بهسازی چسبندگی ماسه‌های سیلت‌دار به روش زیست میکروبی (مطالعه موردی ماسه‌های سیلت‌دار فیروزکوه ایران)

مقاله پژوهشی

احسان پاک نیت*، دانشجوی دکتری، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
سید مرتضی مرندی، استاد، گروه مهندسی عمران، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
علی نیازی، استاد، دانشکده مهندسی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ehsan.pakniyat@yahoo.com

دریافت: ۹۹/۰٤/۱۸- پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۵
صفحه ۹٤-۸۵

چکیده

این روزها با توجه به گسترش خطوط حمل و نقل زمینی، احداث راه‌ها بر روی خاک‌های مسئله‌دار امری اجتناب ناپذیر می باشد. معمولاً مهمترین مشخصه خاک‌های مسئله دار، مقاومت پایین و تراکم پذیری بالای آنها می‌باشد. لذا مشخصات مکانیکی این خاک‌ها لازم است از طریق بهسازی زمین تقویت گردد. از اینرو در سالهای اخیر، تلاش بسیاری محققان بر ارائه روش‌هایی مبتنی بر رعایت مسائل زیست محیطی بوده است. یکی از روش‌هایی که اخیراً در بهسازی خاک‌های ماسه‌ای مورد توجه قرار گرفته است، رسوب کلسیت به روش زیست میکروبی (MICP) است. در این مقاله بمنظور تسریع در رسوب کلسیت از یکی از گونه‌های باکتری باسیلوس، تحت عنوان باسیلوس پاستوری در نقش کاتالیزور این واکنش شیمیایی استفاده شده است. در یک برنامه آزمایشگاهی با انجام ۵ آزمایش برش مستقیم، اثر زمان بر بهبود چسبندگی خاک ماسه‌ای سیلت‌دار نمونه‌گیری شده از منطقه فیروزکوه ایران بررسی گردید. مدت زمان‌های در نظر گرفته شده برای آزمایش‌ها؛ گذشت ۳، ۷، ۱٤، ۲۱ و ۲۸ روز از عملیات بهسازی زیست میکروبی بوده است. نتایج این تحقیقات نشان داد که بطور کلی با گذشت زمان، چسبندگی خاک‌های ماسه‌ای سیلت‌دار بهسازی شده به روش زیست میکروبی افزایش می‌یابد که این موضوع نشان از نقش رشد سلول‌های باکتری و تسریع در پیشرفت فرایند MICP و رسوب کریستال‌های کلسیت در منافذ خاک است. نتایج حاصل از تصاویر SEM نیز گواه موارد مذکور است. با این وجود نرخ رشد باکتری‌ها تابع میزان رشد بهینه آنها یا حجم منافذ باقیمانده خاک می‌تواند کاهنده یا افزاینده باشد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس پاستوری، بهسازی خاک، چسبندگی، رسوب کلسیت به روش زیست میکروبی (MICP)

۱- مقدمه

امروزه با توجه به گسترش خطوط حمل و نقل زمینی، احداث راه‌ها بر روی خاک‌های مسئله‌دار امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. معمولاً مهمترین مشخصه خاک‌های مسئله‌دار، مقاومت پایین و تراکم‌پذیری بالای آنها می‌باشد (Ho and Chan. 2011; Huat. 2006; Kazemian, et al. 2011). لذا لازم است مشخصات مکانیکی این نوع خاک‌ها از طریق بهسازی زمین تقویت گردد. یکی از راهکارهای بهسازی زمین با رویکرد ویژه به مسائل اقتصادی، روش تزریق مواد شیمیایی است. لیکن این روش‌ها اغلب منجر به تغییر pH خاک، و بسیاری آلودگی‌های خاک و آب‌های زیرزمینی شده‌اند (Dejong et al. 2006; Karol. 2003). با توجه به این واقعیت، در سال‌های اخیر تلاش بسیاری محققین، ارائه‌ی روش‌هایی مبتنی بر رعایت مسائل زیست محیطی بوده است. در سال‌های اخیر، با افزایش آگاهی از مسائل زیست محیطی، تغییر دیدگاه ویژه‌ای نسبت به استفاده از تکنیک‌های بهسازی زمین صورت گرفته است. از آنجا که در تکنیک‌های تزریق همگی مواد

