

اثر محیط منفرد و مختلط بیولوژیکی بر خواص مکانیکی - هیدرولیکی ماسه‌بادی

مرتضی خالقی^۱، محمدعلی روشن‌ضمیر^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری مهندسی ژئوتکنیک، دانشکده مهندسی عمران، دانشگاه علم و صنعت ایران
^۲ دانشیار مهندسی ژئوتکنیک، دانشکده مهندسی عمران، دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت: ۱۳۹۷/۲/۷، پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۸، نشر آنلاین: ۱۴۰۰/۲/۸

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های نوین بهسازی برای اصلاح و بهبود خواص ژئوتکنیکی خاک‌ها مورد توجه ویژه قرار گرفته است. در همین راستا بهسازی بیولوژیکی روشی خلاقانه می‌باشد که با استفاده از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و شبکه واکنش‌های بیوشیمیایی باعث بهبود خواص هیدرولیکی و مقاومتی خاک می‌گردد. در این مقاله، بهسازی خاک ماسه‌ای با استفاده از محیط کشت‌های منفرد و مختلط ارزیابی گردیده است. نتایج آزمایشات نشان داد که مقاومت تک‌محوری خاک بهسازی‌شده توسط کشت‌های منفرد و مختلط به ترتیب ۱۳۹۱ کیلوپاسکال و ۱۶۹۰/۳ کیلوپاسکال می‌باشد که افزایش قابل توجهی نسبت به خاک بهسازی‌نشده را نشان می‌دهد. همچنین نتایج نشان داد که مقاومت تک‌محوری و مدول الاستیسیته خاک بهسازی‌شده در حالت کشت مختلط نسبت به کشت منفرد به ترتیب ۲۳٪ و ۸۲٪ افزایش یافته است. نتایج آزمایش نفوذپذیری نیز عملکرد بهتر کشت مختلط را نسبت به کشت منفرد در کاهش نفوذپذیری به میزان ۳۴٪ را نشان می‌دهد. همچنین نفوذپذیری خاک بهسازی‌نشده به ترتیب نسبت به شرایط منفرد و مختلط ۷۷/۳٪ و ۸۶/۸٪ کاهش یافته است.

کلیدواژه‌ها: بهسازی بیولوژیکی، کشت منفرد و مختلط، مقاومت تک‌محوری، نفوذپذیری.

۱- مقدمه و پیشینه تحقیق

سالانه بیش از ۴۰۰۰۰ پروژه بهسازی زمین به‌طور عمومی در دنیا انجام می‌گیرد، که هزینه‌ای بالغ بر ۶ بلیون دلار آمریکا در پی دارد (Dejong و همکاران، ۲۰۱۰). بسیاری از روش‌های بهسازی زمین که به‌طور عمومی به‌کار برده می‌شود که شامل مصرف انرژی مکانیکی و هم افزودن مواد ساخته‌شده توسط انسان به داخل خاک می‌باشد که هر دو گزینه به‌طور ذاتی دارای هزینه‌های مصرف انرژی بالایی می‌باشند. سیمانی‌شدگی مصنوعی با استفاده مواد پسماند، آهک و یا آنچه که در هنگام استفاده از سیمان پرتلند در تزیق‌های سیمانی صورت می‌گیرد، شامل افزودن موادی با خاصیت قلیایی بالا به خاک می‌باشد که باعث آلودگی خاک می‌گردد (Ozdogan, ۲۰۱۰; Goodarzi, ۲۰۱۹). بسیاری از دوغاب‌های شیمیایی نیز که به‌طور عمومی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سمی بوده و ممکن است دارای تأثیرات جدی و مهمی بر روی سلامت انسان و محیط‌زیست داشته

باشند (Karol, ۲۰۰۳). بنابراین وجود چنین مشکلات و ایراداتی، نیاز به ایجاد و توسعه روش‌های جدید و جایگزین روش‌های سنتی را ایجاد می‌کند.

در اوایل دهه ۱۹۸۰، در طول تجاری‌سازی سکوی گازی فلات قاره شمال غرب استرالیا مشکلی در شالوده به‌وجود آمد و مهندسان پی بردند که شمع‌ها به‌اندازه کافی توسط نهشته‌های محیطی مقید نشده است. در همین راستا پرایس^۱ بر روی ساختار و رفتار تغییر شکل نهشته‌های کربناتی در زیر سکو مطالعه کرد و در سال ۱۹۸۷ به فرآیند رسوب کلسیت^۲ رسید (Palmén, ۲۰۱۲). باکتری مناسب جهت فرآیند تشکیل رسوب کلسیت باید قادر به هیدرولیز کردن اوره باشد و معمولاً گرم مثبت و اوره‌آز هستند. در مجموع این باکتری‌ها عموماً از گونه‌های، باسیلوس^۳، اسپروسارسینا^۴، اسپولوکتوباسیلوس^۵، کلوستریدیوم^۶ و در نهایت

4. Sporosarcina
5. Spolactobascillus
6. Clostridium

1. Price
2. Calcite
3. Bacillus

* نویسنده مسئول؛ شماره تماس: ۰۹۱۳-۳۱۶۳۳۳۹

آدرس ایمیل: mortezakhaleghi88@gmail.com (م. خالقی)، mohamali@cc.iut.ac.ir (م. ع. روشن‌ضمیر).

گونه دسوفتوماکوم^۷ هستند (Kucharski و همکاران، ۲۰۰۸).
Stocks-Fischer و همکاران (۱۹۹۹) میزان ماده مغذی جهت رشد و فعالیت اوره‌آزی باکتری را 3g/L گزارش کرده‌اند. این میزان ماده مغذی باکتری را در طول فرآیند رسوب کلسیت تا رسیدن به سطح مطلوبی از بهسازی فعال نگه می‌دارد. استفاده از روش رسوب بیولوژیکی کلسیت (CaCO_3) جهت بهسازی خاک به مواد مغذی، نوع باکتری، غلظت سلول‌های باکتری، توزیع تثبیت باکتری در خاک، دما، غلظت محلول سیمانی، پی‌اچ^۸ و نحوه تزریق بستگی دارد (Wei و همکاران، ۲۰۱۲).

Nemati و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از نوعی باکتری نفتی و بررسی غلظت‌های محلول‌های باکتری و سیمان‌تسیون^۹ نفوذپذیری خاک ماسه‌ای را کاهش دادند. در پژوهش دیگری DeJong و همکاران (۲۰۰۶) بهسازی بیولوژیکی را با استفاده از آزمایش موج برشی بر روی نمونه‌هایی با نسبت ارتفاع به قطر ۱:۱ و ۲:۱ بررسی کردند و نشان دادند که با افزایش زمان سرعت موج برشی نیز افزایش می‌یابد.

Whiffin و همکاران (۲۰۰۷) بهسازی بیولوژیکی را توسط آزمایشات سه‌محوری زهکشی‌شده و نفوذپذیری با بار ثابت موردبررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که مقاومت خاک بهسازی‌شده به 570 کیلوپاسکال افزایش یافته است و نفوذپذیری نیز به حد قابل توجهی کاهش پیدا کرده است به نحوی که تخلخل خاک 90% کاهش یافته است.

Barkouki و همکاران (۲۰۱۰) روش تزریق را بر روی خاک ماسه‌ای بررسی کردند. آن‌ها دو روش تزریق، پیوسته و دوره‌ای را برای محلول سیمانی در نظر گرفتند. آن‌ها نشان دادند که تزریق در حالت دوره‌ای رسوب کلسیت یکنواختی در طول ستون‌ها نسبت به تزریق پیوسته از خود به‌جا می‌گذارد. این نتیجه در شرایط تزریق در خلاف جهت تزریق باکتری نیز صادق است.

Soon و همکاران (۲۰۱۳) بهسازی بیولوژیکی را با استفاده از باکتری باسیلوس مگاتریوم^{۱۰} روی دو نوع خاک برجا و ماسه‌ای بررسی کردند. آن‌ها پس از کشت باکتری و مخلوط کردن آن با خاک، محلول سیمانی را که شامل اوره و کلرید کلسیم بود به خاک تزریق کردند. آن‌ها نمونه‌هایی به قطر 50 میلی‌متر از خاک برجا جهت آزمایش تک محوری و 60×60 میلی‌متر از خاک ماسه‌ای جهت آزمایش برش مستقیم آماده کردند همچنین با انجام آزمایشات نفوذپذیری با بار آبی ثابت و افتان نشان دادند که علاوه بر افزایش مقاومت تک‌محوری و برشی خاک بهسازی‌شده، نفوذپذیری نیز کاهش می‌یابد.

