکه انجام شد؛ با تکرار آزمون

حال آن که در نمونه ساخته شده از عصاره سیب‌زمینی، پراکندگی بیش از اندازه، سبب بی‌اثر بودن فرآیند بهسازی زیستی شده است. شکل ۱۷- پ دارای نمایی از رویه یک دانه ماسه است، که ذرات کربنات کلسیم بر روی آن به صورت بسیار پراکنده قرار گرفته‌اند. در مورد محیط کشت ملاس چغندر قند شکل‌گیری کربنات کلسیم به تراکم دو محیط کشت دیگر نمی‌رسد، با این حال میزان آن بسیار بیشتر نسبت به رسوبات محیط کشت عصاره سیب‌زمینی است. همچنین پوسته کلریدی سبب چسبندگی دانه‌های ماسه‌ای به یکدیگر شده است. شکل ۲۱ نمایی از آنالیز EDS بر روی پوسته کلریدی را نشان می‌دهد که بر روی آن، کریستال‌های کلسیتی قرار گرفته و دانه‌های سیلیسی به هم متصل شده است. مطابق با شکل ۲۲، پوسته کلریدی در بخشی از نقاط نمونه، تنها عامل اتصال بین ذرات خاک است.

با استفاده از نمودار XRD در شکل ۲۳، نمونه ماسه بهسازی شده در رسوب باکتری کشت شده در ملاس چغندر قند، علاوه بر کوارتز، کربنات کلسیم و آمونیوم کلرید مشاهده شده که می‌توان گفت همان پوسته کلریدی است.

۶- انجام فرآیند بهسازی با استفاده از روش‌های زیستی با منبع کربن ملاس چغندر قند در بهسازی خاک‌های آلوده به گازوئیل

با استناد به نتایج بیان شده می‌توان از ملاس به عنوان جایگزینی مناسب برای تأمین منبع کربن استفاده کرد. بر اساس روش‌های مورد

جدول ۶. مقایسه نتایج آزمون برش مستقیم در نمونه های سالم و آلوده به گازوئیل، قبل و پس از بهسازی رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم

Table 6. Comparison of direct cutting results in healthy and diesel-contaminated samples, before and after improvement of induced microbial deposition of calcium carbonate

ϕ	C (kPa)	نوع نمونه
۳۶	۰	ماسه تمیز
۳۲	۲۵	ماسه آلوده شده به ۶٪ جرمی گازوئیل
۳۵۶	۴۰	ماسه تمیز بهسازی شده به روش تزریق دو فازی
۳۶۹	۴۷	ماسه تمیز بهسازی شده به روش اختلاط با فلوکه باکتری
۱۰۰	۳۶	ماسه آلوده به گازوئیل بهسازی شده به روش تزریق دو فازی
۲۹۵	۴۰	ماسه آلوده به گازوئیل بهسازی شده به روش اختلاط با فلوکه باکتری

کارآمد بودن محیط کشت ملاس چغندر قند است. می توان نتایج این پژوهش را بصورت خلاصه ارائه نمود:

- استفاده از فلوکه باکتری، به عنوان تسریع دهنده و بهبود دهنده فرآیند بهسازی زیستی می تواند نقش بسزایی داشته باشد.
- با وجود رشد باکتری در محیط های کشت چهارگانه مورد بحث، شامل Nutrient Broth، Yeast Extract، عصاره سیب زمینی و ملاس چغندر قند ترسیب پس از تزریق محلول سیمانتاسیون در نمونه کشت شده در عصاره سیب زمینی مشاهده نشد.

- نتایج XRD و آنالیزهای FTIR نشان از وجود کربنات کلسیم در رسوب های خالص جمع آوری شده پس از انجام فرآیند MICP دارد؛ تا جایی که در آنالیز FTIR، باندهای 712 cm^{-1} و 874 cm^{-1} و 2512 cm^{-1} که نشان از ترکیبات کربنات کلسیم است ملاحظه شد.
- تحلیل نتایج شیمی تر، اثبات وجود ترکیبات کربنات کلسیم، بیشتر در نقاط ابتدایی تزریق است و هرچه از بالا به پایین و یا از محیط به مرکز نمونه ها نزدیک می شود، مقدار رسوب کمتر است.

- سرعت فرآیند رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم در محیط های کشت ملاس چغندر قند از محیط های کشت مرسوم دیگر کمتر است.

