مقایسه عملکرد باکتری و میکروجلبک در بهسازی بیولوژیکی باطله معدن مس

رضا یزدانی [۱]، ویدا تفکری [۲]، امیر حمیدی [۱*]

[۱] دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه خوارزمی

[۲] دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

[*] ایمیل نویسنده مسئول: hamidi@khu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۰۶

چکیده

ایجاد سیمانتاسیون در خاک به روش رسوب کربنات کلسیم (MICP) از روش های نوین بهسازی زیستی خاک است که توسط میکرواورگانیسم های مولد کربنات انجام می گیرد. در این پژوهش از باکتری اسپوروسارسینا پاستوری و دو میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا و کلرلا وولگاریس استفاده شد. بهینه سازی تشکیل کربنات کلسیم با مناسب ترین مولاریته کلرید کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین دما بعنوان عاملی در جهت افزایش تولید رسوب در باکتری و کاهش تولید آن در میکروجلبک تعیین شد. پس از مطالعات بهینه سازی، میزان رسوب ایجاد شده توسط باکتری و میکروجلبک ارزیابی و عملکرد موفق تر باکتری در فرآیند ایجاد رسوب تایید شد. مصالح مورد استفاده باطله روان و اشباع معدن مس سونگون بود. کارایی روش با انجام مطالعات میکروسکوپی به همراه آزمایشهای مقاومت تک محوری بر نمونه های تثبیت شده بررسی شد و ایجاد سیمان بیولوژیکی و افزایش مقاومت در آنها مورد تایید قرار گرفت. نتایج آزمایشهای مقاومت تک محوری نشان دهنده افزایش ۷ برابری مقاومت نسبت به حالت بدون بهسازی بود. ازدیاد درصد اوره از ۲ تا ۲۰ درصد مقاومت نمونه بهسازی شده را افزایش ولی کاهش رطوبت اختلاط از صفر تا ۱۰۰ درصد، مقاومت را بین نصف تا دو سوم کاهش داد.

کلمات کلیدی

"بهسازی بیولوژیکی"، "باطله مس"، "رسوب کربنات کلسیم"، "دمای عمل آوری"، "باکتری و میکروجلبک"

Comparison of Bacterium and Microalga in Biological Improvement of Copper Mine Tailings

Reza Yazdani[1], Vida Tafakori[2], Amir Hamidi

[1]Faculty of Engineering, Kharazmi University, Tehran, Iran.

[2]Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

[*]Email Address: hamidi@khu.ac.ir

Abstract

Cementation of soil using calcium carbonate precipitation or MICP is a new biologic method of soil improvement. In this research, this method was used to improve the strength of copper mine tailing slurry. It has been performed by carbonate producer microorganisms, which by adding the appropriate calcium source, cause sedimentation or biocementation in the environment. The resulting calcium carbonate has a significant effect on the soil strength. In this study, a bacterium called Sporosaurina Pasteurium and a microalga called Chlorella Suloxanase, have been used. Optimization of the calcium carbonate formation in the presence of the most suitable calcium chloride concentration and the best temperature for the reaction has been evaluated. The calcium carbonate was injected into the specimen and the sample strength was determined by unconfined compression tests. After biological treatment, the unconfined strength of the slurry increased up to 3 times for saturated state and 7 times for the dry condition which proved the successful treatment using biological method.

Keywords

“Biological improvement”, “Copper tailing”, “Temperature”, “Bacterium”, “Microalga”.

۱- مقدمه

در فرایندهای مختلف کارخانه های صنایع معدنی، علاوه بر استخراج فلز مورد نظر، مقدار قابل توجهی نیز زائدات یا باطله معدن تولید می شود. باطله ها شامل سنگها و پسابهای ناشی از فراورده های معدنی می باشد. با روند رشد تکنولوژی و افزایش توان بهره برداری از معادن میزان تولید باطله ها نیز افزایش یافته و صنایع معدنی را با مشکلاتی از جمله محدودیت مکانی در ذخیره باطله های تولید شده مواجه کرده است. دوغاب و خمیر باطله به دلیل سستی و مقاومت به شدت پایین، در حجم و ارتفاع زیاد قابل نگه داری نمی باشند. از طرفی بخش زیادی از باطله ها را ریزدانه ها تشکیل می دهند. این مواد دارای حجم زیادی آب بوده و مقاومت برشی پایین و حالتی ناپلاستیک دارند. بدین ترتیب استفاده از روشی که بتوان آنها را در حجم و ارتفاع بیشتری نگهداری کرد ضروری و کاربردی به نظر می رسد. یکی از رویکردهای نوین برای اصلاح خصوصیات خاک که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از تکنیک های زیستی موسوم به MICP[1] است. در این روش باکتری تزریق شده به خاک با ساخت بلورهای کربنات و سیلیکات سبب ایجاد سیمانتاسیون و افزایش مقاومت خاک خواهد شد. اگر چه تجزیه اوره توسط میکروارگانیسم ها، پیامدهای شیمیایی نظیر تولید آمونیاک و دی اکسید کربن را به همراه خواهد داشت اما در نهایت، کربنات کلسیم رسوب کرده در بین ذرات موجب ایجاد باندهای سیمانی و ازدیاد مقاومت خاک و افزایش پایداری آن خواهد شد (Burne and Chen, 2000). فرایند عمومی واکنشها در عملیات بهسازی بیولوژیکی خاک طی معادلات (۱) تا (۵) ارائه شده است:

$$CO(NH_2)_2+H_2O\rightarrow 2NH_3+ CO_2 \quad (۱)$$

$$2NH_3+2H_2O\rightarrow 2NH_4^++2OH^- \quad (۲)$$

$$CO_2+H_2O\rightarrow HCO_3^-+H^+ \quad (۳)$$

$$HCO_3+H^++2OH^-\leftrightarrow CO_3^{2-}+2H_2O \quad (۴)$$

$$Ca^{2+}+CO_3^{2-}\rightarrow CaCO_3\downarrow \quad (۵)$$

Whiffin et al. (2007) با تزریق باکتری اسپوروسارسینا پاستوری[2] به ستون ۵ متری از خاک ماسه ای ریز، به بررسی بهبود مقاومت، سختی و نفوذپذیری آن پرداختند. بر اساس نتایج حاصل شده، بهسازی بیولوژیکی موجب کاهش نفوذپذیری خاک ماسه ای بدلیل پر شدن خلل و فرج آن و از طرف دیگر افزایش مقاومت تک محوری، بویژه در غلظت های کربنات کلسیم بیش از ۶۰ کیلوگرم در مترمکعب خواهد شد. در تحقیقی دیگر، اثر فاکتورهای مختلف مانند میزان رشد باکتری اسپوروسارسینا پاستوری، متابولیسمها و تشکیل رسوب در شرایط ایده آل بر روش MICP مورد بررسی قرار داده شد. بر اساس نتایج، عواملی همچون pH محیط، آب، اندازه ذرات و نوع خاک، دما، رطوبت و میزان کلسیم موجود برای واکنش از عوامل موثر در فرایند MICPتعیین شدند (Mortensen et al. 2011).

بهسازی خاک و ایجاد سیمانتاسیون توسط انواع میکروجلبک نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در این روش زمینه تشکیل رسوب، مستقیما از طریق فتوسنتز میکروجلبک و بالا رفتن pH تا حدود ۹ اتفاق می افتد. با قرار گرفتن این محیط در معرض کلسیم، رسوب کربنات کلسیم تشکیل می شود. زمان رسوبگذاری در نمونه های بهسازی شده با لیزوشش میکروجلبک حداکثر ۵۰ دقیقه و درصد ایجاد یون Ca^{2+} حدود ۴۱ درصد گزارش شده است (Ariyanti et al. 2012). بهسازی باطله معادن با استفاده از باکتری بومی موجود در خود آن و یا سایر باکتریها در تحقیقات قبلی مورد بررسی قرار گرفته است (Buikema 2015). وی برای تعیین میزان افزایش مقاومت باطله پس از بهسازی بیولوژیکی از آزمایش پرتاب گوی بر سطح مصالح استفاده کرد. نتایج حاکی از افزایش مقاومت باطله آهن بعد از بهسازی بود بطوریکه عمق فروچاله ایجاد شده در خاک بهسازی شده به مراتب کمتر از شرایط قبل از بهسازی بیولوژیکی گزارش شد. بعلاوه با اسکن میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد که پوسته کربنات حاصل از باکتری اسپوروسارسینا پاستوری به مراتب ضخیم تر از باکتری بومی موجود در باطله بوده و بعبارت دیگر، عملکرد بهتری در ایجاد سیمانتاسیون و بهسازی خاک دارد. باکتری اسپوروسارسینا پاستوری در سایر تحقیقات مرتبط با بهسازی خاکها بکار رفته است (Xiao et al. 2018, 2019). ایشان با بهسازی بیولوژیکی خاک ماسه ای سعی بر افزایش مقاومت آن در برابر بروز پدیده روانگرایی تحت بارهای سیکلیک داشتند. نمونه های اشباع بهسازی شده تحت آزمایش سه محوری تناوبی، مقاومت و سختی به مراتب بالاتری را نسبت به نمونه های بدون بهسازی نشان دادند. امامی تبریزی و محمدسیدی (۱۳۹۸) نیز با ارائه روشی نوین برای تزریق این باکتری در خاک ماسه ای خوب دانه بندی شده، سعی در افزایش کارایی و ایجاد ساختار همگن تر در خاک تحت بهسازی نمودند. مرور تحقیقات قبل نشان دهنده دو موضوع مهم است. اول اینکه در مورد بهسازی بیولوژیک باطله معادن بویژه باطله ریزدانه مطالعات بسیار محدودی وجود دارد و عمده تحقیقات قبلی بر بهسازی خاکهای ماسه ای استوار بوده است. دوم آنکه مقایسه ای بین عملکرد باکتری و میکروجلبکها در این خصوص گزارش نشده است. بر این اساس در مطالعه حاضر، به مقایسه کارایی باکتری اسپوروسارسینا پاستوری و دو میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا و کلرلا وولگاریس که عملکرد مناسبی در بهسازی بیولوژیک خاکها در مطالعات نشان داده اند پرداخته شده است. مصالح مورد بهسازی در این تحقیق باطله معدن مس بوده و در نهایت با مطالعات میکروسکوپی بهمراه آزمونهای مقاومتی، میزان بهبود خصوصیات خاک بررسی و پیشنهادهایی جهت استفاده از روش برتر ارائه شده است.

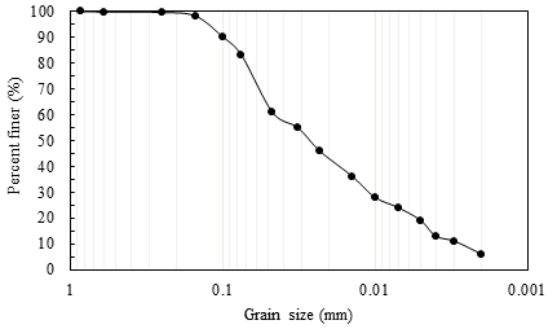
۲- روش انجام تحقیق

• مواد و مصالح

باطله مورد استفاده در این پژوهش از معدن مس سونگون بدست آمده است. کارخانه تولید مس سونگون ورزقان در استان آذربایجان شرقی واقع شده است. فاصله این معدن از تبریز ۱۳۰ کیلومتر و از ورزقان ۳۰

[1] Microbial induced carbonate precipitation
[2] Sporosarcina Pasteurii

کیلومتر می باشد. در قدم اول، درصد اشباع لیه ن مصالح مطابق با استاندارد ASTM D-2216 اندازه گیری شد که نشانگر شرایط کاملا اشباع آن بود. چگالی ویژه لیه ن نمونه ها نیه ز طبق استاندارد ASTM D-854 برابر ۲/۱ بدست آمد. برای تعیین پراکندگی اندازه ذرات نیز آزمایش دانه بندی بر اساس ضوابط ASTM D-422 انجام گرفت. منحنی بدست آمده در شکل (۱) ارائه شده است. بعلاوه، حدود روانی و خمیه ری با توجه به استاندارد ASTM D-4318 بترتیب ۲۵ و ۱۹ تعیین شدند. لذا نام خاک در سیستم طبقه بندی متحد CL-ML است.