Shahrokhi-Shahraki و همکاران (۲۰۱۴) بهسازی بیولوژیکی را بر روی دو نوع ماسه که در دسته ماسه بد دانه‌بندی شده قرار داشتند، موردبررسی قرار دادند. آن‌ها با تغییر در غلظت محلول سیمانی و محلول باکتری، مقاومت تک‌محوری و نفوذپذیری ستون‌های ماسه‌ای را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که مقاومت تک‌محوری خاک بهسازی‌شده افزایش و نفوذپذیری آن کاهش یافته است.

Sidik و همکاران (۲۰۱۴) بهسازی بیولوژیکی را بر روی دو نوع خاک آلی و ماسه‌ای بررسی کردند. آن‌ها نمونه‌هایی به ابعاد $2 \times 6 \times 6$ سانتی‌متر را به مدت ۴ روز در محلول باکتری (باکتری، اوره و کلسیم کلراید^{۱۱}) غرقاب کردند. آن‌ها پی‌اچ محیط واکنش را موردبررسی قرار دادند و گزارش کردند این مقدار بین ۹ و $9/4$ نوسان می‌کند.

Canakci و همکاران (۲۰۱۵) اثر رسوب بیولوژیکی کلسیت را روی مقاومت فشاری و برشی خاک آلی بررسی کردند. آن‌ها با تزریق ثقلی محلول باکتری به داخل نمونه‌ها پس از ۴ روز، مقاومت برشی و فشاری نمونه‌های بهسازی‌شده و بهسازی‌نشده را تعیین نمودند.

Grabiec و همکاران (۲۰۱۵) اثر دوغاب بیولوژیکی روی مقاومت سه‌محوری خاک سیلتی متراکم‌شده ارزیابی کردند. آن‌ها نشان دادند که نمونه‌های بهسازی‌شده توسط محلول باکتری باعث افزایش صلبیت خاک سیلتی و مقاومت سه‌محوری آن می‌گردد. نتایج نشان داد که رسوب بیولوژیکی کلسیت باعث افزایش مقاومت فشاری و برشی نمونه‌های بهسازی‌شده نسبت به بهسازی‌نشده می‌گردد.

Sharma و همکاران (۲۰۱۶) تغییرات غلظت باکتری، غلظت محلول سیمانی و زمان عمل‌آوری را روی مقاومت تک‌محوری دو نوع رس با فشردگی متوسط و زیاد را بررسی کردند. نتایج نشان داد که مقاومت تک‌محوری نمونه‌های بهسازی‌شده $1/5$ تا $2/9$ برابر رس بهسازی‌نشده می‌باشد، همچنین با افزایش زمان عمل‌آوری، مقاومت تک‌محوری نیز افزایش می‌یابد.

Zamani و همکاران (۲۰۱۶) میزان نفوذپذیری ماسه را در سطوح مختلف سیمانی‌شدگی بیولوژیکی به صورت عددی و آزمایشگاهی بررسی کردند. آن‌ها سطوح مختلف سیمانی‌شدگی را توسط آزمایش موج برشی تعیین کردند و نتایج نشان داد که با افزایش سطح سیمانی‌شدگی، نفوذپذیری ماسه کاهش می‌یابد.

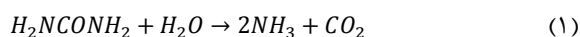
Azadi و همکاران (۲۰۱۷) اثر بهسازی بیولوژیکی با باکتری باسیلوس پاستوری را روی ماسه بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند

7. Desulfotomaculum
8. PH
9. Cementation

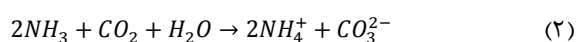
10. B. Megaterium
11. Calcium chloride

وابسته نیست (Rivadeneira و همکاران، ۱۹۹۴). شبکه واکنش بیو-شیمیایی در حضور اوره و کلرید کلسیم در خاک رخ می‌دهد و باعث افزایش خاصیت قلیایی خاک می‌شود که در طی آن رسوب کربنات کلسیم تشکیل شده و باعث چسبندگی ذرات به یکدیگر می‌شود (Rodrigues و Okyay، ۲۰۱۴). این روش به‌طور کلی شامل مراحل زیر می‌باشد:

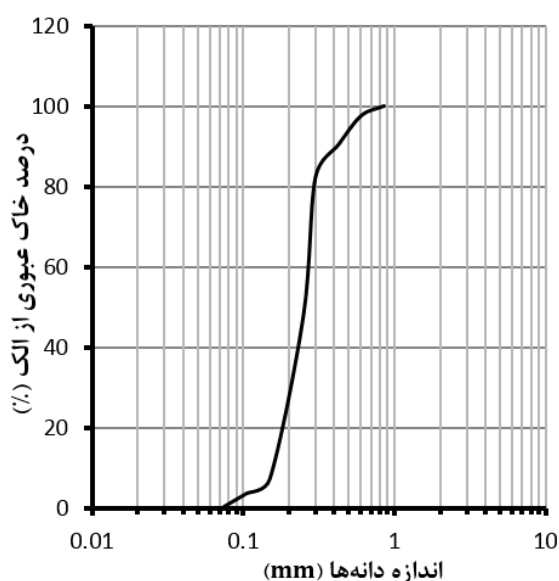
الف) اوره به‌وسیله باکتری‌های اوره‌آز هیدرولیز شده و کربن دی‌اکسید و آمونیاک تولید می‌شود.



ب) یون‌های آمونیاک و کربن دی‌اکسید در حضور آب به آمونیوم و یون کربنات تبدیل می‌شوند.



ج) یون کربنات تشکیل شده با یون کلسیم واکنش داده و بلورهای کلسیم کربنات رسوب می‌کنند.



شکل ۱- نمودار دانه‌بندی خاک ماسه‌ای مورد استفاده

که چسبندگی و زاویه اصطکاک داخلی ماسه بهسازی شده به ترتیب ۷۳۶ کیلوپاسکال و ۶۵ درجه افزایش می‌یابد.

Pakbaz و همکاران (۲۰۱۸) ماسه بد دانه‌بندی را با روش رسوب بیولوژیکی کلسیت تثبیت کردند. نتایج آزمایشات آن‌ها نشان داد که پارامترهای مقاومتی نمونه‌های بهسازی شده افزایش یافته است به طوری که چسبندگی و زاویه اصطکاک داخلی به ترتیب ۲۱/۳ کیلوپاسکال و ۳۹ درجه رسیده است.

مطالعه حاضر جهت ارزیابی عملکرد بهسازی بیولوژیکی ماسه‌بادی که یکی از مسئله‌دارترین انواع خاک‌ها می‌باشد صورت گرفته است. همچنین شرایط بیولوژیکی در دو حالت منفرد و مختلط توسط سه میکروارگانیسم در فرآیند بهسازی خاک ماسه‌ای ارزیابی گردیده است تا عملکرد هر یک از محیط‌های منفرد و مختلط در تثبیت ماسه‌بادی مورد بررسی قرار گیرد.

۲- نحوه تشکیل رسوب کلسیت (CaCO₃)

سیستم بهسازی بیولوژیکی خاک به یک شبکه وسیعی از واکنش‌های شیمیایی که داخل خاک رخ می‌دهد وابسته است و توسط این واکنش‌ها کنترل می‌گردد. محصولات فرعی حاصل از این واکنش‌ها باعث تغییر خواص مهندسی خاک می‌گردد. فعالیت بیولوژیکی باعث کنترل و مدیریت زمان، نرخ و توزیع واکنش شبکه شیمیایی و در نتیجه تولید محصولات فرعی لازم جهت بهبود خواص خاک می‌گردد. زمانی که فرآیند زیستی رخ دهد فرآیندهای شیمیایی از قبیل رسوب غیرآلی، رسوب آلی و گاز فرآوری می‌توانند به صورت کانی زیستی، بیوفیلم^{۱۲} و بیوگاز^{۱۳} به ترتیب در نظر گرفته شوند (Dejong و همکاران، ۲۰۱۰). شبیه سایر فرآیندهای کانی‌سازی زیستی تشکیل رسوب کلسیم کربنات (CaCO₃) توسط دو مکانیزم امکان پذیر می‌باشد: کنترل بیولوژیکی و القاشدگی بیولوژیکی. در روش کنترل بیولوژیکی، ارگانیسم فرآیند را کنترل می‌کند به عبارتی تشکیل و رشد ذرات معدنی تا یک درجه بالا توسط ارگانیسم انجام می‌شود (Lowenstan و Weiner، ۱۹۸۸).

