

ارزیابی بهسازی زیستی خاک‌های آلوده به روغن موتور

محمدتقی بلوری بزاز^۱، جعفر بلوری بزاز*^۲

^۱ دانشجوی دکتری عمران ژئوتکنیک، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۲ دانشیار، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد

(دریافت: ۹۷/۷/۱۵، پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۲، نشر آنلاین: ۹۸/۱۰/۲۲)

چکیده

مشکلات محیط زیستی ناشی از انتشار آلاینده‌ها در خاک، علاوه بر پیامدهای زیست‌محیطی، تغییرات فراوانی در خواص فیزیکی، شیمیایی و پارامترهای ژئوتکنیکی خاک را به وجود می‌آورد. از این رو استفاده از روشی مناسب برای بهسازی خاک‌های آلوده همواره مدنظر بوده است؛ به گونه‌ای که در دهه اخیر و در پی افزایش تحقیقات در مورد استفاده از روش‌های مختلف زیستی در بهسازی (Improvement) و بهیالایی (Purification) خاک‌ها، از روش رسوب میکروبی کلسیم کربنات (MICP) در حل بسیاری از مشکلات ژئوتکنیکی بهره برده شده است. به همین منظور در این پژوهش، یک نوع خاک ماسه‌ای پس از اختلاط با یک نوع آلاینده هیدروکربنی (روغن موتور) مخلوط و پس از انجام برخی آزمون‌های مکانیک خاک کلاسیک (تراکم، برش مستقیم، تک‌محوری و نفوذپذیری) فرآیند بهسازی به دو روش استفاده از محلول باکتری (تزیق دو مرحله‌ای) و اختلاط فلوک باکتری (Bacterial Flocs) با تزیق محلول سیمان‌تاسیون (Cementation) انجام و نتایج بهسازی گزارش شده است. استفاده از آنالیز شیمی تر، SEM (Scanning Electron Microscopy) و EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) نیز جهت تائید و تفسیر بهتر نتایج آمده است.

کلیدواژه‌ها: بهسازی زیستی، رسوب کلسیم کربنات، خاک‌های آلوده، تزیق و فلوک باکتری.

۱- مقدمه

به‌طور کلی، خاک آلوده به خاکی اطلاق می‌شود که مشخصه‌های اصلی آن به‌واسطه تهاجم نوعی از آلودگی، تحت تأثیر قرار گرفته باشد (Construction, ۱۹۹۷). در حالت کلی، فلزات سنگین، اسیدهای قلیایی، محلول‌های خورنده، آلودگی‌های ناشی از مشتقات نفتی، سموم ناشی از دفن زباله‌ها و بسیاری از آلاینده‌های دیگر، سبب تأثیر بر بافت‌های میکروسکوپی و نهایتاً تغییر در ساختار و ویژگی‌های ساختار اصلی و بزرگ‌مقیاس خاک می‌شوند (Yu و Liu, ۲۰۱۷). آلودگی خاک به‌واسطه انتشار گازوئیل در محیط می‌تواند بر خواص فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی آن تأثیرگذار باشد (Nasehi و همکاران، ۲۰۱۶). هم‌چنین عوامل گوناگونی می‌توانند باعث بروز انتشار روغن و فرآورده‌های نفتی باشند؛ تانکرهای حمل مواد سوختی فرسوده، کارخانه‌های استفاده‌کننده از این نوع سوخت، خط لوله‌های انتقال دارای نشت (Patel و Udiwal, ۲۰۱۰) و نشت روغن‌های معدنی روان‌کننده و دیزل‌ها در محل پمپ‌های تأمین‌کننده سوخت (Nespeca و همکاران، ۲۰۱۸). بر مبنای همین مشکلات، تحقیقات فراوانی در بررسی اثرات مهندسی این انتشار بر پارامترهای ژئوتکنیکی خاک

انجام شده است (Ebadi و Kermani, ۲۰۱۲؛ Khamchian و همکاران، ۲۰۰۷؛ Khosravi و همکاران، ۲۰۱۳؛ Puri, ۲۰۰۰؛ Puri, ۲۰۰۰؛ Al-Sanad و همکاران، ۱۹۹۵). اغلب پژوهش‌ها نیز، کاهش پارامترهای مقاومتی خاک، مانند زاویه اصطکاک داخلی را گزارش داده‌اند (Al-Sanad و همکاران، ۱۹۹۵؛ Ghaly, ۲۰۰۱؛ Das و Evgin, ۱۹۹۲؛ Shin و همکاران، ۲۰۰۲؛ Ratnaweera و Meegoda, ۲۰۰۵).

یکی از مهم‌ترین پیامدهای خطرناک آلودگی خاک‌ها، تغییر پارامترهای ژئوتکنیکی آن‌ها است که ناشی از انتشار آلاینده‌های نفتی و مشتقات آن می‌باشد. بنابراین باید با استفاده از روشی مناسب و سازگار با محیط‌زیست بهسازی خاک‌های آلوده‌شده، موردنظر قرار گیرند. روش‌های بهسازی خاک‌های آلوده را می‌توان به شرح زیر بیان نمود:

بهسازی به‌روش شیمیایی مانند استفاده از سیمان (Kogbara, ۲۰۱۳؛ Akinwumi و همکاران، ۲۰۱۶؛ Estabragh و همکاران، ۲۰۱۷)، آهک (Ghasemzadeh و Tabaiyan, ۲۰۱۷؛ Ghobadi و همکاران، ۲۰۱۴)، روباره خاکستر (George و همکاران، ۲۰۱۵) و یا روباره کوره سیمان (Nasr, ۲۰۱۴)؛ بهسازی به‌روش

* نویسنده مسئول؛ شماره تماس: ۹۱۵-۵۱۶۴۲۱۰

تعداد دفعات تزریق محلول سیمانتاسیون سبب افزایش مقاومت تک‌محوره خاک ماسه‌ای شده است (Cheng و Shahin, ۲۰۱۷). با توجه به این که در علوم حاضر، پیشرفت‌ها به سمت استفاده از منابع انرژی بدون کربن یا کم‌کربن رفته است (Simpson و Tatsuoaka, ۲۰۰۸)، ابداع و بهینه‌سازی روش‌های سازگارتر با محیط‌زیست الزامی است. روش‌های زیستی، از این حیث که با موجود زنده سر و کار دارند، دارای حساسیت خاص خود می‌باشند. بررسی روش‌های زیستی در خاک‌های آلوده به‌عنوان یکی از جدیدترین روش‌های بهسازی از حیث نوع تأثیر آلاینده بر فعالیت باکتری‌ها، میزان رسوب ناشی از فعالیت اوره‌آزی^۱، انجام آزمون‌های دقیق‌تر ژئوتکنیکی و هم‌چنین بررسی آلاینده و تأثیر آن بر فرآیند زیستی، مورد توجه کافی قرار نگرفته است. اهداف و نوآوری‌های این پژوهش را با توجه به ادبیات فنی، به شرح زیر می‌توان بیان نمود:

- بررسی میکروسکوپی دلایل درجه بهسازی خاک‌های آلوده با استناد به نحوه و مکانیزم نشست لایه روغنی بر روی ذرات ماسه و تأثیرپذیری آن پس از ورود محلول باکتری؛
- بررسی دو روش متفاوت برای ورود باکتری به خاک و اصلاح روش‌های قبلی بیان شده در ادبیات فنی.
- استفاده از نتایج آزمون‌های برش مستقیم و نفوذپذیری در تحلیل میزان بهسازی خاک‌های آلوده.
- انجام آزمون طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس جهت تحلیل نوع و میزان رسوبات کلسیم کربنات در کنار تصاویر عکس- برداری الکترونی میکروسکوپی.

۲- مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش، خاک دانه‌ای ماسه‌ای از منطقه فیروزکوه ایران، آلاینده روغنی و سویه باکتری *Sporsarcina Pasteuri* 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 توزیع دانه‌بندی آن در شکل (۱) نشان داده شده است (ASTM-D422-63, ۲۰۰۷).

نانوتکنولوژی و با استفاده از نانو ذرات مواد مانند نانو ذرات آهن (Wang و Huang, ۲۰۱۶) صورت می‌پذیرد. با توجه به فرآیند بین ذرات حین بهسازی، فعالیت ذرات در مقیاس اتمی، بسیار مؤثر بوده و سبب به‌وجود آمدن پیوندهای نانومعدنی بین ذرات انواع کانی‌های موجود در خاک و بهبود خواص مکانیکی آن می‌شود (Bahmani و همکاران, ۲۰۱۶). در توصیف فرآیند بین ذرات، می‌توان این‌گونه شرح داد که با توجه به اندازه نانو ذرات، سطح مخصوص آن‌ها بسیار زیاد بوده و در حضور کانی مناسب، سطح نانو ذره دارای بار الکتریکی زیادتر شده که می‌تواند سبب به‌وجود آمدن پیوندهای قوی بین المان‌ها و بهبود خواص فیزوشیمیایی^۱ و مهندسی خاک شود. (Zhang, ۲۰۰۷) عکس‌برداری الکترونی میکروسکوپی، از نمونه‌های بهسازی شده توسط نانو ذرات، نشان از تغییرات گسترده در بافت خاک پس از تلفیق این ذرات در آن را نشان می‌دهد. نانو ذرات فاصله خالی بین دانه‌ها را پر کرده و به این ترتیب، خواص مکانیکی خاک بهبود می‌یابد (Tabarsa و همکاران, ۲۰۱۸). استفاده از نانوتکنولوژی به‌تنهایی و یا با تلفیقی از روش‌های شیمیایی، سبب بهبود خواص ژئوتکنیکی خاک می‌شود در مورد خاک‌های آلوده به هیدروکربن، استفاده از نانو ذرات آهن خالص و آهک هیدراته مورد پژوهش قرار گرفته است (Nasehi و همکاران, ۲۰۱۶). هم‌چنین در بررسی خاک‌های رسی آلوده به کروسن^۲، استفاده از نانو ذرات رس و نانو ذرات سیلیکا به‌صورت منفرد و یا تلفیقی، باعث افزایش کیفیت پارامترهای ژئوتکنیکی شده است (Zomorodian و همکاران, ۲۰۱۷). نانو ذرات رسی، روشی پایدار برای بهسازی خاک‌ها می‌باشند (Tabarsa و همکاران, ۲۰۱۸).

