

## Optimization of resistance of biologically improved sand by response surface methodology

S.A. Ekramirad<sup>1</sup>, M. Azadi<sup>2\*</sup>, N. Shamskia<sup>3</sup>

1- Ph.D Student of Geotechnical engineering, Department of Civil Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

2- Associate Prof., Department of Civil Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

3- Assistant Prof., Department of Civil Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran

### ABSTRACT

Need to increase urban infrastructure and lack of access to suitable quality soil increased demand for new methods for soil improvement. Recently, improving the parameters of strength, stiffness and permeability of sand under microbial induced calcite precipitation has received much attention from geotechnical experts as innovative and environmentally friendly methods. Therefore, it is very important to study the parameters affecting the biological improvement technique and find the ideal combination to increase efficiency and reduce costs. The main purpose of this paper is to investigate the effect of the variability of cementation solution molarity, bacterial optical density and curing time (three levels of variation for each) on the parameters of deviation and effective stresses for biologically improved sand under undrained triaxial compression test. The sand used in this study is a SP soil according to the unified soil classification system, and the adopted micro-organism is *Bacillus pasteurii* as the urease-positive bacterium. The response surface methodology was used to optimize the stress parameters in the improved sand and to significantly reduce the number of experiments. The experiments were designed using a Box-Behnken design with five central points. Three-dimensional schemes and regression model contours were used to evaluate and compare the effect of each variable. In this method, according to the analysis of variance for the data, the effect of all variables on the responses was significant and the optimal values for effective and deviation stresses were 958.2 and 1032.4 (kPa), respectively. Due to the slope of the curves, the molarity of the cementation solution had the greatest effect on the responses, and the effect of bacterial optical density on effective stress was less than deviation stress, that may be due to the accumulation of excess bacteria (lack of nutrients) and its impact on excess pore water pressure.

### ARTICLE INFO

**Receive Date:** 23 November 2021

**Revise Date:** 04 June 2022

**Accept Date:** 02 July 2022

### Keywords:

Biological improvement;  
Cementation solution molarity;  
Optical density;  
Curing time;  
RSM.

All rights reserved to Iranian Society of Structural Engineering.

doi: <https://doi.org/10.22065/jsce.2022.316487.2652>

\*Corresponding author: Mohammad Azadi.  
Email address: azadi@qiau.ac.ir

## بهینه‌سازی مقاومت ماسه بهسازی شده بیولوژیکی توسط روش سطح پاسخ

سید عبدالله اکرامی راد<sup>۱</sup>، محمد آزادی<sup>۲\*</sup>، ناصر شمس کیا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری ژئوتکنیک، گروه مهندسی عمران، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی عمران، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی عمران، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

### چکیده

نیاز به افزایش زیرساخت های شهری و عدم دستیابی به خاک با کیفیت مناسب، باعث افزایش تقاضا برای روش های جدید جهت بهسازی خاک گردید. اخیراً، بهسازی پارامترهای مقاومت، سختی و نفوذپذیری ماسه تحت رسوب بیولوژیکی کرنات کلسیم به عنوان روش های نوآورانه و سازگار با محیط زیست بسیار مورد توجه متخصصان ژئوتکنیک قرار گرفته است. بنابراین بررسی پارامترهای مؤثر بر تکنیک بهسازی بیولوژیکی و یافتن ترکیب ایده‌ال در جهت افزایش کارایی و کاهش هزینه ها بسیار حائز اهمیت می باشد. هدف اصلی مقاله، بررسی اثر متغیرهای مولاریته محلول سیمان تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری و زمان عمل آوری نمونه (هر کدام با سه سطح تغییرات) بر روی پارامترهای تنش های انحرافی و مؤثر برای ماسه بهسازی شده بیولوژیکی تحت آزمایش سه محوری زهکشی نشده بوده است. ماسه مورد استفاده در این پژوهش از نوع ماسه بددانه بندی شده و باکتری ها از نوع اسپروسارسینای پاستوری با فعالیت اوره‌آزی مثبت بود. جهت بهینه نمودن پارامترهای تنش در ماسه بهسازی شده و همچنین کاهش قابل توجه تعداد آزمایشات از روش سطح پاسخ استفاده گردید. طرح مورد استفاده در روش سطح پاسخ، طرح باکس بنکن با پنج نقطه مرکزی بود. جهت ارزیابی و مقایسه میزان تأثیر هر یک از متغیرها از نمودارهای سه بعدی و کانتورهای مدل رگرسیونی استفاده شد. در این روش مطابق آنالیز واریانس برای داده ها، تأثیر تمامی متغیرها بر پاسخ ها معنادار بوده و مقادیر بهینه برای تنش های مؤثر و انحرافی به ترتیب  $۹۵۸/۲$  و  $۱۰۳۲/۴$  ( $kPa$ ) بدست آمدند. مشاهدات نشان داد که باتوجه به شیب نمودار و کانتورها، مولاریته محلول سیمان تاسیون بیشترین تأثیر را بر پاسخ ها داشته و تأثیر چگالی اپتیکی باکتری بر تنش مؤثر نسبت به تنش انحرافی، کمتر بود که می‌تواند به دلیل تجمع باکتری های مازاد (عدم وجود مواد مغذی کافی) و تأثیر آن بر فشار آب منفذی اضافی باشد.

کلمات کلیدی: بهسازی بیولوژیکی، مولاریته محلول سیمان تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری، زمان عمل آوری، روش سطح پاسخ.

شناسه دیجیتال:		سابقه مقاله:				
doi:	<a href="https://doi.org/10.22065/jsce.2022.316487.2652">https://doi.org/10.22065/jsce.2022.316487.2652</a>	چاپ	انتشار آنلاین	پذیرش	بازنگری	دریافت
	10.22065/jsce.2022.316487.2652	۱۴۰۱/۱۲/۲۹	۱۴۰۱/۰۴/۱۱	۱۴۰۱/۰۴/۱۱	۱۴۰۱/۰۳/۱۴	۱۴۰۰/۰۹/۰۲
				محمد آزادی		*نویسنده مسئول: پست الکترونیکی:
				azadi@qiau.ac.ir		

## ۱- مقدمه

در راستای افزایش جمعیت و زیرساخت‌های عمرانی، کمبود زیرساخت‌های شهری از یک سو و عدم دستیابی به خاک با کیفیت مناسب از سوی دیگر، باعث افزایش تقاضا برای روش‌های جدید و نوآورانه جهت بهسازی خاک گردیده است. در سال‌های اخیر، به دلیل نگرانی‌های زیست محیطی و صرف هزینه زیاد در راستای استفاده از تزریق مواد شیمیایی مانند اکریل آمید<sup>۱</sup>، فنوپلاست<sup>۲</sup>، اپوکسی<sup>۳</sup> و پلی اورتان<sup>۴</sup> به داخل منافذ خاک، روش‌های نوین بهسازی مانند رسوب بیولوژیکی کربنات کلسیم<sup>۵</sup> بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۲۱].

با توجه به حضور فراگیر میکروارگانیسمها در لایه‌های زیرین خاک، کنترل و مدیریت فرآیند شیمیایی آنها منجر به توسعه روش‌های بهسازی بیولوژیکی رسوب کربنات کلسیم در مهندسی ژئوتکنیک گردید، که از یک سو به دلیل عدم نیاز به غلظت بالای مواد مصرفی و نفوذ پذیری بیشتر آنها و از سوی دیگر سازگاری با محیط زیست، گامی مناسب در جهت رفع مشکلات قبلی می‌باشد.

مطالعات زیادی در مورد توانایی‌های این روش با هدف افزایش مقاومت و سختی [۴ و ۳]، بهبود مشخصات خاک ماسه‌ای [۵-۷]، کنترل خاک ماسه‌ای [۸]، کاهش فرسایش و تثبیت شیروانی خاک ماسه‌ای [۹]، تولید آجر بیولوژیکی در شرایط اشباع جزئی [۱۰] صورت گرفته است. همچنین رسوب‌گذاری کنترل شده مواد معدنی در فضای حفرات جهت تغییر ویژگی‌های ماکرو خاک به عنوان یک رویکرد ابتکاری جدید در مهندسی ژئوتکنیک بطور قابل ملاحظه‌ای توسعه یافته است [۶].