ارگانیسم، مواد معدنی را به صورت مستقل از شرایط محیطی و به شکلی که منحصر به گونه خودش می‌باشد تولید می‌کند. رسوبات سیلیکاتی در جلبک‌های تک سلولی و دیاتوم‌ها^{۱۴} همچنین به شکل مگنتیت^{۱۵} در باکتری‌های مغناطیسی، نمونه‌هایی از این روش می‌باشند (Muynck و همکاران، ۲۰۱۰). با این حال کلسیم کربنات تولید شده توسط باکتری عموماً به صورت "القاشدگی" می‌باشد، که به صورت گسترده‌ای به شرایط محیطی وابسته است و به هیچ ساختار گونه‌ای و مکانیزم مولکولی منحصر به فردی

14. Magnetite
15. Diatoms

12. Bio-film
13. Bio-gas

گرم‌خانه‌گذاری با رشد باکتری و مشاهده کدورت و بررسی عدم آلودگی، صحت به‌کاررفته ارزیابی گردید.

۳-۴- آماده‌سازی محلول باکتریایی

به‌منظور آماده‌سازی محلول جهت انجام آزمایش‌ها بایستی محیط کشت مایع تهیه‌شده برداشت (جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت) گردد (Shahrokhi-Shahraki و همکاران، ۲۰۱۴). برای جداسازی محیط کشت به این صورت عمل گردید که در هر مرحله ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سلول‌های باکتریایی داخل ۴ عدد فالکون^{۲۴} ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به‌منظور جداسازی توده باکتریایی، سانتریفیوژ^{۲۵} گردید. پس‌ازاین مرحله، محلول شفاف در قسمت بالایی لوله دور ریخته شده و توده جامد باکتری که در کف لوله باقی‌مانده بود، توسط سدیم‌فسفات ۰/۱ مولار در دو مرحله شستشو داده می‌شود تا مواد متابولیکی حاصل از فعالیت متابولیسمی باکتری از بین بروند. پس‌از آن توده باکتری شسته‌شده به درون محلول نوترینت برات^{۲۶} - اوره^{۲۶} که مواد تشکیل‌دهنده آن در جدول (۲) نشان داده شده است، ریخته می‌شود تا محلول باکتری آماده گردد. جهت تعیین غلظت باکتری‌ها در محلول باکتریایی از واحدی به‌نام چگالی نوری استفاده می‌شود. این واحد معرف میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر می‌باشد. جهت اندازه‌گیری چگالی نوری از دستگاهی به‌نام اسپکتروفوتومتر^{۲۷} استفاده می‌گردد که در شکل (۲) نشان داده شده است. بنابراین جهت تعیین غلظت به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان نور (OD₆₀₀) محلول موردنظر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. بدین منظور مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول موردنظر داخل ظرف (ویال) مخصوص دستگاه اسپکتروفوتومتر ریخته و درون آن قرار داده می‌شود. همچنین از محلول نوترینت برات^{۲۸} - اوره^{۲۸} به عنوان محلول شاهد و هم به‌منظور رقیق کردن محلول باکتریایی استفاده می‌گردد.

جدول ۲- ترکیبات و شرایط محلول باکتری

مقدار	نوع ماده
۳ گرم در هر لیتر آب مقطر	نوترینت برات (NB)
۲۰ گرم در هر لیتر آب مقطر	اوره
۱۰ گرم در هر لیتر آب مقطر	آمونیم کلراید (NH ₄ Cl)
۲/۱۲ گرم در هر لیتر آب مقطر	سدیم بی‌کربنات (NaHCO ₃)
۵/۸	پی‌اچ (pH)

جدول ۱- خصوصیات خاک ماسه‌ای مورد استفاده

ویژگی	مقدار
D ₁₀ (mm)	۰/۱۸
D ₃₀ (mm)	۰/۲۱
D ₆₀ (mm)	۰/۲۷
ضریب یکنواختی (C _u)	۱/۵۰
ضریب خمیدگی (C _c)	۰/۹۲
رطوبت بهینه	۰/۱۶
نوع خاک بر مبنای آشتو ^{۱۶}	A-3
نوع خاک بر مبنای یونیفاید ^{۱۷}	SP
چگالی ذرات جامد خاک (G _s)	۲/۷۰
وزن مخصوص حداکثر (G _{max})	۱/۷۴
بیشینه نسبت تخلخل (e _{max})	۰/۷۸
بیشینه نسبت تخلخل (e _{min})	۰/۶۰

۳-۲- میکروارگانیزم‌ها

در پژوهش حاضر از دو گونه باکتریایی استفاده گردید است که گونه‌های مورد استفاده از خانواده باسیلوس‌ها می‌باشند. گونه باسیلوس پاستوری^{۱۸} قادر به هیدرولیز اوره می‌باشد، این گونه از مرکز فارچ و باکتری صنعتی ایران به‌صورت پودر لیوفیلیزه^{۱۹} تهیه شده است. گونه دوم نیز با نام باسیلوس سابتیلیس^{۲۰} که اوره‌آز نمی‌باشد جهت استفاده در کشت مختلط و بررسی کارایی آن در نرخ هیدرولیز اوره مورد استفاده قرار گرفت. گونه مذکور به‌صورت کشت مایع از پژوهش‌شده زیست‌فناوری دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شده است.

۳-۳- نگهداری طولانی مدت جدایه‌های باکتریایی

جهت نگهداری طولانی مدت، جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در محیط کشت لوریا باروس^{۲۱} مایع استریل تلقیح شدند و پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای هرگونه باکتری، ۸۵۰ میکرولیتر از کشت‌های فوق به لوله‌های اپندورف^{۲۲} حاوی ۱۵۰ میکرولیتر از گلیسرول^{۲۳} خالص استریل منتقل شدند و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردیدند. پس از انجماد، لوله‌های مذکور در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند (Haj Mostafas, ۲۰۱۰). به‌منظور اطمینان از فعال بودن باکتری‌هایی که با این روش منجمد شده‌اند، به‌صورت تصادفی نمونه‌ای از فریزر خارج و پس از رفع انجماد، محتویات آن روی محیط کشت لوریا باروس مایع کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت

23. Glycerol
24. Falcon
25. Centrifugus
26. Nutrient broth-urea
27. Spectrophotometer
28. Nutrient Broth-Urea

16. AASHTO
17. Unified
18. B. pasteurii-PTCC 1645
19. Lyophilization
20. B. Subtilis-ATCC 6633
21. Luria broth
22. Ependorf

در ساعت تزریق شدند و پس از گذشت ۱۲ ساعت، ۱۷v محلول سیمانتهسیون دیگر نیز به نمونه‌ها تزریق گردید. نمونه‌ها در این شرایط دارای وزن مخصوص خشک $1/63 \text{ gr/cm}^3$ و تراکم نسبی ۶۷٪ می‌باشند. نحوه تزریق در شکل (۳) به صورت شماتیک نشان داده شده است. در این روش محلول سیمانی به صورت ثقلی و از بالای نمونه‌ها تزریق می‌شود و نرخ جریان به وسیله یک شیر، کنترل می‌گردد و لذا می‌توان پمپ پرستالتیک^{۳۱} را از سیستم تزریق حذف کرد. با اتمام آخرین مرحله تزریق محلول سیمانتهسیون، نمونه‌ها یک شبانه‌روز در حالت اشباع درون قالب نگهداری شدند و پس از آن قالب‌ها از سیستم تزریق جدا شده و به مدت ۷ روز در محیط با دمای $25 \pm 3^\circ\text{C}$ نگهداری شدند. با پایان یافتن مدت عمل‌آوری، نمونه‌های بهسازی شده مورد نیاز به منظور انجام آزمایش تک‌محوری، توسط جک مخصوص از درون قالب‌ها بیرون آورده شدند پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه قرار داده شدند تا علاوه بر توقف فرآیند رسوب کلسیت، قوام کافی را جهت آزمایش تک‌محوری به دست بیاورند.