بهسازی به‌روش زیستی یا بیو^۳ مانند روش ترسیب^۴ میکروبی کلسیم کربنات است. این روش، به‌عنوان یکی از سازگارترین، جدیدترین و مناسب‌ترین روش‌ها برای بهسازی است که با استفاده از پتانسیل‌های موجود بین ذرات خاک و باکتری مناسب، می‌توان از آن بهره برد. استفاده از روش ترسیب میکروبی کلسیم کربنات برای بسیاری از موارد و کاربردهای مهندسی مانند بهسازی مورد استفاده قرار گرفته است (DeJong و همکاران, ۲۰۰۶؛ Whiffin و همکاران, ۲۰۰۷). در سال ۲۰۱۷ و برای اولین بار، استفاده از روش بهسازی میکروبی با استفاده از رسوب کلسیم کربنات، در خاک‌های آلوده شده به نفت مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از فلوک یا ته نشست سوسپانسیون باکتری همراه با تکرار

1. Physicochemical
2. Kerosene
3. Bio
4. Sedimentation
5. Urease

جدول ۲- مشخصات روغن موتور

نقطه اشتعال (درجه سلسیوس)	گرانروی سینماتیک (mm ² /s) [ASTM D 2270:2004]	دمای ۴۰ درجه سلسیوس	دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس	باز [ASTM D1310]
روغن موتور		۱۶۵/۲۳	۱۷/۸۲	۲۱۷

۲-۲- آلاینده

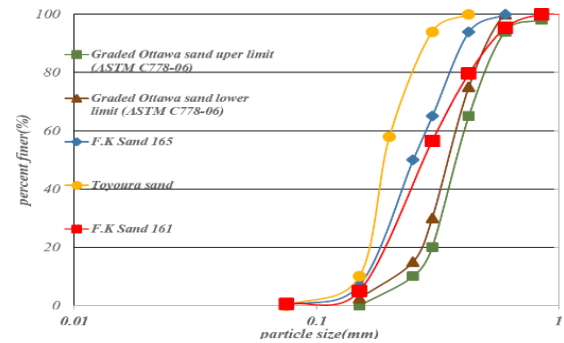
برای آلوده نمودن نمونه‌های مورد آزمایش، از روغن موتور که ویژگی‌های شیمیایی آن‌ها و روش آزمون در جدول (۲) آمده، استفاده شده است.

۳-۲- کشت و رشد سوبه باکتری

سوبه اصلی باکتری با اوره‌آزی بالا مورد استفاده در این تحقیق، دارای نام تجاری Sporsarcina Pasteuri و کد ATCC11859 می‌باشد که از بانک میکروارگانیسم^۶ ایران تهیه شده و برای کشت تازه آن یک محیط کشت جامد تهیه گردید. آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری طی فرآیند مندرج در جدول (۳) آمده است.

جدول ۳- فرآیند آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری

ردیف	فرآیند	توضیحات
۱	تهیه محیط کشت جامد Nutrient Agar و اضافه کردن مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر MnSO ₄	افزودن MnSO ₄ جهت افزایش اسپوردهی ^۷ باکتری انجام شد.
۲	اتوکلاو ^۸ کردن ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت جامد Nutrient Agar	مدت اتوکلاو ۱۵ دقیقه بود.
۳	اضافه کردن اوره ۲۰٪ به محیط کشت از طریق فیلتر کردن	دمای محیط کشت هنگام اضافه کردن اوره به ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید.
۴	ریختن محیط در پلیت ^۹ و کشت باکتری	این فرآیند زیر هود انجام گردید.
۵	قرار دادن پلیت داخل انکوباتور ^{۱۰}	۲۴ ساعت
۶	تهیه و اتوکلاو کردن محیط کشت مایع (۲۰ گرم عصاره مخمر (Yeast Extract)، ۱۷ مولار کلرید آمونیوم (NH ₄ Cl ₂)، ۰/۱ میلی مولار کلرید نیکل (NiCl ₂) و ۲۰ گرم اوره (CO(NH ₂) ₂) در یک لیتر آب مقطر)	مدت اتوکلاو ۱۵ دقیقه بود.
۷	رساندن اسیدیته محیط کشت به pH=9.25 با اضافه کردن (NaOH)	پس از اتوکلاو و رسیدن محیط کشت به دمای ۳۰ درجه انجام شد.
۸	کشت باکتری در محیط مایع و قرار دادن آن در داخل شیکر ^{۱۱} انکوباتور	۴۸ ساعت و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه
۹	بررسی جمعیت باکتری با کمک دستگاه اسپکتوفتومتر ^{۱۲} و استفاده از سوسپانسیون باکتری	در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و زمانی که میزان جذب نوری (دانشسته نوری) باکتری در این طول موج به ۲/۲۵ رسید.



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

جدول ۱- مشخصات فیزیکی ماسه فیروزکوه

Gs	emax	emin	D10(mm)	D60(mm)	Cc	Cu
۲/۶۵۸	۰/۹۴	۰/۶۰	۰/۱۶۷	۰/۴۰	۱/۰۱	۲

رده‌بندی این ماسه بدانه‌بندی شده یا SP (Stevens, ۱۹۸۲) می‌باشد. هم‌چنین مشخصات فیزیکی ماسه فیروزکوه در جدول (۱) آمده است.

۴-۲- روش بهسازی به کمک رسوب کلسیم کربنات

فرآیند بهسازی میکروبی در این پژوهش به دو روش زیر انجام

6. Microorganism
7. Spore formation
8. Autoclave
9. Plate
10. Incubator
11. Shaker
12. Spectrophotometer

شده است:

روش اول: استفاده از فرآیند تزریق دو مرحله‌ای (Whiffin و همکاران، ۲۰۰۷):

در این روش، ورود باکتری به خاک به صورت تزریقی بوده و پس از ورود باکتری، تزریق محلول سیمان‌تاسیون انجام می‌شود (Shahin و Cheng، ۲۰۱۷).

در پژوهش‌های قبل، فرآیند تزریق به صورت گردشی بوده که پس از خروج محلول سوسپانسیون یا سیمان‌تاسیون، مجدداً تزریق انجام شده است. فرآیند تزریق در این پژوهش به شرح زیر است:

۱- تزریق سوسپانسیون باکتری تهیه‌شده، به خاک تزریق شده،
۲- گذر زمان ۲ ساعت جهت تثبیت شدن باکتری بین دانه‌ها و ذرات خاک،

۳- تزریق محلول سیمان‌تاسیون (حاوی یک مولار کلسیم کلرید و اوره در یک لیتر آب مقطر استریل) معادل حجم سوسپانسیون باکتری تزریق شده به خاک در مرحله اول،

۴- تکرار مرحله سوم پس از ۴۸ ساعت تا ۵ نوبت،

۵- باز کردن قالب نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق محلول سیمان‌تاسیون جهت اکسیژن‌دهی.

با توجه به این‌که در این پژوهش، بحث در مورد خاک‌های آلوده بوده و با توجه به ویسکوزیته پائین محلول سوسپانسیون باکتری و سیمان‌تاسیون، اثر گرانش زمین و نیروهای موئینگی (Cheng و Cord-Ruwisch، ۲۰۱۲)، در اثر نفوذ در خاک ماسه‌ای، مقداری از آلاینده‌ها شسته می‌شوند، بنابراین امکان تزریق مجدد مواد خروجی از زیر نمونه خاک پس از تزریق‌ها صحیح نبوده و دلیل آن ایجاد چرخش حرکت آلاینده در خاک می‌باشد. اشاره به این مورد لازم است که روش تزریق نفوذی، در خاک‌های غیراشباع، در عمل مقاومت‌های نهایی بالاتری را نسبت به روش‌های تزریق به-کمک جریان غرق‌آبی و ثابت از خود نشان داده است (Whiffin و همکاران، ۲۰۰۷؛ Van Paassen و همکاران، ۲۰۱۰؛ Omoregie و همکاران، ۲۰۱۷).

روش دوم: بهسازی با استفاده از اختلاط فلوک باکتری (Cheng و Shahin، ۲۰۱۷)

در این روش برای تهیه فلوک باکتری مقدار ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلرید در یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری اضافه شد. کلسیم کلرید باعث تجمع و انعقاد سلول‌های باکتری شده و در نهایت باعث رسوب باکتری‌ها در کف ظرف می‌گردد. پس از ته‌نشست فلوک باکتری، ۸۵٪ سوپرناتانت^{۱۳} رویی حذف گردید (Cheng و Shahin، ۲۰۱۷). بدین ترتیب، سوسپانسیون باکتری

به همراه CaCl_2 ، به صورت لخته و فلوک شده آماده ورود به خاک شدند. اختلاط کلسیم کلرید و سوسپانسیون باکتری سبب شکافت پوسته باکتری و آزادسازی آنزیم‌های اوره‌آز آن می‌شود. با توجه به ویسکوزیته بالا امکان تزریق به روش دوفازی وجود نداشت. عملاً تزریق فلوک باکتری به خاک‌ها، به خصوص در خاک‌ها با نفوذپذیری پائین، باعث به وجود آمدن یک فیلم زیستی (Ivanov و همکاران، ۲۰۱۵) در رویه خاک شده که ضمن بستن راه نفوذ محلول به داخل خاک، پس از تزریق محلول سیمان‌تاسیون عملاً لایه تشکیل شده از کلسیم کربنات در بالای خاک به وجود می‌آید (پوشش زیستی). با توجه به این موارد، بهسازی با استفاده از فلوک باکتری به شرح زیر انجام شد (Cheng و Shahin، ۲۰۱۷):

۱- تهیه فلوک باکتری، با استفاده از ریختن مقدار ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلرید در یک لیتر محیط کشت حاوی باکتری،
۲- حذف ۸۵٪ سوپرناتانت رویی پس از اختلاط،
۳- مخلوط کردن خاک و فلوک باکتری به روش خیساندن،
۴- گذر زمان ۲ ساعت جهت تثبیت شدن باکتری بین دانه‌ها و ذرات خاک،

۵- تزریق محلول سیمان‌تاسیون معادل حجم باکتری فلوک^{۱۴} مخلوط شده با خاک در مرحله اول،

۶- تکرار مرحله سوم پس از ۴۸ ساعت تا ۵ نوبت،

۷- باز کردن قالب نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق محلول سیمان‌تاسیون جهت اکسیژن‌دهی.