در ادامه، تحقیقات به سمت بررسی پارامترهای تأثیرگذار بر کارایی روش و دستیابی به نتایج مطلوب تر پیش رفت. بررسی تزریق دوفازی جهت جلوگیری از تجمع و انباشته شدن رسوب در نقطه شروع تزریق از جمله این موارد بود [۱۱]. در ادامه، اثر غلظت محلول سیمان‌تاسیون و زمان ماند را بر کارایی روش بهسازی بیولوژیکی در شرایط چگالی اپتیکی ثابت [۱۲] و اثر درجه سیمان‌تاسیون را بر رفتار تنش کرنش ماسه در آزمایش سه محوری CU ارزیابی شد [۱۳]. همچنین تحقیقاتی بر روی خواص فیزیکی و مکانیکی ماسه سمنته شده بیولوژیکی و بازسازی شده انجام گردید [۱۴]. از دیگر تحقیقاتی که در این زمینه صورت گرفته می‌توان به مطلوب بودن دامنه  $pH$  بین ۷.۵ تا ۸ [۱۵]، ممانعت از مسدود شدگی با تزریق تک‌فازی و  $pH$  کم [۱۶]، ارزیابی کنترل فرسایش بادی بر روی انواع خاک‌های مختلف [۱۷] و تأثیر محلول سیمان‌تاسیون بر رفتار حالت بحرانی ماسه اشاره نمود [۱۸].

هدف اصلی در این مقاله بررسی میزان تأثیر هر یک از متغیرها جهت دستیابی به ترکیب ایده آل آنها و بهینه نمودن پارامترهای تنش مؤثر و انحرافی در ماسه بهسازی شده بیولوژیکی تحت آزمایش سه محوری زهکشی نشده<sup>۶</sup> توسط روش سطح پاسخ<sup>۷</sup> می‌باشد. روش سطح پاسخ یک روش آماری مفید و مؤثر در جهت بهینه‌سازی پارامترها بوده که به طور موفق در بسیاری از پروسه‌های بیولوژیکی و شیمیایی استفاده می‌گردد [۱۹]. هدف از اعمال این روش، یافتن بهترین ترکیب پارامترهای مؤثر بر بهسازی بیولوژیکی ماسه برای دستیابی به تنش‌های حداکثر خاک می‌باشد. متداول ترین طرح‌های مورد استفاده در روش سطح پاسخ شامل طرح‌های باکس بنکن<sup>۸</sup> و مرکب مرکزی<sup>۹</sup> می‌باشد [۲۰]. در ادامه با استفاده از روش باکس بنکن اثرات سه عامل غلظت محلول سیمان‌تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری و زمان عمل آوری در آزمایش سه محوری زهکشی نشده با سه سطح تغییرات مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

<sup>1</sup> Acrylamide

<sup>2</sup> Phenoplasts

<sup>3</sup> Epoxy

<sup>4</sup> Polyurethane

<sup>5</sup> Microbial Induced Calcite Precipitation (MICP)

<sup>6</sup> Consolidated Undrained (CU) Triaxial Test

<sup>7</sup> Response Surface Methodology (RSM)

<sup>8</sup> Box - Behnken

<sup>9</sup> Central Composite

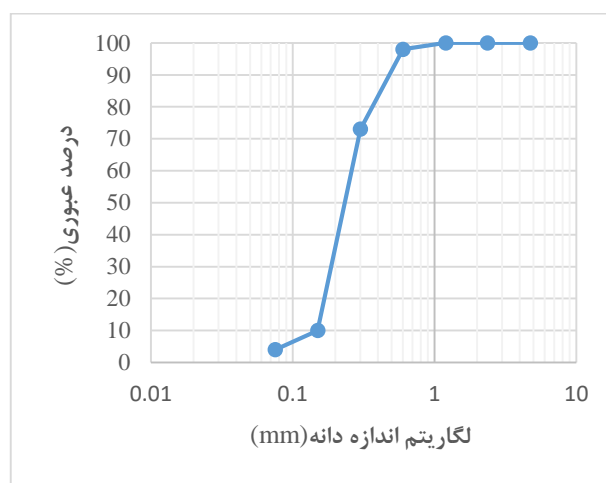
## ۲- مصالح

## ۲-۱ - نوع خاک

آزمایشات بر روی ماسه بد دانه بندی شده از منطقه کوهین استان قزوین، مطابق سیستم طبقه بندی متحد خاک<sup>۱۰</sup> انجام شد (جدول ۱) و منحنی دانه بندی خاک براساس آنالیز اندازه دانه‌ها<sup>۱۱</sup>، ترسیم شد (شکل ۱). سایز دانه‌ها باید به گونه‌ای باشد تا فضای کافی برای باکتری‌ها و حرکت آنها فراهم گردد [۲۱]، که باتوجه به اندازه نسبتاً کوچک باکتری‌ها بین ۰/۵ تا ۳ میکرون، خاک ماسه مناسب می‌باشد. بر اساس آزمایشهای صورت گرفته روی نمونه خاک تخلخل خاک، دانسیته خاک و وزن مخصوص خشک خاک به ترتیب ۰/۳۷، ۰/۷۳ و ۱/۵۹ g/cm<sup>۳</sup> بوده است. (جدول ۱)

جدول ۱: مشخصات فیزیکی مصالح.

مشخصات	مقدار
طبقه بندی خاک	ماسه بد دانه بندی شده
ضریب یکنواختی	۱/۷۳
ضریب خمیدگی	۱/۰۲۶
چگالی دانه‌های جامد	۲/۶۳
چگالی خشک	۱/۵۹ g/cm <sup>۳</sup>
تخلخل ماکزیمم	۰/۸۸
تخلخل مینیمم	۰/۴۲
چگالی نسبی	۰/۳۷



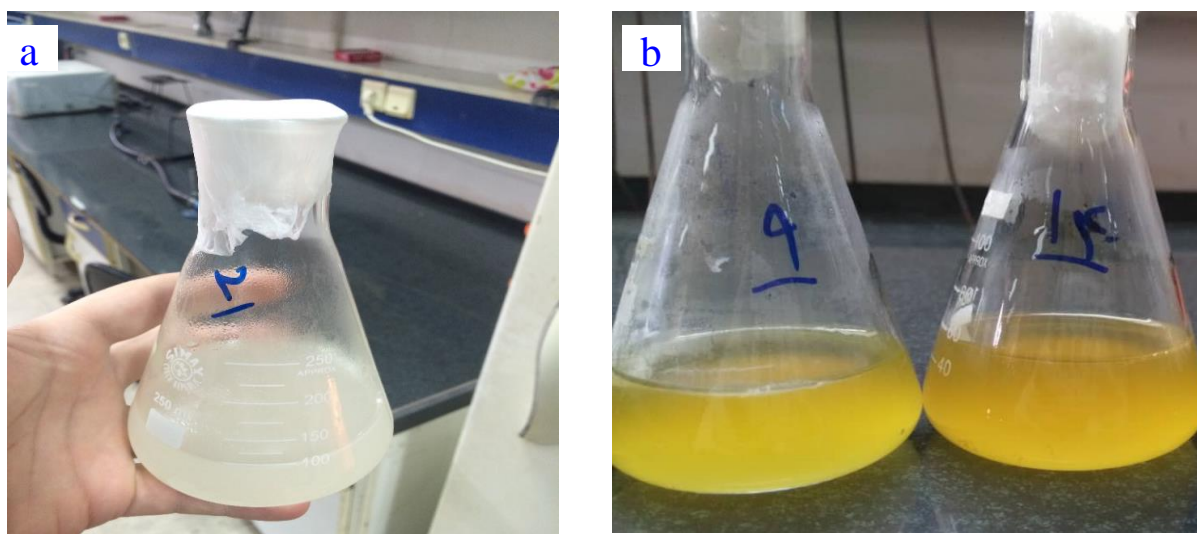
شکل ۱: منحنی دانه بندی خاک.

