

## The Effect of Calcium Carbonate Bioprecipitation on *Escherichia coli* Leaching in Sand Column

REYHANEH SHOKATI<sup>1</sup>, NASRIN GHORBANZADEH<sup>1\*</sup>, MOHAMMAD BAGHER FARHANGI<sup>1</sup>, MAHMOUD SHABANPOUR<sup>1</sup>

1. Department of Soil Science, University of Guilan, Rasht, Iran  
(Received: June. 8, 2019- Revised: July. 2, 2019- Accepted: July. 27, 2019)

### ABSTRACT

Prediction of bacteria transport to groundwater is very important to prevent water resources from coliform bacteria pollution. The objective of this study was to investigate the effectiveness of microbially induced calcium carbonate precipitation (MICCP) in preventing the transport of *Escherichia coli* as an indicator coliform. For the MICCP process, the sand sample was poured into PVC tubes (with inside diameter of 4.8 and height of 14.92 cm) and incubated for 3 days in the presence of *Sporosarcina pasteurii*. After the establishment of steady-state flow, 0.1 pore volume of *Escherichia coli* suspension ( $10^8$  CFU/mL) was added to the sand column and the leaching was followed with distilled water. The column effluent was sampled in 0.1 to 5 pore volume. After leaching, the sand column was sliced into five sections (~3 cm), and the number of *E. coli* trapped in each slice was measured using the plate count method in EMB agar culture medium. Leaching was also carried out in control sand column. The effect of MICCP treatment and its interaction with pore volume was significant ( $p < 0.05$ ) on *Escherichia coli* count in effluent. The effect of depth and its interaction with MICCP treatment were significant ( $p < 0.05$ ) on *E. coli* residuals and bioprecipitated calcium carbonate in the column. Overall, the role of bioprecipitated calcium carbonate was significant in bacteria filtration, as it decreased the sand column hydraulic conductivity and reduced the number of *E. coli* in column effluents.

**Keywords:** Biomineralization, Urease, Hydraulic conductivity, *Sporosarcina pasteurii*

## پیامد رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم بر آب‌شویی باکتری/شیریشیا کولی در ستون شنی

ریحانه شوکتی<sup>۱</sup>، نسرین قربان‌زاده<sup>۱\*</sup>، محمدباقر فرهنگی<sup>۱</sup>، محمود شعبان‌پور<sup>۱</sup>

۱. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۸ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۴/۱۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۵/۵)

### چکیده

پیش‌بینی انتقال باکتری‌ها به آب‌های زیرزمینی برای جلوگیری از آلودگی منابع آب به باکتری‌های کلی‌فرم بسیار حائز اهمیت است. این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم (MICCP) در جلوگیری از انتقال باکتری/شیریشیا کولی به عنوان باکتری شناساگر آلودگی زیستی انجام شده است. برای انجام فرایند MICCP نمونه شنی در لوله PVC (قطر داخلی ۴/۸ و بلندی ۱۴/۹۲ سانتی‌متر) ریخته شد و برای سه روز همراه با باکتری/اسپوروسارسینا پاستئوری انکوباسیون شد. پس از پیدایش جریان ماندگار اشباع، به اندازه ۰/۱ حجم منفذی از سوسپانسیون باکتری/شیریشیا کولی ( $10^8$  CFU/mL) به ستون افزوده شد و آب‌شویی با آب مقطر انجام شد. از زه‌آب خروجی از ستون‌ها در حجم‌های منفذی ۰/۱ تا ۵ نمونه‌برداری شد. پس از پایان آب‌شویی، ستون شنی به ۵ برش ۳ سانتی‌متری تقسیم شد و شمار باکتری‌های به دام افتاده در ستون اندازه‌گیری شدند. شمارش باکتری‌ها در محیط کشت EMB و به روش شمارش کلنی انجام شد. ستون شنی کنترل نیز آب‌شویی شد. پیامد تیمار MICCP و برهم‌کنش آن با حجم منفذی بر شمار/شیریشیا کولی در زه‌آب معنی‌دار شد ( $p < 0/05$ ). پیامد عمق و برهم‌کنش آن با تیمار نیز بر شمار مانده باکتری/شیریشیا کولی در ستون و کربنات کلسیم معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). روی‌هم‌رفته، کارکرد کربنات کلسیم فراهم شده زیستی در پالایش باکتری‌ها به ویژه در لایه‌های بالایی ستون قابل توجه بوده و با کاهش ضریب آب‌گذری ستون شنی، غلظت باکتری/شیریشیا کولی در زه‌آب کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: کانی‌شدن زیستی، اوره‌آز، ضریب آب‌گذری، اسپوروسارسینا پاستئوری

### مقدمه

خواستگاه اصلی آب آشامیدنی در بسیاری از سرزمین‌های خشک و نیمه خشک آب‌های سطحی و زیرزمینی است. انتقال ریزجانداران بیماری‌زا در محیط‌های متخلخل مانند خاک، باعث آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود. فضولات جانوری و مردمی دارای شمار فراوانی از جانداران گوناگون مانند کلی‌فرم‌ها، استرپتوکوک‌ها، ژیاودییا، کریپتوسپوریدیوم<sup>۴</sup> و روتاویروس‌ها<sup>۵</sup> است (Unc and Goss, 2003). شمار فراوانی از باکتری‌های بیماری‌زا در زه‌آب خروجی در جایگاه‌های نگهداری دام و کودهای دامی، نشن فاضلاب و یا ایستگاه‌های پالایش پساب‌های شهری دیده شده است. این زه‌آب‌های آلوده بیشتر به رودخانه‌ها می‌ریزند و همراه با آب رودخانه، ته‌نشست‌ها را نیز آلوده می‌کنند. بنابراین،

ته‌نشست‌های رودخانه‌ها همانند خواستگاه‌های مهم باکتری‌های بیماری‌زا هستند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ته‌نشست‌های کناره و کف رودخانه‌ها، شمار بسیار بالاتری از باکتری‌های رودهای و به ویژه/شیریشیا کولی<sup>۱</sup> را در برابر خود آب دارا هستند (Rehmann and Soupir, 2009).

باکتری/شیریشیا کولی با بودن همیشگی آن در فضولات و شناسایی آسان، یک باکتری شناساگر در بررسی آلودگی آب‌های روزمینی و زیرزمینی به فضولات مردمی و دامی است. این باکتری از خانواده انتروباکتریاسه<sup>۷</sup> بوده و یک باکتری میله‌ای، بی‌هوازی، اختیاری، گرم-منفی، بدون اسپور، جنینده با تاژک پیرامونی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و دارای اندازه ۲ در ۰/۷ میکرومتر است (Madigan et al., 2017). این باکتری در دستگاه گوارش

\* نویسنده مسئول: nghorbazadeh@guilan.ac.ir

1 Coliforms  
2 Streptococci  
3 Giardia  
4 Cryptosporidium  
5 Rotaviruses  
6 Escherichia coli  
7 Enterobacteriaceae

2015). در فرایند کانی‌شدن زیستی<sup>۲</sup>، باکتری‌ها همانند جایگاه‌های هسته‌ای عمل می‌کنند که از این راه کربنات کلسیم بر روی دیواره باکتری‌ها رسوب می‌کند (Ramachandran et al., 2001). کربنات کلسیم ساخته شده با ریزجانداران در این فرایند، فضای بین دانه‌های شن را پر کرده و با پیدایش پیوند میان آن‌ها، سختی خاک را افزایش می‌دهد (Gorospe et al., 2013). افزون بر این، رسوب کربنات کلسیم برانگیخته میکروبی<sup>۳</sup> (MICCP) مایه کاهش نفوذپذیری آب در خاک‌های شنی می‌شود (De Muynck et al., 2010; Phillips et al., 2013). در پژوهش‌های بسیاری به کاهش ضریب آبگذری در خاک شنی با فرایند زیستی رسوب برانگیخته کربنات کلسیم یاد شده است (Cunningham et al., 2011; Lee et al., 2012; Sharma and Ramkrishnan, 2016).