- با مقایسه معیارهای GC و PD نمونه های بهسازی شده با استفاده رسوب باکتری های کشت شده در محیط کشت ملاس چغندر قند، با ماسه سنگ ها می توان این نمونه ها را در رده "ماسه سنگ های ضعیف" دسته بندی کرد. شکل عمومی کریستال های ناشی از رسوبات محیط کشت Yeast Extract به صورت کروی با فاز کریستالی و اثریت و سیستم هگزاگونال است. در مورد سه محیط کشت دیگر،

مقاومت فشاری تک محوری با روش نامه مندرج در قسمت ۱-۴ (آزمون تک محوری)، مقاومت بیشینه برای خاک های آلوده بهسازی شده به روش تزریق دوفازی، معادل ۳۱۲ کیلو پاسکال و در روش اختلاط فلوکه، ۴۹۰ کیلو پاسکال بدست آمد. در واقع، آلاینده گازوئیلی در عملکرد رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم تأثیر منفی گذاشته و سبب کاهش تأثیر گذاری شده است؛ به نحوی در هر دو روش اختلاط فلوکه و تزریق دوفازی، در خاک سالم، عملکرد رسوب میکروبی القایی کربنات کلسیم باعث افزایش مقاومت تک محوری تا حدود ۷۹۰ کیلو پاسکال شده بود. همچنین با تکرار آزمون برش مستقیم طبق روش نامه مندرج در قسمت ۲-۴ (آزمون برش مستقیم)، جدول ۶ پارامترهای برش مستقیم، برای ماسه تمیز، ماسه آلوده شده، ماسه های تمیز بهسازی شده به دو روش زیستی، و در نهایت پارامترهای برش مستقیم برای ماسه های آلوده شده به گازوئیل و بهسازی شده به دو روش اختلاط فلوکه و تزریق دوفازی، را نمایش می دهد.

۷- نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر، حصول اطمینان از استفاده ملاس به عنوان یک منبع کربنی مطمئن برای ایجاد شرایط رشد و نمو باکتری Sporosarcina Pasturii جهت ترسیب، حین فرآیند آزادسازی یون کاتیون پوسته باکتری در واکنش با محلول سیمانتاسیون است. نتایج آزمون های XRD، FTIR، SEM و EDS وجود ترسیب کربنات کلسیم در کریستال های تشکیل شده را تأیید کرده و از طرفی، آزمون های مکانیک خاک کلاسیک نیز به عنوان یکی از مهم ترین ابزارها، برای ارزیابی موفقیت فرآیند ترسیب میکروبی نیز صحتی بر