شکل ۱- دانه بندی مصالح باطله معدن مس سونگون

در این مطالعه، باکتری اسپوروسارسینا پاستوری که بعنوان یکی از رایج ترین باکتری های هوازی در تولید بیوسمنت مطرح است مورد استفاده قرار گرفت که از بانک میکروبی PTTC، به شماره PTTC:۱۶۴۵ تهیه شد. این باکتری دارای آنزیم اوره آز است. بنابراین وقتی اوره بعنوان ماده غذایی در اختیار آن قرار میگیرد، آن را تجزیه و یون کربنات تولید می کند. همچنین بدلیل تولید آمونیاک، pH محیط افزایش می یابد. سپس نمک کلرید کلسیم به واکنش اضافه می شود تا بیوسمنت طبق معادلات ۶ و ۷ تشکیل گردد.

$$Ca^{2+}+HCO_3+OH^-\rightarrow CaCO_3+H_2O \quad (۶)$$

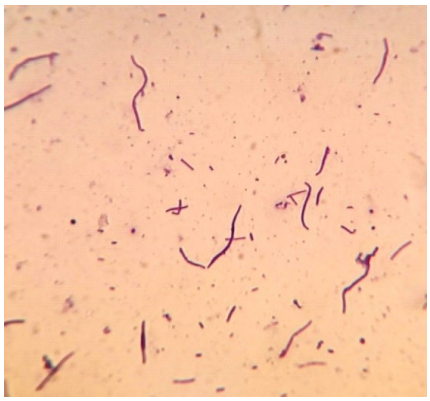
$$Ca^{2+}+2HCO^-+OH^-\rightarrow CaCO_3+CO_2+H_2O \quad (۷)$$

به دلیل وجود برخی محدودیت های زیست محیطی در استفاده از باکتری مانند تولید ماده سمی آمونیاک که باعث آلودگی خاک، سفره های آب زیر زمینی و آبزیان می شود، میکروجلبکهای مولد بیوسمنت نیز مورد توجه قرار گرفته اند. برای مقایسه عملکرد آنها با باکتری، در این تحقیق از دو میکرو جلبک کلرلا سوروکینیانا[1] و کلرلا وولگاریس[2] استفاده شد که از بانک IBRC با کدهای ۵۰۰۲۱ IBRC-M و ۵۰۰۲ IBRC-M به صورت کشت فعال تهیه شدند. باکتری اسپوروسارسینا پاستوری در محیط جامد و میکرو جلبکهای کلرلا سوروکینیانا و کلرلا وولگاریس در محیط مایع کشت داده شدند. بنابراین در این قسمت نحوه ایجاد هر دو محیط کشت توضیح داده می شود.

- **محیط کشت جامد**

در تهیه محیط کشت جامد مطابق پروتکل های موجود در علوم شیمی و میکروبیولوژی عمل شد (Whiffin et al. 2007). بدین ترتیب که ابتدا مقدار معینی از عصاره مخمر در حجم مشخص از آب مقطر حل و سپس مقدار معین از نمک NH_4CL به محلول اضافه شد. برای تنظیم pH محیط کشت از ماده Agar استفاده شد. با اضافه کردن آن به مقدار لازم، pH محیط روی ۸/۵ که عدد مناسب برای رشد باکتری مورد نظر است، تنظیم گردید (Stabnikov et al. 2013). شکل (۲-الف) تصویری از باکتری رشد کرده در محیط کشت را نشان می دهد. این باکتری از خانواده باسیلها است و بنابراین شکل میله ای آن مشخص است. شکل (۲-ب) نیز تصویر میکروسکوپی از باکتری پس از رنگ آمیزی را ارائه می نماید.

(الف)



(ب)

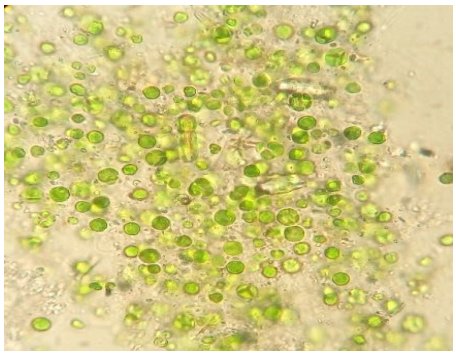
شکل ۲- الف: اسپوروسارسینا پاستوری پس از رشد، ب: تصویر میکروسکوپی اسپوروسارسینا پاستوری

- **محیط کشت مایع**

محیط کشت مایع در دو فاز ماکرو و میکرو ساخته شده و سپس با هم ترکیب شدند.عناصر ماکرو به ترتیب به آب اضافه شده و بعد از حل کردن هر یک ، بخش بعدی اضافه شد. مقدار مواد برای فاز میکرو ، ۱۰۰۰ برابر غلیظ تر می باشد. با توجه به غلظت بالای فاز میکرو ،

[1] Chlorella sorukiniana
[2] Chlorella vulgaris

حجم مشخصی از آن به محیط ماکرو اضافه می شود تا به غلظت مورد نظر برسد. در نهایت pH محیط حاصل روی ۸ تنظیم و جهت استریل کردن در دستگاه اتوکلاو قرار گرفت. پس از اتوکلاو محیط، pH در حدود یک درجه کمتر شده و به عدد ۷ که همان pH مورد نظر است، خواهد رسید (Stein 1980). شکل (۳) تصویر میکروسکوپی از میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا که در محیط مایع کشت داده شده است را نشان می دهد.