تزریقی شیمیایی به جز سیلیکات سدیم، سمی و خطرناک هستند، استفاده از آنها همواره توأم با نگرانی‌هایی بوده است (Dejong et al. 2010). از اینرو با رویکرد حفظ محیط زیست، روش‌های زیست میکروبی مطرح شده است (Le Metayer-Levrel et al. 1999). تکنیک MICP یک روش بیولوژیک در بهسازی خاک است که استفاده از آن نیازمند تلفیق مهندسی بیوتکنولوژی، ژئوشیمی و مهندسی ژئوتکنیک است. MICP تکنیکی طبیعی در بهسازی زمین است که به صورت طبیعی مستلزم گذشت میلیون‌ها سال می‌باشد (Dejong et al. 2010). تحقیقات نشان داده است که در هر گرم خاک در نزدیکی سطح زمین، بصورت طبیعی 10^{9}-10^{6} باکتری وجود دارد (Mitchell and Santamarina. 2005; Pichan and O'Kelly. 2014). یک گروه از این باکتری‌ها از گروه باکتری‌های Bacillus بوده که با افزایش عمق خاک از تعداد آنها کاسته می‌شود. به منظور تشدید فرایند MICP، می‌توان از طریق ایجاد میکروارگانیسم اوره، سیمانتاسیون ساختار خاک را بهبود داده و خواص مهندسی خاک را ارتقاء داد. برای این منظور لازم است محلولی حاوی باکتری و مواد مغذی سیمانی باکتری‌ها شامل ترکیب اوره و یکی از منابع یون کلسیم (مانند $CaCl_2$، $CaCl_2.2H_2O$، $CaSO_4.2H_2O$ و...) را مهیا نموده و در نمونه‌ی مورد نظر تزریق نمود. گونه‌های مختلف گروه باکتری‌های باسیلوس قادر به رسوب کلسیت از طریق تبدیل اوره به آمونیوم و دی‌اکسیدکربن هستند (Hammes et al. 2003; Castanier et al. 1999). باکتری‌های B. pasteurii, B. cereus and B. sphaericus از اوره به عنوان منبع انرژی تولید آمونیاک و کربنات استفاده می‌کنند (Mobley and Hausinger. 1989). اوره، pH و غلظت کربنات را در نزدیکی سلول‌های باکتری افزایش می‌دهد و با تولید Ca^{2+} و CO_3^{2}، منجر به رسوب کلسیت ($CaCO_3$) می‌شود (Hammes et al. 2003; Castanier et al. 1999; Mobley and Hausinger. 1989; Stocks-Fischer et al. 1999; Udert et al. 2003). کریستال‌های کربنات کلسیم حول ذرات خاک باندی را به وجود می‌آورد که منجر به افزایش سختی و مقاومت خاک می‌گردد. در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، از باکتری باسیلوس پاستوری استفاده شده است و کارایی فرایند MICP در بهسازی خاک ماسه‌ای سیلت دار منطقه فیروزکوه ایران در گذر زمان بررسی شده است.

۲- مواد و مصالح

۲-۱- نمونه‌های خاک

در این تحقیق از خاک ماسه‌ای سیلت‌دار فیروزکوه ایران استفاده شده است. شکل ۱ دانه‌بندی این نوع خاک را نشان می‌دهد. مطابق جدول ۱ خاک مذکور به روش یونیفاید SP-SM نام‌گذاری شده است. جداول ۲ و ۳ به ترتیب مشخصات پایه مکانیکی و پارامترهای مقاومتی این خاک را که از نتایج آزمایش‌های برش مستقیم استخراج شده است، نشان می‌دهد.

۲-۲- میکروارگانیسم

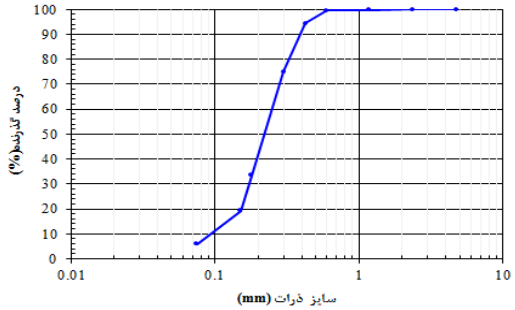
روش‌های زیست میکروبی بهسازی خاک عموماً شامل مراحل زیر می‌باشند (Noraisyah Nordin et al. 2015).

۱- هیدرولیز اوره و ایجاد یون‌های آمونیوم (NH_4^+) و کربنات (CO_3^{2-})، مطابق رابطه ۱ (لازم به ذکر است که باکتری‌ها در این فرایند نقش کاتالیزور را ایفا می‌کنند).

(۱)

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \xrightarrow{UreaseBy\ Bacteria} 2NH_4^+ + CO_3^{2-}$$

۲- یون‌های کربنات تولید شده در مرحله‌ی قبل، از طریق رابطه ۲ با یون‌های کلسیم موجود در یکی از منابع کلسیم از قبیل $CaCl_2$، $CaSO_4.2H_2O$ و ... واکنش داده و به صورت کریستال‌های کربنات کلسیم ($CaCO_3$) رسوب گذاری می‌شوند.



شکل ۱. منحنی دانه‌بندی نمونه خاک مورد مطالعه

جدول ۱. مشخصات توزیع دانه‌بندی نمونه خاک مورد مطالعه

Soil type	D_{10}	D_{30}	D_{60}	c_u	C_C
SP-SM	۰/۰۹۳	۰/۱٦	۰/۲۵	۲/٦۹	۱/۱

جدول ۲. مشخصات مکانیکی خاک مورد مطالعه.