- Advances in Materials Science and Engineering, 2017 (2017).
- [6] K. Todar, Nutrition and growth of bacteria, (2013).
- [7] J.M. Martinko, M.T. Madigan, Brock biology of microorganisms, International Microbiology, 2(8) (2005).
- [8] H. Rong, C.X. Qian, L.Z. Li, Influence of molding process on mechanical properties of sandstone cemented by microbe cement, Construction and Building Materials, 1(28) (2012) 243-238.
- [9] L. Cheng, R. Cord-Ruwisch, In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation, Ecological Engineering, 42 (2012) 72-64.
- [10] M.B. Burbank, T.J. Weaver, T.L. Green, B.C. Williams, R.L. Crawford, Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soils, Geomicrobiology Journal, 4(28) (2011) 312-301.
- [11] L.A. van Paassen, R. Ghose, T.J. van der Linden, W.R. van der Star, M.C. van Loosdrecht, Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogROUT experiment, Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering, 12(136) (2010) 1728-1721.
- [12] Q. Zhao, L. Li, C. Li, M. Li, F. Amini, H. Zhang, Factors affecting improvement of engineering properties of MICP-treated soil catalyzed by bacteria and urease, Journal of Materials in Civil Engineering, 12(26) (2014) 04014094.
- [13] K. Feng, B.M. Montoya, Influence of confinement and cementation level on the behavior of microbial-induced calcite precipitated sands under monotonic drained loading, Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 1(142) (2015) 04015057.
- [14] V.S. Whiffin, Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement Doctoral dissertation, Murdoch University, (2004).
- [15] M.Y. Jung, B.S. Park, J. Lee, M.K. Oh, Engineered Enterobacter aerogenes for efficient utilization of sugarcane molasses in 2, 3-butanediol production, Bioresource technology, 139 (2013) 27-21.
- [16] R. Boopathy, J. Manning, C.F. Kulpa, A laboratory study of the bioremediation of 2, 4, 6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor, تبلور کریستال‌های کربنات‌کلسیم به صورت مکعبی و یا تیز گوشه آراگونیت است.
- با توجه به اینکه امروزه یکی از رایج‌ترین مسائل ژئوتکنیکی آلودگی خاک‌ها به هیدروکربن‌ها است، با استفاده از ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن در روش رسوب القایی کربنات‌کلسیم، با روشی سازگار با محیط‌زیست نه تنها خاک را بهسازی نموده، بلکه خواص مکانیکی آن بهبود بخشید.
- امید است تا با روش‌های بهینه سازی محیط کشت، صنعتی شدن این روش برای بهسازی و استفاده از سایر مزایای روش ترسیب میکروبی کربنات‌کلسیم در برنامه پژوهش‌های بعدی قرار گیرد. بطور خلاصه، با استفاده از نتایج این پژوهش می‌توان با روش اختلاط فلوک باکتری با خاک، نسبت به بهسازی بهتر، سریع‌تر و مؤثرتر آن امیدوار بود. همچنین با وجود بدست آمدن نتایج بهتر در آزمون‌های مقاومتی ژئوتکنیکی از محیط‌های کشت Nutrient Broth و Yeast Extract، اما با توجه به ارزش اقتصادی بسیار پایین‌تر ملاس بخصوص در کشور ایران، این منبع کربنی می‌تواند هزینه‌های تولید مواد باکتریایی را تا حدودی کاهش داده و تجاری‌سازی روش بهسازی میکروبی را توجیه‌پذیر و در مقیاس صنعتی عملیاتی نماید.

مراجع

- [1] V. Ivanov, J. Chu, Applications of microorganisms to geotechnical engineering for biologging and biocementation of soil in situ, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2(7) (2008) 153-139.
- [2] S. Stocks-Fischer, J.K. Galinat, S.S. Bang, Microbiological precipitation of CaCO₃, Soil Biology and Biochemistry, 11(31) (1999) 1571-1563.
- [3] H.L. Ehrlich, Microbes and metals, Applied Microbiology and Biotechnology, 6(48) (1997) 692-687.
- [4] L. Cheng, M.A. Shahin, D. Mujah, Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization, Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, -1-04016083(143 11-04016083) (2016).
- [5] G. Xu, Y. Tang, J. Lian, Y. Yan, D. Fu, Mineralization Process of Biocemented Sand and Impact of Bacteria and Calcium Ions Concentrations on Crystal Morphology,