کاهش نفوذپذیری در پی بسته شدن زیستی<sup>۴</sup> منافذ با کربنات کلسیم در خاک‌های شنی رخ می‌دهد. گزارش شده است که حتی در اندازه‌های اندک رسوب کربنات کلسیم (کمتر از ۶-۵ درصد) نیز کاهش چشم‌گیری در نفوذپذیری خاک رخ می‌دهد (Whiffin et al., 2007). اگرچه در پژوهش‌ها به پیامد روش MICCP در افزایش سختی و کاهش نفوذپذیری آب در خاک پرداخته شده است اما توان این روش در کاهش انتقال باکتری‌ها در محیط متخلخل کمتر بررسی شده است. بنابراین از آنجا که در ایران گزارش‌های بسیاری از آلوده شدن آب‌های زیرزمینی به باکتری‌های بیماری‌زا مانند /شیریشیا کولی دیده شده است و با توجه به این‌که فرایند MICCP در کاهش نفوذپذیری خاک‌های شنی کارایی ویژه‌ای دارد، این پژوهش با هدف بررسی کارایی روش MICCP در کاهش انتقال باکتری /شیریشیا کولی به عنوان باکتری شناساگر آلودگی زیستی آب و خاک پیشنهاد و انجام شده است.

## مواد و روش

### نمونه برداری و آزمایش شن

شن بکاررفته در این پژوهش از تهنشست‌های رودخانه‌ای در منطقه خشکبیجار استان گیلان گردآوری شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی مانند دانه‌بندی و پخش اندازه‌ی دانه‌های شن به روش هیدرومتر و الک خشک (Gee and Bauder, 1986)، جرم مخصوص حقیقی به روش پیکنومتر، جرم مخصوص ظاهری به روش

جانوران خون‌گرم زندگی می‌کند و در فضولات آن‌ها یافت می‌شود. /شیریشیا کولی یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است و باعث بیماری‌های گوارشی مانند اسهال خونی، عفونت‌های ادراری در مردم و مایه نارسایی حاد کلیه در کودکان می‌شود (Kaper and Karmali, 2008).

باکتری بیماری‌زا برای انتقال در محیط متخلخل در آغاز بایستی زنده بماند. زمان زنده‌مانی /شیریشیا کولی در بیرون از دستگاه گوارش می‌تواند بسته به شرایط از چند روز تا بیش از یک سال باشد (Fremaux et al., 2007). این باکتری در کنار دانه‌های رس می‌تواند برای زمانی طولانی زنده بماند (Mosaddeghi et al., 2009). زمان زنده‌مانی باکتری در خاک شنی بسته به کم بودن گنجایش نگهداری آب و اندوخته مواد آلی در برابر خاک لومی و یا رسی کمتر است (Erickson et al., 2014).

/شیریشیا کولی در خاک می‌تواند با جریان آب جابجا شده و به آب‌های زیرزمینی برسد. انتقال باکتری‌ها به آب‌های زیرزمینی به ویژگی خاک و خواصگاه آلودگی (فضولات مردمی و دامی)، ویژگی‌های الکتروشیمیایی رویه باکتری‌ها و شاید ریخت باکتری بستگی دارد (Becker et al., 2004; Unc and Goss, 2003). توزیع اندازه ذرات محیط متخلخل نیز یکی از فاکتورهای مهم در انتقال باکتری‌ها است. منافذ پیوسته که اندازه آن‌ها چند برابر بزرگتر از اندازه یک باکتری است، با پیدایش یک راه آزاد برای جابجایی باکتری‌ها، اجازه انتقال آن‌ها به لایه‌های زیرتر را می‌دهد (Abu-Ashour et al., 1998). خاک‌های رسی بسته به اندازه ریز و رویه ویژه بیشتر در برابر شن توانایی جذب و چسبندگی بالاتری از باکتری‌ها بر روی رویه‌های خود دارند و جلوی انتقال آن‌ها به ژرفای پایین‌تر را می‌گیرند. بنابراین انتقال باکتری‌ها در خاک شنی بسته به وجود منافذ بزرگتر آن‌ها بیشتر بررسی شده است. روش‌های گوناگونی برای کاهش نفوذپذیری و افزایش

پایداری خاک‌های شنی بررسی شده است. این روش‌ها بیشتر بهره‌گیری از چسباننده‌ها، سیمان و مواد شیمیایی است که افزون بر پرهزینه بودن، مایه آلودگی نیز می‌شوند (DeJong et al., 2010). در این میان، بهره‌گیری از باکتری‌های چرخه نیتروژن که از ریزجانداران مهم در پیدایش کانی‌های زیستی هستند می‌تواند یک راه‌کار خوب باشد. این باکتری‌ها با ساخت آنزیم اوره‌آز مایه پیدایش رسوب کربنات کلسیم در منافذ می‌شوند. این فرایند به رسوب‌گذاری زیستی کربنات کلسیم شناخته می‌شود (Achal,

برآورد شد. در گام سوم برای انجام فرایند MICCP، ستون شن با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱:۱ اوره و کلرید کلسیم (هر دو با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار)، به همراه ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری اسپوروسارسینا پاستوری (۱۰<sup>۸</sup> یاخته باکتری در گرم) (Okwadha and Li, 2010)، به گونه عمودی و از بالای ستون اشباع شد. برای جلوگیری از هدر رفت محلول‌های یادشده در زمان انکوباسیون ظرفی در زیر ستون گذاشته شد تا ستون اشباع بماند. پس از اشباع شدن، ستون برای ۷۲ ساعت در دمای ۳۰°C انکوباسیون شد. ضریب آب‌گذری اشباع ستون‌ها پیش و پس از انجام فرایند MICCP به روش بار ثابت اندازه‌گیری شد (Klute, 1986). ستون شن بدون فرایند MICCP هم به عنوان کنترل آزمایش آماده شد.

#### جداسازی باکتری/شریشیا کولی پایدار به آنتی‌بیوتیک

باکتری/شریشیا کولی پایدار به آنتی‌بیوتیک از ته‌نشست‌های رودخانه زرجوب واقع در شهر رشت جداسازی شد. برای جداسازی باکتری/شریشیا کولی از دیگر باکتری‌های هم‌خانواده از محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) در دمای ۳۷°C بهره‌گیری شد و باکتری سبز با جلای فلزی به عنوان/شریشیا کولی شناسایی شد. سپس پایداری باکتری جدا شده در برابر چند آنتی‌بیوتیک در محیط کشت مولر هینتون آگار<sup>۶</sup> به روش پخشیدگی قرص ارزیابی شد (CLSI, 2012) و با بررسی قطر ناحیه بازدارندگی<sup>۷</sup> آنتی‌بیوتیکی آشکار شد که باکتری جدا شده در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین پایدار است. با بازکشت باکتری در محیط کشت EMB دارای ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، پایداری باکتری به این آنتی‌بیوتیک گواهی شد. سپس باکتری به محیط کشت NB دارای آنتی‌بیوتیک جابجا و در دمای ۳۷°C با هوادهی بر روی شیکر (۱۱۰ rpm) تا زمان رسیدن باکتری به گام پایانی فاز رشد نمایی برای ۱۶ ساعت گذاشته شد. سپس باکتری از محیط کشت جداسازی و تا زمان آزمایش در یخچال (دمای ۴°C) نگاهداری شد (Jiang et al., 2007).

#### آب‌شویی ستون‌ها

برای آب‌شویی ستون‌های انکوباسیون شده، ستون‌ها به گونه یکنواخت اشباع شده و جریان آب ماندگار در آن‌ها پدیدار شد. شدت جریان ماندگار در ستون کنترل آزمایش و MICCP به

استوانه‌های نمونه‌برداری و ضریب آب‌گذری اشباع شن به روش بار ثابت<sup>۱</sup> اندازه‌گیری شد (Klute, 1986). تخلخل کل نیز با داشتن جرم مخصوص‌های ظاهری و حقیقی برآورد شد. از ویژگی‌های شیمیایی نیز pH با پی‌اچ متر دیجیتالی مدل 420A و رسانندگی الکتریکی با رسانندگی سنج دیجیتالی مدل 4510، در نسبت‌های ۱ به ۵ شن به آب اندازه‌گیری شد (Rhoades, 1996). اندازه کرنات کلسیم به روش تیتراسیون برگشتی (Loeppert and Suarez, 1996) و ماده آلی شن نیز به روش اکسیداسیون‌تر (Walkley and Black, 1934) اندازه‌گیری شد.