شکل (۴) نمونه‌های تزریق شده و عمل‌آوری شده را نشان می‌دهد. همچنین آزمایش نفوذپذیری بار آبی افتان نیز جهت تعیین ضریب نفوذپذیری انجام شده است.



شکل ۲- دستگاه اسپکتروفوتومتر

در پژوهش حاضر براساس پژوهش‌های پیشین، میزان چگالی نوری باکتریایی برابر ۱/۱ در نظر گرفته شد. چگالی نوری انتخاب شده براساس رابطه (۴) معادل 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر محلول می‌باشد (Maier و همکاران، ۲۰۰۹ - Shahraki و همکاران، ۲۰۱۴).

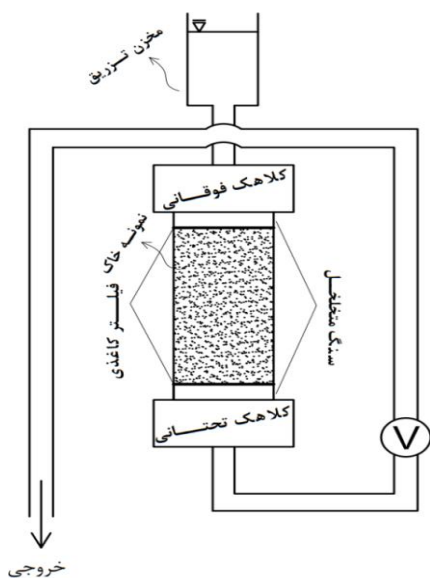
$$Y = 8.59 \times 10^7 \times OD_{600}^{1.3627} \quad (4)$$

۳-۵- آماده‌سازی محلول سیمانتهسیون

اوره یا کاربامید^{۲۹} یک ترکیب آلی می‌باشد و کلرید کلسیم نیز در فرایند رسوبدهی میکروبی کلسیت برای تأمین یون‌های کلسیم مورد نیاز برای انجام واکنش استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر پس از انجام آزمایشات اولیه غلظت اوره و کلسیم کلراید به ترتیب ۲ و ۱ مولار در نظر گرفته شد. با توجه به وزن مولکولی و غلظت مورد نیاز میزان اوره و کلسیم کلرید محاسبه گردید و پس از انحلال در آب مقطر توسط آب مقطر به حجم رسانده شد. در این حالت محلول حاصل، محلول سیمانتهسیون (سیمانی) نامیده می‌شود.

۳-۶- آماده‌سازی نمونه‌ها

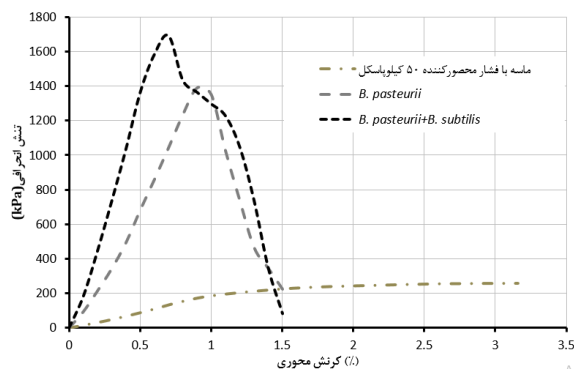
جهت آماده‌سازی نمونه‌های خاکی، با توجه به حجم قالب مقدار ۲۸۲ گرم خاک خشک با ۱۷v (۶۰ میلی‌لیتر) از محلول باکتریایی و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سیمانتهسیون به طور کامل مخلوط گردید و سپس درون قالب‌هایی به قطر ۴۷ میلی‌متر و طول ۱۰۰ میلی‌متر با نسبت طول به قطر ۲/۱ ریخته شد. سپس قالب‌ها توسط واشر اورینگ^{۳۰} آب‌بندی شدند. پس از آب‌بندی، نمونه‌ها توسط ۱۷v از محلول سیمانتهسیون با سرعت تقریبی ۹۰ میلی‌لیتر



شکل ۳- قالب و نحوه تزریق نمونه‌ها

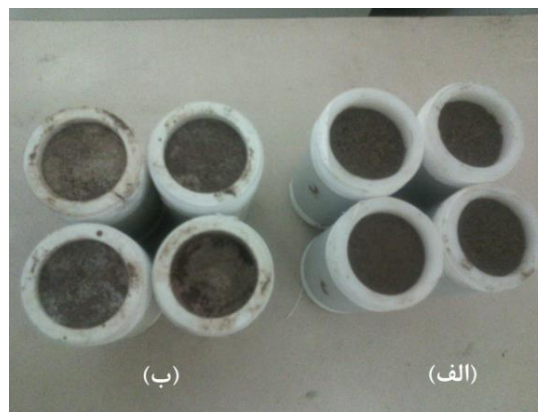
31. Peristaltic pump

29. Hydrogen peroxide-urea
30. O-ring



شکل ۵- نمودار تنش-گرنش برای حالت *B. pasteurii* و *B. pasteurii+B. subtilis*

از طرفی نمونه‌های بهسازی‌شده در شرایط محصورنشده (تک‌محوری) قرار گرفته‌اند درحالی‌که نمونه ماسه‌ای در شرایط سه‌محوری زهکشی‌نشده (UU) با فشار محصورکننده ۵۰ کیلوپاسکال مورد ارزیابی قرار گرفته است، لذا احتمالاً با توجه به وجود فشار محصورکننده، مقاومت پسماند در شرایط بهسازی‌نشده بیشتر از شرایط بهسازی‌شده می‌باشد. به‌کارگیری مقاومت سه‌محوری زهکشی‌نشده (UU) در فشار محصورکنندگی پایین (۵۰ کیلوپاسکال) در نمونه‌های بهسازی‌نشده به دلیل عدم اعتبار مقاومت تک‌محوری در نمونه‌های ماسه‌ای و همچنین مقایسه نسبی با مقاومت تک‌محوری نمونه‌های بهسازی‌شده صورت گرفته است. با توجه به شکل (۵) از گرنش ۱/۵٪ به بعد مقاومت حالت بهسازی‌نشده از حالت بهسازی‌شده بیشتر است، این امر می‌تواند به این دلیل باشد که شکل‌پذیری نمونه بهسازی‌شده نسبت به بهسازی‌نشده کم‌تر می‌باشد به‌گونه‌ای که در یک مقاومت فشاری یکسان گرنش حالت بهسازی‌نشده بیشتر از حالت بهسازی‌شده می‌باشد. همچنین نمونه‌های بهسازی‌شده در حالت خشک تحت آزمایش تک‌محوری قرار گرفته‌اند که فاقد فشار محصورکننده است درحالی‌که نمونه بهسازی‌نشده در شرایط تراکم استاندارد (بیشینه فشردگی و رطوبت بهینه) تحت آزمایش سه‌محوری زهکشی‌نشده (UU) قرار گرفته‌اند. مدول الاستیسیته نیز پارامتری است که مبین تمایل مصالح به تغییرشکل در راستای نیروی وارد بر آن می‌باشد. شکل (۶) مدول الاستیسیته متناظر با خاک ماسه‌ای و خاک بهسازی‌شده را نشان می‌دهد. علت افزایش مدول الاستیسیته در ترکیب مختلط نسبت به منفرد، مقاومت تک‌محوری بیشتر در عین گرنش گسیختگی کم‌تر در حالت مختلط نسبت به منفرد می‌باشد. این امر به دلیل سخت شدن نمونه بهسازی‌شده توسط کشت مختلط می‌باشد که ناشی از رسوب کلسیت بیشتر در حالت مختلط نسبت به منفرد می‌باشد. شکل (۷) نحوه شکست نمونه‌های بهسازی‌شده توسط *B. pasteurii* و *B. pasteurii+B. subtilis* را