Soil type	Gs	$\gamma_{d(\max)}(kN/m^3)$	$w_{opt}(\%)$	$LL(\%)$	$PL(\%)$	$PI(\%)$
SP-SM	۲/٦۷	۱٦/٦	۱٤/۳	۲٦	۲٤	۲

جدول ۳. پارامترهای مقاومتی خاک، برگرفته از آزمایش برش مستقیم.

Soil type	C $\left(kg/m^2\right)$	$\phi(\deg ree)$
SP-SM	۰/۰۲	۲۸/۸۳

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3 \qquad (۲)$$

تحقیقات نشان داده است که در هیدرولیز اوره به CO_2 و آمونیاک، مقدار pH و غلظت کربنات بعلت اثر کاتالیزوری آنزیم در محیط باکتریایی افزایش می‌یابد (Stocks-Fischer et al. 1999). غلظت کلسیم، غلظت محلول کربن غیرآلی و pH، فاکتورهای کلیدی انجام این فرایند شیمیایی هستند (Hammes and Verstraete. 2002). رسوب طبیعی $CaCO_3$ به علت اختلاف غلظت کلسیم و کربنات و در نتیجه تفاوت در قابلیت حل‌شدن آنها در محلول است (Seshagiri Rao et al. 2013).

یکی از راهکارهای رایج رسوب $CaCO_3$، تجزیه‌ی اوره از طریق "آلوده نمودن باکتری به اوره" (Ureolytic Bacteria) است. آنزیم اوره در یک فرایند زیست میکروبی، هیدرولیز شده و منجر به تجزیه‌ی اوره به آمونیوم، کربن غیرآلی و دی اکسید کربن می شود. آمونیاک منتشر شده در محیط، متعاقباً pH را افزایش داده و منجر به تجمیع کلسیت ($CaCO_3$) نامحلول در محیط غنی از کلسیم می‌شود. دیواره‌ی سلول باکتری، به دلیل شارژ منفی، یون‌های کلسیم را به سمت خود جذب می‌کند. با اضافه شدن اوره به باکتری، در محیط میکروبی باکتری، کربن غیرآلی محلول و آمونیوم آزاد می‌شوند. حضور یون‌های کلسیم، منجر به رسوب کربنات کلسیم بر روی قسمت‌هایی از دیواره‌ی سلول باکتری می‌شود. بعد از مدتی، کل سلول به رسوبات کربنات کلسیم آغشته می‌شود (Willem De Muynck et al. 2008).

۲-۳- محلول حاوی باکتری

به منظور مشاهده اثر کاتالیزوری باکتری بر رسوب کریستال‌های کلسیت در منافذ خاک، از باکتری Bacillus pasteurii (PTCC, 1645) از خانواده باکتری‌های باسیلوس استفاده شد. به منظور بررسی اثر غلظت محلول حاوی سلول‌های باکتری، از معیار OD_{600} (دانسیته باکتری اندازه‌گیری شده به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۰۰ nm) استفاده گردید. معیار OD_{600} از طریق رابطه ۳ مبین تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر محلول است (Ramachandran et al. 2001):

$$Y(cells/ml)=8.59\times10^7\times OD_{600}^{1.3627} \qquad (۳)$$

محلول‌های حاوی سلول‌های باکتری با غلظت (OD_{600}) ۰/۸ تا ۱/۲، بالاترین فعالیت اوره‌آز (تسریع در رابطه‌ی شماره ۱) را دارند (Stocks-Fischer et al. 1999). شاهرخی-شهرکی و همکاران (۲۰۱٤) در تحقیقات خود از سه غلظت سلول‌های باکتری B.pasteurii برابر با :

OD=0.8, 1.5, 3.0 (به ترتیب در حدود $6\times10^7, 1\times10^8, 4\times10^8$ $cells/ml$) استفاده نمودند که مبنای این انتخاب، استفاده از کران پایین محدوده غلظت بهینه معرفی شده در تحقیقات استاکس-فیشر و همکاران (۱۹۹۹) و مقادیر حدوداً ۲ و ٤ برابر آن مقدار بوده است. تحقیقات ایشان نشان از مؤثرتر بودن غلظت‌های پایین در مقایسه با غلظت‌های بالاتر سلول‌های باکتری در رسوب کلسیت است (Shahrokhi-Shahraki et al. 2014). به این ترتیب در این تحقیق کمترین و مؤثرترین غلظت سلول‌های باکتری (OD=0.8) استفاده گردید.