#### آماده‌سازی و بازکشت باکتری اسپوروسارسینا پاستوری<sup>۲</sup>

باکتری اسپوروسارسینا پاستوری (PTCC1645) از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) فراهم شد و در محیط کشت نوترینت آگار (NA) به همراه اوره (۲ درصد) بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشت نوترینت برات (NB)، دارای ۲ درصد وزنی به حجمی اوره (۳۳۳ میلی‌مولار) جابجا و در دمای ۳۰°C با هوادهی بر روی شیکر (۱۱۰ rpm) تا زمان رسیدن باکتری به گام پایانی فاز رشد نمایی گذاشته شد. سپس باکتری از محیط کشت جداسازی و تا زمان انجام آزمایش در یخچال (دمای ۴°C) نگاهداری شد (Achal et al., 2009).

#### آماده‌سازی و پایه‌گذاری ستون‌های آب‌شویی

در آغاز به ۴۰۰ گرم شن، ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۵۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم افزوده شد و پس از آمیختن آن، برای ۲۴ ساعت در دمای اتاق انکوباسیون شد تا فرایند پایدارکنندگی<sup>۳</sup> رخ دهد (Harkes et al., 2010). پس از آن آمیخته شن و کلرید کلسیم در دستگاه اتوکلاو (فشار ۱/۵ اتمسفر، دمای ۱۲۱°C) و برای ۱۵ دقیقه استرون شد. سپس شن آماده شده در ۳ گام درون لوله‌ی با جنس پلی‌وینیل کلراید<sup>۴</sup> (PVC) به عنوان ستون آب‌شویی با پهنای درونی ۴/۸ و بلندی ۱۴/۹۲ سانتی‌متر ریخته شد. برای جلوگیری از ریزش شن از ستون و همچنین انجام آب‌شویی و جابجایی باکتری، بخش زیرین آن با پارچه سترون با منافذ ۴۰ میکرومتر با یک بست فلزی بسته شد. یک کیف پلاستیکی نیز در زیر ستون گذاشته شد تا زه‌آب آن را بتوان گردآوری نمود (شکل ۱). با توجه به اندازه‌های ستون و چگالی ظاهری و حقیقی شن درون آن (جدول ۱)، حجم شن ریخته شده در ستون و حجم منفذی<sup>۵</sup> (PV) آن به ترتیب ۲۶۹/۸۴ و ۱۱۸/۷۳ سانتی‌متر مکعب

کولی به روش گفته شده در بالا انجام شد و شمار باکتری‌ها بر پایه  $CFU\ g^{-1}$  گزارش شد. افزون بر آن درصد رطوبت وزنی (Carter and Gregorich, 2007)، کربنات کلسیم و همچنین pH و EC (در نسبت ۱:۵) هر یک از بخش‌های برش یافته ستون اندازه‌گیری شد.



شکل ۲. ستون شن MICCP بریده شده به بخش‌های ۳ سانتی‌متری پس از آب‌شویی

#### آنالیز آماری

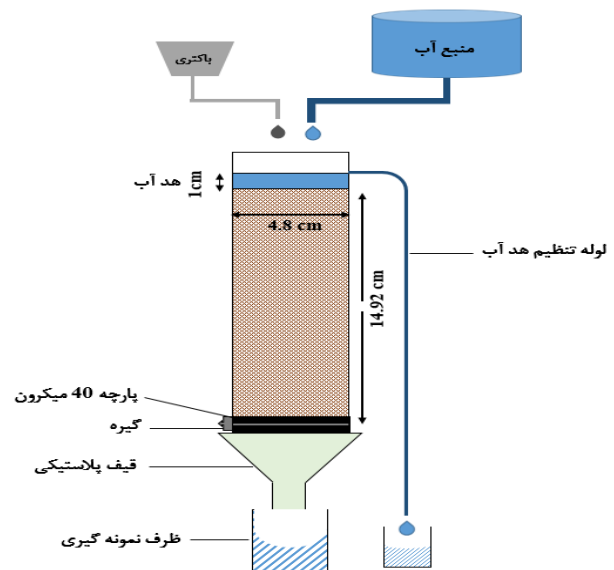
آزمایش آب‌شویی در دو تکرار برای ستون شن با فرایند MICCP و کنترل آزمایش (در مجموع ۴ ستون آب‌شویی) انجام شد. داده‌های زه‌آب ستون‌ها به روش اندازه‌های تکرار شده در زمان و غلظت باکتری‌های مانده در بخش‌های گوناگون ستون شن در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل آنالیز شدند. در بخش زه‌آب فاکتور اصلی آزمایش رسوب‌گذاری زیستی در دو سطح (ستون با فرایند MICCP و شاهد) و فاکتور فرعی PV‌های نمونه-برداری در ۱۸ سطح (صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۳، ۱/۶، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵) بود. در بررسی باکتری‌های مانده در ستون شن فاکتور یکم مانند پیش است و فاکتور دوم لایه نمونه‌برداری از ستون در ۵ سطح (۰-۳، ۳-۶، ۶-۹، ۹-۱۲ و ۱۲-۱۵ سانتی‌متر) بود. در ضمن میانگین داده‌های مربوط به غلظت تجمعی باکتری /شیریشیا کولی در زه‌آب ستون تیمار و کنترل با آزمون t مقایسه شدند. داده‌های به دست آمده با بهره‌گیری از نرم‌افزار SAS آنالیز شدند و آزمون میانگین آن‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در در پایه آماری ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel بهره‌گیری شد.

#### نتایج و بحث

##### ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شن بکاررفته در پژوهش

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شن بکاررفته در جدول (۱) و شکل (۳) آورده شده است. شن نمونه‌برداری شده همراه با ۱

ترتیب ۴۸ و ۱۳ سانتی‌متر مکعب در دقیقه برآورد شد. پس از پیدایش جریان ماندگار، ۰/۱ حجم منفذی (۱۱/۸ میلی‌لیتر) از باکتری /شیریشیا کولی با غلظت  $10^6$  یاخته بر میلی‌لیتر، به سر ستون‌ها افزوده شد و از زه‌آب بیرون آمده از ستون‌ها در حجم‌های منفذی صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱، ۱/۳، ۱/۶، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵ نمونه‌برداری انجام شد (شکل ۱). اندازه‌گیری شمار باکتری‌ها در زه‌آب ستون به روش شمارش کلنی انجام شد. به این گونه که نمونه‌های برداشت شده اگر نیاز بود، رقیق شده و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن‌ها در محیط کشت EMB دارای ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین مایه-زنی شد. این محیط کشت دارای پپتون، لاکتوز، ساکاروز، نمک-های کانی و رنگ‌های آئوزین Y، متیلن بلو و آگار است. رنگ متیلن بلو از رشد ریزجاندازان گرم مثبت جلوگیری می‌کند. شمار کلنی باکتری‌های رشد کرده روی محیط کشت پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}C$  شمارش شده و بر پایه  $CFU\ ml^{-1}$  گزارش شد (Safari-Sanjani et al., 2011).