## ۲-۲ - میکروارگانیزم و محیط کشت

باکتری‌های اسپروسارسینای پاستوری<sup>۱۲</sup> که یک باکتری با فعالیت اووره‌آزی مثبت می‌باشند که به عنوان کاتالیزور و تسریع کننده واکنش استفاده می‌گردد. باکتری‌ها از مرکز تحقیقات علمی و صنعتی ایران به شماره PTCC 1645 (DSM33) بصورت لیوفلیزه<sup>۱۳</sup> (خشک- شده انجمادی) تهیه گردید. این باکتری گرم مثبت، دارای اندوسپور و بهترین دمای رشد آن ۳۰ درجه سانتیگراد است. در کلیه

<sup>10</sup> ASTM D2487<sup>11</sup> ASTM 175 D422<sup>12</sup> Sporosarcina pasteurii<sup>13</sup> Lyophilized

استانداردهای شناخته شده در سطح بین المللی، این باکتری در دسته باکتریهای بدون آلودگی قرار گرفته و رسوب کربنات کلسیم ناشی از آن برای محیط زیست خطری ندارد. هنگامیکه باکتریها در شرایطی مناسب قرار گیرند، قادر به تکثیر و رشد بوده و اصطلاحاً گفته می شود باکتری کشت داده شده است. کشت باکتری انواع مختلفی دارد که شامل، کشت باکتری در محیط کشت مایع (براث)<sup>۱۴</sup> یا کشت باکتری در محیط کشت جامد (آگار)<sup>۱۵</sup> خواهد شد (شکل ۲). باکتری جهت فعالیت به محیط کشت مطابق جدول ۲ حاوی ۱۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر  $\text{NiCl}_2$  با  $\text{pH} = 8/5$  برای فعالیت منتقل شدند. فعالیت آنزیم اورهاز با نظارت بر میزان هیدرولیز اوره، مطابق روش پیشنهادی ویفین ۲۰۰۴، با اندازه گیری تغییرات در هدایت الکتریکی اندازه گیری شد. واکنش اوره آز، یک متالوآنزیم وابسته به نیکل و از دسته هیدرولازهاست که هیدرولیز اوره را به آمونیاک و دی اکسید کربن کاتالیز می کند. بنابراین، هدایت الکتریکی را در شرایط استاندارد افزایش می دهد [۲۲].



شکل ۲: (a) محیط کشت مایع (ناترینت براث و اوره) قبل و (b) پس از کشت باکتری

جدول ۲: مشخصات محیط کشت.

مقدار	محیط کشت
۵/۰	پپتون (g/L)
۵/۰	کلرید سدیم (g/L)
۱/۵۰	عصاره مخمر (g/L)
۲۰/۰	آگار (g/L)

از آنجایی که یکی از پارامترهای مورد بررسی چگالی اپتیکی<sup>۱۶</sup> باکتری می باشد، با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری<sup>۱۷</sup> در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری می شود [۲۳]. چگالی اپتیکی باکتری، میزان کدورت باکتری رشد یافته در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری می باشد. این دستگاه با عبور نوری با طول موج معین از محلول های شاهد و اصلی حاوی ماده مورد نظر، کدورت حاصل از افزودن آن ماده را تعیین می کند. همچنین غلظت آمونیوم توسط روش نسلر<sup>۱۸</sup> اصلاح شده تعیین گردید [۶].

<sup>14</sup> Nutrient broth

<sup>15</sup> Nutrient agar

<sup>16</sup> Optical density

<sup>17</sup> Spectrophotometer

<sup>18</sup> Nessler

## ۳- روش کار

## ۳-۱- آماده سازی نمونه

نمونه‌ها در یک قالب استوانه‌ای از جنس لوله پی وی سی با قطر ۷ و ارتفاع ۱۴ سانتیمتر مطابق با شرایط نمونه آزمایش دستگاه سه محوری آماده گردید. جهت تخلیه محلول سیمان‌تاسیون در انتهای هر فاز تزریق، نیاز به تعبیه روزنه خروجی در کف قالب با قابلیت باز و بسته شدن آن می‌باشد بطوریکه با قرار دادن فیلتر مناسب در مدخل خروجی (انتهای آن) مانع خروج دانه های خاک از قالب گردد. پس از ساخت و آب‌بندی قالب، نمونه خاک مطابق شرایط استاندارد با تراکم نسبی ۰/۳۷ و وزن معادل ۸۲۰ گرم در آن جایگزین شده و حجم مورد نیاز محلول سیمان‌تاسیون با غلظت های مختلف شامل ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ مولار بر اساس حجم مولی اوره و کلرید کلسیم دو آبه به ترتیب برابر ۶۰ و ۱۴۷ گرم بر مول محاسبه و جهت تزریق آماده می‌گردد.

## ۳-۲- مراحل بهسازی بیولوژیکی

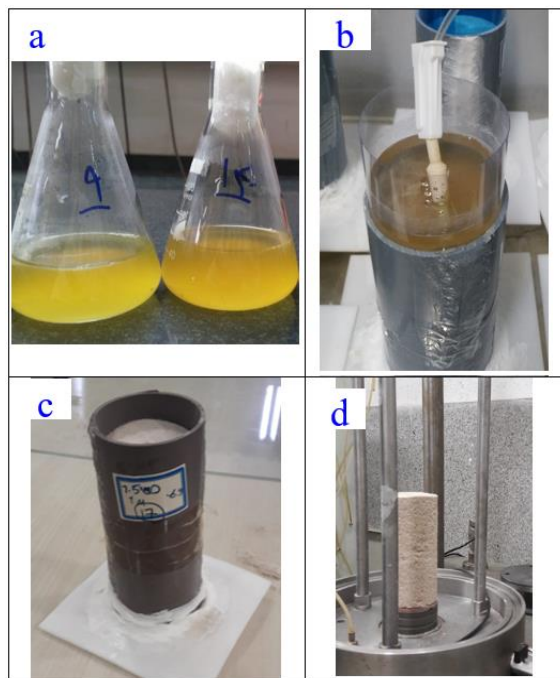
برای بهسازی نمونه از روش تزریق ثقلی جهت توزیع یکنواخت رسوب کلسیت استفاده گردید. جهت آماده سازی نمونه، ابتدا خاک را در سه لایه در داخل قالب قرار داده و سپس با استفاده از آب مقطر معادل حجم نمونه، کاملاً شستشو داده شد [۲۴]. پس از شستشوی نمونه، نوبت به تزریق باکتری رقیق شده به همراه بافر ها و محیط کشت بوده، که از قبل به اندازه ۱/۲ برابر حجم منافذ خاک آماده گردیده [۲۵ و ۲۶] و به آرامی به داخل منافذ خاک تزریق شد. باید توجه داشت که در این مرحله نیاز به تثبیت باکتری در داخل منافذ خاک و انجام واکنش پس از اضافه نمودن محلول سیمان‌تاسیون می‌باشد. تثبیت باکتری با اضافه نمودن محلول کلرید کلسیم با حجمی معادل ۱/۲ برابر حجم منافذ خاک [۱۱] و بر اساس مولاریته هر آزمایش، به نمونه خاک انجام گردید و حدود ۶ ساعت به نمونه زمان داده شد تا تثبیت و توزیع یکنواخت باکتری صورت گیرد. در ادامه، عمل تزریق محلول سیمان‌تاسیون با استفاده از ظرف سرم مطابق شکل ۳(b) در ۴ فاز صورت گرفت. بعد از تزریق فازهای اول و دوم، مجدداً تزریق باکتری به همراه بافر ها و محیط کشت و همچنین تثبیت آنها انجام شده و پس از گذشت ۶ ساعت، تزریق فازهای سوم و چهارم محلول سیمان‌تاسیون ادامه یافت. جهت دستیابی به حداکثر کارایی، فاصله زمانی بین فازها، بر اساس نرخ سرعت تزریق 0.042 mol/L/h و مولاریته محلول سیمان‌تاسیون (بین ۱۲ تا ۳۶ ساعت در این پژوهش به دست آمده است.) بوده [۱۲] و در پایان هر فاز تزریق، تخلیه کامل محلول سیمان‌تاسیون از دریچه انتهایی قالب صورت گرفت. فقط بعد از پایان فاز چهارم تزریق، عمل تخلیه محلول سیمان‌تاسیون جهت انجام واکنش مناسب پس از ۴۸ ساعت انجام شد.