شکل ۴- نمونه‌های: الف) تزریق‌شده، ب) عمل‌آوری شده

۴- بحث و تحلیل نتایج

۴-۱- آزمایشات تک‌محوری و سه‌محوری

نمودار ارائه‌شده در شکل (۵) تغییرات تنش محوری وارده بر نمونه را با افزایش گرنش محوری برای ماسه‌بادی بهسازی‌نشده و دو محیط کشت منفرد و مختلط (دوگانه) که به ترتیب عبارت‌اند از: *B. pasteurii* و *B. pasteurii+B. subtilis* را نشان می‌دهد. همچنین جدول (۳) میانگین نتایج به دست آمده حاصل از حداقل سه تکرار در آزمایشات را گزارش می‌کند. با توجه به شکل (۵) و نتایج آزمایشات تک‌محوری روی ماسه بهسازی‌شده و سه‌محوری روی ماسه‌بادی می‌توان دریافت که بهسازی بیولوژیکی در هر دو حالت کشت منفرد و مختلط باعث افزایش مقاومت خاک ماسه‌ای می‌گردد. همچنین حداکثر مقاومت کشت منفرد *B. pasteurii* برابر با ۱۳۹۱ کیلوپاسکال و همچنین مقدار متناظر آن برای کشت مختلط *B. pasteurii+B. subtilis* برابر با ۱۶۹۰/۳ کیلوپاسکال به دست آمده است. با توجه به مقادیر حداکثر مقاومت واضح است که کشت مختلط عملکرد بهتری نسبت به کشت منفرد داشته است، این عملکرد بهتر ناشی از حضور باکتری *B. subtilis* می‌باشد که نرخ فعالیت اوهرآزی را بالا برده و باعث تولید بیشتر رسوب کلسیت در بین دانه‌های خاک نسبت به کشت منفرد شده است. با توجه به شکل (۵) نمونه‌های بهسازی‌شده مقاومت پسماند اندکی نسبت به نمونه‌های خاک ماسه‌ای مشاهده گردیده است که این کاهش می‌تواند به این دلیل باشد که نمونه‌های بهسازی‌شده به‌طور کامل خشک شده‌اند درحالی‌که نمونه‌های ماسه‌ای در شرایط تراکم استاندارد (بیشینه فشردگی و رطوبت بهینه) مورد آزمایش قرار گرفته‌اند.

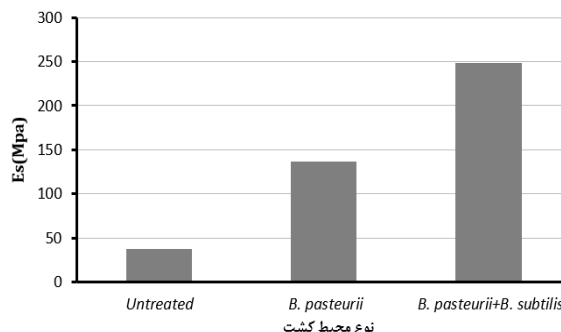
شده است نسبت به افق تقریباً دارای زاویه $45 + \phi/2$ می‌باشد. امتداد صفحه گسیختگی نسبت به افق به شرایط مرزی نمونه‌ای که بین دو سطح دستگاه قرار گرفته است وابسته می‌باشد به گونه‌ای که هر چه اصطکاک بین سطح خاک و میله بارگذاری کم‌تر باشد خطا کم‌تر می‌باشد. این شرایط برای نمونه‌های بهسازی نشده نیز صادق می‌باشد به طوری که نمونه‌های ماسه‌ای در شرایط تراکم استاندارد تحت آزمایش سه‌محوری قرار گرفته‌اند لذا شکست در این نمونه‌ها با توجه به بیشینه تراکمی که دارند به صورت قطری و در راستای ضعیف‌ترین صفحه رخ می‌دهد.

۴-۲- آزمایش نفوذپذیری

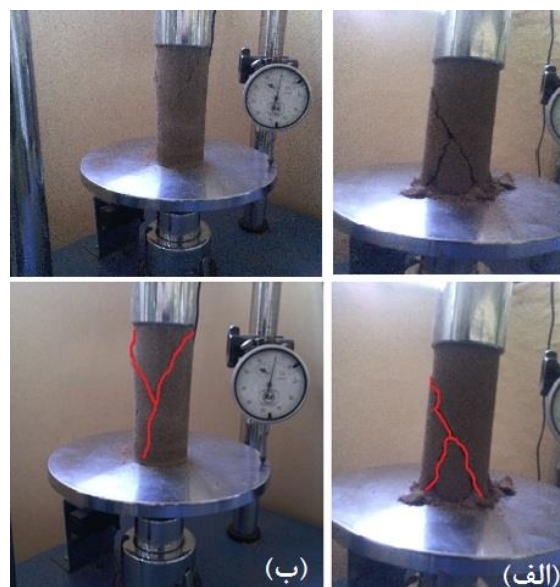
برای ارزیابی اثر رسوب بیولوژیکی روی خصوصیات هیدرولیکی خاک ماسه‌بادی از آزمایش نفوذپذیری به روش بار آبی افتان استفاده گردید. جدول (۳) میانگین نتایج به دست آمده حاصل از حداقل سه تکرار در آزمایشات را گزارش می‌کند. شکل (۸) نتایج آزمایش نفوذپذیری برای شرایط بهسازی توسط *B. pasteurii* و *B. pasteurii+B. subtilis* را نشان می‌دهد.

همان‌طور که در شکل (۸) نشان داده شده است، بهسازی بیولوژیکی نمونه‌های ماسه‌ای توسط *B. pasteurii* و *B. pasteurii+B. subtilis* با تولید رسوب کربنات کلسیم، تخلخل خاک ماسه‌بادی را کاهش می‌دهد که در نتیجه باعث کاهش نفوذپذیری خاک ماسه‌ای می‌شود. این فرآیند در حالت کشت مختلط *B. pasteurii+B. subtilis* با عملکرد بهتری نسبت به کشت منفرد *B. pasteurii* صورت گرفته است. این عملکرد بهتر در کاهش نفوذپذیری به دلیل نرخ بیشتر تولید رسوب کربنات کلسیم در حالت کشت مختلط نسبت به کشت منفرد می‌باشد که این نرخ بیشتر ناشی از حضور باکتری *B. subtilis* می‌باشد که به عنوان یک تسریع کننده در فرآیند رسوب کلسیت در دوره عمل‌آوری ۷ روزه عمل می‌کند. بنابراین کاهش زمان بهسازی (رسوب‌گذاری) به وسیله کشت مختلط *B. pasteurii+B. subtilis* از این جهت حائز اهمیت می‌باشد که زمان رسیدن به نتیجه مطلوب (افزایش مقاومت و کاهش نفوذپذیری) کاهش می‌یابد. مجموعه نتایج آزمایشات فشاری و نفوذپذیری با حداقل سه تکرار در آزمایشات مذکور در جدول (۳) آورده شده است.

در آزمایش تک‌محوری نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل (۷) پیداست نمونه‌ها به صورت قطری در امتداد ضعیف‌ترین صفحه خود گسیخته می‌شود.