٢-٤- محلول حاوی مصالح سیمانی

اُکوادها و لی (٢٠١٠) با تحقیق بر ترکیب‌های متعدد Urea و Ca^{2+} (اوره با غلظت‌های 0.33 M و 0.67 M و یون کلسیم با غلظت‌های 0.0025 M، 0.025 M و 0.25 M) دریافتند که با یک غلظت مشخص سلول‌های باکتری، از میان ترکیب‌های مورد آزمایش، بهینه‌ترین ترکیب اوره و یون کلسیم مربوط به بالاترین غلظت‌ها یعنی ترکیب 0.25 M Ca^{2+} و 0.67 M Urea است (Okwadha and Li. 2010). ویفین (٢٠٠٤) با هدف تعیین بالاترین غلظت مؤثر ترکیب اوره و Ca^{2+}، چندین ترکیب هم‌مول در بازه 0.5-3.0 M را مورد آزمایش قرار داد. تحقیقات او نشان داد که تا غلظت 1.5 M، مقدار رسوب کلسیت با غلظت محلول urea-Ca^{2+} رابطه مستقیم دارد. اما غلظت‌های بالاتر از 1.5 M منجر به کاهش مقادیر رسوب کلسیت می‌شود (Whiffin. 2004). در این تحقیق به منظور تأمین منبع یون کلسیم از $CaCl_2.2H_2O$ با غلظت 0.25M و اوره با غلظت 1.00M استفاده گردید. برای ساخت غلظت‌های مذکور، به منظور تهیه محلول لازم بود وزن هر یک از مصالح تعیین گردد. وزن مصالح شیمیایی از طریق جرم مولکولی آنها قابل تعیین است. از آنجا که جرم مولکولی اوره ($(CO)(NH_2)_2$) و کلریدکلسیم دومولکول آب ($CaCl_2.2H_2O$) به ترتیب برابر با ٦٠/٠٦ و ١٤٧/٠٢ گرم بر مول (با نسبت وزن مولکولی حدوداً ٢/٤٥) بود، در تعیین وزن هر یک از این مصالح برای تهیه یک لیتر محلول مواد مغذی، به ترتیب از ٦٠/٠٦ گرم اوره و ٣٦/٧٦ گرم کلریدکلسیم دومولکول آب استفاده گردید.

٣- روش کار

٣-١- آماده سازی نمونه ها

به منظور تزریق محلول‌های حاوی باکتری (B.Pastuerii) و محلول‌های سیمانی حاوی ترکیب اوره و کلریدکلسیم دومولکول آب (Urea-Cacl2.2H2O) مطابق مراحل زیر به ترتیب از حجم ٤٥ سی سی معادل ١/٥ برابر حجم منافذ خاک (Shahrokhi-Shahraki et al. 2014) و ٣٠ سی سی معادل حجم منافذ خاک (Shahrokhi-Shahraki et al. 2014) محلول استفاده شد:

- استفاده از کاغذ صافی در وجوه بالا و پایین نمونه، بمنظور ایجاد جریان یکنواخت و جلوگیری از شسته شدن موضعی خاک.
- بستن کف قالب با استفاده از بافتی از جنس لاتکس، بمنظور امکان جلوگیری از زهکشی نمونه.
- تزریق محلول باکتری به آرامی به نمونه خاک با نرخ جریان تقریبی ٠/٤ سی سی بر دقیقه.
- قرارگیری نمونه‌های خاک حاوی محلول باکتری به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق (20±2 درجه سانتی گراد)، بمنظور اطمینان از آغشته شدن سطوح جانبی ذرات خاک با سلول های باکتری.
- جدا نمودن بافت لاتکس از کف قالب، پس از گذشت مدت زمان مذکور، با هدف اطمینان از زهکشی باقیمانده محلول باکتری از نمونه.
- تزریق محلول حاوی ترکیب اوره و کلریدکلسیم دو مولکول آب، با نرخ تقریبی ٠/٤ سی سی بر دقیقه بر روی نمونه.
- جدا نمودن بافت لاتکس از کف قالب و قرارگیری نمونه‌های خاک به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق (20±2 درجه سانتی گراد)، به منظور اطمینان از آغشته شدن سطوح جانبی ذرات خاک با محلول حاوی اوره و کلریدکلسیم دو مولکول آب.
- استفاده روزانه از افشانه آب برای حفظ شرایط رطوبتی نمونه‌ها در دوره زمانی نگهداری هر یک از نمونه‌ها قبل از انجام آزمایش.

٣-٢- رفتار MICP و تهیه محیط کشت باکتری‌ها

به منظور کشت باکتری‌های Bacillus pasteurii (PTCC 1645)، از محیط کشت جامد استفاده شده است. یک لیتر محلول کشت باکتری B.Pasteurii حاوی ٢٠ گرم عصاره گوشت و ١٠ گرم کلرید آمونیوم حل شده در آب دیونیزه شده است که برای رشد باکتری‌ها در نظر گرفته شده است (Whiffin et al. 2007). در این تحقیق بمنظور تهیه محلول حاوی سلول‌های باکتری، ٢٠٠ میلی‌لیتر محلول کشت اولیه مد نظر بود. بنابراین تصمیم گرفته شد با حل نمودن ٤

گرم عصاره‌ی گوشت و ۲ گرم کلرید آمونیوم در آب دیونیزه شده محلول کشت باکتری‌ها تهیه شود. pH محلول در این شرایط برابر با ٦/٥٤ اندازه‌گیری شد که به منظور بهینه نمودن فعالیت باکتری‌ها با اضافه نمودن تدریجی هیدروکسید سدیم ((Na(OH) ٤ مولار به عنوان یک باز قوی، pH محلول به ۸/۵ رسید. پس از تنظیم pH محلول، و به منظور جامد نمودن محیط کشت (ژله‌ای شدن محیط) از ۳ گرم آگار با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از تکمیل ساخت محیط کشت جامد، به منظور استریلیزه نمودن آن، محلول کشت را در دستگاه اتوکلاو قرار داده و بمنظور استریل نمودن آن، محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ بار قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان مذکور، محلول کشت را از دستگاه اتوکلاو خارج نموده تا با گذشت زمان، حرارت آن کمی متعادل‌تر شود. محیط کشت را زیر دستگاه هود قرار داده تا با گذشت زمان آگار موجود در محلول، محیط کشت را به آرامی جامد نماید.