شکل ۱. نمایی از ستون آب‌شویی بکاررفته در این پژوهش

##### بررسی باکتری‌های به دام افتاده در ستون آب‌شویی

پس از پایان آب‌شویی، شن به آرامی از ستون بیرون آورده شد و سپس به ۵ بخش هر یک به اندازه نزدیک ۳ سانتی‌متر برش داده شد (شکل ۲). شن هر بخش به خوبی با هم آمیخته شده و برای شمارش باکتری‌های /شیریشیا کولی به دام افتاده در ستون، سوسپانسیونی با نسبت ۱ به ۱۰ از شن و آب مقطر ستون ساخته شد. پس از رقیق‌سازی سوسپانسیون، شمارش باکتری /شیریشیا

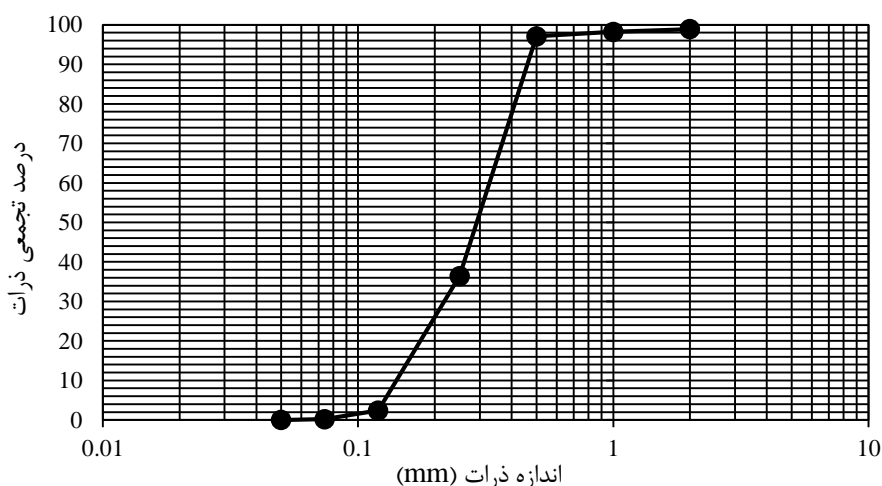
گروه‌بندی اندازه دانه‌ها به روش USDA<sup>۱</sup> شن به کار رفته از گروه شن میانه است چراکه پراکندگی دانه‌های آن در دامنه ۰/۱۵ - ۰/۳ میلی‌متر است (شکل ۳).

درصد سیلت بوده و دارای ۵/۵ درصد کربنات کلسیم معادل و بدون مواد آلی و مانده‌های گیاهی و جانوری بود. ضریب آب‌گذری شن نیز ۰/۰۴۱ سانتی‌متر بر ثانیه به دست آمد. میانگین قطر دانه‌ها ۰/۳ میلی‌متر برآورد شد. با نگر به شکل (۳) و بر پایه

جدول ۱. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شن بکاررفته

pH	EC	D <sub>50</sub>	K <sub>s</sub>	sθ	TP	PD	BD	CaCO <sub>3</sub>	سیلت	شن	ویژگی‌های شن
	dS m <sup>-1</sup>	mm	cm s <sup>-1</sup>	cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup>	cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup>	g cm <sup>-3</sup>	g cm <sup>-3</sup>		g 100g <sup>-1</sup>		
۷/۴	۰/۱۸۶	۰/۳	۰/۰۴۱	۰/۴۴	۰/۴۲	۲/۷۵	۱/۶	۵/۵	۱	۹۹	

BD: جرم مخصوص ظاهری، PD: جرم مخصوص حقیقی، TP: تخلخل کل، θs: اندازه رطوبت حجمی اشباع، K<sub>s</sub>: ضریب آب‌گذری اشباع، EC: رسانندگی الکتریکی، pH: اسیدیته.



شکل ۳. منحنی دانه‌بندی شن بکاررفته

یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار شد. پیامد حجم منفذی برای pH در پایه آماری یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار شد و پیامد حجم منفذی و برهم‌کنش آن با تیمار نیز بر غلظت باکتری زه‌آب معنی‌دار شدند ( $p < 0.05$ ).

یافته‌های آزمایش آب‌شویی باکتری/اشریشیا کولی در جدول (۲) نتایج تجزیه واریانس پیامد تیمار، حجم منفذی و برهم‌کنش آن‌ها آورده شده است. پیامد تیمار بر لگاریتم غلظت اشریشیا کولی، رسانندگی الکتریکی و pH در زه‌آب در پایه آماری

جدول ۲. تجزیه واریانس پیامد تیمار باکتریایی شن، حجم منفذی و برهم‌کنش آن‌ها بر ویژگی‌های بررسی شده

پی‌اچ	رسانندگی الکتریکی	غلظت/اشریشیا کولی در زه‌آب	درجه آزادی	خواستگاه تغییرات
** ۰/۰۲۴	** ۰/۰۷۰	** ۱/۶۷۹	۱	تیمار (Treatment)
ns ۰/۰۰۱	** ۰/۱۲۰	* ۰/۲۲	۲	تکرار (تیمار) Rep(Treat)
** ۰/۰۱۱	ns ۰/۰۱۰	** ۱۱/۳۸۱	۱۷	حجم منفذی (PV)
ns ۰/۰۰۵	ns ۰/۰۰۷	* ۰/۱۲۴	۱۷	تیمار × حجم منفذی (T×PV)
۰/۰۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۵۲	۳۴	خطا (Error)

هر روی، بیشینه غلظت باکتری در زه‌آب و هم‌چنین غلظت تجمعی باکتری /شریشیا کولی در ستون کنترل آزمایش بسیار بیشتر از ستون MICCP بود. همان‌گونه که در شکل (۴-ب) دیده می‌شود، غلظت تجمعی باکتری بیرون آمده از ستون در ۵ برابر حجم آب منفذی (حدود ۶۰۰ میلی‌لیتر) به ترتیب برای ستون کنترل آزمایش و MICCP برابر با ۴/۹۵ و ۴/۲۴ واحد لگاریتمی است که در ستون کنترل آزمایش حدود ۳/۳۴ برابر بیشتر از ستون MICCP است.

از سوی دیگر، با این‌که پیک باکتری بیرون آمده از ستون در تیمار MICCP در حجم آب منفذی ۱ به گونه چشم‌گیری افت کرده است، اما در ستون کنترل آزمایش پیک دوم نیز در حجم آب منفذی ۱/۱ دیده می‌شود. در واقع پیک منحنی رخنه در ستون کنترل آزمایش دوگامه است. (Mosaddeghi et al., 2009). بیرون آمدن بیشتر باکتری در خاک لومی رسی شنی در برابر خاک لوم شنی را گزارش کردند و این را وابسته به جریان‌های برتر و ساختمان پایدار در خاک لوم رسی شنی دانستند. پس از حجم آب منفذی ۲، غلظت باکتری در هر دو ستون تیمار و کنترل آزمایش به هم نزدیک شده و با گذشت زمان و ادامه آب‌شویی تا ۵ برابر حجم آب منفذی ادامه پیدا کرده و بیرون آمدن باکتری کم شده است. اما در همه حجم‌های آب منفذی غلظت باکتری در زه‌آب در ستون کنترل آزمایش بیشتر بوده است.

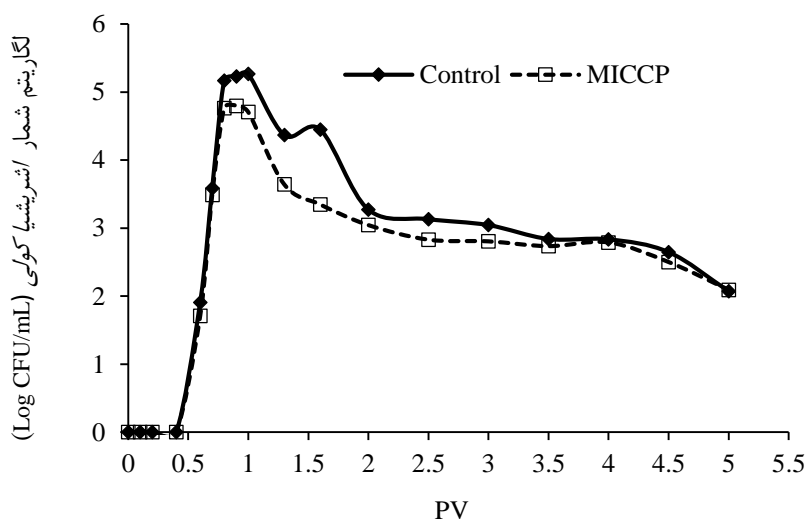
بافت، ساختمان خاک و راه‌های برتر (ماکروپورها) مهم‌ترین کارایی را در فرورفتن باکتری‌ها و پالایش آن‌ها در خاک دارند. خاک‌های شنی منافذ درشت‌آبیشتری در برابر خاک‌های رسی دارند و اگر در بارندگی تندی باشند، حباب‌های هوای درون منافذ به هم پیوست شده که خود برای انتقال آسان باکتری‌ها کمک کننده می‌شود (Powelson and Mills, 2001). Sepehrnia et al. (2012) مشاهده کردند که مدت زنده‌مانی /شریشیا کولی در خاک شنی با درصد کربنات کلسیم بالا (۲۰ درصد) کاهش یافت، زیرا آنیون کربنات نشان بازدارندگی بر رشد این باکتری دارد. از سوی دیگر شاید کربنات‌های ساخته شده با باکتری /اسپوروسارسینا پاستئوری در این پژوهش به کلسیت دگرگون نشده و آنیون کربنات خود مایه از میان رفتن یاخته باکتری /شریشیا کولی در ستون خاک شده باشد.