سرعت تزریق محلول‌ها، ۷۵ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. بر مبنای پژوهش‌ها، سرعت بالای تزریق سبب حرکت ذرات باکتری از سطح دانه‌ها به سمت اعماق بیشتر نمونه و همگن شدن نمونه‌ها پس از ترسیب می‌گردد (Whiffin و همکاران، ۲۰۰۷). تشکیل سریع بلورهای کلسیم کربنات به خصوص در نقطه تزریق، مانع از انتشار فرآیند تیمار به صورت همگن در سرتاسر نمونه می‌شود (Achal و همکاران، ۲۰۰۹) دلیل دیگر برای تجمع بلورهای کلسیم کربنات در قسمت فوقانی نمونه‌ها، نزدیک بودن آن به محیط دارای اکسیژن است؛ به‌طور مشخص، سلول‌های باکتریایی هوازی در مجاورت اکسیژن نرخ رشد بالاتری را از خود نشان می‌دهند (Zhao و همکاران، ۲۰۱۴). از طرفی در بسیاری از موارد مندرج در ادبیات فنی، فرآیند تزریق به‌کمک پمپ در فرآیند چرخه‌ای بوده که سبب می‌گردد حرکت از بالا به پائین و یا بالعکس، آن قدر تکرار شود تا باکتری‌ها تا حد امکان در نمونه توزیع و فرآیند ترسیب همگن شوند. با توجه به این‌که مشخصات فیزیکی محیط مانند دما تأثیر بسزایی در تولیدات بیومس^{۱۵} دارد (Hamzah و همکاران، ۲۰۱۲)، دمای محیط حین انجام آزمایش ثابت و در دوره نگهداری حدود

13. Supernatant

14. Flocculation

15. Biomass

نیز از حرف N و مطابق با جدول (۴) استفاده شده است. همچنین برای آزمون‌های کلاسیک مکانیک خاک شامل برش مستقیم، تک‌محوره و نفوذپذیری به ترتیب از حروف U، D، H استفاده شده است. تعداد آزمون‌های انجام شده در جدول (۵) گزارش شده است.

جدول ۴- کدگذاری نمونه‌های آماده‌سازی شده خاک مورد آزمایش

نوع آلاینده	بهبودی نداشت	بهبودی با تزریق سوسپانسیون	بهبودی با اختلاط فلوک
%2MN	%2MS	%2MF	
%6MN	%6MS	%6MF	
%12MN	%12MS	%12MF	

جدول ۵- تعداد آزمایش‌ها

ردیف	نام آزمایش	تعداد
۱	تک‌محوره	۹
۲	برش مستقیم	۶
۳	نفوذپذیری	۳
۵	تحلیل به روش شیمی تر	۱۰
۶	تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی	۴

۳- نتایج و بحث

در این قسمت ضمن بیان مسیر انجام آزمون‌ها، نتایج به‌دست‌آمده بررسی و تحلیل شده است.

۳-۱- آزمون تک‌محوری

برای ارزیابی میزان مقاومت فشاری محدود نشده بر اساس آزمون تک‌محوری، نمونه‌های استوانه‌ای با قطر و ارتفاع ۶ و ۱۲ سانتی‌متر و وزن مخصوص ۱۶/۹ کیلونیوتن بر مترمکعب تهیه شدند. بدین منظور، دو عامل و متغیر درصد مایع منفذی نسبت به وزن خاک و روش ورود باکتری به خاک بررسی مورد بحث قرار گرفتند.

۳-۱-۱- درصد مایع منفذی

میزان مایع منفذی، از دیگر عوامل مؤثر بر نحوه و کیفیت رسوبدهی باکتری است. از موارد مورد بحث، درصد مایع منفذی بین فضای خالی دانه‌هاست که با توجه به یکسان در نظر گرفتن میزان تراکم، در مقایسه نمونه‌های مشابه، با درصد‌های مختلف، فضای خالی بین دانه‌ها با مایع مورد نظر پر شده است که این خود به‌تنهایی بر کیفیت پل‌های ایجاد شده به‌واسطه رسوبات کلسیم کربنات تأثیرگذار خواهد بود.

۳-۱-۲- روش ورود باکتری به خاک

دو روش تزریق سوسپانسیون و اختلاط فلوک باکتری، پاسخ ویژه نسبت به بهسازی از خود نشان داده‌اند. پس از تزریق محلول

۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد کنترل شده است (Zhao و همکاران، ۲۰۱۴).

۲-۵- آماده‌سازی نمونه‌ها

برای آماده‌سازی نمونه‌های خاک آلوده، نمونه‌های خاک به مدت ۲۴ ساعت داخل اون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس با درصد‌های مختلف آلاینده مورد نظر مخلوط شدند و (Khamchayan و همکاران، ۲۰۰۷). بیشینه درصد مقدار مواد آلاینده ۱۲٪ وزن خشک خاک اصلی بوده که بر اساس حدود میزان آلاینده‌ها در پروژه‌های گوناگون انتخاب شده است. (Singh و همکاران، ۲۰۰۸). از آنجایی که برخی پژوهش‌گران، به بررسی تأثیر زمان ماندگاری آلاینده در خاک پرداخته‌اند (Zamani و Montoya، ۲۰۱۶) و تغییری در خواص خاک‌های آلوده شده در زمان ۳۰ روزه با زمان‌های ماندگاری بیش‌تر (به‌عنوان مثال ۱۸۰ روز) مشاهده نشده بود، بنابراین نمونه‌ها پس از آماده‌سازی، داخل ظرف به‌صورت سربسته و دمای طبیعی محیط به مدت ۳۰ روز نگهداری شده و به‌صورت ۳ روز یک مرتبه، مجدداً مخلوط شدند. برخی پژوهش‌گران، حداقل زمان مورد نیاز برای رسیدن مخلوط به تعادل بین ذرات خاک و ملکول‌های آلاینده را ۳ تا ۷ روز در نظر گرفته‌اند (Singh و همکاران، ۲۰۰۸). پس از گذشت زمان مورد نظر، با توزین مجدد نمونه‌های آماده‌شده، درصد تبخیر مایع آلاینده از نمونه‌ها اندازه‌گیری شده و در محاسبات مورد نظر قرار گرفت. در مورد نمونه‌های آلوده شده به روغن موتور کم‌تر از ۰/۱ درصد بود که عملاً قابل چشم‌پوشی است.

۲-۶- برنامه آزمون‌ها

آزمون‌های انجام شده در تحقیق حاضر به چهار دسته کلی زیر تقسیم‌بندی شده‌اند:

۱- آزمون‌های مکانیک خاک کلاسیک شامل آزمون مقاومت فشاری تک‌محوره (ASTM-D2166، ۱۹۹۹)، آزمون برش مستقیم (ASTM-D3080، ۱۹۹۹) و آزمون نفوذپذیری (ASTM-D5084).

۲- آزمون طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) برای تجزیه و تحلیل ساختاری یا خصوصیات شیمیایی نمونه‌ها و عکس‌برداری به‌روش SEM برای مشاهده میکروسکوپی رخداد بین ذرات.

۳- تحلیل شیمی تر جهت تعیین میزان CaCO_3 ترکیبات.

در واقع آزمون‌های انجام شده در ردیف‌های ۲ و ۳، برای تحلیل بهتر نوع، میزان و کیفیت رسوب کلسیم کربنات است.

برای نام‌گذاری نمونه‌ها، درصد مایع منفذی شامل ۲، ۶ و ۱۲ درصد و روش بهسازی شامل تزریق محلول باکتری (S) یا اختلاط فلوک باکتری (F) کدگذاری شده و برای نمونه‌های بهسازی نشده

دستگاه تک‌محوره را نمایش می‌دهد. عکس‌های میکروسکوپی تهیه‌شده از محیط نمونه و نیز قسمتی از بخش داخلی در مقطع شکست نمایش داده شده است. فرآیند بهسازی در بخش میانی به دلیل نحوه آماده‌سازی نمونه و ثقلی بودن نفوذ مایع، به صورت نامنظم بوده است. فرآیند ترسیب میان ذرات موجود در محیط پیرامونی نمونه دارای پیوستگی کامل‌تری نسبت به ذرات در بخش داخلی آن به گونه نشان داده در شکل (۴) می‌باشد. به عبارتی صفحه شکست در ناحیه ضعیف نمونه، مسیر خود را (Bu و همکاران، ۲۰۱۸) اثر ناهمگنی (Whiffin و همکاران، ۲۰۰۷؛ Achal و همکاران، ۲۰۰۹؛ Soga و Qabany، ۲۰۱۳) حین ترسیب یکی از عوامل بروز صفحات سست برای شکست است.