همزمان با تهیه محیط کشت جامد، به ۱۰ سی‌سی محلول کشت مایع، ۱۰۰ میکرولیتر باکتری اضافه نموده و محلول حاصل را در دستگاه شیکینگ اینکوباتور قرار داده و دمای دستگاه و ویبره به ترتیب بر روی ۳۰ درجه سانتیگراد و حدود ۱۳۰ پالس تنظیم گردید. مدت زمان رشد و کشت باکتری‌ها ممکن است حدود ٢٤ ساعت به طول بی‌انجامد. لازم به توضیح است که از علائم رشد باکتری‌ها تیره رنگ شدن محلول حاوی باکتری‌ها و از دست دادن شفافیت اولیه است. در این مرحله محلول باکتری‌ها با تکنیک کشت خطی به محیط کشت جامد اضافه گردیده و محیط کشت به مدت حدوداً ٢٤ ساعت در دستگاه شیکینگ اینکوباتور تحت ویبره ۱۳۰ پالس و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شود. پس از رشد باکتری‌ها و تیره شدن محیط کشت (مطابق شکل ۲)، باکتری‌ها به محلول‌های کشت در احجام بیشتر اضافه شده و محلول‌های حاوی باکتری مطابق شکل ۳ تهیه می‌شوند.

۳-۳- آزمایش مقاومت برشی

به منظور تعیین مقاومت برشی نمونه‌های خاکی از آزمایش‌های برش مستقیم بر اساس استاندارد ASTM D3080 استفاده شد (ASTM D 3080-03). با توجه به مشخصات دستگاه، در آزمایشگاه از نمونه‌های دایره‌ای به قطر ۷۲ میلی‌متر و ضخامت ۲۰ میلی‌متر استفاده گردید.

۳-٤- برنامه آزمایشات

با تهیه ترکیب اوره و کلریدکلسیم دو مولکول آب، به ترتیب با غلظت‌های 1.00M و 0.25M و بمنظور مشاهده اثر زمان بر رسوب کلسیت در منافذ خاک ماسه‌ای (رابطه ۲)، پس از گذشت مدت زمان‌های ۳، ۷، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روز از تزریق محلول‌ها به نمونه‌های خاکی، نمونه‌ها آزمایش شدند.

شکل ۲. سمت راست: محیط کشت جامد قبل از رشد باکتری‌ها، سمت چپ: محیط کشت جامد پس از رشد باکتری‌ها

(الف) **(ب)**

شکل ۳. الف) محلول‌های حاوی محیط کشت قبل از رشد باکتری‌ها، ب) محلول‌های حاوی محیط کشت پس از رشد باکتری‌ها

٤- نتایج آزمایشات برش مستقیم

٤-۱- نتایج آزمایشگاهی و تحلیل‌ها

در این مرحله و با هدف بررسی اثر زمان بر فرایند MICPدر رسوب کریستال‌های کلسیت در منافذ خاک ماسه‌ای سیلت‌دار نتایج زیر ارائه شده است. به منظور مشاهده اثر زمان بر رسوب کریستال‌های کلسیت مطابق شکل ٤ آزمایش‌های برش مستقیم پس از گذشت ۳، ۷، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روز بر روی نمونه‌های ماسه‌ای سیلت‌دار انجام شد. همانطور