شکل (۵-الف) منحنی بیرون آمدن نمک‌ها از ستون خاک به هنگام آب‌شویی را نشان می‌دهد. رسانندگی الکتریکی زه‌آب ستون MICCP به هنگام آب‌شویی دگرش داشت که شاید وابسته

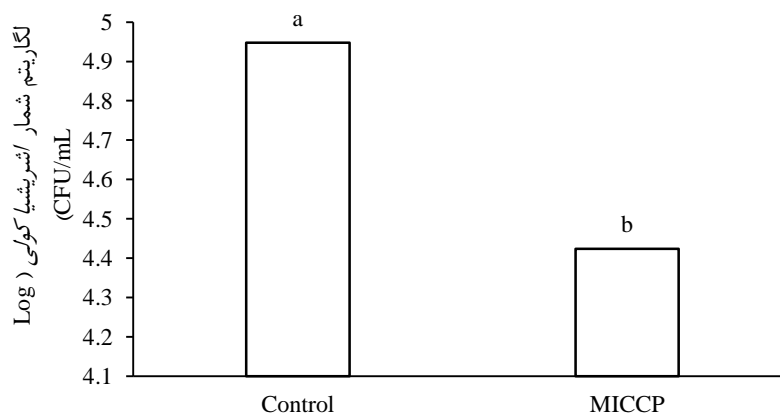
در شکل (۴-الف) منحنی رخنه باکتری /شریشیا کولی در ستون کنترل آزمایش و MICCP نشان داده شده است. در هر دو ستون بیرون آمدن باکتری از ستون از حجم آب منفذی ۰/۶ آغاز شده اما روند متفاوتی را در دو ستون به خود گرفته است. به گونه‌ای که در ستون MICCP پیک غلظت باکتری در حجم آب منفذی ۰/۹ و در ستون کنترل آزمایش در حجم آب منفذی ۱ بوده است. بنابراین در ستون MICCP، زودآبی خروج باکتری در مقایسه با منحنی رخنه ایده‌آل ( $PV=1$ ) دیده می‌شود که شاید بسته به هم‌آوری دانه‌های شن با کربنات کلسیم و ایجاد جریان برتر پس از فرایند MICCP در شن است. گزارش شده است که پیدایش کربنات کلسیم میان ذرات مایه بهبود ساختمان خاک می‌شود (De Muynck et al., 2010). وجود منافذ پیوسته در خاک دارای ساختمان مایه ایجاد جریان برتر و هموار نمودن راه برای حرکت باکتری‌ها می‌شود. از سویی با وجود این‌که جریان برتر انگشتی در خاک‌های شنی رایج است اما فاکتورهای زیستی باعث افزایش آن می‌شود. گزارش شده است که بودن باکتری‌ها در خاک به ویژه آن‌هایی که مواد برون یاخته‌ای ترشح می‌کنند، موجب آب‌گریز شدن سطوح دانه‌های خاک و بیشتر شدن جریان برتر آب در خاک می‌شوند (Morales et al., 2010). (Unc and Goss (2004). جابجایی باکتری /شریشیا کولی را در خاک‌های لوم شنی و لوم سیلتی بررسی و گزارش کردند که تندی انتقال آب و باکتری در خاک لوم سیلتی بیشتر است که این پدیده بسته به، پایداری ساختمان و منافذ درشت و در پی آن افزایش جریان برتر در خاک با اندوخته سیلت بیشتر بود. شواهد تجربی نشان می‌دهد که جریان برتر قاعده است نه استثنا و در بیشتر خاک‌های ساختمان‌دار دیده می‌شود (Flury et al., 1994). اگرچه در ستون MICCP پدیده زودآبی منحنی رخنه دیده می‌شود اما دو نکته نیاز به یادآوری است. نخست این‌که در ستون MICCP در برابر ستون کنترل آزمایش شمار بیشتری از باکتری‌ها در ستون گیر افتاده‌اند که شاید بسته به جذب شیمیایی روی کربنات کلسیم و هم‌چنین گیر افتادن فیزیکی در منافذ با بسته شدن زیستی آن‌ها است. دوم این‌که کربنات کلسیم پدید آمده از گونه پایدار است و در شرایط شیمیایی و آب‌شویی از میان نمی‌رود. بسته شدن زیستی منافذ خاک با فرایندهایی چون سیمانی شدن در پی ساخت کربنات کلسیم با باکتری اورئولیتیک و هم‌چنین تراوش‌ها و پوشش زیستی باکتری‌ها رخ می‌دهد (Morales et al., 2010). به

که این در کاهش انتقال باکتری کارایی دارد. افزایش قدرت یونی محلول خاک مایه کاهش انتقال باکتری بسته به کاهش ضخامت لایه دوگانه<sup>۴</sup> (DDL) پیرامون دانه‌ها شده و مایه افزایش جذب باکتری بر دانه‌های خاک می‌شود (Massoudieh *et al.*, 2013). همچنین David and Mils (2001) با پژوهش‌هایی که درباره پیامد کاربرد نمک‌ها بر جابجایی باکتری /شیریشیا کولی انجام دادند دریافتند که پساب ساختگی در برابر آب‌های دارای کلرید پتاسیم و کلرید کلسیم کارایی کمتری در کاهش بیرون آمدن باکتری از ستون‌های شن دارد. کلرید کلسیم با پیامدی که بر افزایش قدرت یونی می‌گذارد، بیشترین پیامد را در کاهش انتقال داشته و کلرید پتاسیم کارایی کمتری دارد. بنابراین نمک کلرید کلسیم افزوده شده خود در جذب باکتری‌ها بر روی دانه‌های شن و کربنات کلسیم کارایی دارد.

به پیامد باکتری ورودی به ستون بر بیرون آمدن کلرید کلسیم مازاد در شن است. چرا که بالاترین اندازه رسانندگی الکتریکی نیز در بالاترین غلظت باکتری /شیریشیا کولی در منحنه رخنه (شکل ۴-الف) است. افزون بر آن باکتری /شیریشیا کولی می‌تواند کاتیون کلسیم را بر رویه خود جذب کند و همراه با خود از ستون بیرون برد. در شکل (۵-ب) افزایش pH زه‌آب بیرون آمده از ستون MICCP در برابر ستون کنترل آزمایش را نشان می‌دهد. ساخت یون‌های آمونیوم و هیدروکسید در پی کارکرد آنزیم اوره‌آز می‌تواند مایه افزایش pH محیط شود (Qian *et al.*, 2010) که شاید در آغاز آب‌شویی مازاد این یون‌ها از ستون MICCP بیرون آمده‌اند و pH در زه‌آب ستون بالا رفته است. Rostami *et al.* (2009) گزارش کردند که افزودن کربنات کلسیم به شن مایه افزایش قدرت یونی، پیچ و خم منافذ<sup>۱</sup> و رویه‌های جذب می‌شود