شکل ۶- مدول الاستیسیته مربوط به خاک ماسه‌ای و خاک بهسازی شده

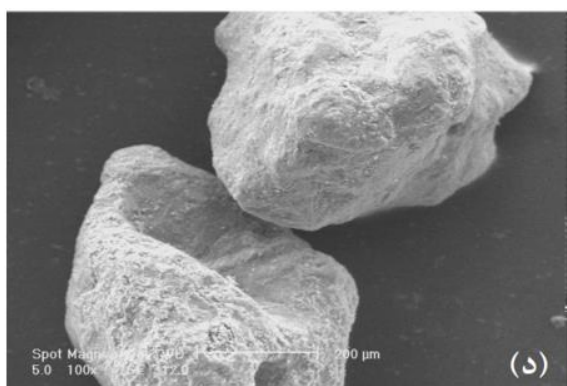
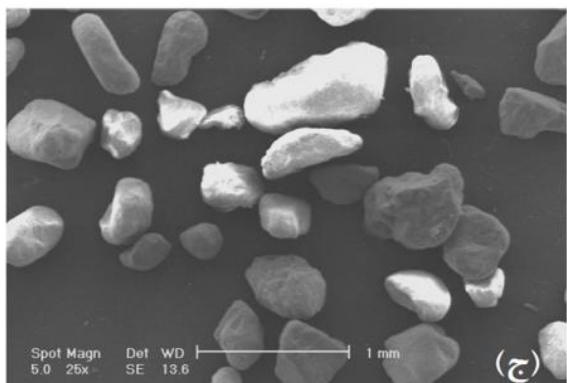
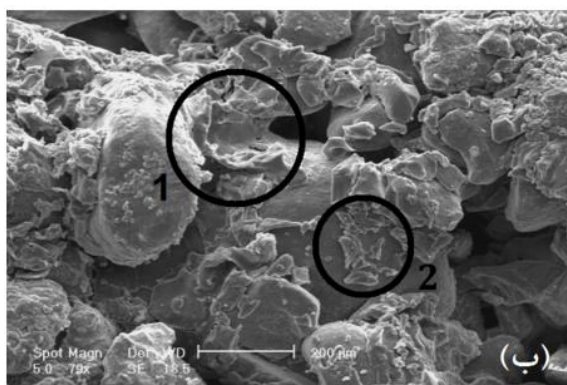
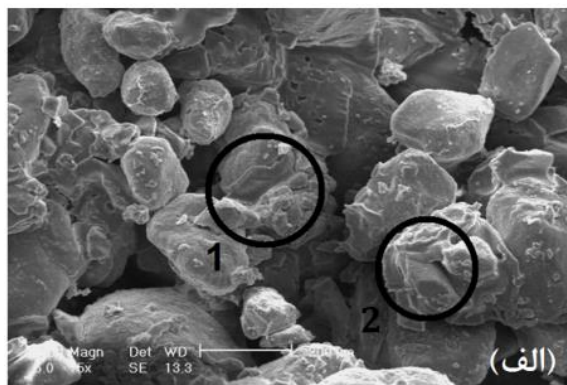


شکل ۷- نحوه شکست: الف) *B. pas*، ب) *B. pas+B. sub*

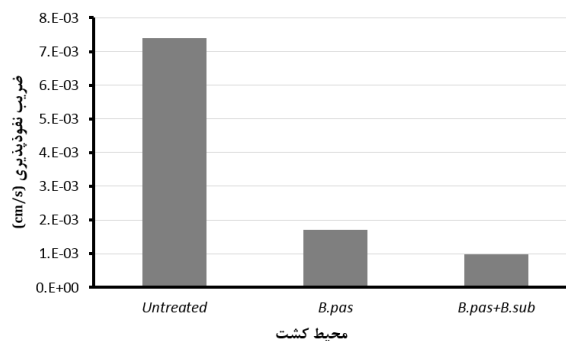
صفحه گسیختگی لزوماً دارای بیش‌ترین تنش نرمال یا تنش برشی نمی‌باشد بلکه ترکیبات تنش در این صفحه به گونه‌ای می‌باشد که خاک تحمل این ترکیبات تنش را ندارد و لذا در همین امتداد گسیخته می‌شود. معادله (۵)، معیار گسیختگی موهر-کولمب می‌باشد که نشان‌دهنده ترکیب تنش نرمال و تنش برشی در صفحه گسیختگی می‌باشد.

$$\tau = \sigma \cdot tg\phi + C \quad (5)$$

τ تنش برشی در صفحه گسیختگی، σ تنش نرمال در صفحه گسیختگی، ϕ زاویه اصطکاک داخلی خاک و C چسبندگی خاک می‌باشد. همچنین صفحه گسیختگی که در شکل (۷) نشان داده



شکل ۹- تصاویر SEM از نمونه بهسازی شده توسط: الف) کشت منفرد، ب) کشت مختلط، ج و د) نمونه بهسازی نشده



شکل ۸- نفوذپذیری خاک بهسازی شده و بهسازی نشده

جدول ۳- مجموعه نتایج آزمایشات فشاری و نفوذپذیری

K(cm/s)	Es(Mpa)	مقاومت فشاری (kPa)		نمونه خاکی
		Triaxial (50 kPa confined)	UCS	
$7/4 \times 10^{-3}$	۲۵/۵	۲۵۵/۷	-	ماسه بادی
$1/7 \times 10^{-3}$	۱۳۶/۴	-	۱۶۹۰/۳	B. pasteurii
$9/8 \times 10^{-4}$	۲۴۸/۶	-	۱۳۹۱	B. pasteurii + B. subtilis

۳-۴- تصویربرداری الکترونی (SEM)

جهت تصویربرداری از سطوح کریستال‌های تشکیل یافته از میکروسکوپ الکترونی استفاده گردید. این دستگاه قادر به تصویربرداری از سطوح در بزرگنمایی ۱۰ تا ۱۰۰۰۰۰ برابر می‌باشد. در این دستگاه پس از قرار دادن نمونه داخل دستگاه، یک دسته پرتو الکترونی به نمونه تابیده می‌شود. منبع الکترونی (تفنگ الکترونی) معمولاً از انتشار ترمونیکی^{۳۳} فیلامان^{۳۴} یا رشته تنگستنی است. معمولاً الکترون‌ها بین ۱۰-۳۰ keV شتاب داده می‌شوند، سپس دو یا سه عدسی متمرکزکننده پرتوی الکترونی را کوچک می‌کنند تا حدی که در موقع برخورد با نمونه قطر آن حدوداً بین ۱۰-۲ نانومتر می‌باشد (Haj Mostafa, ۲۰۱۰). شکل (۹) رسوب کلسیت در نمونه‌های بهسازی شده و بهسازی نشده را نشان می‌دهد.

با توجه به شکل (۹- الف) و (۹- ب) رسوب کلسیت تشکیل شده در بین دانه‌ها (بخش ۱) و همچنین روی سطح دانه‌ها (بخش ۲) نه تنها باعث کاهش هدایت هیدرولیکی بلکه افزایش مقاومت تک‌محوری نمونه‌ها شده است.

کشت مختلط نسبت به کشت منفرد کاهش تقریباً ۳۴٪ دارد لذا با توجه به بهبود عملکرد بهسازی به روش کشت مختلط می‌توان از این شیوه در زمان کم‌تری به نتایج مطلوبی رسید که از منظر اقتصادی در کارهایی عملی بسیار سودمند می‌باشد. با توجه به شرایط یکسان عمل‌آوری و انجام آزمایشات، عملکرد کشت مختلط صرفاً ناشی از وجود باکتری *B. subtilis* می‌باشد.

۶- قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان بر خود لازم می‌بینند از دانشگاه صنعتی اصفهان، پژوهشکده زیست‌فناوری و آزمایشگاه مکانیک خاک دانشگاه صنعتی اصفهان جهت فراهم آوردن تجهیزات لازم برای انجام پژوهش حاضر کمال تشکر را داشته باشند.

۷- مراجع

- Aghayari I, "Investigation of biogROUT's properties at a laboratory scale", MSc Thesis, Isfahan University of Technology, IRI, 2013.
- Azadi M, Ghayoomi M, Shamskia N, Kalantari H, "Physical and mechanical properties of reconstructed bio-cemented sand", *Geomicrobiology Journal*, 2017, 57 (7), 698-706.
- Barkouki T, Martinez B, Mortensen B, Weathers T, Dejong JT, Ginn T, Spycher N, Smith R, Fujita Y, "Forward and inverse bio-geochemical modeling of microbially induced calcite precipitation in half-meter column experiments", *Transport in Porous Media*, 2010, 90 (1), 23-39.
- Canakci H, Sidik W, Kilic IH, "Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil", *Soils and Foundations*, 2015, 55 (5), 1211-1221.
- Dejong JT, Mortensen BM, Martinez BC, Nelson DC, "Bio-mediated soil improvement", *Ecological Engineering*, 2010, 36 (2), 197-210.
- Dejong JT, Fritzges M, Nüsslein K, "Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2006, 132 (11), 1381-1392.
- Goodarzi A, Akbari H, "Impact of lime-slugs combination on the hydro-mechanical behavior of clayey soils", *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2019, 1 (94), 97-108.
- Grabiec AH, Starzyk J, Stefaniak K, Wierzbicki J, Zawal D, "On possibility of improvement of compacted silty soils using biodeposition method", *Construction and Building Materials*, 2015, 138, 134-140.
- Haj Mostafa M, "Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils", MSc Thesis, Isfahan University of Technology, IRI, 2010.
- Kucharski ES, Cord-ruwisch R, Whiffin V, Al-thawadi SM, "Microbial biocementation", US Patent 20080245272, 2008.
- Karol RH, "Chemical grouting and soil stabilization", Marcel Dekker, US, 2003, 50-170.
- Lowenstan HA, Weiner S, "On biomineralization",

همان‌طور که از شکل (۹-ج) و (۹-د) پیداست، در حالت ماسه بهسازی‌نشده هیچ‌گونه چسبندگی و ارتباطی بین ذرات ماسه قابل مشاهده نمی‌باشد، از طرفی در نمونه بهسازی‌شده به‌وسیله کشت مختلط *B. pasteurii+B. subtilis* رسوب کلسیت قابل توجهی تشکیل شده است که باعث پر کردن فضاهای خالی در نمونه بهسازی‌نشده و اتصال دانه‌های خاک به یکدیگر شده است. بنابراین با افزایش رسوبات بیولوژیکی کلسیت توده خاک از حالت دانه‌ای به یک توده یکپارچه و پیوسته و با باندهای کلسیتی بین‌دانه‌ای تبدیل گردد.