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی کلرلا سوروکینیانا

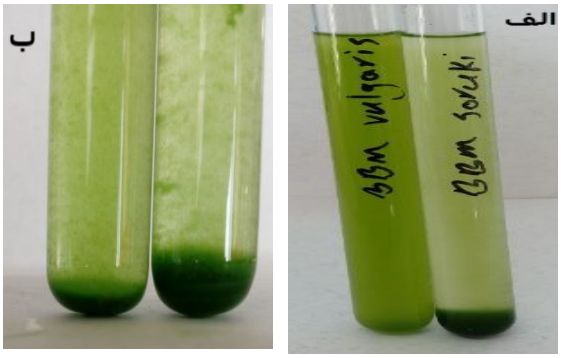
۳- نتایج

- **مقایسه عملکرد دو میکروجلبک**

پس از تلقیح دو میکروجلبک در محیط کشت و در شرایط یکسان، میزان رشد و کیفیت رسوب تشکیل شده در حضور کلرید کلسیم، مورد ارزیابی قرار گفت. پس از ۲۰ روز، هر دو میکرو جلبک به رشد و غلظت تقریبا یکسان رسیدند. شکل (۴) تصویری از وضعیت آنها پس از رشد ۲۰ روزه در محیط کشت مایع را نشان می دهد.

شکل ٤- تصویر رشد دو میکروجلبک بعد از ۲۰ روز، کلرلا سوروکینیانا (ارلن ۱) و کلرلا وولگاریس (ارلن ۲)

با توجه اینکه پس از دوره ۲۰ روزه، هم از لحاظ ظاهری و هم بر اساس قرائت غلظت با دستگاه اسپکتروفوتومتر، دو میکروجلبک تفاوت رشد قابل ملاحظه ای نداشتند، میزان رشد و غلظت مجددا پس از اضافه کردن منبع کلرید کلسیم برای هر دو میکروجلبک مورد ارزیابی قرار گرفت. با اضافه کردن کلرید کلسیم ۳ مولار، رسوب تشکیل شده پس از ۱۰ دقیقه بر اساس شکل (۵-الف) مشاهده شد. همانطور که در این شکل ملاحظه می شود، تشکیل رسوب بعد از این مدت فقط در کلرلا سوروکینیانا اتفاق افتاد و در نمونه دیگر رسوبی تشکیل نشده است. به نمونه ها فرصت بیشتری نیز داده شد و بعد از ۶۰ دقیقه مجددا تغییرات در رسوب ایجاد شده مشاهده شد. نتیجه این تغییرات در شکل (۵-ب) نمایش داده شده است. با توجه به چندین بار تکرار آزمایش های فوق و ملاحظه نتایج مشابه، مشخص شد که میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا در ایجاد رسوب عملکرد بهتری داشته و بنابراین در ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

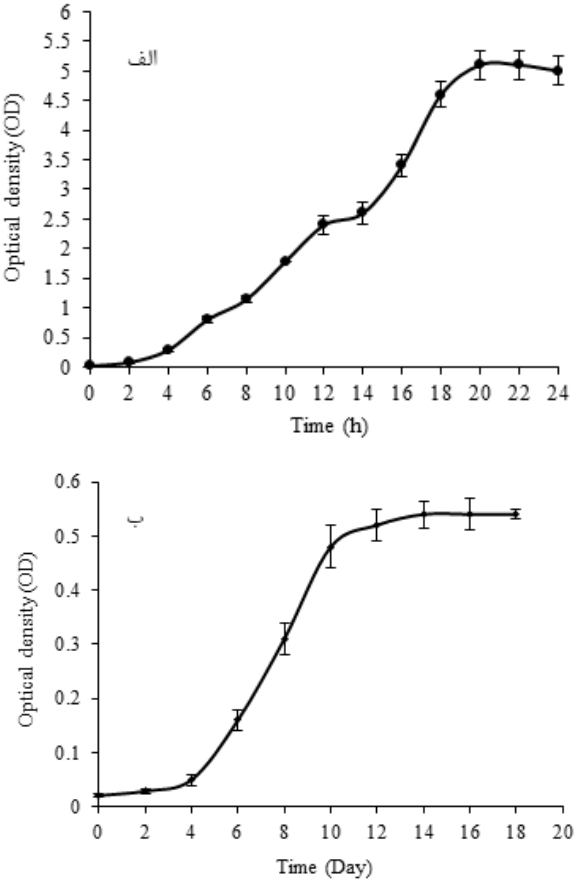


شکل ۵- مقایسه عملکرد دو میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا (لوله راست) و کلرلا وولگاریس (لوله چپ)، الف) ۱۰ دقیقه پس از ورود کلرید کلسیم ب) ٦۰ دقیقه پس از ورود کلرید کلسیم

- **مقایسه عملکرد باکتری و میکروجلبک**

منحنی رشد:

برای داشتن محلول باکتری یکسان در تمامی تست ها، منحنی رشد باکتری با غلظت اولیه ۰/۰۲ ترسیم گردید. بدین منظور دانسیته نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. قرائت ها در هر دو ساعت انجام و ثبت گردید. منحنی رشد نهایی باکتری در شکل (۶-الف) نشان داده شده است. با توجه به شکل، باکتری با مصرف عصاره مخمر و رشد ابتدایی، وارد فاز لگاریتمی اولیه می شود. پس از مدتی که منبع غذایی اولیه تمام شد، از حدود ساعت چهاردهم شروع به مصرف و تجزیه اوره کرده و وارد فاز لگاریتمی جدید می شود. در آخرین مرحله که تجزیه اوره به پایان رسید، رشد باکتری به فاز سکون می رسد. همانطور که در شکل پیداست فاز سکون از ساعت بیستم آغاز شده است. منحنی رشد ابتدا به مقدار ثابتی رسیده و سپس سیر نزولی را طی می کند. بهترین زمان برداشتن محلول برای تزریق به محیط، ابتدای فاز سکون می باشد، زیرا پس از آن، باکتری فاز پیرشدگی و مرگ را طی می نماید. منحنی رشد میکروجلبک منتخب نیز با غلظت اولیه ۰/۰۲ در شکل (۶-ب) نشان داده شده است. با توجه به نرخ رشد بسیار کمتر میکروجلبک در برابر باکتری، قرائتها در فواصل زمانی ۲ روزه انجام گرفت. براساس شکل، بهترین زمان برداشت، شروع فاز سکون، یعنی روز چهاردهم تا شانزدهم خواهد بود.



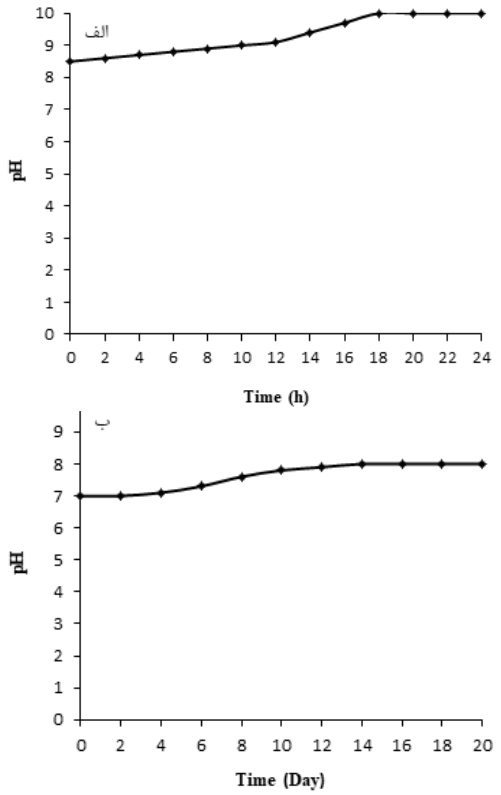
شکل ٦ – منحنی رشد باکتری و میکروجلبک منتخب
الف) باکتری ب) میکروجلبک

منحنی تغییرات pH:

با رشد باکتری، تجزیه اوره و تولید آمونیاک در محیط، pH در طول فرایند رشد افزایش خواهد یافت. روند این افزایش تا پایان رشد و فاز سکون در شکل (۷–الف) نمایش داده شده است. میکروجلبک ها نیز با رشد خود به مرور زمان باعث افزایش pH محیط می شوند. برای اثبات این مدعا، در حین رشد میکروجلبک، pH محیط هر ۲ روز یکبار اندازه گیری شد که نتیجه آن در شکل (۷–ب) نمایش داده شده است. مقایسه تغییرات pH باکتری و میکروجلبک نمایانگر نرخ بسیار کمتر تغییرات برای میکروجلبک در زمان است.

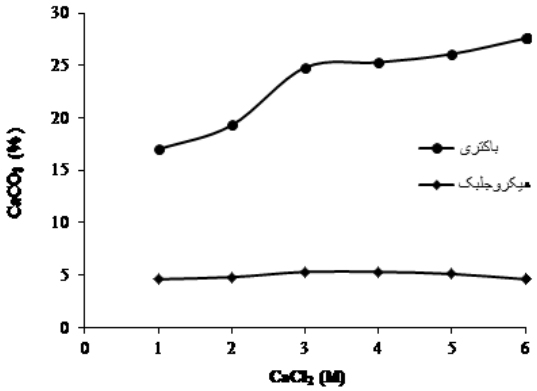
بهینه سازی مولاریته کلرید کلسیم:

پس از رشد باکتری و رسیدن به فاز سکون، محلول در معرض کلرید کلسیم، از ۱ تا ۶ مولار قرار گرفت تا بهینه ترین حالت تشکیل رسوب تعیین گردد. آزمایش در هر ۳ مولار تکرار شد و هر تکرار تحت آزمایش تیتراسیون قرار گرفت. نتایج با آزمون آماری t-test مقایسه و بهینه ترین مقدار انتخاب شد. شکل (۸) تغییرات درصد کربنات کلسیم تولید شده با مولاریته کلرید کلسیم را نشان می دهد. بر اساس این شکل مشخص است که پس از غلظت ۳ مولار، با افزایش مولاریته تاثیر قابل توجهی در تشکیل رسوب ایجاد نمی شود. نتیجه آزمون آماری نیز نشانگر تفاوت بین مولاریته ۱ و ۲ و یا ۲ و ۳ است اما پس از آن، میزان تفاوت قابل ملاحظه نخواهد بود. بنابراین کلرید کلسیم ۳ مولار به عنوان بهینه ترین مولاریته جهت انجام واکنش برای باکتری انتخاب شد. این آزمایش برای میکروجلبک نیز انجام شد. نمودار تغییرات درصد رسوب با مولاریته کلرید کلسیم برای میکروجلبک نیز در شکل (۸) ارائه شده است. با توجه به شکل و نتایج آزمون آماری t-test ملاحظه می گردد که تغییرات مولاریته تاثیرچندانی بر افزایش میزان رسوب تولیدی ندارد. دلیل اصلی آن کم بودن یون کربنات در محیط است. لذا بهترین غلظت مذکور برای میکروجلبک ۱ مولار انتخاب شد.