- Zouari, Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization, *RSC Advances*, 11(8) (2018) 5863-5854.
- [28] H.A. Keykha, A. Asadi, M. Zareian, Environmental factors affecting the compressive strength of microbiologically induced calcite precipitation-treated soil, *Geomicrobiology Journal*, 10(34) (2017) 894-889.
- [29] L. Cheng, M.A. Shahin, Stabilisation of oil-contaminated soils using microbially induced calcite crystals by bacterial flocs, *Géotechnique Letters*, (2017) 6-1.
- [30] ASTM-D2166, American Society for Testing and Materials D2166 (1999) Standard test method for unconfined compressive strength of cohesive soils. Annual Books of ASTM Standards., (1999).
- [31] ASTM-D5084, 16a Standard Test Methods for Measurement of Hydraulic Conductivity of Saturated Porous Materials Using a Flexible Wall Permeameter.
- [32] M.G. Gomez, C.M. Graddy, J.T. DeJong, D.C. Nelson, M. Tsesarsky, Stimulation of Native Microorganisms for Biocementation in Samples Recovered from Field-Scale Treatment Depths, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 1(144) (2017) 04017098.
- [33] D.J. Tobler, M.O. Cuthbert, V.R. Phoenix, Transport of *Sporosarcina pasteurii* in sandstone and its significance for subsurface engineering technologies, *Applied geochemistry*, 42 (2014) 44-38.
- [34] T.J. Weaver, M. Burbank, A. Lewis, R. Lewis, R. Crawford, B. Williams, Bio-induced calcite, iron, and manganese precipitation for geotechnical engineering applications, *Advances in Geotechnical Engineering* (2011) 3983-3975.
- [35] M.P. Harkes, L.A. Van Paassen, J.L. Booster, V.S. Whiffin, M.C. van Loosdrecht, Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement, *Ecological Engineering*, 2(36) (2010) 117-112.
- [36] L. Cheng, R. Cord-Ruwisch, M.A. Shahin, Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation, *Canadian Geotechnical Journal*, 1(50) (2013) 90-81.
- Water environment research, 1(70) (1998) 86-80.
- [17] Y. Fujita, J.L. Taylor, T.L. Gresham, M.E. Delwiche, F.S. Colwell, T.L. McLing, R.W. Smith, Stimulation of microbial urea hydrolysis in groundwater to enhance calcite precipitation, *Environmental science & technology*, 8(42) (2008) 3032-3025.
- [18] A.B. Cunningham, R.R. Sharp, R. Hiebert, G. James, Subsurface biofilm barriers for the containment and remediation of contaminated groundwater, *Bioremediation Journal*, 4(3)7) (2003) 164-151.
- [19] L. Cheng, M.A. Shahin, R. Cord-Ruwisch, Surface percolation for soil improvement by biocementation utilizing In Situ enriched Indigenous aerobic and anaerobic ureolytic soil microorganisms, *Geomicrobiology journal*, 6(34) (2017) 556-546.
- [20] D. Gat, Z. Ronen, M. Tsesarsky, Long-term sustainability of microbial-induced CaCO₃ precipitation in aqueous media, *Chemosphere*, 531-524(184) (2017).
- [21] S.L. Williams, M.J. Kirisits, R.D. Ferron, Optimization of growth medium for *Sporosarcina pasteurii* in bio-based cement pastes to mitigate delay in hydration kinetics, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 4(43) (2016) 575-567.
- [22] S.A. Nasehi, A. Uromeihy, M.R. Nikudel, A. Morsali, Influence of gas oil contamination on geotechnical properties of fine and coarse-grained soils, *Geotechnical and Geological Engineering*, 1(34) (2016) 345-333.
- [23] H. Ghasemzadeh, M. Tabaiyan, The effect of diesel fuel pollution on the efficiency of soil stabilization method, *Geotechnical and Geological Engineering*, 1(35) (2017) 484-475.
- [24] M. Al-Aghbari, R. Dutta, Y. Mohamedzeini, Effect of diesel and gasoline on the properties of sands—a comparative study, *International Journal of Geotechnical Engineering*, 1(5) (2011) 68-61.
- [25] ASTM-D63-422, e2 Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils (Withdrawn 2016), (2007).
- [26] J. Stevens, Unified soil classification system. *Civil Engineering, ASCE*, 12(52) (1982) 62-61.
- [27] S. Bibi, M. Oualha, M.Y. Ashfaq, M.T. Suleiman, N.