پُر شدن منافذ ماسه بهسازی‌نشده و یکپارچه شدن توده خاک باعث بهبود خواص مکانیکی (افزایش مقاومت ماسه‌بادی) و خواص هیدرولیکی (کاهش نفوذپذیری ماسه‌بادی) می‌گردد. با توجه به شکل (۹) و مقایسه تصاویر (الف) و (ب) به‌طور تقریبی و کیفی افزایش رسوب کلسیت و اتصال دانه‌ها در حالت کشت مختلط نسبت به منفرد قابل مشاهده می‌باشد که می‌توان بهبود خواص هیدرولیکی و مکانیکی در حالت کشت مختلط نسبت به منفرد با توجه به آزمایشات فشاری و نفوذپذیری به این افزایش و کیفیت رسوب کلسیت نسبت داد.

۵- نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان به این نتیجه رسید که نرخ هیدرولیز اوره و در ادامه آن رسوب کلسیت در حالت کشت مختلط نسبت به کشت منفرد بیشتر است به‌نحوی که با توجه به نتایج آزمون تک‌محوری و مدول الاستیسیته، عملکرد محیط کشت مختلط *B. pasteurii+B. subtilis* نسبت به محیط کشت منفرد *B. pasteurii* بهتر می‌باشد، طوری که مقاومت تک‌محوری خاک بهسازی‌شده توسط کشت مختلط نسبت به کشت منفرد افزایش تقریباً ۲۳٪ دارد. مدول الاستیسیته نیز شاخص دیگری از خصوصیات مقاومتی خاک می‌باشد که نشان‌دهنده سختی خاک می‌باشد، افزایش تقریباً ۸۲٪ در حالت کشت مختلط نسبت به کشت منفرد داشته است که مقادیر مدول الاستیسیته در هر دو حالت کشت منفرد و کشت مختلط افزایش قابل توجهی نسبت به مدول خاک ماسه بهسازی‌نشده داشته است. با انجام آزمایش سه‌محوری در فشار محصورکننده ۵۰ کیلوپاسکال و مقایسه آن با مقاومت تک‌محوری نمونه‌های بهسازی‌شده توسط کشت منفرد و مختلط می‌توان این نتیجه را گرفت که بهسازی بیولوژیکی باعث افزایش قابل توجهی در مقاومت خاک ماسه‌بادی می‌گردد. از این فرآیند مخصوصاً در حالت کشت مختلط در تثبیت شن‌های روان می‌توان بهره گرفت. تراوایی خاک بهسازی‌نشده نسبت به نمونه‌های بهسازی‌شده در حالت کشت منفرد و مختلط به ترتیب ۷۷/۳٪ و ۸۶/۸٪ کاهش یافته است. همچنین نفوذپذیری در حالت

- University Press, Oxford, New York, 1998.
- Muynck WD, Belie ND, Verstraete W, "Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review", *Ecological Engineering*, 2010, 36, 118-136.
- Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, "Environmental microbiology", China: Elsevier Science, China, 2009.
- Nemati M, Greene EA, Voordouw G, "Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option", *Process Biochem*, 2005, 40 (2), 925-933.
- Nj WS, Lee ML, Khun TC, Hii SL, "Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation", *KSCE Journal of Civil Engineering*, 2013, 17 (4), 718-728.
- Ozdogan A, "A study on the triaxial shear behavior and microstructure of biologically treated sand specimens", MSc Thesis, University of Delaware, US, 2010.
- Okyay TO, Rodrigues DF, "Optimized carbonate micro-particle production by *Sporosarcina pasteurii* using response surface methodology", *Ecological Engineering*, 2014, 62, 168-174.
- Palmén A, "Stabilization of frictional soil through injection using CIPS", MSc Thesis, KTH Royal Institute of Technology, Sweden, 2012.
- Pakbaz MS, Behzadipor H, Ghezelbash GR, "Evaluation of shear strength parameters of sandy soils upon microbial treatment", *Geomicrobiology Journal*, 2018, 35 (8), 721-726.
- Rivadeneira MA, Delgado R, del Moral A, Ferrer MR, Ramos-Cormenzana A, "Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern", *FEMS Microbiology Ecology*, 1994, 13 (3), 197-204.
- Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS, "Microbiological precipitation of CaCO_3 ", *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31 (11), 1563-1571.
- Shahrokhi-Shahraki R, Zomorodian MA, Niazi A, O'Kelly BC, "Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation", *ICE*, 2014, 168 (13), 217-230.
- Sidik W, Canakci H, Kilic IH, "An investigation of bacterial calcium carbonate precipitation in organic soil for geotechnical applications", *IJST*, 2014, 39 (1), 201-205.
- Sharma A, Ramkrishnan R, "Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils", *Perspectives in Science*, 2016, 8, 198-202.
- Wei SN, Min LL, Siew LH, "An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement", *Engineering and Technology*, 2012, 62 (1), 723-729.
- Whiffin VS, Van-Paassen LA, Harkes MP, "Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique", *Geomicrobiology Journal*, 2007, 24 (5), 417-423.
- Zamani A, Montoya BM, "Permeability reduction due to microbial induced calcite precipitation in sand", *Geo-Chicago (ASCE)*, 2016, 269, 94-103.

EXTENDED ABSTRACT

Impact of Biologic Single and Mixed Medium on Mechanical-Hydraulic properties of Dune Sand

Morteza Khaleghi, Mohammad Ali Rowshanzamir *

Faculty of Civil Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 27 April 2018; Accepted: 28 April 2021

Keywords:

Biological improvement, Single and mixed culture, Unconfined compression, Permeability.

1. Introduction

Today, new improvement methods to improve the geotechnical properties of soils are considered. Although a lot of improvement techniques are in use around the world, they have their own advantages and disadvantages. Chemical, physical, mechanical, biological and electrical techniques may be named as the common methods of soil improvement (Karol, 2003). Some of the methods, particularly those using cement and other toxic chemical grout, may cause environmental problems which limit their usage. In this regard biological improvement is an innovative method that uses microorganisms in the soil and biochemical reaction networks, the soil physical and mechanical properties are improved. In this research, mixed culture performance was studied against single culture of bacteria on physical strength properties of sandy soil, as the stabilization efficiency was evaluated in terms of the soil compressive strength, secant stiffness, and permeability with unconfined compression and falling head tests, respectively.

2. Methodology

Bacillus Pasteurii bacteria was used as single culture and Bacillus Pasteurii+Bacillus subtilis were used as mixed culture. Both of them were cultured in LB medium. After the required bacterial growth had occurred, the cells in the culture medium were harvested by centrifugation for 15 min at 4500g. The harvested cells were then washed twice in sodium phosphate buffer 0.1 M (pH 7) to remove metabolic waste and any metabolism produced during the bacterial growth phase. The cells were transferred to in nutrient broth (NB)-urea solution comprising 3 g of NB, 20 g of urea, 10 g of ammonium chloride and 2.12 g of sodium bicarbonate per litre of deionized water with $OD_{600} = 1.1$ (Shahrokhi-Shahraki et al., 2014).

Cementation solution by dissolving 1 mole of urea and 2 moles calcium chloride per liter of distilled water were prepared. Bacteria solution mixed with sand and then was poured into moulds made of PVC with dimensions of 47 mm diameter and 100 mm in height (height to diameter ratio 2.1), after that, cementation solution was injected into samples and after a period of 12 hours the cementation solution was injected again and the curing time was considered 7 days.