شکل ۷- منحنی تغییرات pH در مقابل زمان برای میکروجلبک
الف) باکتری ب) میکروجلبک

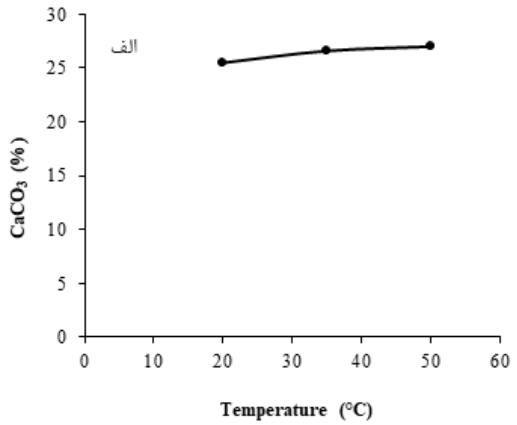
مقایسه عملکرد باکتری و میکروجلبک در شکل (۸) نشان دهنده اختلاف چشمگیر در ایجاد رسوب کربنات کلسیم بین این دو میکرو ارگانیسم است. بطور مشخص میزان رسوب ایجاد شده توسط باکتری بین ۳ تا ۵ برابر بیشتر از میکروجلبک منتخب است. با حجم اندک تولید بیوسمنت توسط میکروجلبک، امکان استفاده از آن در پروژه های بزرگ مقرون به صرفه نخواهد بود. بنابراین در ادامه تحقیق، تمرکز بر باکتری معطوف شد و آزمایشهای مقاومتی و تزریق به خاک تنها با استفاده از باکتری انجام گرفت.

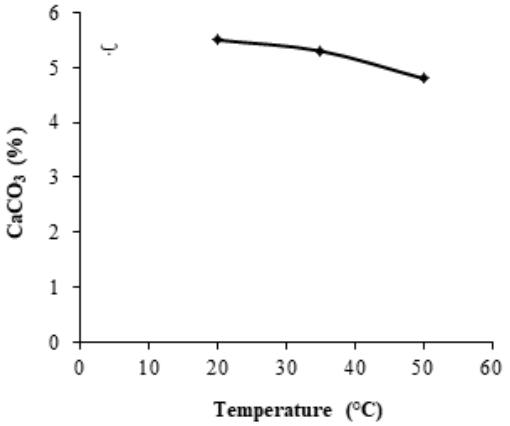


شکل ۸- مقایسه رسوب تولید شده توسط باکتری و میکروجلبک

اثر دما بر تشکیل رسوب کربنات کلسیم:

تغییرات فصلی دما می تواند بر بازدهی پروژه های بهسازی بیولوژیکی تاثیرگذار باشد. بنابراین در این تحقیق، پس از انتخاب بهترین مولاریته تشکیل کربنات کلسیم برای باکتری و میکروجلبک، آزمایش تعیین رسوب در سه دمای ۲۰، ۳۵ و ۵۰ درجه تکرار شد، تا تاثیر تغییرات دما مورد بررسی قرار گیرد. پس از ترکیب یک سی سی محلول باکتری و یک سی سی محلول سه مولار کلرید کلسیم، نمونه ها به مدت یک ساعت در دماهای مذکور داخل انکوباتور قرار داده شدند. آزمایش برای هر دما سه بار تکرار شد و مقادیر میانگین در شکل (۹-الف) نشان داده شده است. با توجه به نمودار ملاحظه می گردد که تغییرات دما در محدوده مورد بررسی، تاثیر قابل توجهی روی واکنش تشکیل کربنات کلسیم ندارد، هرچند با افزایش آن، افزایش کمی در میزان رسوب تولید شده مشاهده می شود. در مورد میکروجلبک نیز آزمون روی یک سی سی از محلول حاوی میکروجلبک با یک سی سی محلول یک مولار کلرید کلسیم انجام شد. در هر مورد از دماهای ۲۰، ۳۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد، سه آزمایش انجام و میانگین درصد تشکیل رسوب در برابر تغییرات دما ترسیم شد. این نمودار در شکل (۹-ب) نشان داده شده است. بر این اساس مشاهده می شود تغییرات دما تاثیر چشمگیری در تشکیل رسوب تشکیل شده با میکروجلبک نداشته، اما افزایش آن، کاهش کمی در میزان رسوب تولیدی را به همراه دارد.