طبق تحقیقات صورت گرفته، فعالیت باکتری بعد از ۲۰ روز به زیر ۵ mM urea/h افت می‌کند. کاهش فعالیت باکتری می‌تواند ناشی از محدودیت هیدرولیکی مثل مقاومت باکتری و وقفه انتقال شیمیایی در فضای حفرات بعد از رسوب باشد (که مانع رسیدن مواد مغذی مورد نیاز برای رشد و فعالیت شیمیایی برای رسوب بیشتر باکتری می‌گردد). هر دو دلیل (کپسوله کردن باکتری و کمبود مواد مغذی) همراه با شستشوی باکتری به عنوان دلایل کاهش فعالیت باکتری گزارش شده است [۳]. پس از اتمام مراحل تزریق و باتوجه به تزریق ۴ فازی، نمونه در آزمایشگاه در دمای حدود ۲۷ تا ۳۰ درجه بر اساس مدت زمان عمل آوری نمونه (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) مطابق شکل ۳(c) نگهداری شده تا فرایند بهسازی بیولوژیکی خاک کامل گردد و پس از سمته شدن بیولوژیکی مطابق شکل ۳(d) جهت انجام آزمایشات سه محوری در داخل دستگاه سه محوری قرار گرفت.

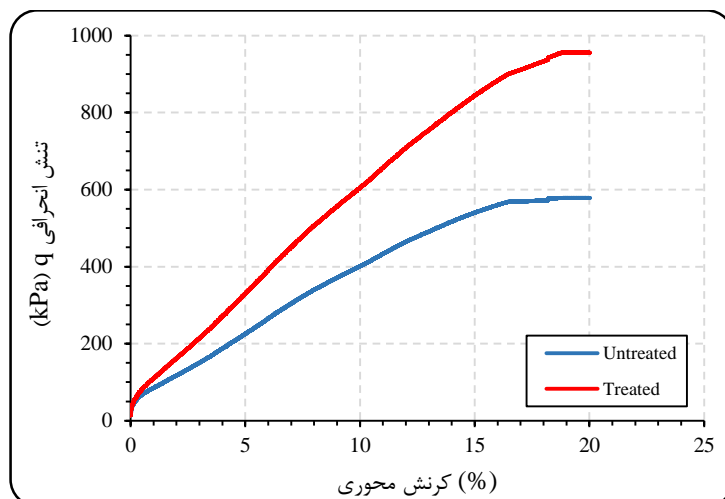
## ۳-۳- آزمایش سه محوری

جهت بررسی مشخصات مقاومتی خاک با استفاده از دستگاه سه محوری و شرایط زهکشی نشده، نمونه ها از قالب خارج شده و در قالب دستگاه سه محوری قرار گرفت. جهت انجام آزمایش سه محوری زهکشی نشده، ابتدا توسط گاز CO<sub>2</sub>، هوای موجود در داخل خلل فرج خاک خارج گردیده و بعد از اشباع سازی نمونه، تحکیم نمونه تحت فشار همه جانبه ۱۰۰ kPa شکل گرفت. بعد از اتمام مرحله تحکیم و کنترل آن، بارگذاری تحت تنش انحرافی در شرایط بسته بودن شیرهای زهکشی بر نمونه خاک اعمال گردید. مطابق شکل ۴، مقایسه نمودارهای تنش انحرافی نسبت به کرنش، برای نمونه در شرایط قبل و بعد از بهسازی بیولوژیکی تحت القای رسوب

کربنات کلسیم می‌تواند به میزان ۶۵ درصد مقدار تنش انحرافی را افزایش دهد. پس از اتمام آزمایش سه محوری آنالیزهای آماری توسط روش سطح پاسخ بر روی نتایج خروجی مورد بررسی انجام شد. در این مقاله تأثیر پارامترهایی مانند مولاریته محلول سیمان‌تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری و زمان عمل‌آوری نمونه با سه سطح تغییرات، بر بهسازی به روش رسوب بیولوژیکی کربنات کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۳: (a) محلول سیمان‌تاسیون (b) تزریق محلول سیمان‌تاسیون (c) نمونه پس از عمل‌آوری (d) نمونه در دستگاه آزمایش سه محوری.



شکل ۴: تغییرات تنش انحرافی نسبت به کرنش محوری برای نمونه، قبل و بعد از بهسازی بیولوژیکی

### ۳-۴ - آنالیز آماری

به منظور یافتن بهترین شرایط رفتار تنش - کرنش خاک بهسازی شده، از روش سطح پاسخ، به عنوان یک روش ریاضی و آماری برای تجزیه و تحلیل مسائل با پاسخ‌های وابسته به چند متغیر، استفاده شد. طرح انتخابی، طرح باکس بنکن با پنج نقطه مرکزی بود که توسط نرم‌افزار طراحی و ارائه گردید. متغیرهای اصلی مورد بررسی شامل مولاریته محلول سیمان‌تاسیون (غلظت مواد واکنش دهنده شامل کلرید کلسیم دی‌هیدراته و اوره و باکتری در محلول تزریق) بین ۰/۵ تا ۱/۵ مولار، چگالی اپتیکی باکتری ( $OD_{600}$ ) حداقل ۱/۲ -

۰/۸ و حداکثر ۴ - ۲ و زمان عمل آوری نمونه بین ۱۵ تا ۴۵ روز بودند (جدول ۳). پاسخ‌های مورد بررسی شامل تنش انحرافی ( $q$ ) و تنش مؤثر ( $P'$ ) هستند. معنی‌دار بودن یا نبودن هر یک از پارامترها و همچنین اثرات ترکیبی آنها با توجه به مقدار  $P$ -Value محاسبه شده توسط نرم افزار مشخص می‌گردد. در صورتی که مقدار  $P$ -Value کمتر از ۰/۰۰۵ باشد، پارامتر معنی‌دار بوده و اگر بالاتر از ۰/۰۱ باشد، معنی‌دار نبوده و از معادله حذف می‌گردد تا مدل‌های جدید ارائه شود. کیفیت مدل‌های مناسب از طریق ضرایب رگرسیون مورد بررسی قرار می‌گیرد.

جدول ۳: سطح تغییرات متغیرها جهت بهسازی بیولوژیکی ماسه.

نمونه	متغیرهای مستقل	سطح تغییرات		
A	(mol/L) مولاریته سیمان‌تاسیون	۰/۵	۱/۰	۱/۵
B	(OD <sub>600</sub> ) چگالی اپتیکی باکتری	۰/۸-۱/۲	۱/۵-۲/۰	۲/۰-۴/۰
C	(day) زمان عمل آوری	۱۵	۳۰	۴۵

همچنین جهت ارزیابی تأثیر متغیرها بر روند بهسازی بصورت تصویری و گرافیکی، از طرح‌های سه بعدی و کانتورهای مدل رگرسیونی استفاده شد.

#### ۴- نتایج

##### ۴-۱ - بررسی نتایج بدست آمده توسط نرم افزار

مقادیر  $q$  و  $p'$  بر اساس تنش همه جانبه ۱۰۰ kPa و خروجی نتایج تنش انحرافی حاصل از دستگاه سه محوری CU محاسبه و در جدول ۴ آمده است. در این جدول، نتایج آزمایشگاهی، حاصل تحلیل و محاسبات خروجی‌های دستگاه سه محوری برای هر نمونه بوده و نتایج پیشگویی شده بر اساس تحلیل‌های واریانس<sup>۱۹</sup> و آماری روش سطح پاسخ توسط مدل Quadratic یا رگرسیون سهمی درجه دوم برای مقادیر  $q$  و  $p'$  بدست آمده است. با توجه به جدول ۴ مشاهده می‌گردد که تطابق خوبی بین مقادیر آزمایشگاهی و پیش بینی شده توسط روش سطح پاسخ وجود دارد. در مورد هر دو پاسخ  $q$  و  $p'$ ، مقادیر بهینه شده با مدل درجه دوم ارزیابی شدند. مقادیر ضرایب رگرسیونی  $q$  و  $p'$  به ترتیب ۰/۹۸۸۵۳ و ۰/۹۸۷۹ بدست آمدند که پس از ساده کردن یعنی حذف پارمترهای با  $P$ -Value بالاتر از ۰/۰۱ از مدل، به ۰/۹۷۵۵ و ۰/۹۸۲۳ کاهش یافتند.