جهت تثبیت باکتری بر روی دانه‌های خاک، به ویژه دانه‌های آلوده، تا حد امکان باید زمان برای آزادسازی کاتیون‌های کلسیم و فعالیت آنزیم‌های اوره‌از به حداقل برسد. بدین ترتیب فرآیند ترسیب و تشکیل بلور و پیوند دانه‌ها در روش اختلاط سریع‌تر، راحت‌تر و با کیفیت بالاتری صورت خواهد پذیرفت. در محیط‌هایی که روغن، ذرات سیلیسی و یون Ca^{2+} حضور دارند، پوششی از این یون، سبب به وجود آمدن سه گونه از فعل‌وانفعال به گونه نشان داده‌شده در شکل (۵) می‌شود (Buckley و همکاران، ۱۹۹۸):

- روغن-Ca - روغن
- ذره سیلیسی - Ca - ذره سیلیسی
- روغن - Ca - ذره سیلیسی (شکل (۵))

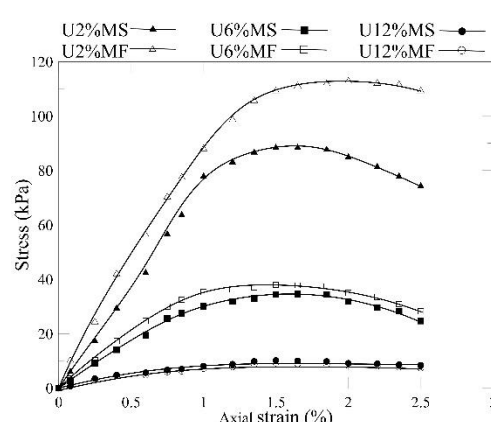
گرچه مکانیزم فوق برای نفت خام، با ویژگی‌هایی متفاوت از آلاینده‌های مورد بحث در این پژوهش آمده، اما می‌تواند نمایشی از نحوه فعالیت کاتیون‌های آزادشده بین ذرات روغنی و ذرات SiO_2 را نمایش دهد. در روش استفاده از فلوک باکتری، هنگامی که درصد اولیه مایع نافذ نزدیک به درصد رطوبت بهینه (مانند ۱۲ درصد) باشد، اضافه کردن فلوک به صورت مایع و سپس کوبیدن خاک، رسیدن به تراکم مناسب را سخت و کیفیت فرآیند را به شدت کاهش می‌دهد. با افزایش مایعات بین ذرات (مایع منفذی نخستین و محلول فلوک باکتری) حالت فیزیکی مخلوط به مویرگی (Capillary) و حتی دوغابی (Slurry) تغییر می‌یابد (Mitarai و Nori، ۲۰۰۶). با توجه به این که آزمون‌ها در وزن مخصوص ثابت انجام گرفته، با افزایش درصد مایع منفذی، میزان هوای بین دانه‌ها کاهش یافته و مایع منفذی، بین دانه‌ها را پر کرده و موجب افزایش درجه اشباع می‌شود. یکی از عوامل کاهش مقاومت با افزایش درجه اشباع، کاهش میزان تأثیر پل‌های ایجاد شده بین دانه‌ها است (Cheng و همکاران، ۲۰۱۳). این موضوع با افزایش مقدار مایع منفذی و شناور کردن دانه‌ها بین محلول فلوک باکتری و مایع منفذی به وضوح سبب کاهش مقاومت می‌شود.

سیمانتاسیون (معادل حجم باکتری مورد استفاده) و رسیدن نمونه‌ها به سن مورد نظر، قالب‌ها باز شده تا هواخوری تکمیل گردد و شکست آن‌ها انجام شود. از دیگر عوامل مؤثر بر مقاومت نمونه‌ها، افزایش تعداد دفعات تزریق و همچنین سن نمونه‌ها است که در واقع بر میزان هواخوری آن‌ها در تولید کلسیم کربنات تأثیرگذار است (Li و همکاران، ۲۰۱۸). شکل (۲)، نمایی از نمونه‌ای از خاک آغشته شده به ۶٪ روغن موتور است که به هر دو روش بهسازی شده است. در این شکل نمونه ماسه قبل از بهسازی و نیمه شکسته شده آن پس از آزمون تک‌محوری نمایش داده شده است.



شکل ۲- نمونه‌ای از خاک آغشته به روغن در شرایط مختلف بهسازی، شکست و قبل از بهسازی

نمودار تنش- کرنش در آزمون تک‌محوری تا هنگام شکست نمونه‌ها در شکل (۳) برای مایع منفذی روغن، در سه درصد وزنی متفاوت به دو روش مختلف از ورود باکتری به خاک آمده است. در درصد‌های پائین مایع منفذی، استفاده از روش اختلاط فلوک باکتری، تأثیر بسزایی در افزایش حدود ۱۵٪ مقاومت نمونه‌های حاصل، پس از ۵ مرحله تزریق مستقیم محلول سیمان‌تاسیون، به فاصله ۴۸ ساعت، نسبت به نمونه‌های تزریقی سوسپانسیون باکتری در شرایط مشابه داشت.



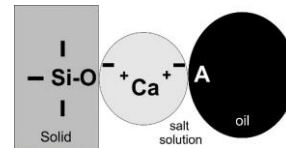
شکل ۳- مقاومت فشاری تک‌محوری ماسه آلوده‌شده به روغن و بهسازی شده

شکل (۴) نمایی از نحوه شکست یکی از نمونه‌ها تحت بار زیر



شکل ۴- نیم‌رخ شکست یک نمونه بهسازی شده در آزمون تک‌محوری

اصلی دستگاه انتقال یافته است (Azadi و همکاران، ۲۰۱۷). برای تحلیل صحیح نتایج، باید دانست که ساختار خاک متشکل از بافت دانه خاک (مانند هندسه کانی‌های تشکیل‌دهنده دانه‌ها) و نیروهای بین این دانه‌ها است. تأثیرات وابسته به خواص فیزیکی و شیمیایی دانه‌ها، زمانی مؤثر می‌شوند که کانی‌های مواد معدنی در تماس با مایع منفذی قرار گرفته‌اند. به این ترتیب لایه دوگانه الکتریکی از مایع منفذی حول کانی‌ها شکل می‌گیرد. مشابه این موضوع در مورد آب که دارای ملکولی دوقطبی است و اطراف خاک‌هایی مانند خاک‌های رسی وجود دارد. نوع دیگری از تأثیرات دانه‌ها بر رفتار کلی خاک‌ها، فعل‌وانفعالات و اثرات متقابل مکانیکی است. این نوع از فعل‌وانفعالات هنگامی رخ می‌دهد که دانه‌ها در حال چرخیدن و یا جابه‌جا شدن هستند. سهم هرکدام از "اثرات وابسته به خواص فیزیکی و شیمیایی" و "فعل‌وانفعالات مکانیکی" وابسته به مشخصات فازهای سه‌گانه خاک دارد. در خاک‌های ریزدانه، عموماً اثرات وابسته به خواص فیزیکی و شیمیایی بر رفتار خاک غلبه دارد، حال آن‌که در خاک‌های درشت‌دانه و دانه‌ای، فعل‌وانفعالات مکانیکی تعیین‌کننده رفتار خاک می‌باشد (Holtz و Kovacs، ۱۹۸۱). پژوهش‌های بسیاری نیز در مورد بررسی پارامترهای قالب در تأثیرگذاری فعل‌وانفعالات فیزیوشیمیایی و یا مکانیکی بر دانه‌های خاک حین اختلاط با یک مایع انجام شده است (Meegoda و Ratnaweera، ۲۰۰۵). در این پژوهش، خاک مورد استفاده، خاک ماسه‌ای بوده و تأثیر فعل‌وانفعالات مکانیکی بر نحوه رفتار خاک تأثیرگذار است. حال آن‌که خاک آلوده پس از بهسازی و تشکیل بلورهای کریستالی، صرفاً به واسطه افزایش قسمت ریزدانه آن (کریستال‌های کلسیم کربنات) به نحوی تغییر رفتار می‌دهد که متأثر از اثرات وابسته به خواص فیزیکی و شیمیایی نیز می‌باشد. اثرات فیزیوشیمیایی، در دو ردیف قابل بررسی است؛ اثرات وابسته به سطح مانند زاویه تماس و کشش سطحی و اثرات وابسته به عواملی همانند خواص پراکنده‌کنندگی، قطبیت و ویسکوزیته (Chao و همکاران، ۲۰۱۸). از جمله مهم‌ترین عوامل در نحوه رفتار خاک‌های ماسه‌ای در



شکل ۵- مکانیزم فعل‌وانفعال بین نفت خام و ذرات جامد (Buckley و همکاران، ۱۹۹۸)

۳-۲- آزمون برش مستقیم

جهت تعیین پارامترهای مقاومتی خاک طبیعی، آلوده‌شده و بهسازی شده از آزمون برش مستقیم استفاده شده است. در مورد خاک‌های آلوده یا نمونه شاهد برای تیمار به کمک بهسازی میکروبی، نمونه‌ها با درصدهای مختلف از مایع منفذی، داخل ظرفی به ابعاد ۴×۱۵×۲۵ سانتی‌متر با تراکم موردنظر کوبیده شدند. قالب مربوط به آزمون برش مستقیم با ابعاد ۲/۵×۱۰×۱۰ سانتی‌متر نیز به صورت مدفون در میانه ظرف قرار گرفت. سپس فرآیند ورود باکتری به دو روش بیان‌شده در قسمت آزمون تک-محوری به نمونه‌ها انجام گرفت. با اتمام فرآیند بهسازی، نمونه داخل قالب به قالب اصلی آزمون برش منتقل شد. نمونه‌ها پس از کوبش و قبل از بهسازی، به صورت دست‌نخورده بود که پس از بهسازی در قالب اصلی برش قرار گرفت. پس از اعمال تنش قائم ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلو پاسکال، تنش برشی به صورت کنترل کرنش و با سرعت حرکت ۱ میلی‌متر بر دقیقه تحت اثر تنش برشی تا هنگام گسیختگی قرار گرفت.