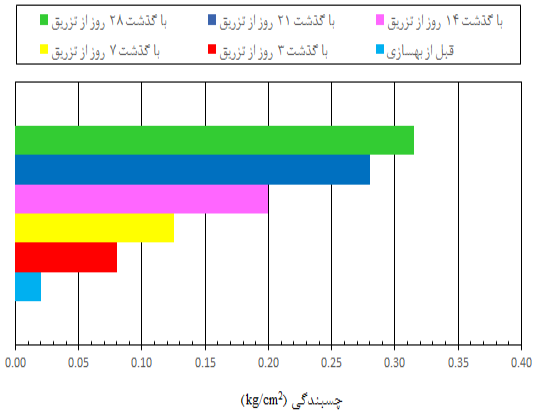
که در شکل ٥ مشاهده می‌شود بخصوص پس از ٢١ روز از بهسازی، افزایش چسبندگی خاک با گذشت زمان نرخ کاهنده دارد که این موضوع مبین پر شدن تقریبی فضای خالی بین ذرات خاک از رسوبات کلسیت و کاهش بازدهی روند بهسازی زیست میکروبی با گذشت زمان می‌باشد. جدول ٤ تحلیل مناسبی از آنچه در شکل ٥ مشاهده می‌شود را ارائه می‌دهد. مطابق جدول ٤، بیشترین درصد رشد چسبندگی خاک مربوط به ٣ روز نخست پس از تزریق بوده است که چسبندگی با رشد ٣٠٠ درصد از مقدار ٠/٠٢ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به مقدار ٠/٠٨ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع رسیده است. این موضوع را می‌توان به خالی بودن فضاهای خالی بین ذرات خاک ماسه‌ای سیلت‌دار و وجود بستر مناسب برای ایجاد پل بین ذرات توسط رسوبات کلسیت و ایجاد بافت سیمانی حاصله در فضای بین حفره‌ها نسبت داد. پس از این رشد چشم‌گیر، با کمتر شدن فضاهای خالی موجود در بین ذرات، نرخ رشد چسبندگی تا آزمایش بر روی نمونه‌های ٧ روزه از ٣٠٠ درصد تا درصد افزایش ٥٦ درصد کاهش می‌یابد. اما این روند از ٧ تا ١٤ روزگی با نرخی تقریباً افزایشی افزایش می‌یابد (افزایش نرخ رشد از ٥٦ درصد به ٦٠ درصد) که این موضوع را می‌توان به نرخ رشد بهینه باکتری‌ها در این مدت زمان و ایجاد رسوبات بیشتر کریستال‌های کلسیت نسبت داد که البته با توجه به پر شدن قسمت اعظم منافذ، این درصد قابل مقایسه با رشد ٣٠٠ درصد اولیه چسبندگی خاک نیست. گفتنی است با پایین آمدن راندمان رشد باکتری‌ها و البته با به حداقل رسیدن منافذ موجود در خاک، چسبندگی از ٢١روزگی (نرخ رشد نسبت به ١٤ روزگی به ٤٠ درصد کاهش یافته است) تا ٢٨ روزگی (نرخ رشد نسبت به ٢١ روزگی به ١٣ درصد کاهش یافته است) با نرخی کاهنده همچنان به روند افزایشی خود ادامه می‌دهد. شکل ٦ کاملاً تغییرات بوجود آمده و بافت سیمانی ایجاد شده ناشی از رسوب کریستال‌های کلسیت را پس از ٢٨ روز نشان می‌دهد.

٤-٢- اسکن میکروسکوپ الکترونی (SEM)

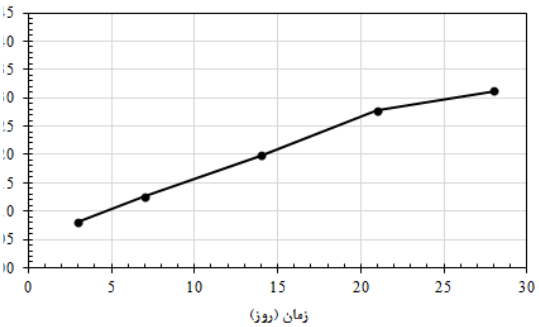
بمنظور مشاهده رسوبات کلسیت در فضای منافذ و بر روی ذرات خاک ماسه‌ای سیلت دار (SP-SM) از عکس‌های SEM استفاده شد. به منظور تهیه عکس‌های SEM از میکروسکوپ الکترونی مدل Cambridge S360 استفاده گردید. برای این منظور از بین نمونه‌های خاکی عکس‌های مربوط به نمونه‌های ٧ روزه و ٢٨ روزه با بزرگنمایی ٣٠٠ برابر مطابق شکل ٧ تهیه شد. همانطور که در این تصاویر مشاهده می‌شود، نرخ رسوبات کلسیت با گذشت زمان افزایش یافته است بطوریکه تصویر نمونه ٢٨ روزه (شکل ٧-ب) در مقایسه با تصویر نمونه ٧ روزه (شکل ٧-الف)، رسوبات کلسیت بیشتری را نشان می‌دهند به طوری که روکشی از رسوب کلسیت، علاوه بر سطح ذرات خاک، فضای خالی بین آن‌ها را نیز کاملاً پوشانده است.

جدول ٤. نتایج آزمایش برش مستقیم بر روی نمونه‌های ماسه‌ای سیلت‌دار.

زمان (روز)	چسبندگی خاک (kg/cm^2)	درصد نسبی رشد چسبندگی خاک در مقایسه با آزمایش قبل (درصد)
قبل از تزریق	٠/٠٢	-
٣ روز پس از تزریق	٠/٠٨	٣٠٠
٧ روز پس از تزریق	٠/١٢٥	٥٦
١٤ روز پس از تزریق	٠/٢٠	٦٠
٢١ روز پس از تزریق	٠/٢٨	٤٠
٢٨ روز پس از تزریق	٠/٣١٥	١٣