- [49] M. Azadi, M. Ghayoomi, N. Shamskia, H. Kalantari, Physical and mechanical properties of reconstructed bio-cemented sand, *Soils and Foundations*, 5(57) (2017) -698 706.
- [50] C.W. Chou, E.A. Seagren, A.H. Aydilek, M. Lai, Biocalcification of sand through ureolysis, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 12(137) (2011) 1189-1179.
- [51] H. Canakci, W. Sidik, I.H. Kilic, Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil, *Soils and Foundations*, 5(55) (2015) 1221-1211.
- [52] M.R. Coop, J.H. Atkinson, The mechanics of cemented carbonate sands, *Geotechnique*, 1(43) (1993) 67-53.
- [53] L.M.M. Costa, G.M. Olyveira, R. Salomão, Precipitated Calcium Carbonate Nano-Microparticles: Applications in Drug Delivery, *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*, 2(3) (2017) 00059.
- [54] L.N. Plummer, E. Busenberg, The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO₂-H₂O solutions between 0 and 90 C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO₃-CO₂-H₂O, *Geochimica et cosmochimica acta*, 6(46) (1982) 1040-1011.
- [55] H. Lu, H. Lutz, S.J. Roeters, M.A. Hood, A. Schäfer, R. Muñoz-Espí, R. Berger, M. Bonn, T. Weidner, Calcium-Induced Molecular Rearrangement of Peptide Folds Enables Biomineralization of Vaterite Calcium Carbonate, *Journal of the American Chemical Society*, 8(140) (2018) 2796-2793.
- [56] N. Nassif, N. Gehrke, N. Pinna, N. Shirshova, K. Tauer, M. Antonietti, H. Cölfen, Synthesis of stable aragonite superstructures by a biomimetic crystallization pathway, *Angewandte Chemie International Edition*, 37(44) (2005) 6009-6004.
- [57] S. Al-Thawadi, R. Cord-Ruwisch, Calcium carbonate crystals formation by ureolytic bacteria isolated from Australian soil and sludge, *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 1(2) (2012) 26-12.
- [58] W. Sun, S. Jayaraman, W. Chen, K.A. Persson, G. Ceder, Nucleation of metastable aragonite CaCO₃ in seawater, [37] J. Chu, V. Ivanov, V. Stabnikov, B. Li, Microbial method for construction of an aquaculture pond in sand, (2013).
- [38] N. Jiang, K. Soga, The applicability of microbially induced calcite precipitation (MICP) for internal erosion control in gravel-sand mixtures, (2016).
- [39] J. Chu, V. Stabnikov, V. Ivanov, Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil, *Geomicrobiology Journal*, 6(29) (2012) 549-544.
- [40] S.G. Choi, J. Chu, R.C. Brown, K. Wang, Z. Wen, Sustainable Biocement Production via Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation: Use of Limestone and Acetic Acid Derived from Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(5) (2017) 5190-5183.
- [41] E. Salifu, E. MacLachlan, K.R. Iyer, C.W. Knapp, A. Tarantino, Application of microbially induced calcite precipitation in erosion mitigation and stabilisation of sandy soil foreshore slopes: a preliminary investigation, *Engineering Geology*, 201 (2016) 105-96.
- [42] M. Mirmohammad sadeghi, A.R. Modarresnia, F. Shafiei, Parameters effects evaluation of microbial strengthening of sandy soils in mixing experiments using taguchi methodology, *Geomicrobiology Journal*, 5(32) (2015) 465-453.
- [43] F. Kalantary, M. Kahani, Optimization of the biological soil improvement procedure, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10-1 (2018).
- [44] L. Dobereiner, M.D. Freitas, Geotechnical properties of weak sandstones, *Geotechnique*, 1(36) (1986) 94-79.
- [45] C.G. Dyke, L. Dobereiner, Evaluating the strength and deformability of sandstones, (1991).
- [46] J.S. Kahn, The analysis and distribution of the properties of packing in sand-size sediments: 1. On the measurement of packing in sandstones, *The journal of Geology*, 4(64) (1956) 395-385.
- [47] F.J. Pettijohn, P.E. Potter, R. Siever, *Sand and Sandstone* Springer, New York, NY, 1972.
- [48] A. Cheshomi, S. Mansouri, M.A. Amoozegar, Improving the Shear Strength of Quartz Sand using the Microbial Method, *Geomicrobiology Journal*, (2018) 8-1.

- 34)115) (2018) 8471-8469.
- [61] A. Richter, D. Petzold, H. Hofmann, B. Ullrich, Production, properties and application of calcium carbonate powders. 3. Investigations to the transition of vaterite and aragonite in aqueous systems, *Chemische Technik*, 5)48) (1996) 275-271.
- [62] G.T. Zhou, Y.F. Zheng, Chemical synthesis of CaCO₃ minerals at low temperatures and implication for mechanism of polymorphic transition, *Neues Jahrbuch für Mineralogie-Abhandlungen*, (2001) 343-323.
- Proceedings of the National Academy of Sciences, (2015) 201423898.
- [59] M. Zeng, Y.Y. Kim, C. Anduix-Canto, C. Frontera, D. Laundry, N. Kapur, H.K. Christenson, F.C. Meldrum, Confinement generates single-crystal aragonite rods at room temperature, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 30)115) (2018) 7675-7670.
- [60] Y. Xu, N.A. Sommerdijk, Aragonite formation in confinements: A step toward understanding polymorph control, *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

چگونه به این مقاله ارجاع دهیم

M.T. Bolouri Bazaz, J. Bolouri Bazaz, S.M. Karrabi, *Analyzing the Use of Molasses as an Alternate and Optimal Culture Medium in MICP Process of Sandy Soils*, *Amirkabir J. Civil Eng.*, 53(7) (2021) 3029-3050.

DOI: [10.22060/ceej.2020.17631.6630](https://doi.org/10.22060/ceej.2020.17631.6630)