انجام فرآیند بهسازی از طریق ساخت نمونه خاک در قالب اصلی نیز از دیگر راه‌حلهایی بود که می‌توان برای ساخت نمونه استفاده کرد (Canakci و همکاران، ۲۰۱۵). استفاده از این روش نیز مورد آزمایش قرار گرفت که به دلیل ترسیب بلورهای کلسیم کربنات در زهکش پائینی نمونه، خروجی محلول سیمان‌تاسیون حین تزریق محدود و نهایتاً پس از ۲ بار تزریق محلول سیمان‌تاسیون، زهکشی متوقف می‌شد. در روندی مشابه و در پژوهشی دیگر، تهیه نمونه‌ها خارج از دستگاه و با ابعاد بزرگ‌تر انجام شده که پس از بریدن قسمت‌های اضافه آن به داخل قالب

سپوح به وسیله فیلمی از سیال با ضخامت معین جدا می‌شوند. بنابراین برای سیالات با ویسکوزیته بالاتر، فاصله دانه‌ها از یکدیگر بیش‌تر شده (در هم فرورفتگی سطوح دندانه‌ای در مقیاس میکروسکوپی کاهش می‌یابد) و نیز چسبندگی سطوح مولکولی مایع لزج در اندازه‌گیری پارامترهای مقاومت برشی غیرقابل چشم‌پوشی خواهد شد. اختلاط دانه‌های خاک و مایع منفذی دو نوع آرایش را از کنار هم قرارگیری ذرات ایجاد می‌کند. حالت اول، شرایطی است که مایع منفذی، به صورت کامل دانه را در بر گرفته و لایه‌ای از مایع، حول ذره قرار دارد. حالت دوم نیز، شرایطی است که لخته‌ای از مایع منفذی، بین ذرات را گرفته است. در حالت اول، پل‌های معلق مایع، بین ذرات سبب ایجاد چسبندگی ذرات به هم می‌شود؛ به این حالت از اتصال دانه‌ها به اصطلاح آونگی یا معلق^{۱۸} می‌گویند (Mitarai و Nori، ۲۰۰۶). پل‌های مویرگی (حلقه‌های پاندولی) در اطراف نقاط تماس ذرات همسایه باعث چسبندگی قوی شده و در این شرایط مایع، فاز پراکنده و گاز، فاز پیوسته است (Danov و همکاران، ۲۰۱۷). در حالت دوم، که با افزایش درصد مایع منفذی ایجاد می‌شود، اتصال دانه‌ها به صورت دسته‌بندی^{۱۹} می‌باشد (Nori و Mitarai، ۲۰۰۶). در این شرایط ادغام پل‌های مویرگی رخ داده (Danov و همکاران، ۲۰۱۷) و نیروهای کشش سطحی بسیج می‌شوند. تعیین ضخامت روغن بین دو سطح، از ویسکوزیته روغن حاصل می‌گردد. فاصله بین سطح دانه و سطح خارجی آغشته به آلایندگی نیز از عوامل مؤثر دیگر در وضعیت ساخت بلورهای کلسیم کربنات و افزایش و بهبود پارامترهای ژئوتکنیکی آن است. که عملاً سطح آغشته به روغن، فاصله بیش‌تری را بین باکتری‌های مخلوط در بین دانه‌ها و سطح اصلی آن‌ها ایجاد می‌نماید. سطح آب‌گریز دانه‌های آلوده نیز از دیگر عوامل کاهش کیفیت بلورسازی است (Shahin و Cheng، ۲۰۱۷). در واقع باکتری‌های آب‌دوست، هیچ چسبندگی و اتصالی را با سطح قطرات روغن ندارند (Dorobantu و همکاران، ۲۰۰۴) بنابراین در محیط‌های هیدروکربنی، باید از باکتری‌های با آب‌دوستی متوسط برای پایدارسازی استفاده کرد (Yan و همکاران، ۲۰۰۱). با توجه به این‌که مایع منفذی مانند روغن در کنار محلول‌های دارای باکتری قرار می‌گیرند، با توجه به ویسکوزیته روغن، ممکن است قطرات روغن به صورت لخته به واحدهای کوچک‌تر منعقد شده (Vankova و همکاران، ۲۰۰۷) و باکتری‌ها فرصت چسبیدن به دانه‌ها را به صورت مستقیم پیدا کنند. در این صورت است که امکان بلورسازی و ایجاد پل کلسیم کربناتی بین ذرات به هم نزدیک وجود دارد.

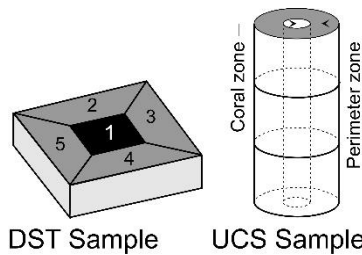
حین برش، ویسکوزیته مایع متخلخل (به‌ویژه در مورد مایعات هیدروکربنی) درون آن‌هاست (Meegoda و Ratnaweera، ۱۹۹۴). ویسکوزیته یکی از پارامترهای اساسی موردنیاز در صنایع مختلف به‌خصوص وابسته به صنایع نفتی و شیمیایی است (Baled و همکاران، ۲۰۱۸). با توجه به تأثیر زیاد عامل ویسکوزیته، روندی نامتشابه برای وضعیت تغییرات رفتار خاک با افزایش درصد مایع منفذی آلاینده در آن ملاحظه گردیده است. تا جایی که در بسیاری از پژوهش‌ها، در مقایسه روند تغییرات رفتاری خاک، مغایرت بین پژوهش‌ها گزارش شده است. این در حالی است که ویسکوزیته مایع‌های متخلخل^{۱۶} تفاوت بسیاری با یکدیگر دارند. به‌عنوان مثال در پژوهش (Ebadi و Kermani، ۲۰۱۲)، مایع متخلخل دارای ویسکوزیته مطلق $41/3$ cp است و مقایسه رفتاری خاک در پژوهش (Khamehchiyan و همکاران، ۲۰۰۷) با مایع متخلخل با ویسکوزیته مطلق معادل 50 درصد پژوهش قبل (cp) $(20/52)$ صحیح به نظر نمی‌رسد. هم‌چنین از دیگر عوامل مؤثر در تغییرات رفتاری خاک‌های آلوده، سطح مخصوص ذرات است. خاک‌ها با سطح مخصوص بیشتر، ظرفیت بیشتری در جذب آلاینده یا مایع سطحی به خود دارند (Khamehchiyan و همکاران، ۲۰۰۷) به شرط آن‌که شرایط قطبیت در جذب بین مایع و ذرات خاک وجود داشته باشد. شکل (۶) رفتار تنش- کرنش نمونه‌ها با 6 درصد مایع منفذی تحت اثر تنش قائم 50 ، 100 و 150 کیلو پاسکال را نشان می‌دهد. ویسکوزیته یا گرانیروی معیاری از اصطکاک داخلی یا مقاومت در برابر جریان یک سیال است و هنگامی ظاهر می‌شود که بین لایه‌های سیال حرکت نسبی وجود داشته باشد. این رخداد هنگام آزمون برش بین سطوح آغشته شده به روغن اتفاق افتاده و سبب فعال شدن کشش سطحی و نیروهای جاذبه بین ملکولی سیال می‌شود. در واقع در محیط‌های دانه‌ای که در شرایط خشک فاقد چسبندگی می‌باشند، حضور یک مایع بین ذرات آن، به دلیل نیروهای کشش سطحی مایع، سبب بروز چسبندگی در رفتار محیط می‌شود (Nori و Mitarai، ۲۰۰۶). اغلب روغن‌ها، دارای کشش سطحی بالاتر از 23 mN/m هستند (Shibuichi و همکاران، ۱۹۹۸). به همین دلیل نیز، در خاک‌های آغشته به آلایندگی، چسبندگی ظاهری واضح‌تر دیده شده که حاصل از همین نیروهای بین ملکولی سیال است و نه چسبندگی بین دانه‌ها. در رابطه با روغن موتور مورد استفاده، به دلیل ویسکوزیته بالا، کشش سطحی نیز بیش‌تر می‌باشد. واحد عمومی متریک برای ویسکوزیته مطلق، پویز^{۱۷} است که به صورت نیروی موردنیاز برای حرکت یک سانتی‌متر مربع از سطحی در برابر سطحی دیگر به صورت موزی، با سرعت یک سانتی‌متر بر ثانیه تعریف می‌شود که

16. Porous
17. Poise
18. Pendular
19. Funicular

روند کاهش میزان نفوذپذیری منطبق بر پژوهش‌های دیگر نیز می‌باشد (Azadi و همکاران، ۲۰۱۷؛ Montoya و Zamani، ۲۰۱۶؛ Yasuhara و همکاران، ۲۰۱۱؛ Chu و Ivanov، ۲۰۰۸).

۳-۴- تحلیل میزان کرنات کلسیم رسوبی با استفاده از روش شیمی تر

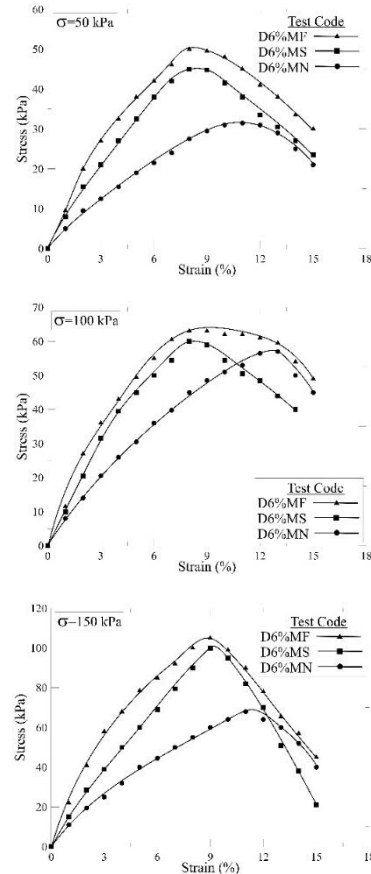
برای اندازه‌گیری میزان کلسیم کرنات تولیدشده، حاصل از فرآیند زیستی، آزمون شیمی تر بر روی نمونه‌های مختلف انجام پذیرفت. این میزان برای نمونه‌های بهسازی شده به روش اختلاط با فلوک باکتری بیشتر از روش تزریق سوسپانسیون بود. مقدار کرنات کلسیم برای نمونه‌هایی که دارای روغن به‌عنوان مایع منفذی بود، تا ۱/۵ درصد مزاد بر مقدار کلسیم کرنات موجود در خاک اولیه اندازه‌گیری شد. شکل (۷)، الگوی نمونه‌گیری برای اندازه‌گیری میزان رسوب کرنات کلسیم و جدول (۷)، درصد وزنی آن در نقاط مختلف را نشان می‌دهند. حرکت جریان موارد تزریقی در نمونه‌های استوانه‌ای، سبب افزایش درصد تولید کرنات کلسیم و شکل‌گیری پوسته‌ای سخت برای نمونه‌ها شده است. هم‌چنین، توزیع تولید رسوبات در نمونه‌های مکعبی تقریباً یکنواخت بوده است که دلیل آن ضخامت کم نمونه‌ها می‌باشد.