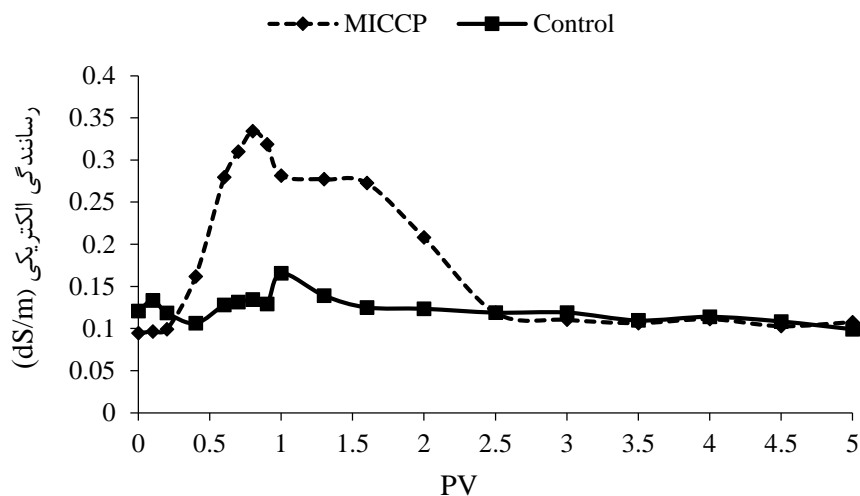
(الف)



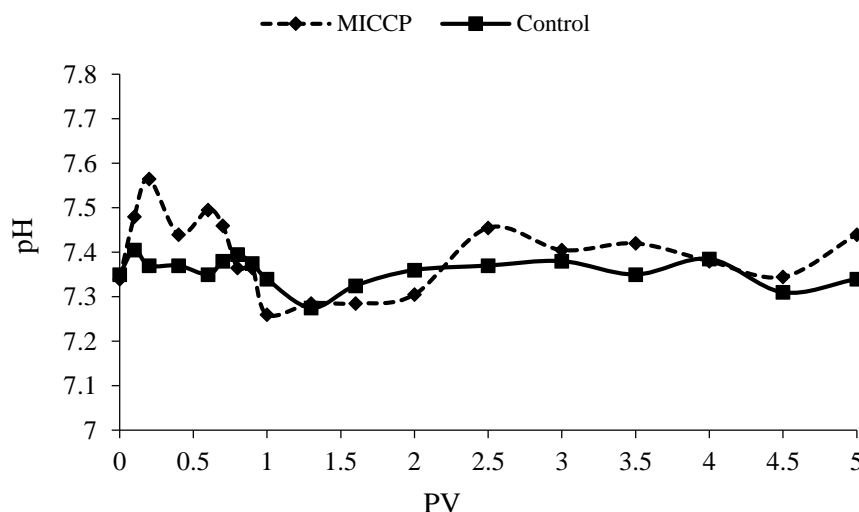
(ب)

شکل ۴. منحنی رخنه (الف) و غلظت تجمعی (ب) باکتری /شیریشیا کولی در ستون کنترل آزمایش و MICCP





(الف)



(ب)

شکل ۵. دگرش رسانندگی الکتریکی (الف) و pH (ب) در زه آب بیرون آمده از ستون های آب شویی

آن آورده شده است. پیامد تیمار بر همه فاکتورها معنی دار شد اما پیامد لایه نمونه برداری از شن و برهم کنش آن با تیمار تنها بر لگاریتم غلظت باکتری/شیریشیا کولی مانده در شن ( $p < 0.01$ ) و کربنات کلسیم آن ( $p < 0.05$ ) معنی دار بود.

یافته های آزمایش شمارش باکتری/شیریشیا کولی مانده در خاک در جدول (۳) نتایج تجزیه واریانس پیامد تیمار MICCP، لایه خاک و برهم کنش آن ها بر لگاریتم غلظت باکتری/شیریشیا کولی مانده در ستون شن، رسانندگی الکتریکی، pH و کربنات کلسیم

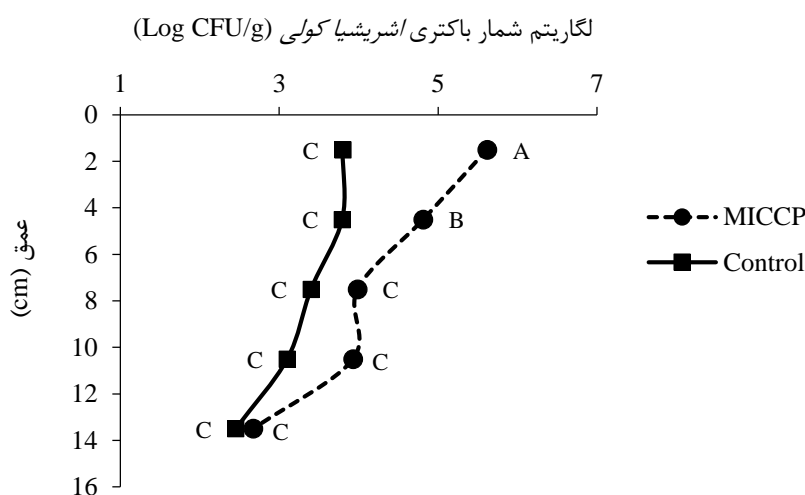
جدول ۳. تجزیه واریانس پیامد تیمار شن با MICCP، لایه نمونه برداری از شن و برهم کنش آن ها بر ویژگی های بررسی شده

میانگین مربعات

خواستهگاه تغییرات	درجه آزادی	غلظت مانده/شیریشیا کولی	رسانندگی الکتریکی	پی اچ	کربنات کلسیم
تیمار (Treatment)	۱	۴/۴۲**	*.۰/۰۰۰۳۸	۲/۸۵۷۶**	**۳۴/۷۴۲
لایه نمونه برداری از شن (Depth)	۴	۲/۶۵**	ns.۰/۰۰۰۰۹	ns.۰/۰۰۱۸	*.۰/۲۶۵
تیمار × لایه نمونه برداری از شن (T × D)	۴	۰/۳۵۵**	ns.۰/۰۰۰۰۴	ns.۰/۰۰۱۷	*.۰/۲۶۵
خطا (Error)	۱۰	۰/۰۴۷	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۲۶	۰/۰۵۵

شدن منافذ با خود باکتری /شیریشیا کولی می تواند رخ دهد (Morales et al., 2010). در ستون MICCP با افزایش ژرفای لایه نمونه برداری از شن، شمار باکتری ها به گونه خطی کم شده است که با غلظت کربنات کلسیم ساخته شده در لایه های خاک هم-خوانی دارد (شکل ۷). از طرفی میزان چسبندگی باکتری ها به دانه های شن به شدت جریان آب نیز بستگی دارد. شدت جریان ماندگار ستون MICCP نسبت به ستون کنترل آزمایش ۷۲/۹۱ درصد کاهش پیدا کرده که موجب کاهش سرعت جابجایی باکتری در میان منافذ شن و افزایش چسبندگی به دانه های شن می شود. در کل، باکتری های نگه داری شده در ستون کنترل آزمایش و MICCP به ترتیب حدود ۱/۳ و ۳ واحد لگاریتمی بود. یعنی این که حدود نیمی از باکتری های افزوده شده به سطح ستون در آن گیر کرده اند.