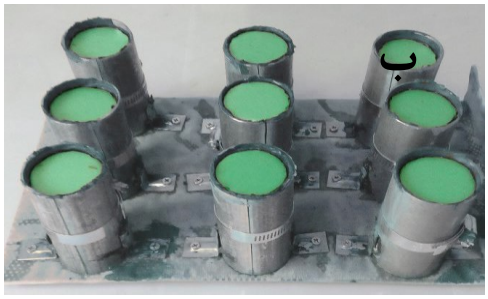




شکل ۹- منحنی تغییرات رسوب کربنات کلسیم با دما
الف) باکتری ب) میکروجلبک

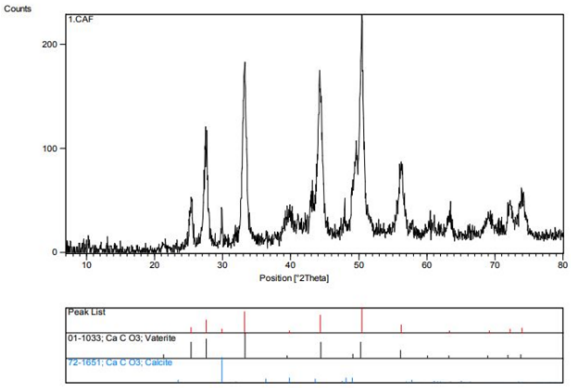
- **ترکیب با خاک و شناسایی نوع رسوبات**

با توجه به محدودیتهای روش تزریق در خاکهای ریزدانه، در تحقیق حاضر از روش اختلاط استفاده شد. مقدار مشخصی از نمونه در ظرف ریخته شده، ابتدا محلول باکتری به مقدار مشخص و سپس کلرید کلسیم با مولاریته بهینه به نسبت یک به یک اضافه و به آرامی مخلوط شد. پس از آن مخلوط به داخل قالب انتقال داده می شود. با توجه به آنکه کربنات تولید شده در محیط به شدت به درصد اوره موجود در محیط کشت وابسته است، مخلوطها در دو درصد اوره ۲ و ۲۰ تهیه شدند. همچنین برای بررسی اثر درصد رطوبت مخلوط، سه حالت رطوبتی اولیه صفر، ۵۰ و ۱۰۰ برای نمونه ها لحاظ گردید. نمونه ها در قالبهایی با قطر و ارتفاع به ترتیب ۴ و ۹ سانتیمتر در سه مرحله پر و برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در زیر قالب ها یک توری فلزی و یک کاغذ صافی قرار داده شد تا مانع از حرکت خاک و خارج شدن مخلوط از زیر قالب شود. شکل (۱۰) قالب ها را در حالت خالی و پر از نمونه نشان می دهد.



شکل ۱۰- قالبهای تهیه شده از مخلوط باکتری و کلرید کلسیم
الف) قالبهای خالی ب) قالبهای پر شده

رسوب کربنات کلسیم دارای سه نوع کریستال متفاوت شامل کلسیت[1]، واتریت[2] و آراگونیت[3] است که به ترتیب حائز مقاومت بیشتر هستند. از نظر شکل ظاهری نیز کریستالهای کلسیت لوزی یا مربعی شکل، واتریت کروی یا صفحه ای و آراگونیت سوزنی شکل می باشند. به منظور شناسایی نوع رسوب ایجاد شده در بهسازی بیولوژیکی با باکتری اسپوروسارسینا پاستوری، نمونه های مخلوط با خاک تحت آزمایش SEM و XRD قرار گرفتند. نتایج آزمون XRD برای باکتری در شکل (۱۱) نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می شود عمده نقاط اوج پراش اشعه ایکس، منطبق بر اوج لیست کریستال واتریت می باشند و بخش اندکی از آن نیز مربوط به کریستال کلسیت است. به این ترتیب قسمت اصلی از رسوب تشکیل شده از واکنش ها از نوع واتریت است. لازم به توضیح است که نوع کریستال ایجاد شده به شدت وابسته به دمای واکنش بوده و در دماهای پایین به سمت کریستال کلسیت میل خواهد کرد.



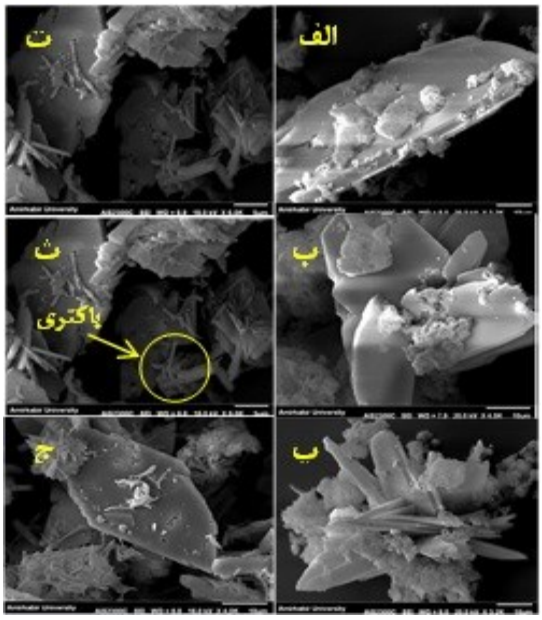
شکل ۱۱- نتیجه آزمون XRD در خصوص رسوبات باکتری

نتایج آزمون SEM بر روی رسوب تشکیل شده توسط باکتری نیز در شکل (۱۲) نشان داده شده است. با توجه به این شکل، کریستال های تشکیل شده عمدتا صفحه ای و برخی لوزی شکل هستند. این نکته بار دیگر نشان می دهد که عمده رسوب ایجاد شده از نوع کریستال واتریت است. تصاویر "الف تا پ" کریستالهای تشکیل شده بدون باکتری و تصاویر "ت تا ج" کریستالهای ایجاد شده همراه با باکتریهای میله ای شکل اسپوروسارسینا پاستوری را نشان می دهند.

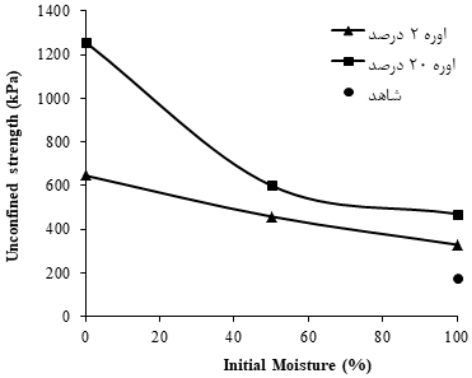
- **تعیین مقاومت**

نمونه های خاک با تزریق باکتری در سه رطوبت اولیه صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد و دو درصد اوره ۲ و ۲۰، پس ازخشک کردن در آون تحت آزمایش مقاومت تک محوری قرار گرفتند. شکل (۱۳) تغییرات مقاومت تک محوری با درصد رطوبت اولیه را نشان می دهد. در لیِ ن شکل منظور از نمونه شاهد نمونه بدون بهسازی بیولوژیکی است که در آن باطله بصورت طبیعی و بدون اضافه کردن باکتری خشک می شود. با

شکل ۱۲- تصاویر SEM از رسوب کربنات کلسیم تشکیل شده
(الف تا پ): خاک فاقد باکتری
(ت تا ج): خاک حاوی باکتری