شکل ۷- الگوی برش نمونه‌های تک‌محوری و برش مستقیم برای آنالیز شیمی تر

۳-۵- تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و تحلیل پراش اشعه ایکس

به‌جهت تحلیل بهتر نمونه‌ها، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس انجام شده است. در شکل (۸) نمونه‌ای از خاک که به ۶ درصد روغن آلوده شده و سپس بهسازی شده بود، پس از خروج روغن از بین دانه‌ها (به‌دلیل آسیب ناشی از گازهای متصاعد شده در اثر بمباران الکترونی نمونه به میکروسکوپ)، توسط رزین تثبیت و پس از سمباده کشی عکس تهیه شد. تصاویر، نشان از پیوستگی دانه‌ها با استفاده رسوب تولیدشده بین دانه‌ها دارد.



شکل ۶- تغییرات تنش - کرنش خاک آلوده‌شده با ۶٪ مایع

۳-۳- آزمون نفوذپذیری

برای تحلیل بهتر میزان تأثیر رسوب کرنات کلسیم بر کاهش نفوذپذیری نمونه‌ها و هم‌چنین تأثیر آلاینده بر میزان نفوذپذیری خاک، آزمون هدایت هیدرولیکی انجام شده است. باید دانست، ویسکوزیته از عوامل مؤثر بر تخمین نرخ جریان در محیط‌های متخلخل است (Baled و همکاران، ۲۰۱۸). منطبق بر نتایج سایر محققین (Khamsehchiyan و همکاران، ۲۰۰۷)، افزایش میزان آلودگی در خاک سبب کاهش میزان نفوذپذیری می‌شود. این روند کاهشی در خاک‌های آلوده‌شده به روغن تندتر بوده و نفوذپذیری خاک را از $5/03 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ به $3/96 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ برای ۱۲ درصد آلاینده رسانده است. جدول (۶) نیز، تأثیر بهسازی بر میزان نفوذپذیری را برای مایع منفذی ۶ درصد نمایش می‌دهد.

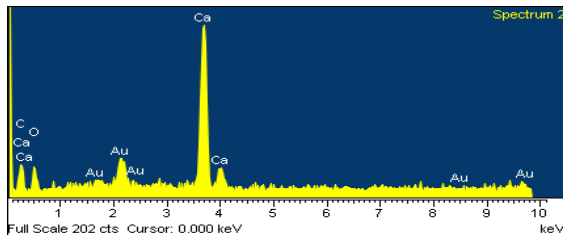
جدول ۶- تغییرات میزان نفوذپذیری خاک‌های بهسازی شده با

ردیف	نوع نمونه	نفوذپذیری $10^{-3} \times (\text{cm/s})$
۱	H6%MN	۴/۰۱
۲	H6%MS	۳/۹۵
۳	H6%MF	۳/۹۹

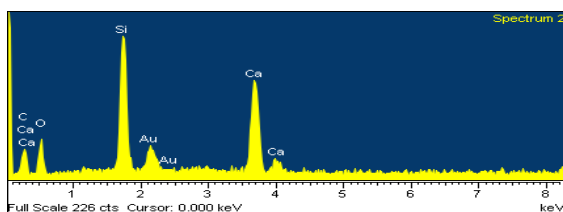
جدول ۷- درصد کربنات کلسیم تولیدی از نمونه‌های مورد آزمایش

نوع نمونه	استوانه						مکعب					
	مقطع	محیطی ۱	محیطی ۲	محیطی ۳	مرکزی ۱	مرکزی ۲	مرکزی ۳	۱	۲	۳	۴	۵
%6MF		۲/۵	۲	۰/۵	۰/۸	۱	۰/۳۹	۱/۵	۱/۸	۱/۲	۱/۵	۱/۸۹
%6MS		۱/۷۵	۱/۵	۰/۵	۱/۵	۱/۲۵	۰/۹۴	۱/۸۵	۱/۹	۱/۳۹	۱/۵۶	۱/۶

طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس

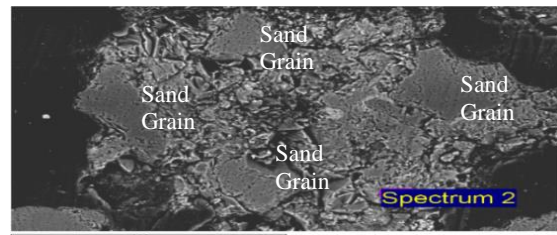


(الف-۲)

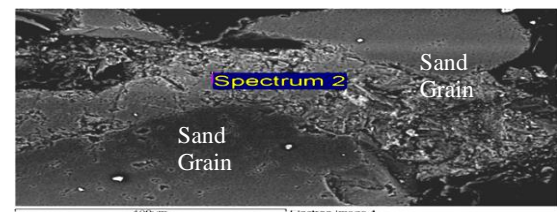


(ب-۲)

تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی



(الف-۱)



(ب-۱)

شکل ۸- تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس از نمونه‌های آغشته به روغن موتور

۴- نتیجه‌گیری

روش‌ها، مانند روش‌های شیمیایی، آثار مخرب کم‌تری بر محیط‌زیست داشته و در ازای آن، پارامترهای مقاومتی از دست رفته خاک را تا حد قابل قبولی به آن بازگرداند. از طرفی بررسی میزان بهیالایی زیستی حین بهسازی زیستی نیز می‌تواند از موارد تحقیق آینده باشد.

- فلوک‌ها باکتری، باعث به‌وجود آمدن یک فاز اشباع از آنزیم‌های اوره آز آزاد شده در ترکیب سوسپانسیون باکتری و کلسیم کربنات می‌شود. آنزیم‌های اوره آز آزاد شده، به راحتی و در سرعت بالاتری، قابلیت هیدرولیز اوره را دارا هستند.
- استفاده از فلوک‌ها باکتری، به‌عنوان یکی از روش‌های نوین، در کنار تزریق دوفازی، می‌تواند در خصوص خاک‌های آلوده عملکرد مناسبی داشته باشد. البته در درصد‌های بالاتر آلاینده باید به این موضوع دقت نمود که هم‌زمان با اختلاط فلوک‌ها باکتری با خاک آلوده‌شده، ممکن است، میزان درصد

- خاک‌های آلوده به مایعات منفذی به‌ویژه هیدروکربن‌ها، دارای سه وضعیت به لحاظ قرارگیری مایع منفذی بین دانه‌ها می‌باشند: اتصال دانه‌ها، به‌صورت آونگی^{۲۰}، اتصال دانه‌ها به- صورت دسته‌بندی^{۲۱} و درنهایت، با افزایش مایع منفذی، حالت فیزیکی مخلوط به مویرگی^{۲۲} و حتی دوفازی^{۲۳} تغییر می‌یابد.
- در بررسی خاک‌های آلوده به هیدروکربن، با توجه به این‌که سطح دانه‌ها به‌خصوص در مواجهه با هیدروکربن‌ها، به وضعیت آب‌گریز تبدیل می‌شوند، امکان تثبیت باکتری بر روی سطح آن‌ها ضعیف شده به‌گونه‌ای که به راحتی از روی آن جدا می‌شوند.
- در مواجهه با خاک‌های آلوده، استفاده از روش‌های بهسازی زیستی و سازگار با محیط‌زیست می‌تواند نسبت به سایر

20. Pendular
21. Funicular
22. Capillary
23. Slurry

- soil", *Construction and Building Materials*, 2016, 118, 294-306.
- Baled HO, Gamwo IK, Enick RM, Mchugh MA, "Viscosity models for pure hydrocarbons at extreme conditions: A review and comparative study", *Fuel*, 2018, 218, 89-111.
- BU C, Wen K, Liu S, Ogbonnaya U, Li L, "Development of bio-cemented constructional materials through microbial induced calcite precipitation", *Materials and Structures*, 2018, 51, 30.
- Buckley JS, Liu Y, Monsterleet S, "Mechanisms of wetting alteration by crude oils", *SPE Journal*, 1998, 3, 54-61.
- Canakci H, Sidik W, Kilic IH, "Bacterail Calcium Carbonate Precipitation in Peat", *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2015, 40, 2251-2260.
- Chao C, Genot C, Rodriguez C, Magniez H, Lacourt S, Fievez A, Van Hecke E, "Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 536, 156-164.
- Cheng L, Cord-Ruwisch R, "In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation", *Ecological Engineering*, 2012, 42, 64-72.
- Cheng L, Cord-Ruwisch R, Shahin MA, "Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation", *Canadian Geotechnical Journal*, 2013, 50, 81-90.
- Cheng L, Shahin MA, "Stabilisation of oil-contaminated soils using microbially induced calcite crystals by bacterial flocs", *Géotechnique Letters*, 2017, 1-6.
- Construction S, Management Commission, In: (DGJ08-37-2002), C.F.I.O.G.E. (ed.). Shanghai (in Chinese), 1997.
- Danov KD, Georgiev MT, Kralchevsky PA, Radulova GM, Gurkov TD, Stoyanov SD, Pelan EG, "Hardening of particle/oil/water suspensions due to capillary bridges: Experimental yield stress and theoretical interpretation", *Advances in colloid and interface science*, 2017.
- Dejong JT, Fritzges MB, Nusslein K, "Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2006, 132, 1381-1392.
- Dorobantu LS, Yeung AK, Foght JM, Gray MR, "Stabilization of oil-water emulsions by hydrophobic bacteria", *Applied and environmental microbiology*, 2004, 70, 6333-6336.
- Estabragh AR, Kholoosi M, Ghaziani F, Javadi AA, "Mechanical and leaching behavior of a stabilized and solidified anthracene-contaminated soil", *Journal of Environmental Engineering*, 2017, 144, 04017098.
- Evgin E Das BM, "Mechanical behavior of an oil contaminated sand", *Environmental Geotechnology*, Usmen & Acar (eds), Balkema, Rotterdam, 1992.
- George S, Aswathy EA, Sabu B, Krishnaprabha NP, George M, "Stabilization of diesel oil contaminated soil using fly ash", *International Journal of Civil and Structural Engineering Research*, 2015, 2, 118-123.
- مایع منفذی داخل خاک از حد بهینه خارج و در نمودار تراکم، در شاخه نزولی آن قرار گیرد. بر همین مبنا تراکم به صورت مناسب انجام نشده و همین موضوع نیز می تواند سبب کاهش مقاومت نهایی خاک شود.
- در مورد نمونه های با درصد آلاینده پایین، افزودن فلوکه باکتری، علاوه بر این که امکان نشست باکتری ها و آنزیم های اوره آز آزاد شده آن بر روی سطح ذرات خاک آلوده شده را افزایش می دهد، به تراکم بهتر خاک نیز کمک می کند.
 - در روش اختلاط فلوکه باکتری، در مقیاس آزمایشگاهی، امکان اختلاط کامل خاک وجود دارد، حال آنکه در مقیاس صنعتی باید توجه داشت که در کنار گزینه برهم زدن و اختلاط خاک آلوده با فلوکه باکتری، گزینه جایگزین کردن خاک آلوده با خاک مناسب نیز مطرح است.
 - انجام آزمون نفوذپذیری، نشان از کاهش میزان نفوذپذیری خاک های آلوده شده و یا بهسازی شده از خود نشان می دهد. بدیهی است، افزایش میزان کربنات کلسیم، به این روند کاهشی کمک می کند.
- #### ۵- مراجع
- Achal V, Mukherjee A, Basu PC, Reddy MS, "Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*", *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36, 433-438.
- Akinwumi, II, Booth C, Diwa D, Mills P, "Cement stabilisation of crude-oil-contaminated soil", *Proceedings of the ICE-Geotechnical Engineering*, 2016, 336-345.
- Al-Sanad HA, Eid WK, Ismael NF, "Geotechnical properties of oil-contaminated Kuwaiti sand", *Journal of Geotechnical Engineering*, 1995, 121, 407-412.
- ASTM-D422-63, e2 Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils (Withdrawn 2016), 2007.
- 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.
- ASTM-D3080 American Society for Testing and Materials D3080 (1999), Standard test method for direct shear test of soils under consolidated drained conditions, *Annual Books of ASTM Standards*, 1999.
- ASTM-D5084 16a Standard Test Methods for Measurement of Hydraulic Conductivity of Saturated Porous Materials Using a Flexible Wall Permeameter.
- Azadi M, Ghayoomi M, Shamskia N, Kalantari H, "Physical and mechanical properties of reconstructed bio-cemented sand", *Soils and Foundations*, 2017, 57, 698-706.
- Bahmani SH, Farzadnia N, Asadi A, Huat BB, "The effect of size and replacement content of nanosilica on strength development of cement treated residual