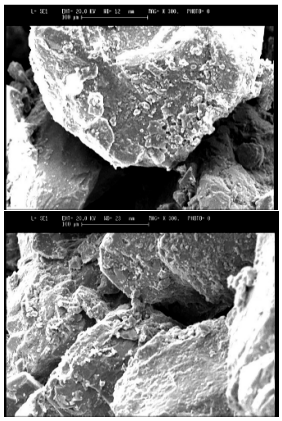


شکل ٤. اثر بهسازی زیست میکروبی بر چسبندگی خاک با گذشت زمان



شکل ۵. تغییرات نرخ رشد چسبندگی خاک ماسه‌ای سیلت‌دار با گذشت زمان در اثر بهسازی زیست میکروبی

شکل ٦. اثر بهسازی زیست میکروبی بر ایجاد چسبندگی خاک ماسه‌ای سیلت دار پس از ۲۸ روز



(الف) (ب)

شکل ۷. تصاویر SEM ماسه سیلت‌دار بهسازی شده به روش MICP؛ با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر، الف) ۷ روزه، ب) ۲۸ روزه

۵- نتیجه‌گیری

در این تحقیق با بررسی اثر زمان بر پیشرفت فرایند MICP، کارایی بهسازی خاک ماسه‌ای سیلت‌دار به روش زیست میکروبی در درازمدت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور پس از گذشت مدت زمان‌های ۳، ۷، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روز از تزریق سلول‌های باکتری باسیلوس پاستوری و مواد سیمانی حاوی اوره و منبع یون کلسیم (اوره به منظور ایجاد یون‌های آمونیوم و کربنات و منبع یون کلسیم با هدف رسوب کریستال‌های کلسیت در منافذ خاک و ایجاد بافت سیمانی در فضای بین ذرات خاک ماسه‌ای و بر روی آنها)، در نمونه‌های خاکی اخذ شده از ماسه سیلت‌دار منطقه فیروزکوه ایران، آزمایش‌های برش مستقیم بر روی آنها انجام گرفت تا روند پیشرفت بهسازی به دقت مطالعه گردد. مشاهدات بطور کلی دلالت بر بهبود چسبندگی خاک ماسه‌ای سیلت‌دار با گذشت زمان داشت. لیکن نرخ افزایش چسبندگی با گذشت سه روز نخست به شدت افزاینده، پس از یک هفته نرخ افزایش چسبندگی در مقایسه با نتایج آزمایش سه روزه کاهنده، پس از ١٤ روز نرخ افزایش چسبندگی در مقایسه با نتایج آزمایش ۷ روزه مجدداً تاحدودی افزاینده و از آن پس تا ۲۸ روزگی نرخ افزایش چسبندگی سیری کاهنده را طی نمود. علت این تغییرات نرخ رشد چسبندگی خاک از نگاه محقق: ۱- کمتر شدن منافذ خاک با توجه به رسوب کریستال‌های کلسیت به مرور زمان و ۲- تغییر در نرخ رشد باکتری‌ها در این مدت و نوسان در ایفای نقش کاتالیزوری آنها بوده است. در پایان ضمن مثبت ارزیابی نمودن این روش بهسازی در بهبود چسبندگی خاک ماسه‌ای سیلت‌دار منطقه فیروزکوه می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در صورت استفاده از روش زیست‌میکروبی در بهسازی خاک‌ها، باید فاکتور کلیدی "مدت زمان بهینه بهسازی" لحاظ گردد و از نگاه این محقق استفاده از این روش زیست‌میکروبی در بهسازی بستر راه‌ها می‌تواند بسیار مؤثر باشد.

٦- سپاسگزاری

نویسندگان این اثر از خدمات کارشناسان و پرسنل محترم دانشکده بیوتکنولوژی و دانشکده مواد دانشگاه شیراز به جهت همکاری‌های بی شائبه در فرایند کشت باکتری‌ها و در اختیار

قراردادن تجهیزات و میکروسکوپ الکترونی صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

۷- مراجع

-ASTM D 3080-03, Standard Test Method for Direct Shear Test of Soils Under Consolidated Drained Conditions, American Society for Testing and Materials.

-Castanier S, Le, Me´tayer-Levrel G & Perthuisot J., (1999), Cacarbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view. Sediment. Geol. 126, pp.9–23.

-Dejong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., and Nelson, D. C., (2010), "Bio-mediated soil improvement." Ecol. Eng., Vol. 36, No. 2, pp. 197-210.

-Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., and Siciliano, S. D., (2003), "Strain specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation" Appl. Environ. Microbiol, Vol. 69, No. 8, pp. 4901- 4909.

- Hammes, F., Verstraete,W., (2002), "Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation" Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1, pp.3–7.

- Le Metayer-Levrel ,G., Castanier, S., Orial, G., Loubiere, J.F., Perthuisot, J.P., (1999), "Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony", Sediment. Geol. 126, pp.25-34.

- M.V. Seshagiri Rao, V. Srinivasa Reddy, M. Hafsa, P. Veena and P. Anusha, (2013), "Bioengineered Concrete - A Sustainable Self- Healing Construction Material," Research Journal of Engineering Sciences ISSN 2278 – 9472 Vol. 2(6), pp.45-51.

-Mitchell, J. K. and Santamarina, J. C., (2005), "Biological considerations in geotechnical engineering." Journal Geotech. Geoenviron. Eng., Vol. 131, No. 10, pp. 1222 1233.