توجه به نمودار، تاثیر رطوبت اولیه اختلاط در تشکیل بیوسمنت به وضوح پیداست. با افزایش رطوبت زمان تزریق، مقاومت تک محوری به شدت کاهش یافته که علت آن رقیق شدن کربنات موجود در سوسپانسیون باکتری پس از اختلاط با نمونه خاک است. تاثیر درصد اوره بر مقاومت تک محوری نیز در شکل مشهود است. با افزایش درصد اوره، مقاومت تک محوری افزایش یافته است. در نمونه خشک، افزایش اوره از ۲ به ۲۰ درصد، مقاومت تک محوری را تا ۲ برابر و نسبت به نمونه شاهد تا حدود ۷ برابر افزایش می دهد. در نمونه اشباع نیز ۲ درصد اوره مقاومت تک محوری را نسبت به نمونه شاهد ۲ برابر کرده و افزایش اوره تا ۲۰ درصد موجب افزایش ۳ برابری نسبت به نمونه شاهد شده است. بطور مشخص، تاثیر اوره بر مقاومت نمونه تک محوری در شرایط خشک به مراتب بیشتر است. شکل (۱۴) تصویری از انجام آزمایش تک محوری و نحوه گسترش ترکها در نمونه را نشان می دهد.



شکل ۱۳- تغییرات مقاومت تک محوری با رطوبت اولیه برای درصدهای اوره ۲ و ۲۰

[1] Calcite
[2] Vaterite
[3] Aragonite

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق به مطالعه تاثیر دو میکروارگانیسم متفاوت بر روند بهسازی بیولوژیکی باطله معدن مس پرداخته شد. باطله مورد مطالعه، خمیری از یک خاک ریزدانه اشباع و میکروارگانیسمهای مورد نظر شامل باکتری اسپوروسارسینا پاستوری و دو میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا و کلرلا وولگاریس بودند. در ابتدا مقایسه بین عملکرد دو میکروجلبک انجام گرفت. بر اساس میزان رسوب تشکیل شده در زمان معین، مشخص گردید که توانایی میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا در فرآیند تشکیل رسوبات کربناتی، به مراتب بالاتر از میکروجلبک کلرلا وولگاریس است. در ادامه، بررسی میزان رسوب تشکیل شده توسط باکتری و میکروجلبک منتخب نشان داد که توانایی باکتری اسپوروسارسینا پاستوری بین ۳ تا ۵ برابر بیشتر از میکروجلبک کلرلا سوروکینیانا است. بنابراین عملیات اختلاط با خاک تنها بر روی باکتری مذکور انجام شد. آزمایشهای مقاومت تک محوری بیانگر افزایش مقاومت حدود ۷ برابر نسبت به نمونه اولیه بهسازی نشده بود. سایر نتایج بدست امده از تحقیق حاضر به قرار زیر می باشند.

الف- تغییرات pH محیط در زمان بهسازی با میکروجلبک به مراتب کمتر از باکتری می باشد.

ب- مولاریته بهینه کلرید کلسیم برای رشد باکتری ۳ و برای میکروجلبک منتخب ۱ تعیین شد.

پ- تغییرات دما در محدوده ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد موجب افزایش اندک مقدار رسوب ایجاد شده توسط باکتری و کاهش رسوب تشکیل شده توسط میکروجلبک منتخب گردید.

ت- رسوبات تشکیل شده در بهسازی بیولوژیکی توسط باکتری اسپوروسارسینا پاستوری عموما واتریت با کریستالهای صفحه ای و بخش اندکی کلسیت با کریستالهای لوزی شکل است.

ث- درصد اوره و درصد رطوبت زمان اختلاط نقش مهمی در مقاومت نمونه بهسازی شده داشتند، بطوریکه با افزایش درصد اوره، مقاومت تک محوری نمونه به شدت افزایش یافت. ولی افزایش رطوبت اولیه از صفر تا صد درصد، این مقاومت را بین نصف تا دو سوم کاهش داد.

منابع

- امامی تبریزی، م.، محمدسیدی، ب.، ۱۳۹۸. بررسی یک روش نوین تزریق برای خاک‌های ماسه‌ای به‌سازی شده به‌روش بیولوژیکی، نشریه زمین شناسی مهندسی، سال ۱۳، شماره ۱، ص ۲۹-۴۴.
- Ariyanti, D., Handayani, N.A., Hadiyanto. 2012. Feasibility of using microalgae for biocement production through biocementation, J Bioproc Biotech, Vol. 2, P. 1-4.
- ASTM. 1998. Soils and Rock Division, West Conshohocken, Philadelphia, USA.
- Buikema, N.D. 2015. Stabilization of iron mine tailing through microbially induced calcite precipitation, M.Sc. Thesis, Michigan Technological University, USA.
- Burne, R.A., Chen, Y.Y. 2000. Bacterial ureases in infectious diseases, Microbes Infect, Vol. 2, P. 533–542.
- Mortensen, B.M., Haber, M.J., De Jong, J.T., Caslake, L.F., Nelson, D.C. 2011. Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation, J Appl Microbiol, Vol. 111, P. 338–349.
- Stabnikov, V., Jian, C., Ivanov, V., Li, Y. 2013. Halotolerant alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand, World J Microb Biotech, Vol. 29, P. 1453–1460.
- Stein, J. 1980. Handbook of physiological methods: culture methods and growth measurements, Cambridge University press, UK.
- Whiffin, V.S., Van Paassen, L.A., Harkes, M.P. 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique, Geomicrobiol J, Vol. 24, P. 417–423.
- Xiao, P., Liu, H., Xiao, Y., Stuedlein, A.W., Evans, T.M. 2018. Liquefaction resistance of bio-cemented calcareous sand, Soil Dyn Earthquake Engrg, Vol. 107, P. 9-19.
- Xiao, Y., Wang, Y., Desai, C.S., Jiang, X. 2019. Strength and deformation responses of biocemented sands using a temperature-controlled method, Int J Geomech, Vol. 19, No. 11, P. 04019120.