- Nazir AK, "Effect of motor oil contamination on geotechnical properties of over consolidated clay", Alexandria Engineering Journal, 2011, 50, 331-335.
- Nespeca MG, Piassalonga GB, De Oliveira JE, "Infrared spectroscopy and multivariate methods as a tool for identification and quantification of fuels and lubricant oils in soil", Environmental monitoring and assessment, 2018, 190, 72.
- Omeregic AI, Khoshdelnezamiha G, Senian N, Ong DEL, Nissom PM, "Experimental optimisation of various cultural conditions on urease activity for isolated Sporosarcina pasteurii strains and evaluation of their biocement potentials", Ecological Engineering, 2017, 109, 65-75.
- Puri VK, "Geotechnical aspects of oil-contaminated sands", Soil and Sediment Contamination, 2000, 9, 359-374.
- Qabany A, Soga K, "Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils", Géotechnique, 2013, 63, 331.
- Ratnaweera P, Meegoda JN, "Shear strength and stress-strain behavior of contaminated soils", 2005.
- Shibuichi S, Yamamoto T, Onda T, Tsujii K, "Super water- and oil-repellent surfaces resulting from fractal structure", Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 28, 287-294.
- Shin EC, Omar MT, Tahmaz AA, Das BM, Atalar C, "Shear strength and hydraulic conductivity of oil-contaminated sand", Proceedings of Environmental Geotechnics IV (ICEG), 2002 Rio de Janeiro, Brazil, 1998, 11-15.
- Simpson B, Tatsuoka F, "Geotechnics: the next 60 years", Géotechnique, 2008, 58, 357-368.
- Singh SK, Srivastava RK, John S, "Settlement characteristics of clayey soils contaminated with petroleum hydrocarbons", Soil & sediment contamination, 2008, 17, 290-300.
- Stevens J, "Unified soil classification system", Civil Engineering, ASCE, 1982, 52, 61-62.
- Tabarsa A, Latifi N, Meehan CL, Manahiloh KN, "Laboratory investigation and field evaluation of loess improvement using nanoclay- A sustainable material for construction", Construction and Building Materials, 2018, 158, 454-463.
- Udiwal KH, Patel VM, "Restoration of oil contaminated soil by bioremediation for ground water management and environment protection", International Journal of Chemical Environmental and Pharmaceutical Research, 2010, 1, 17-26.
- Van Paassen LA, Ghose R, Van Der Linden TJ, Van Der Star WR, Van Loosdrecht MC, "Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogroup experiment", Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 2010, 136, 1721-1728.
- Vankova N, Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB, Vulchev VD, Danner T, "Emulsification in turbulent flow: Mean and maximum drop diameters in inertial and viscous regimes", Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 312, 363-380.
- Whiffin VS, Van Paassen LA, Harkes MP, "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique", Geomicrobiology Journal, 2007, 24, 417-423.
- Ghaly AM "Strength remediation of oil contaminated sands", In The Seventeenth International Conference on Solid Waste Technology and Management, 2001, Philadelphia.
- Ghasemzadeh H, Tabaiyan M, "The effect of diesel fuel pollution on the efficiency of soil stabilization method", Geotechnical and Geological Engineering, 2017, 35, 475-484.
- Ghobadi MH, Abdilor Y, Babazadeh R, "Stabilization of clay soils using lime and effect of pH variations on shear strength parameters", Bulletin of Engineering Geology and the Environment, 2014, 73, 611-619.
- Hamzah A, Zarin MA, Hamid AA, Omar O, Senafi S, "Optimal physical and nutrient parameters for growth of Trichoderma virens UKMP-1M for heavy crude oil degradation", Sains Malaysiana, 2012.
- Holtz RD, Kovacs WD, "An Introduction to geotechnical engineering", Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, 1981, New Jersey, 2012.
- Huang Y, Wang L, "Experimental studies on nanomaterials for soil improvement: a review", Environmental Earth Sciences, 2016, 75, 497.
- Ivanov V, Chu J, "Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ", Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2008, 7, 139-153.
- Ivanov V, Chu J, Stabnikov V, "Basics of construction microbial biotechnology", In Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering, Springer International Publishing, 2015, 21-56.
- Kermani M, Ebadi T, "The effect of oil contamination on the geotechnical properties of fine-grained soils", Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 2012, 21, 655-671.
- Khamehchiyan M, Charkhabi AH, Tajik M, "Effects of crude oil contamination on geotechnical properties of clayey and sandy soils", Engineering Geology, 2007, 89, 220-229.
- Khosravi E, Ghasemzadeh H, Sabour MR, Yazdani H, "Geotechnical properties of gas oil-contaminated kaolinite", Engineering Geology, 2013, 166.
- Kogbara RB, "A review of the mechanical and leaching performance of stabilized/solidified contaminated soils", Environmental Reviews, 2013.
- Li M, Wen K, Li Y, Zhu L, "Impact of oxygen availability on microbially induced calcite precipitation (MICP) treatment", Geomicrobiology Journal, 2018, 35, 15-22.
- Liu C, Yu XJ, "The Interaction between Contaminant and Soil, and Its Mechanism", 2017.
- Meegoda NJ, Ratnaweera P, "Compressibility of contaminated fine-grained soils", 1994.
- Mitarai N, Nori F, "Wet granular materials", Advances in Physics, 2006, 55-45-1.
- Nasehi SA, Uromeihy A, Nikudel MR, Morsali A, "Influence of gas oil contamination on geotechnical properties of fine and coarse-grained soils", Geotechnical and Geological Engineering, 2016, 34, 333-345.
- Nasr AM, "Utilisation of oil-contaminated sand stabilised with cement kiln dust in the construction of rural roads", International Journal of Pavement Engineering, 2014, 15, 889-905.

- Yan N, Gray MR, Masliyah JH, "On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2001, 193, 97-107.
- Yasuhara H, Hayashi K, Okamura M, "Evolution in mechanical and hydraulic properties of calcite-cemented sand mediated by biocatalyst", In *Geo-Frontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering*, 2011, 3984-3992.
- Zamani A, Montoya BM, "Permeability Reduction Due to Microbial Induced Calcite Precipitation in Sand", *Geo-Chicago*, 2016, 103-94.
- Zhang G, "Soil nanoparticles and their influence on engineering properties of soils", In *Advances in Measurement and Modeling of Soil Behavior*, 2007, 13-1.
- Zhao Q, Li L, Li C, Li M, Amini F, Zhang H, "Factors affecting improvement of engineering properties of MICP-treated soil catalyzed by bacteria and urease", *Journal of Materials in Civil Engineering*, 2014, 26, 04014094.
- Zomorodian SA, Shabnam M, Armina S, O'Kelly BC, "Strength enhancement of clean and kerosene-contaminated sandy lean clay using nanoclay and nanosilica as additives", *Applied Clay Science*, 2017, 140, 140-147.

EXTENDED ABSTRACTS

Evaluation of Success in Microbial Bio-Improvement of Motor Oil Contaminated Sandy Soils

Mohammad Taghi Bolouri Bazaz, Jafar Bolouri Bazaz *

Civil Engineering Department, Engineering Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad Iran

Received: 18 October 2018; **Accepted:** 13 January 2020

Keywords:

Hydrocarbon contamination, Biological method, Bacterial solution, Flocculation.

1. Introduction

Given that advances have been made toward the use of carbon-free or low-carbon energy sources in the modern sciences (Simpson and Tatsuoka, 2008), the development and optimization of more environmentally-friendly methods are required. Biological practices have their own sensitivity due to their dealings with living organisms. The feasibility of the use of the calcium carbonate precipitation method in the sandy soils contaminated with hydrocarbon pollutants and the use of bacterial flocculation have been recently investigated (Cheng and Shahin, 2017). The purpose of the present research is to investigate the variation of geotechnical parameters of sandy soils contaminated with motor oil.