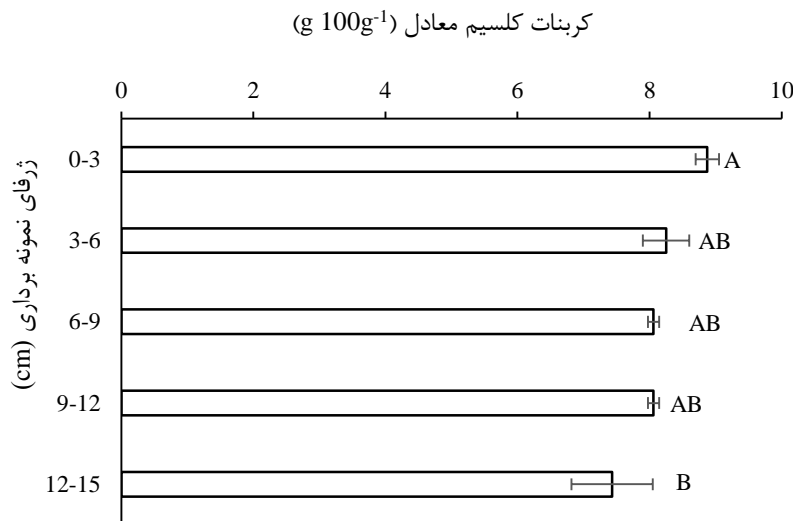
در شکل (۶) آزمون میانگین شمار باکتری های زنده مانده در ستون شن MICCP و کنترل آزمایش نشان داده شده است. بیشترین شمار باکتری /شیریشیا کولی نگه داری شده در ستون در لایه ۰-۳ سانتی متری (لایه رویین) ستون MICCP به دست آمد که اختلاف آماری معنی داری را با سایر عمق ها داشت ( $p < 0.05$ ). با افزایش ژرفای لایه نمونه برداری از شن، شمار باکتری های چسبیده به دانه های شن در هر دو ستون کنترل آزمایش و MICCP کاهش پیدا کرد ولی این کاهش برای ستون کنترل آزمایش معنی دار نبود که شاید بسته به ثابت بودن جذب کننده ها و درصد کربنات کلسیم زیستی در همه طول ستون است. به هر روی، شمار باکتری ها در ستون کنترل آزمایش نیز با افزایش ژرفای لایه نمونه برداری از شن کم شده است که به گیر افتادن فیزیکی باکتری ها در این ستون در مسیر جابجایی باکتری و بسته



شکل ۶. پیامد برهم کنش تیمار در لایه نمونه برداری از شن بر لگاریتم شمار باکتری /شیریشیا کولی در گرم شن. حروف همسان روی نقاط در هر نمودار نشان دهنده ی نبود تفاوت آماری میان نقاط در سطح احتمال ۵ درصد است.

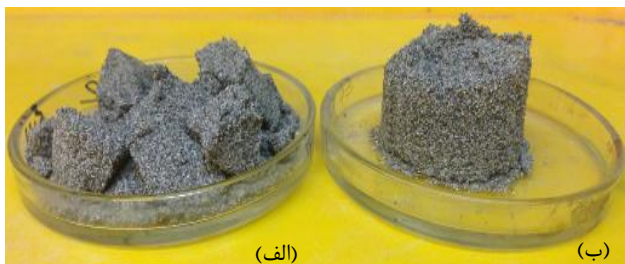
کربنات کلسیم پدید آمده در ستون MICCP در برابر کنترل آزمایش نزدیک ۲ درصد بیشتر شده بود. از آن جا که شن بکاررفته در این پژوهش، ماده آلی نداشت که خود عاملی برای جذب بهتر باکتری ها است (Al-Degs et al., 2000) و از سویی چون دانه های شن در برابر دانه های رس بار الکتریکی چندانی برای جذب باکتری ها ندارند، بنابراین نگه داری باکتری /شیریشیا کولی در ستون را می توان به پیامد مستقیم (جذب) و غیرمستقیم (بستن منافذ) کربنات کلسیم تولید شده در فرایند MICCP نسبت داد. (Achal et al., 2009) بیشترین اندازه کربنات کلسیم تولید شده در فرایند MICCP با باکتری اسپوروسارسینا پاستوری را به ترتیب در لایه های بالایی، میانی و پایین ستون شن گزارش کردند.

در شکل (۷) پیامد برهم کنش تیمار در لایه نمونه برداری از شن بر اندازه کربنات کلسیم در ستون MICCP آمده است. با افزایش لایه نمونه برداری از شن، اندازه کربنات کلسیم معادل کاهش یافته است. بیشترین اندازه کربنات کلسیم پدید آمده در لایه های رویین (۰-۳ cm) بود که البته تفاوت آماری معنی دار با دیگر لایه ها به جز لایه زیرین نداشت ( $P > 0.05$ ). کمترین اندازه کربنات کلسیم پدید آمده نیز در پایین ترین لایه (۱۲-۱۵ cm) به دست آمد که تنها تفاوت آماری معنی داری با لایه سطحی داشت ( $p < 0.05$ ). اندازه کربنات کلسیم تولید شده با باکتری اسپوروسارسینا پاستوری در ستون MICCP در برابر کنترل آزمایش که در همه لایه ها اندازه کربنات کلسیم برابری دارد، افزایش پیدا کرده بود. به گونه ای که در پایین ترین لایه نیز اندازه



شکل ۷. آزمون میانگین کربنات کلسیم معادل در ستون MICCP. حروف همسان روی ستون‌ها نشان دهنده نبود تفاوت آماری میان آن‌ها در سطح احتمال ۵ درصد است. نوارهای روی ستون انحراف معیار است.

بیشتر دانه‌های آن با تراوش‌های باکتری و کربنات کلسیم معادل آن می‌باشد.



شکل ۸. شن بیرون آمده از ستون پس از پایان آب‌شویی در نمونه کنترل آزمایش (الف) و MICCP (ب)

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش انتقال باکتری/شیریشیا کولی در ستون شن مایه-زنی شده با باکتری/اسپوروسارسینا و فرایند MICCP در جریان اشباع ماندگار در برابر کنترل آزمایش آزمون و بررسی شد. پیک منحنی رخنه در ستون MICCP بلندی کمتری داشت و شمار تجمعی باکتری‌های بیرون آمده از این ستون در برابر کنترل آزمایش کمتر بود. اندازه کربنات کلسیم پدید آمده در فرایند MICCP در لایه‌ی بالایی شن تیمار شده، بیشترین اندازه خود را داشت و با افزایش ژرفای لایه نمونه‌برداری از شن روند کاهشی داشت ولی در همه لایه‌های شن تیمار MICCP در برابر کنترل آزمایش بیشتر بود. بیشترین اندازه پالایش یا نگهداری باکتری/شیریشیا کولی در لایه بالایی انجام شد و در دیگر لایه‌ها از اندازه

باکتری/اسپوروسارسینا پاستوریزه یک باکتری هوازی است و در شرایط بهینه رشد با هیدرولیز آنزیمی اوره می‌تواند در لایه-های بالایی در برابر لایه‌های پایین‌تر به اندازه چشم‌گیری کربنات کلسیم بیشتری بسازد (Achal et al., 2009). شاید اشباع کردن ستون با باکتری/اسپوروسارسینا که از بالای ستون انجام گرفته است، در پیدایش کمتر کربنات کلسیم در لایه‌ی زیرین پیامد داشته باشد. چرا که اگرچه این باکتری کوکسی بوده و ریزتر است، ولی در منافذ شن و در لایه‌های بالایی بیشتر گیر کرده و ساکن شده و بنابراین انباشتگی باکتری و تراوش‌های آن و همچنین رسوب زیستی کربنات کلسیم در این لایه‌ها بیشتر رخ داده است. اندازه کربنات کلسیم معادل شن در آغاز آزمایش ۵/۵ درصد بوده است که پس از مایه‌زنی با باکتری یاد شده با فرایند MICCP به ترتیب در لایه بالایی و پایینی ستون شن ۶۱/۲۷ و ۳۵/۰۹ درصد افزایش پیدا کرده است. کربنات کلسیم تشکیل شده در فرایند MICCP مانند پل مایه به هم پیوستن دانه‌های شن شده (Abu-Ashour et al., 1998) و در پی آن مایه افزایش پایداری و پایداری ساختمان و کاهش نفوذپذیری خاک‌های شنی می‌شود (De Muynck et al., 2010; Phillips et al., 2013). بنابراین با کاهش تندی فرورفتن آب که دارنده باکتری‌هاست، اندازه چشم‌گیری از باکتری‌ها می‌توانند در میان دانه‌های خاک گیر کرده و بمانند (Rostami et al., 2009). در شکل (۸) ریخت شن بیرون آمده از ستون پس از پایان آب‌شویی در نمونه کنترل آزمایش و MICCP آمده است. ریخت شن نمونه MICCP در برابر نمونه کنترل آزمایش به گونه کاملاً پایدار است که نشان‌دهنده چسبندگی

باکتری‌های بیماری‌زا در خاک و رسیدن آن‌ها به آب زیرزمینی جلوگیری کرد. برای روشن شدن کامل چگونگی کارکرد این فرایند و دامنه پیامد آن در پهنه یک آبخیز به پژوهش‌های بیشتری نیاز است.