##### ۴-۲ - بهینه سازی $q$

##### ۴-۲-۱ - آنالیز واریانس

بهینه‌سازی  $q$  ابتدا توسط نرم افزار Design Expert version 11.0.3.0 انجام گردید. این نرم افزار جهت طراحی آزمایش با توجه به تعداد متغیرها و سطح تغییرات آنها، به تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و بهینه نمودن پاسخ‌ها از طریق مدل‌های رگرسیونی پرداخته و با ارائه نمودارهای سه بعدی و کانتورها اثر متغیرها را نشان می‌دهد. سه مدل شامل Linear, 2FI, Quadratic توسط نرم افزار آزمایش شد و از بین آنها مدل Quadratic به خوبی با مدل آزمایشگاهی منطبق گردید (جدول ۵). بنابراین مدل Quadratic با بکارگیری از رگرسیون سهمی درجه دوم، برای محاسبه نحوه تغییرات  $q$  با متغیرهای مستقل و اندرکنش آنها انتخاب شد. مدل Quadratic بطور کلی توسط معادله زیر نشان داده می‌شود:

$$Y_i = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{ii=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{ij=1}^3 \alpha_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

که در آن  $Y_i$  پاسخ پیشگویی شده توسط نرم افزار،  $\alpha_0$  ضریب ثابت،  $\alpha_i$  ضریب متغیر خطی،  $\alpha_{ii}$  ضریب متغیر درجه دوم،  $\alpha_{ij}$  ضریب متغیرهای اندرکنشی و  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای مستقل مدل می‌باشند.

<sup>19</sup> ANOVA



جدول ۴: مقادیر آزمایشگاهی و نتایج پیش بینی شده توسط مدل Quadratic.

شماره	متغیرها			نتایج			
	مولاریته سیمان تاسیون (mol/L)	چگالی اپتیکی باکتری (OD <sub>600</sub> )	زمان عمل آوری (day)	آزمایشگاهی		پیشگویی شده	
				q (kPa)	p' (kPa)	q (kPa)	p' (kPa)
1	0.5	0.8	30	562.68	619.08	580.75	631.92
2	1.5	0.8	30	914.86	1002	912.89	999.89
3	0.5	2.2	30	627.82	690.2	629.79	692.31
4	1.5	2.2	30	957.08	1020.32	939.01	1007.48
5	0.5	1.5	15	543.53	598.93	518.59	575.11
6	1.5	1.5	15	853.75	935.85	848.85	926.98
7	0.5	1.5	45	633.23	695.9	638.13	704.77
8	1.5	1.5	45	924.31	1012.21	949.25	1036.04
9	1	0.8	15	677.33	743.93	684.20	754.91
10	1	2.2	15	686.15	753.53	709.12	775.24
11	1	0.8	45	804.48	882.33	781.51	860.62
12	1	2.2	45	838.63	919.25	831.76	908.27
13	1	1.5	30	774.36	850.63	793.11	870.27
14	1	1.5	30	802.08	879.7	793.11	870.27
15	1	1.5	30	794.15	871.16	793.11	870.27
16	1	1.5	30	795.41	872.82	793.11	870.27
17	1	1.5	30	799.56	877.06	793.11	870.27

جدول ۵: خلاصه مدل‌های آماری برای پاسخ q توسط BBD.

Source	Linear	2FI	Quadratic
Lack of Fit p-value	0.0199	0.0108	0.0321
Adjusted R <sup>2</sup>	0.9426	0.9279	0.9665
Predicted R <sup>2</sup>	0.9209	0.8455	0.7936
			Suggested

براساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس برای پاسخ q (جدول ۶) مشاهده گردید که پارامترهای خطی مولاریته محلول سیمان تاسیون، زمان عمل آوری نمونه و پارامتر درجه دوم زمان عمل آوری نمونه به ترتیب بیشترین تأثیر را بر q دارند. پس از آن پارامتر خطی چگالی اپتیکی باکتری (OD<sub>600</sub>) نیز بر q تأثیر گذار است. سایر پارامترها مانند پارامتر درجه دوم مولاریته و چگالی اپتیکی و غیره، به دلیل معنی دار نبودن (P-Value > 0.01) از مدل حذف شدند.

#### ۴-۲- معادله مدل رگرسیونی

براساس مقادیر تجربی بدست آمده از طرح باکس بنکن، معادله درجه دوم برای پاسخ q قبل از ساده سازی بصورت زیر ارائه گردید:

$$q = 54.5743 + 526.16A + 69.6931B + 12.515C - 16.3714AB - 0.638AC + 0.603095BC - 80.889A^2 - 14.8566B^2 - 0.151932C^2 \quad (2)$$

که در آن A مولاریته محلول سیمان تاسیون، B چگالی اپتیکی باکتری و C زمان عمل آوری نمونه می‌باشد. اما با توجه به P-Value بدست آمده از آنالیز واریانس، پارامترهای بدون معنی (P-Value > 0.01) از معادله اولیه حذف و به صورت زیر ساده سازی شد:

$$q = 167.1139 + 320.685A + 26.845B + 13.189C - 0.1587C^2 \quad (3)$$

انحراف استاندارد و  $R^2$  برای مدل درجه دوم پیشگویی شده به ترتیب برابر  $۰/۹۸۵۳$  و  $۲۲/۶۲$  بدست آمده است. مقدار ضریب رگرسیونی  $R^2$  در جدول بالا نشان می‌دهد که  $۱/۴۷$  درصد پاسخ‌ها با مقادیر پیشگویی شده مطابقت ندارد.

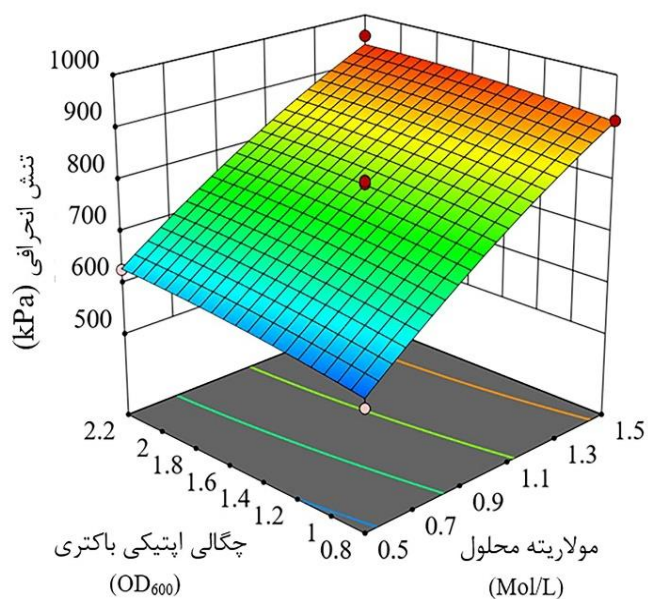
جدول ۶: نتایج آنالیز واریانس مدل Quadratic برای پاسخ  $q$ .