2. Methodology

2.1. Material

The soil used in the current research was Firoozkooch sand with internal friction angle and specific gravity 36° and 2.71, respectively. The maximum and minimum dry unit weights of this sand were found to be 16.38 kN/m^3 and 14.05 kN/m^3 , respectively. Also, two common types of hydrocarbon contaminants (motor oil and gasoline) and *Sporesarcina pasteurii* strain as the main strain of the bacteria with high urease activity were employed.

2.2. Culture and growth of the bacterial strain

The main strain of the bacteria with high urease activity, ATCC11859 *Sporesarcina pasteurii*, was prepared from the Iran microorganism Bank. Bacterial suspension preparation is conducted based on the process presented in Table 1.

2.3. Improvement method using calcium carbonate precipitation

The microbial improvement process was carried out with two methods:

Method 1: Using the two-stage injection process (Whiffin et al., 2007) in which bacteria enter the soil by injection followed by cementation solution injection.

Method 2: Using flocculation of bacteria (Cheng and Shahin, 2017) in which 100 mM of calcium chloride was added to one liter of culture medium, containing bacteria, to prepare bacterial flocculation. Calcium chloride caused the bacterial cells to accumulate and coagulate, leading to the precipitation of the bacteria at the bottom of the container. To prepare bacterial flocculation, 85% supernatant was removed (Cheng and Shahin, 2017).

* Corresponding Author

E-mail addresses: mbloori@gmail.com (Mohammad Taghi Bolouri Bazaz), bolouri@um.ac.ir (Jafar Bolouri Bazaz).

Table 1. Bacterial preparation process

Step	Process	Description
1	Preparation of Nutrient Agar solid medium and addition of 10 mg/L MnSO ₄	Adding MnSO ₄ is to increase the bacterial sporulation
2	Autoclaving 100 ml of Nutrient Agar solid medium	Autoclaving takes 15 minute time
3	Adding 20% urea to the culture medium by filtering	Increasing the culture medium temperature up to 45 ° C when urea is added
4	Pouring the medium into the plate and cultivating the bacteria	This process is carried out beneath the hood.
5	Placing the plate inside the incubator	For 24 hours
6	Preparation and autoclaving of the liquid culture medium (20 g Yeast Extract, 17 M Ammonium Chloride (NH ₄ Cl ₂), 0.1 mM NiCl ₂ , 20 g Urea (CO (NH ₂) ₂) per liter of distilled water	Autoclaving takes 15 minute time
7	Reaching the acidity of the medium to pH = 9.25 by adding (NaOH)	After autoclaving and reaching the temperature up to 30°C
8	Culture of bacteria in a liquid medium and placing it in the incubator shaker	For 48 hours at 150 rpm
9	The bacterial population was measured by spectrophotometer and bacterial suspension	It was measured at a wavelength of 600 nm and when the light absorbance (light density) of the bacterium in this wavelength reached 2.5

2.4. Test program

The tests performed in this study are classified into three general categories:

1. Classic soil mechanics tests including density , uniaxial compressive strength (UCS) (ASTM-D2166, 1999) and direct shear (DS) tests (ASTM-D3080,1999).
2. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) for the elemental analysis or chemical characterizations of a sample and scanning electron microscope (SEM).
3. Wet chemistry analysis to estimate the amount of CaO compounds (with Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) salt titration)

3. Results and discussion

Table 2-a, Table 2-b and Table 2-c summarize the UCS test results, strength parameters including cohesion and internal friction angle, and magnitudes of permeability of soil contaminated before and after the MICP improving process respectively.

The test results indicate that with increasing motor oil percentage, the uniaxial compressive strength decreases. On the other hand, using method 2 (bacteria flocculation) in comparison with method 1 leads to better performance. Table 2-b summarizes the direct shear test results of samples with 6% contamination of motor oil, indicating the shear strength parameters have been modified with the MICP improvement process. This leads to a noticeable reduction in permeability after the MICP process, which has been gathered in Table 2-c. Depending on the viscosity of the oil, the oil droplets may be clothed into smaller coagulated units in the vicinity of bacteria solutions, (Vankova et al., 2007). When this happens, the bacteria are not able to grasp the grains directly (Fig. 1). In this case, there is a low chance of crystallization and the formation of a calcium-carbon bridge between the soil particles. Finally, it is worth mentioning that method 2 provides more suitable conditions to connect the bacteria and grains firmly.

Table 2. Classical soil mechanics test results: a) UCS, b) DS, c) permeability results

Sample Code	UCS (kPa)	Sample Code	ϕ (°)	C (kPa)	Sample Code	Permeability (cm/s)×10 ⁻³
U2%MS	88.5	D6%MN	17	17	H6%MN	17
U2%MF	113				H6%MS	33
U6%MS	34	D6%MS	19	33	H6%MS	33
U6%MF	38					
U12%MS	10	D6%MF	21	35	H6%MF	35
U12%MF	9					

(a)

(b)

(c)

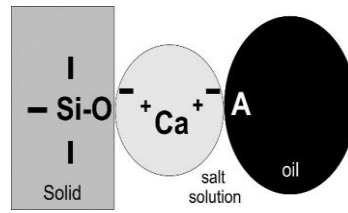


Fig. 1 Interaction mechanism between crude oil and solids

To measure the amount of calcium carbonate produced by the biological process, additional chemical tests were performed on samples, taken from UCS and DS. The amount of precipitated calcium carbonate was higher for samples improved by method 2 (flocculation of bacteria) in comparison with method 1 (bacteria suspension injection). Also, the amount of precipitated calcium carbonate was measured at different parts of a contaminated sample (Fig. 2) with motor oil, which has been summarized in Table 3.

In order to analyze clearly the samples, imaging with SEM was performed. An improved contaminated sample has been shown in Figs. 3-a and 3-b, in which sand grains and CaO bridges can be obviously observed. EDS analysis indicates the precipitation of calcium carbonate between sand grains. Si and Ca peaks in the EDS diagram, shown in Figs. 3-c and 3-d, are related to the sand grain and calcium carbonate respectively.

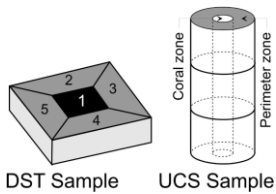


Fig. 2. UCS and direct shear samples for wet chemistry analysis

Table 3. The percentage of calcium carbonate produced from the tested specimens

Sample	Cylinder						Cube					
	zone	per.1	per.1	per.1	cor.1	cor.2	cor.3	1	2	3	4	5
6%MS	2.5	2	0.5	0.5	1	0.39	1.5	1.8	1.2	1.5	1.89	
6%MF	1.75	1.5	0.5	1.5	1.25	0.94	1.85	1.9	1.39	1.56	1.6	

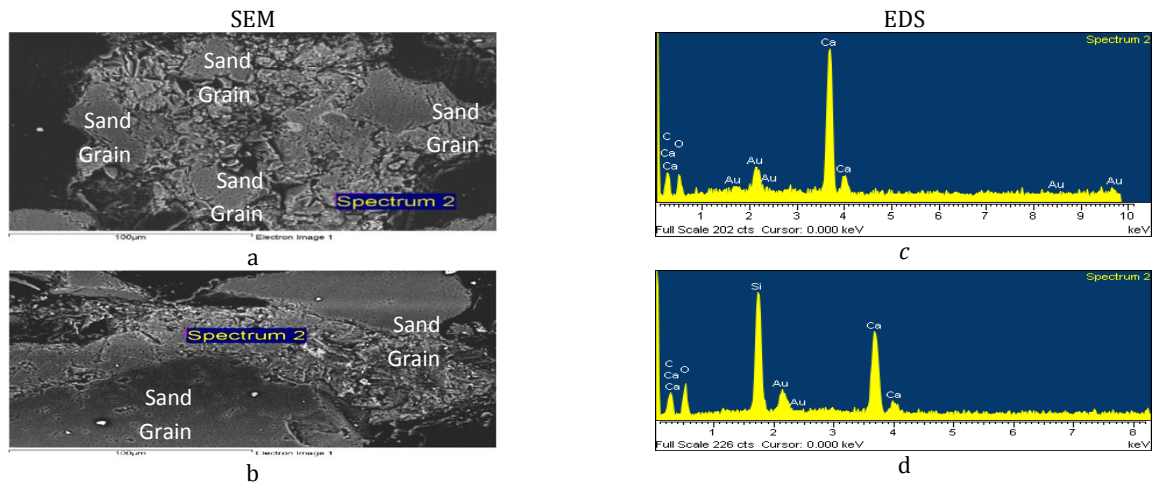


Fig. 3. SEM from the motor- oil contaminated samples and the EDS analyses

4. Conclusions

This paper presents the influence of motor oil contamination on the degree of prosperity with 2 different MICP methods. While the first method, which has been commonly applied in the literature, is two-phase injection method (method 1), the other method (namely method 2) focuses on premixing ureolytic bacterial flocs with motor oil-contaminated soils for the purpose of bacteria fixation. In both methods, precipitation was observed but the quality and quantity of calcium carbonate bridges between grains were differed. In method 2 because of the firm fixation of bacteria flocs on the surface of the grain, MICP process was supplemented on the grain and the bridges were effective. In method 1 despite precipitating of calcium carbonate, no firm connections were performed between oily grains due to non-effective bridges.

5. References

- 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.
- ASTM-D3080 American Society for Testing and Materials D3080 (1999), Standard test method for direct shear test of soils under consolidated drained conditions, Annual Books of ASTM Standards, 1999.
- Cheng L, Shahin MA, "Stabilisation of oil-contaminated soils using microbially induced calcite crystals by bacterial flocs", *Géotechnique Letters*, 2017, 1-6.
- Simpson B, Tatsuoka F, "Geotechnics: the next 60 years", *Géotechnique*, 2008, 58, 357-368.
- Vankova N, Tcholakova S, Denkov ND, Ivanov IB, Vulchev VD, Danner T, "Emulsification in turbulent flow: Mean and maximum drop diameters in inertial and viscous regimes", *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 312, 363-380.
- Whiffin VS, Van Paassen LA, Harkes MP, "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique", *Geomicrobiology Journal*, 2007, 24, 417-423.