آن کاسته شد. نگهداشت باکتری در ستون MICCP وابسته به ویژگی‌های گوناگونی است که اندازه‌گیری کربنات کلسیم پدید آمده نشان از پیامد مستقیم (جذب) و غیر مستقیم (کاهش نفوذپذیری) بر آن دارد. بنابراین، می‌توان با فراهم کردن شرایط پیدایش فرایند MICCP در شن و خاک‌های سبک از انتقال

## REFERENCES

- Abu-Ashour, J., Joy, D. M., Lee, H., Whiteley, H.R. and Zelin, S. (1998). Movement of bacteria in unsaturated soil columns with macropores, Transactions of the ASAE. American Society of Agricultural Engineers, 41, 1043-1050.
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C. and Reddy, M.S. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36(7), 981-988.
- Achal, V. (2015). Production of bacteria for structural concrete. In F. Pacheco Torgal, J. A. Labrincha, M.V. Diamanti, C.P. Yu, and H.K. Lee (Eds.), Biotechnologies and biomimetics for civil engineering. P: 309-324. Dordrecht: Springer.
- Al-Degs, Y., Khraisheh, M.A.M., Allen, S.J. and Ahmad, M.N. (2000). Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent. Water Research, 34 (3), 927-935.
- Becker, M.W., Collinsa, S.A., Metgeb, D.W., Harveyb, R.W. and Shapiro, A.M. (2004). Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. Journal of Contaminant Hydrology, 69, 195-213.
- Cunningham, A.B., Gerlach, R., Spangler, L., Mitchell, A.C., Parks, S., and Phillips, A. (2011). Reducing the risk of well bore leakage of CO<sub>2</sub> using engineered biomineralization barriers. Energy Procedia. Procedia, 4, 5178-5185.
- Carter, M. R. and Gregorich, E. G. (2007). Soil sampling and methods of analysis. CRC press.
- CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- David, K.P. and Mills, A.L. (2001). Transport of *Escherichia coli* in sand columns with constant and changing water contents. Journal of Environmental Quality, 30, 238-245.
- DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C. and Nelson, D.C. (2010). Bio-mediated soil improvement. Journal of Ecological Engineering, 36, 197-210.
- De Muynck, W., De Belie, N. and Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. Journal of Ecological Engineering, 36, 118-136.
- Erickson, M.C., Habteselassie, M.Y., Liao, J., Webb, C.C., Mantripragada, V., Davey, L.E. and Doyle, M.P. (2014). Examination of factors for use as potential predictors of human enteric pathogen survival in soil. Journal of Applied Microbiology, 116, 335-349.
- Flury, M., Flühler, H., Jury, W.A. and Lauenberger, J. (1994). Susceptibility of soils to preferential flow. Water Resources Research, 30, 1945-1954.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Dothal, M. and Vernozzy-Rozand, C. (2007). Persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in cow slurry. Letters in Applied Microbiology, 45, 55-61.
- Gee, G.W. and Bauder, J.W. (1986). Particle size analysis. In: Klute, A. (Ed.) Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods. ASA/SSSA Monograph 9. 2nd Ed, pp. 383-411.
- Gorospe, C.M., Han, S.H., Kim, S.G, Park, J.Y., Kang, C.H., Jeong, J.H. and So, J.S. (2013). Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18, 903-908.
- Harkes, M.P., van Paassen, L.A., Booster, J.L. Whiffin, V.S., van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. Ecological Engineering, 36, 112-117. Jiang, G., M.J., Noonan, G.D., Buchan, and N., Smith. (2007). Transport of *Escherichia coli* through variably saturated sand columns and modeling approaches. Journal of Contaminant Hydrology, 93, 2-20.
- Kaper, J.B. and Karmali, M.A. (2008). The continuing evolution of a bacterial pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(12), 4535-4536.
- Klute, A. (1986). Water retention: laboratory methods. PP. 635 - 662. In: Klute, A. (Ed.) Method of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods. 2nd ed., ASA/SSSA. Monograph 9.
- Lee, L.M., Soon, N.G.W., Khun, T.C. and Ling, H.S. (2012). Bio-mediated soil improvement under various concentrations of cementation reagents. Applied Mechanics and Materials, 204-208, 326-329.
- Loeppert, R.H. and Suarez, D.L. (1996). Carbonates and gypsum. In: Sparks, D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 3, Chemical Methods. SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. and Stahl, D.A., 2017. Brock Biology of Microorganisms 15 edn
- Massoudieh, A., Lu, N., Liang, X., Nguyen, T.H. and

- Ginn, T.R. (2013). Bayesian process-identification in bacteria transport in porous media. *Journal of Contaminant Hydrology*, 153, 78-91.
- Morales, V.L., Parlange, J.Y. and Steenhuis, T.S. (2010). Are preferential flow paths perpetuated by microbial activity in the soil matrix, A review. *Journal of Hydrology*, 393(1-2), 29-36.
- Mosaddeghi, M.R., Mahboubi, A.A., Zandsalimi, S., and Unc, A. (2009). Influence of organic waste type and soil structure on the bacterial filtration rates in unsaturated intact soil columns. *Journal of Environmental Management*, 90, 730-739.
- Okwadha, G.D.O. and Li, J. (2010). Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 81, 1143-1148.
- Phillips, A. J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A. C., Cunningham, A. B. and Spangler, L. (2013). Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 29, 715-733.
- Powelson, D.K. and Mills, A.L. (2001). Transport of *Escherichia coli* in sand columns with constant and changing water contents. *Journal of Environmental Quality*, 30, 238-245.
- Qian, C., Wang, R., Cheng, L. and Wang, J. (2010). Theory of microbial carbonate precipitation and its application in restoration of cement-based materials defects. *Chinese Journal of Chemistry*, 28, 847-857.
- Ramachandran, S.K., Ramakrishnan, V. and Bang, S.S. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal-American Concrete Institute*, 98, 3-9.
- Rehmann, C.R. and Soupir, M.R., (2009). Importance of interactions between the water column and the sediment for microbial concentrations in streams. *Water Research*, 43 (18), 4579-4589.
- Rhoades, J.D. (1996). Salinity electrical conductivity and total dissolved solid. In *Methods of Soil Analysis*. In: Page, A.L., Somner, C.E. and Nelson, P.W. (Eds.) Part 3. Chemical Methods. ASA/SSSA Madison, Wisconsin, USA. pp: 417-436.
- Rostami, k., Mahbobi, A.A., Mosaddeghi, M.R. and Safari-sanjani, A.A. (2009). The effect of calcium carbonate and calcium sulfate on transportation of *Pseudomonas fluorescens* through sand columns. *Journal of Ecology*, 50, 119-128. (In Farsi)
- Safari-Sanjani, A.A., Sharifi, Z., Safari-Sanjani, M. (2011). *Laboratory methods in soil microbiology*. First Edition. University of Bu-Ali Sina, Hamadan, (p. 457). (In Farsi)
- Sepehrnia, N.A., Mahbobi, A.A., Mosaddeghi, M.R., Khoda-Karamian, Gh. R. and Safari-Sanjani, A.A. (2012). Effect of calcium carbonate and calcium sulfate on *E. coli* survival in fine sand mixtures. *Journal of Environmental Studies*, 39(62): 117-126. (In Farsi).
- Sharma, A. and Ramkrishnan, R. (2016). Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, 8, 198-202.
- Unc, A. and Goss, M.J. (2003). Movement of faecal bacteria through the vadose zone. *Water Air Soil Pollution*, 149, 327-337.
- Unc, A. and Goss, M.J. (2004). Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Applied Soil Ecology*, 25, 1-18.
- Walkley, A. and Black, I.A. (1934). An examination of digestion method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration. *Soil Science*. 37: 29-38.
- Whiffin, V.S., Van Paassen, L.A. and Harkes, M.P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24, 417-423.