پارامتر	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	p-value
Model	2.405E+05	26721.26	52.22	< 0.0001
A	2.057E+05	2.057E+05	401.92	< 0.0001
B	2824.89	2824.89	5.52	0.0511
C	24187.90	24187.90	47.27	0.0002
AB	131.33	131.33	0.2566	0.6280
AC	91.58	91.58	0.1790	0.6850
BC	160.40	160.40	0.3134	0.5930
A <sup>2</sup>	1721.85	1721.85	3.36	0.1093
B <sup>2</sup>	223.14	223.14	0.4360	0.5302
C <sup>2</sup>	4920.41	4920.41	9.61	0.0173

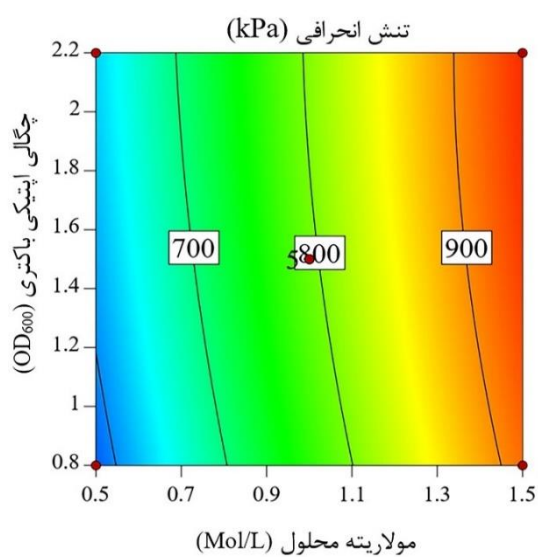
#### ۴-۲-۳- بررسی نمودارهای سه بعدی و کانتورهای مدل رگرسیونی

برای مشهود شدن اثر متغیرهای مستقل بر هریک از پاسخ‌ها، نمودارهای سه بعدی و کانتورها کارایی مؤثری را خواهند داشت. توسط اشکال گرافیکی، تأثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ در نقاط مختلف ارزیابی شده و با یافتن نقطه تقاطع بین متغیرها، می‌توان مقدار دقیق ویژگی اندازه‌گیری شده تحت عنوان پاسخ را بدست آورد [۲۷]. برای ترسیم نمودارها و کانتورها، یک متغیر مستقل در مقدار مرکزی خود ثابت و تغییرات متغیر وابسته نسبت به دو متغیر مستقل دیگر به تصویر کشیده می‌شود.

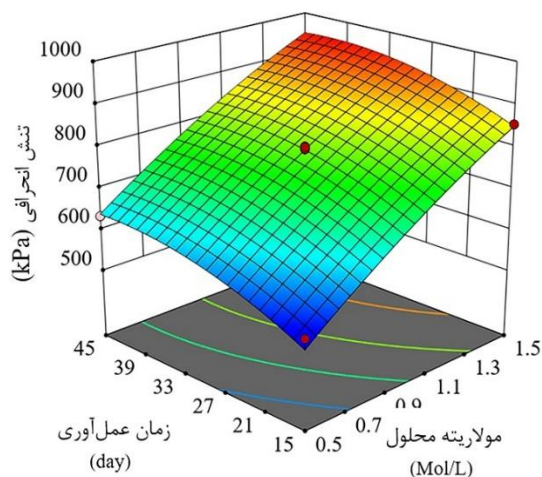
باتوجه به تأثیر بیشتر مولاریته محلول سیمانتاسیون، در نمودارهای سه بعدی و کانتورها، اثرات اندرکنشی آن با هر یک از دو متغیر مستقل دیگر در شکل‌های ۵ و ۶ برای زمان عمل آوری ۳۰ روزه و همچنین در شکل‌های ۷ و ۸ برای چگالی اپتیکی باکتری برابر  $۱/۵$  تا  $۲/۰$  ارائه گردید. مشاهدات نشان می‌دهد که باتوجه به شیب نمودار و کانتورها، مولاریته محلول سیمانتاسیون به دلیل تامین مواد مغذی، بیشترین تأثیر را بر پاسخ  $q$  دارد. همچنین مقایسه بین شکل‌های ۵ و ۸ نشان می‌دهد که تأثیر زمان عمل آوری نمونه به دلیل ایجاد فرصت کافی جهت تشکیل رسوب کربنات کلسیم، نسبت به چگالی اپتیکی بیشتر بود.



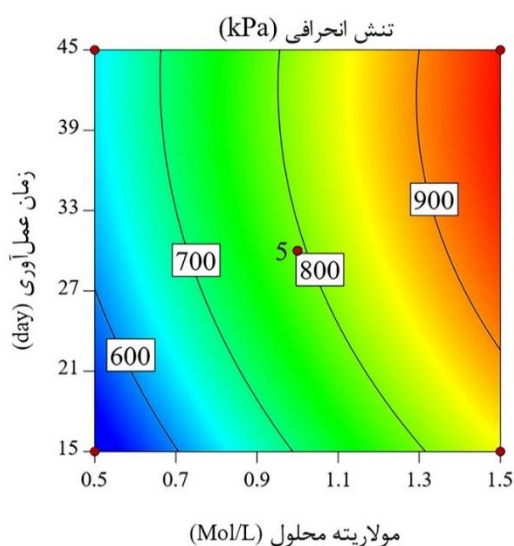
شکل ۵: نمودار سه بعدی تأثیر مولاریته محلول و چگالی اپتیکی بر پاسخ  $q$  (زمان عمل آوری برابر ۳۰ روز).



شکل ۶: تغییرات پاسخ  $q$  تحت تأثیر مولاریته محلول و چگالی اپتیکی (زمان عمل آوری برابر ۳۰ روز).



شکل ۷: نمودار سه بعدی تأثیر مولاریته محلول و زمان عمل آوری بر پاسخ  $q$  ( $OD_{600} = 1.5 - 2.0$ ).



شکل ۸: تغییرات پاسخ  $q$  تحت تأثیر مولاریته محلول و زمان عمل آوری ( $OD_{600} = 1.5 - 2.0$ ).

۴ - ۳ - بهینه سازی  $P'$

۴ - ۳ - ۱ - آنالیز واریانس

بهینه‌سازی صورت گرفته برای  $P'$  توسط مدل‌های آماری مختلف نشان داد که نتایج آزمایشگاهی تقریباً منطبق با مدل درجه دوم (مطابق جدول ۷) می‌باشد. بنابراین مجدداً مدل درجه دوم، مطابق معادله (۱) برای ارزیابی تغییرات  $P'$  نسبت به متغیرهای مستقل انتخاب گردید.

جدول ۷: خلاصه مدل‌های آماری برای پاسخ  $P'$  توسط BBD.

Source	Linear	2FI	Quadratic
Lack of Fit p-value	0.0178	0.0104	0.0442
Adjusted R <sup>2</sup>	0.9410	0.9290	0.9725
Predicted R <sup>2</sup>	0.9210	0.8609	0.8346
			Suggested

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس برای پاسخ  $P'$  (جدول ۸) پارامترهای خطی مولاریته محلول سیمان تاسیون و زمان عمل آوری نمونه، بیشترین تأثیر را بر  $P'$  دارند. پس از آن پارامتر درجه دوم زمان عمل آوری نمونه و مولاریته محلول سیمان تاسیون و پارامتر خطی چگالی اپتیکی باکتری ( $OD_{600}$ )، به ترتیب بیشترین تأثیر را بر  $P'$  گذاشت. سایر پارامترها مثل پارامتر درجه دوم چگالی اپتیکی و حاصلضرب پارامترهای مورد بررسی در این مقاله، به دلیل معنی دار نبودن ( $P\text{-Value} > 0.01$ ) از مدل حذف شدند.

جدول ۸: نتایج آنالیز واریانس مدل Quadratic برای پاسخ  $P'$ .