3. Results and discussion

To examine the mechanical and physical properties, the unconfined, triaxial compression and permeability (falling head method) tests were carried out on the cured specimens. These tests were conducted in accordance with the ASTM standard. The compression tests speed was 1 mm/min.

3.1. Unconfined compression strength and stiffness

* Corresponding Author

E-mail addresses: mortezakhaleghi88@gmail.com (Morteza Khaleghi), mohamali@cc.iut.ac.ir (Mohammad Ali Rowshanzamir).

Fig. 1 shows the axial stress-strain of the soil samples derived from unconfined compression tests. As observed, the unconfined strength of the treated soil with *B. pasteurii*+ *B. subtilis* is obtained 1690.3 kPa which is significantly greater than the treated soil strength with *B. pasteurii* that obtained 1391. The unconfined strength of the treated soil with *B. pasteurii*+ *B. subtilis* and *B. pasteurii* mediums are significantly greater than the untreated soil strength. The untreated soil strength at a confining stress of 50kPa to be about 256kpa through triaxial conditions at $w=16\%$ and $\gamma_d = 1.74 \text{ gr/cm}^3$ (proctor compaction conditions). The high unconfined strength of *B. pasteurii*+ *B. subtilis* medium in comparison with that of the treated soil with *B. pasteurii* is due to the higher calcite precipitation made of biochemical reactions. The cementation process is caused the soil particles sticking to each other and creating a firm mass. Fig. 2 shows amount of elasticity modulus of untreated and treated sandy soil. Elasticity modulus is calculated with Secant method.

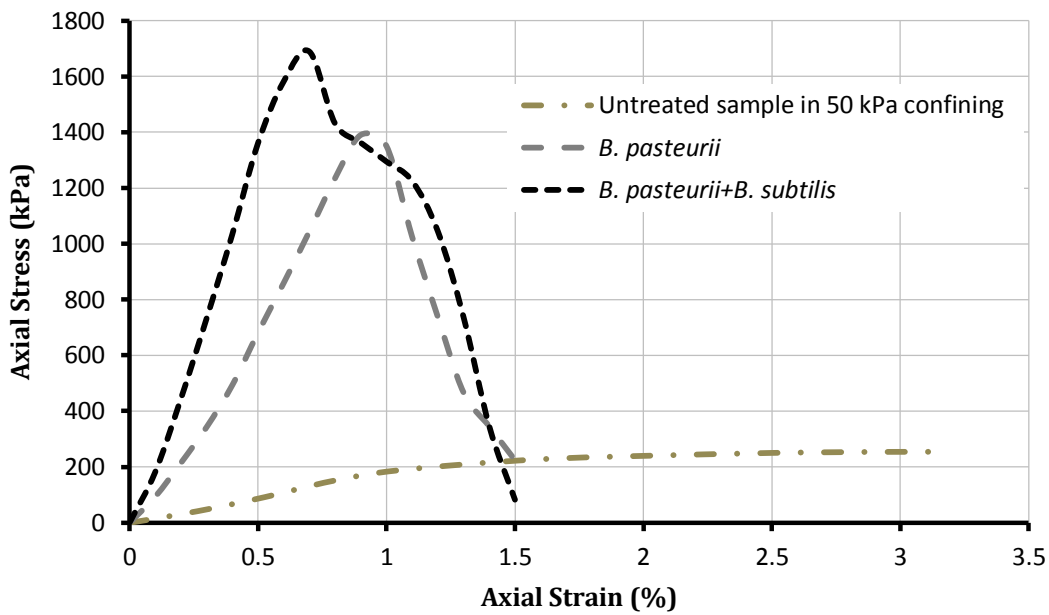


Fig. 1. Stress-strain diagram of untreated and treated sand

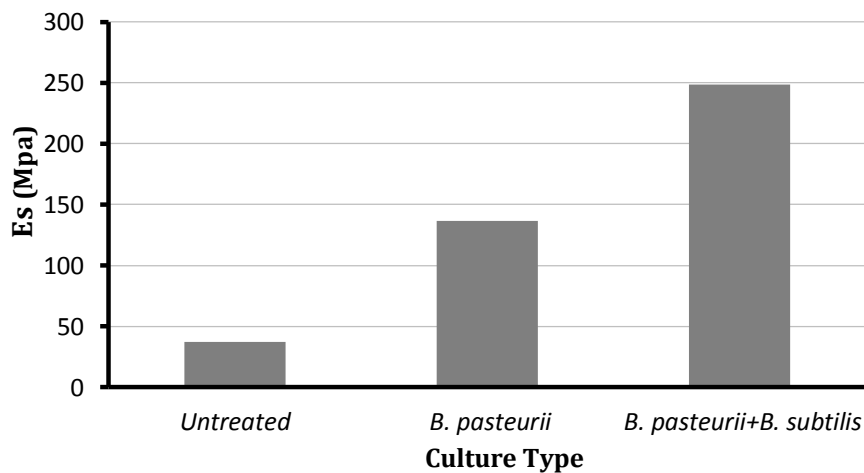


Fig. 2. Amount of elasticity modulus

3. 2. Coefficient of permeability

Fig. 3 shows permeability of untreated sand and treated with *B.pasteurii* and *B. pasteurii*+ *B. subtilis*

mediums. According to Fig. 3 permeability coefficient of *B. pasteurii*+ *B. subtilis* medium is less than *B. pasteurii* medium and untreated sand, it is for this reason that the calcite precipitation made of biochemical reactions reduce void ratio of sandy soil.

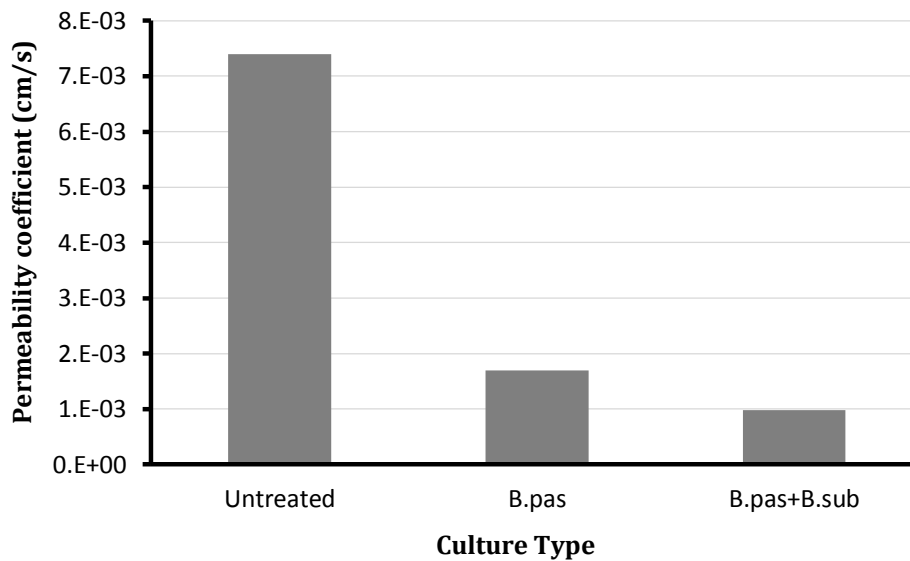


Fig. 3. Coefficient of permeability

4. Conclusions

After curing time (7 days), the results showed that the unconfined compression of improvement soil by single and mixed cultures are 1391kPa and 1690.3 kPa, respectively, which increased 44% and 53% compared to the sandy soil, respectively. Also the results showed that the unconfined compression of improvement soil in mixed culture to single culture has increased 38%. Permeability test results also show mixed culture better performance than single culture in reducing the permeability, as permeability in mixed culture state is 34% less than single culture state. Increasing unconfined strength and decreasing permeability factor of improved samples by mixed culture to single culture is for this reason that *Bacillus subtilis* increases urea hydrolysis rate and the rate of precipitation of calcite. Finally precipitated calcium carbonate has been shown by SEM.

5. References

- Karol RH, "Chemical grouting and soil stabilization", Marcel Dekker, US, 2003.
 Shahrokhi-Shahraki R, Zomorodian MA, Niazi A, O'Kelly BC, "Improving sand with microbial-induced carbonate precipitation", ICE, 2014, 168 (13), 217-230.