-Mobley HLY & Hausinger RP, (1989), "Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization", Microb. Rev. 53, pp.85–108.

-Noraisyah Nordin, Leong Sing Wong, Praveen Regunathan, (2015), "A Review On The Compressive Strength Of Biomineralized Mortar", The 3rd National Graduate Conference (NatGrad2015), University Tenaga Nasional Putrajaya Campus.

-Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V., Bang, S.S., (2001), "Remediation of concrete using micro-organisms. ACI Mater. J., 98, pp.3–9.

-Stocks-Fischer S, Galinat JK & Bang SS (1999), "Microbiological precipitation of CaCO3, Soil Biol, Biochem", 31, pp.1563–1571.

-Udert KM, Larsen TA & Gujer W., (2003), "Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems", Water Res. 37, pp.2667–2677.

-Willem De Muynck, Kathelijn Cox, Nele De Belie, Willy Verstraete, (2008), "Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete," Construction and Building Materials 22, pp.875–885.

-Dejong, J. T., Fritzges, M. B., and Nüsslein, K., (2006), "Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear." J. Geotech Geoenviron, Eng., Vol. 132, No. 11, pp. 1381-1392.

-Ho, M. H., and Chan, C. M., (2011), "Some mechanical properties of cement stabilized malaysian soft clay" World cad. Sci. Eng. Technol, Vol. 74, No., pp. 24-31.

-Huat, B. B. K., (2006), "Deformation and shear strength characteristics of some tropical peat and organic soils" Pertanika J. Sci. Technol., Vol. 14, Nos. 1-2, pp. 61-74.

-Karol, R. H., (2003), "Chemical grouting and soil stabilization", M. Dekker, New York.

-Kazemian, S., Huat, B. B. K., Prasad, A., and Barghchi, M., (2011), "A state of art review of peat geotechnical engineering perspective." Int. J. Phys. Sci., Vol. 6, No. 8, pp. 1974-1981.

-Okwadha, G. D. and Li, J., (2010), "Optimum conditions for microbial carbonate precipitation." Chemosphere, Vol. 81, No. 9, pp. 1143- 1148.

-Pichan SP. and O'Kelly BC., (2014), "Stimulated decomposition in peat for engineering applications", Proceedings of the ICE – Ground Improvement 166(3), pp.168–176.

-Shahrokhi-Shahraki, R., Zomorodian, M., Niazi, A., O'Kelly, B., (2014), "Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation".

-Whiffin VS (2004), "Microbial CaCO3 Precipitation for the Production of Biocement", PhD thesis, Murdoch University, Perth, Australia.

-Whiffin, V. S., van Paassen, L. A., and Harkes, M. P., (2007), "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique" Geo microbial, Journal, Vol. 24, No. 5, pp. 417-423.

Improvement of Cohesion of Silty Sands by Biological Microbiology (Case Study: Firouzkooh Silty Sands, Iran)

Ehsan Pakniyat, Ph.D. Student, Civil Engineering Department, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
Seyed Morteza Marandi, Professor, Department of Civil Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
Ali Niazi, Professor, Faculty of Agriculture Engineering, Biotechnology School and Material Engineering, School of Shiraz University, Shiraz, Iran.

ehsan.pakniyat@yahoo.com

Received: September 2020-Accepted: January 2021

ABSTRACT
Nowadays, construction on problematic soils is inevitable owing to the growing scarcity of land worldwide. Problematic soils are commonly characterized by low strength and high compressibility. Thus, the mechanical properties of these soils should be improved. In recent years the researchers have attempted to present approaches based on environmental measurements. One of the methods recently considered in the improvement of sandy soils, is Microbial-Induced Calcite Precipitation (MICP). In order to accelerate the MICP process, it is possible to improve the soil structure cementation and soil engineering properties by creating Urea microorganism. In order to do this, a solution containing bacterial cell and cementation is required which includes urea and one of the Calcium ion sources such as $CaSO_4.2H2O$, $CaCl_2$. 2H2O, $CaCl_2$. In this paper, in order to accelerate the calcite precipitation, a Bacillus bacterium called Bacillus Pasteurii is used as catalyzer of this chemical reaction. In order to investigate the effectiveness of time factor on improving cohesion of silty sand from Firouzkooh city, Iran, an experimental study consisting of 5 direct shear tests were performed. The time taken for the experiments was 3, 7, 14, 21 and 28 days from MICP. The results of this research demonstrated that, over time, cohesion of improved silty sandy soils increased by bio-microbial method. This indicates the role of the growth of bacterial cells and accelerates the progress of the MICP process and the precipitation of calcite crystals in the pores. The results from scanning electron microscope (SEM) confirmed this finding. SEM images indicated that the rate of calcite precipitation increases with time. However, the rate of growth of bacteria depends on their amount of optimal growth or volume of residual pores of the soil that can be decreasing or increasing.

Keywords: Bacillus Pasteurii, Cohesion, Microbial-Induced Calcite Precipitation (MICP), Soil Improvement