پارامتر	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-value	p-value
Model	2.741E+05	30455.03	63.76	< 0.0001
A	2.333E+05	2.333E+05	488.48	< 0.0001
B	2310.64	2310.64	4.84	0.0638
C	28494.81	28494.81	59.65	0.0001
AB	696.96	696.96	1.46	0.2663
AC	106.19	106.19	0.2223	0.6516
BC	186.60	186.60	0.3906	0.5518
A <sup>2</sup>	2782.26	2782.26	5.82	0.0465
B <sup>2</sup>	573.25	573.25	1.20	0.3096
C <sup>2</sup>	4823.30	4823.30	10.10	0.0155

#### ۴-۳-۲ - معادله مدل رگرسیونی

بر اساس مقادیر تجربی بدست آمده از طرح باکس بنکن، معادله درجه دوم برای پاسخ  $P'$  قبل از ساده سازی بصورت زیر ارائه گردید:

$$P' = 33.2314 + 624.395A + 113.917B + 12.7156C - 37.7143AB - 0.687AC + 0.650476BC - 102.823A^2 - 23.8128B^2 - 0.150426C^2 \quad (۴)$$

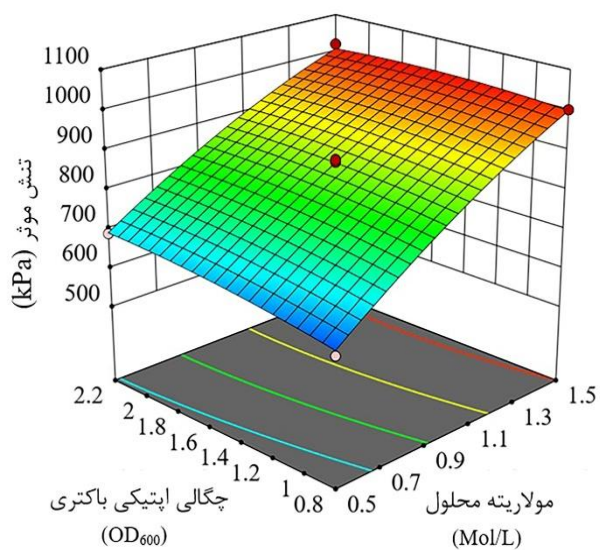
که در آن  $A$  مولاریته محلول سیمان تاسیون،  $B$  چگالی اپتیکی باکتری و  $C$  زمان عمل آوری نمونه می باشد. اما با توجه به  $P\text{-Value}$  بدست آمده از آنالیز واریانس، پارامترهای بدون معنی ( $P\text{-Value} > 0.01$ ) از معادله اولیه حذف و به صورت زیر ساده سازی شد:

$$P' = 124.894 + 522.1265A + 24.2786B + 13.168C - 105.2796A^2 - 0.1532C^2 \quad (۵)$$

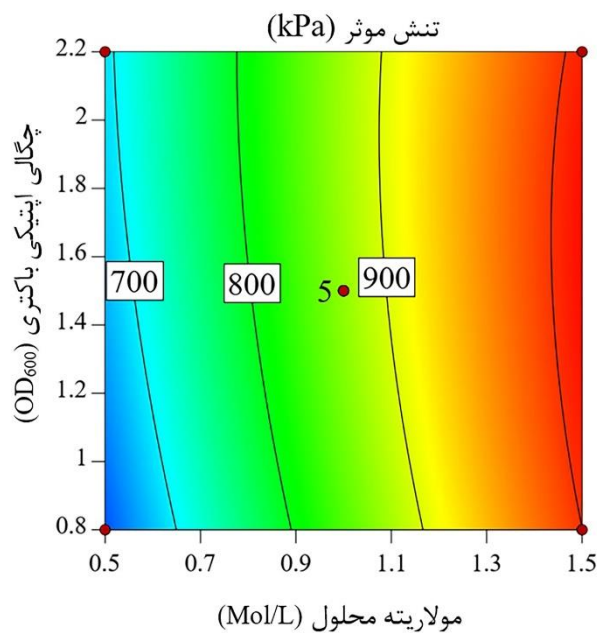
انحراف استاندارد و  $R^2$  برای مدل درجه دوم پیشگویی شده به ترتیب برابر  $۲۱/۸۶$  و  $۰/۹۸۷۹$  بدست آمده است. مقدار ضریب رگرسیونی  $R^2$  در جدول بالا نشان می دهد که  $۱/۱۱$  درصد پاسخها با مقادیر پیشگویی شده مطابقت ندارد.

#### ۴-۳-۳ - بررسی نمودارهای سه بعدی و کانتورهای مدل رگرسیونی

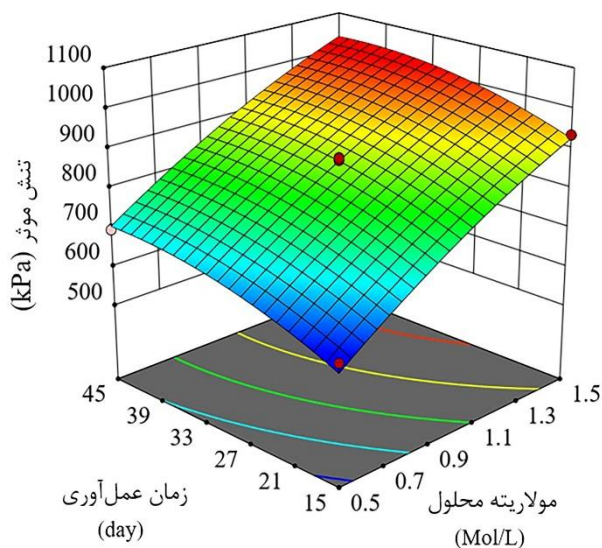
مشابه حالت قبل، با توجه به تأثیر بیشتر مولاریته محلول سیمان تاسیون، در نمودارهای سه بعدی و کانتورها، اثرات اندرکنشی آن با هر یک از دو متغیر مستقل دیگر در شکل های ۹ و ۱۱ ارائه گردید. طبق شواهد و شیب نمودار و کانتورها، مولاریته محلول سیمان تاسیون بیشترین تأثیر را بر پاسخ  $P'$  دارد. همچنین مقایسه بین شکل های ۹ و ۱۰ حاکی از تأثیر بیشتر زمان عمل آوری نمونه نسبت به چگالی اپتیکی باکتری بود. ضمناً مقایسه بین شکل های ۶ و ۹ نشان می دهد که اثرات چگالی اپتیکی بر روی پاسخ  $P'$  نسبت به حالت قبل ( $q$ ) کمتر نیز گردیده است. شاید علت فوق ناشی از تجمع باکتری های مازاد (کافی نبودن مواد مغذی و عدم مشارکت باکتری در القای رسوب کربنات کلسیم) باشد که می تواند بر فشار آب حفره ای اضافی و متعاقباً بر  $P'$  تأثیر بگذارد.



شکل ۹: نمودار سه بعدی تأثیر مولاریته محلول و چگالی اپتیکی بر پاسخ  $P'$  (زمان عمل آوری برابر ۳۰ روز).

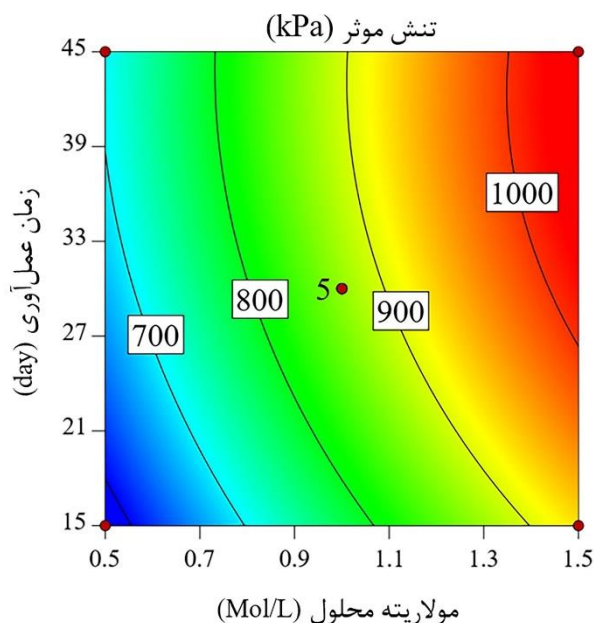


شکل ۱۰: تغییرات پاسخ  $P'$  تحت تأثیر مولاریته محلول و چگالی اپتیکی (زمان عمل آوری برابر ۳۰ روز).



شکل ۱۱: نمودار سه بعدی تأثیر مولاریته محلول و زمان عمل آوری بر پاسخ  $P'$  ( $OD_{600}=1.5-2.0$ ).

در ادامه آنالیز بهینه‌سازی با استفاده از روش سطح پاسخ بر روی داده‌های تجربی صورت گرفت. نتایج نشان داد که مقادیر بهینه برای پاسخ‌های  $q$  و  $P'$  به ترتیب برابر  $۹۵۸/۲$  و  $۱۰۳۲/۴$  کیلو پاسکال می‌باشد که براساس مقادیر مولاریته محلول سیمان‌تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری و زمان عمل آوری به ترتیب برابر  $۱/۴۹۱$  (mol/L)،  $۲/۰۹۵$  و  $۳۹/۱۶$  (روز) اتفاق می‌افتد.



شکل ۱۲: تغییرات پاسخ  $P'$  تحت تأثیر مولاریته محلول و زمان عمل آوری ( $OD_{600}=1.5-2.0$ ).

## ۵- نتیجه‌گیری

در این مقاله، روش سطح پاسخ توسط طرح باکس بنکن جهت طراحی آزمایشات استفاده شد که با کاهش تعداد آزمایشات باعث صرفه‌جویی قابل توجه در وقت و هزینه‌ها گردید. هدف اصلی، بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر مانند مولاریته محلول سیمان‌تاسیون، چگالی اپتیکی باکتری و زمان عمل آوری نمونه بر بهسازی به روش رسوب بیولوژیکی کربنات کلسیم بود.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که برای هر دو پاسخ  $q$  و  $P'$ ، مدل درجه دوم بکارگرفته شده توسط نرم افزار Design Expert version 11.0.3.0 تطابق خوبی را بین داده‌های تجربی و مقادیر پیش بینی شده برقرار می‌سازد. با توجه به ضریب

رگرسیون  $R^2$  بدست آمده برای پاسخها، میزان خطا بین مقادیر واقعی و پیش بینی شده کمتر از ۲ درصد بود. نتایج حاصل از آنالیزها برای پاسخ  $q$  نشان داد که از یک سو، تأثیر افزایش مولاریته محلول سیمان تاسیون، بیشتر از چگالی اپتیکی و زمان عمل آوری بر خاک مورد مطالعه بوده و به ترتیب ۶۸/۵، ۸/۰۲ و ۲۳/۴۸ درصد است، که دلیل آن، تامین مواد مغذی مانند اوره و کلرید کلسیم در تسریع انجام واکنش و تولید رسوب کربنات کلسیم می باشد. از سوی دیگر افزایش زمان عمل آوری باعث می شود که فرصت بیشتری به نمونه ها جهت القای رسوب کربنات کلسیم داده شده و پیوندهای بین ذرات قوی تری و منجر به افزایش بیشتر  $q$  و  $P'$  نسبت به افزایش چگالی اپتیکی گردد. به طور مشابه تأثیر هر یک از پارامترهای فوق بر پاسخ  $P'$  به ترتیب ۶۹، ۶/۹ و ۲۴/۱ درصد بود. تأثیر مولاریته محلول سیمان تاسیون و زمان عمل آوری بر هر دو پاسخ  $q$  و  $P'$  تقریباً مشابه بوده، اما تأثیر کمتر چگالی اپتیکی باکتری بر  $P'$  به دلیل تجمع باکتری های مازاد (عدم وجود مواد مغذی کافی) و تأثیر آن بر فشار آب منفذی اضافی و  $P'$  باشد. همچنین بهینه سازی صورت گرفته بر روی پارامترهای مؤثر بر بهسازی به روش رسوب بیولوژیکی کربنات کلسیم نشان داد که مقادیر بهینه برای پاسخ های  $q$  و  $P'$  برای خاک مورد بررسی در این پژوهش، به ترتیب برابر ۹۵۸/۲ و ۱۰۳۲/۴ کیلو پاسکال می باشد.

## مراجع

- [1] Xanthakos, P.P., Abramson, L.W. and Bruce, D.A. (1994). Ground Control and Improvement. John Wiley & Sons.
- [2] Karol, R.H. (2003). Chemical Grouting and Soil Stabilization. Revised and Expanded. Vol 12, Crc Press.
- [3] Van Paassen, L.A. (2009). BiogROUT, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation. University of Delf. Dissertation.
- [4] Rong, H., Qian, C-X. and Li, L. (2012). Study on microstructure and properties of sandstone cemented by microbe cement. *Construction and Building Materials*, 36, 687-694.
- [5] DeJong, J.T., Fritzges, M.B. and Nüsslein, K. (2006). Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering*, 132(11), 1381-1392.
- [6] Whiffin, V.S., van Paassen, L.A. and Harkes, M.P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.
- [7] Cheng, L. and Shahin, M.A. (2019). Microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. In *Ecological wisdom inspired restoration engineering*, 47-68.
- [8] Gao, Y., Tang, X., Chu, J. and He, J. (2019). Microbially Induced Calcite Precipitation for Seepage Control in Sandy Soil. *Geomicrobiology Journal*, 36(4), 366-375.
- [9] Jiang, N.J. and Soga, K. (2017). The applicability of microbially induced calcite precipitation (MICP) for internal erosion control in gravel-sand mixtures. *Géotechnique*, 67(1), 42-55.
- [10] Cheng, L., Kobayashi, T. and Shahin, M.A. (2020). Microbially induced calcite precipitation for production of "bio-bricks" treated at partial saturation condition. *Construction and Building Materials*, 231, 117095.
- [11] Harkes, M.P., Van Paassen, L.A., Booster, J.L., Whiffin, V.S. and van Loosdrecht M.C.M. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecological Engineering*, 36(2), 112-117.
- [12] Al Qabany, A., Soga, K. and Santamarina, C. (2012). Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 138(8), 992-1001.
- [13] Montoya, B.M. and DeJong, J.T. (2015). Stress-strain behavior of sands cemented by microbially induced calcite precipitation", *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 141(6), 4015019.
- [14] Azadi, M., Ghayoomi, M., Shamskia, N. and Kalantari, H. (2017). Physical and mechanical properties of reconstructed bio-cemented sand. *Soils and Foundations*, 57(5), 698-706.
- [15] Kim, G., Kim, J. and Youn, H. (2018). Effect of temperature, pH, and reaction duration on microbially induced calcite precipitation. *Applied Sciences*, 8(8):1277.
- [16] Cheng, L., Shahin, M.A. and Chu, J. (2019). Soil bio-cementation using a new one-phase low-pH injection method. *Acta Geotechnica*, 14(3), 615-626.
- [17] Salifu, E., MacLachlan, E., Iyer, K. R., Knapp, C. W., and Tarantino, A. (2016). Application of microbially induced calcite precipitation in erosion mitigation and stabilisation of sandy soil foreshore slopes: a preliminary investigation. *Engineering Geology*, 201, 96-105.
- [18] Riveros, G.A. and Sadrekarimi, A. (2020). Effect of Microbially-induced Cementation on the Instability and Critical State Behaviors of Fraser River Sand", *Canadian Geotechnical Journal*, 1(519), 1-50.



- [19] Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., and Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food chemistry*, 107(3), 1300-1306.
- [20] Khuri, A.I., and Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- [21] Madigan, M.T., Martinko, J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. 11th edited.
- [22] Whiffin, V.S. (2004). Microbial CaCO<sub>3</sub> precipitation for the production of biocement", Dissertation, Murdoch University, Western Australia.
- [23] Chen, L., Li, L., Xing, F., Peng, J., Peng, K., Wang, Y., and Xiang, Z. (2018). Human urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy of cartilage defects. *Stem cells international*.
- [24] Lin, H., Suleiman, M.T., Brown, D.G., and Kavazanjian Jr, E. (2016). Mechanical behavior of sands treated by microbially induced carbonate precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 142(2), 1-13.
- [25] Han, Z., Cheng, X., and Ma, Q. (2016). An experimental study on dynamic response for MICP strengthening liquefiable sands. *Earthquake Engineering and Engineering Vibration*, 15(4), 673-679.
- [26] Sasaki, T., and Kuwano, R. (2016). Undrained cyclic triaxial testing on sand with non-plastic fines content cemented with microbially induced CaCO<sub>3</sub>. *Soils and Foundations*, 56(3), 485-495.
- [27] Gharibzahedi, S.M. T., Mousavi, S.M., Hamed, M., and Ghasemlou, M. (2012). Response surface modeling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut oil-in-water beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 293-301.