



## Phosphate, fluoride and calcium removal from Saravan landfill leachate using calcium carbonate bioprecipitation process

Fatemeh Mahdipour<sup>1</sup> | Nasrin Ghorbanzadeh<sup>2</sup> | Mohammad Bagher Farhangi<sup>3</sup> |  
Maryam Khalili Rad<sup>4</sup>

1. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [fatemehmahdipour@guilan.ac.ir](mailto:fatemehmahdipour@guilan.ac.ir)

2. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [nghorbanzadeh@guilan.ac.ir](mailto:nghorbanzadeh@guilan.ac.ir)

3. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [m.farhangi@guilan.ac.ir](mailto:m.farhangi@guilan.ac.ir)

4. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: [m\\_khalilirad@guilan.ac.ir](mailto:m_khalilirad@guilan.ac.ir)

### Article Info

**Article type:** Research Article

**Article history:**

**Received:** Aug. 21, 2023

**Revised:** Oct. 19, 2023

**Accepted:** Oct. 21, 2023

**Published online:** Dec. 23, 2023

**Keywords:**

Biomining, Nnative Microorganisms, Sporosarcina Pasteurii, Urea.

### ABSTRACT

In recent years, environmental friendly methods have been considered for managing hazardous chemicals in landfill leachates to prevent their entrance to surface and groundwater resources. This research was done in 2022 at University of Guilan. An ureolytic bacterium with the ability to precipitate calcium carbonate was isolated from the Saravan landfill leachate (SLL) firstly. Then, its potential was investigated along with the indicator bacteria *Sporosarcina pasteurii* in removing phosphate, calcium and fluoride ions from LLA through the calcium carbonate bioprecipitation process (MICP). The experiment was carried out as a  $3 \times 2 \times 2$  factorial in a completely randomized design with three replicates (36 samples). Factors include biocementing bacteria at three levels (no inoculation, inoculation with strain isolated from LLA and inoculation with *S. pasteurii*), urea at two levels (0 and 2% (v/v)), and calcium chloride at two levels (0 and 50 mM). The highest phosphate removal rate (93%) was observed in the presence of calcium chloride without bacteria inoculation, and urea addition. However, ureolytic bacteria were needed for fluoride removal where the treatments of indicator bacteria and isolated strain in the presence of urea and calcium chloride removed 77% and 48% of fluoride, which was 14.4 and 9 times greater than the control treatment, respectively. The calcium removal rate in treatments with indicator and isolated bacteria was 93% and 90%, respectively. Although the removal rate of phosphate, calcium and fluoride was higher in the presence of the indicator bacteria compared to the isolated strain, there was no significant difference between them. Therefore, considering the application of native microorganisms, in addition to reducing costs, also creates less environmental concern than the indicator bacteria, it can be used to remove hazardous chemicals from landfill leachates through the MICP process.

Cite this article: Mahdipour, F., Ghorbanzadeh, N., Farhangi, M. B., & Khalili Rad, M. (2023) Phosphate, fluoride and calcium removal from Saravan landfill leachate using calcium carbonate bioprecipitation process, *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 54 (10), 1431-1445. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.364169.669556>

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.



DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.364169.669556>

## حذف فسفات، فلوراید و کلسیم از شیرابه دفن گاه زباله سراوان با استفاده از فرایند رسوب زیستی کلسیم کربنات

فاطمه مهدی پور<sup>۱</sup> | نسرين قربان زاده<sup>۲</sup> | محمدباقر فرهنگي<sup>۳</sup> | مريم خليلي راد<sup>۴</sup>

۱. گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [fatemehmahdipour@guilan.ac.ir](mailto:fatemehmahdipour@guilan.ac.ir)

۲. گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [nghorbanzadeh@guilan.ac.ir](mailto:nghorbanzadeh@guilan.ac.ir)

۳. نویسنده مسئول، گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [m.farhangi@guilan.ac.ir](mailto:m.farhangi@guilan.ac.ir)

۴. گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: [m.khalilirad@guilan.ac.ir](mailto:m.khalilirad@guilan.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	در سال‌های اخیر روش‌های دوست‌دار محیط‌زیست در مدیریت مواد شیمیایی خطرناک موجود در شیرابه مکان‌های دفن زباله به منظور جلوگیری از ورود آن‌ها به منابع آب‌های سطحی و زیرزمینی مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش در سال ۱۴۰۱ در دانشگاه گیلان انجام شد. ابتدا یک باکتری اورئولیتیک با توانایی ترسیب کلسیم کربنات از شیرابه دفن گاه سراوان جداسازی شد. سپس پتانسیل آن در کنار باکتری شاخص اسپوروسارسینا پاستوری در حذف یون‌های فسفات، کلسیم و فلوراید از شیرابه در فرایند رسوب زیستی کلسیم کربنات (MICP) بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (۳۶ نمونه) اجرا شد. فاکتورها شامل باکتری سیمان کننده در سه سطح (بدون مایه‌زنی، مایه‌زنی با سویه جدا شده از شیرابه و مایه‌زنی با اسپوروسارسینا پاستوری)، اوره در دو سطح (صفر و دو درصد) و کلسیم کلراید در دو سطح (صفر و 50 mM) به عنوان فاکتور سوم بودند. بیشترین درصد حذف فسفات (۹۳ درصد) در تیمار بدون باکتری و اوره و در حضور کلسیم کلراید مشاهده شد. اما برای حذف فلوراید به حضور باکتری‌های اورئولیتیک نیاز بود به طوری که در تیمارهای دارای باکتری شاخص و جدا شده در حضور اوره و کلسیم کلراید به ترتیب ۷۷ و ۴۸ درصد فلوراید حذف شد که به ترتیب ۱۴/۴ و ۹ برابر حذف فلوراید در تیمار شاهد بود. در تیمارهای دارای باکتری شاخص و جدا شده به ترتیب ۹۳ و ۹۰ درصد کلسیم شیرابه حذف شد. اگرچه درصد حذف فسفات، کلسیم و فلوراید در حضور باکتری شاخص نسبت به باکتری جدا شده بیشتر بود اما تفاوت چشم‌گیری بین آن‌ها در حذف یون‌ها دیده نشد. بنابراین، با توجه به این که استفاده از ریزجانداران بومی، علاوه بر کاهش هزینه‌ها، نگرانی زیست محیطی بسیار کمتری را نیز نسبت به گونه‌های شاخص ایجاد می‌کنند، می‌توان از آن‌ها برای حذف مواد خطرناک موجود در شیرابه در فرایند MICP استفاده کرد
واژه‌های کلیدی: اسپوروسارسینا پاستوری، اوره، ریزجانداران بومی، معدنی شدن زیستی.	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۳۰	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۷/۱۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۹	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۱	

استناد: مهدی پور؛ فاطمه، قربان زاده؛ نسرين، فرهنگي؛ محمدباقر، خليلي راد؛ مريم (۱۴۰۲) حذف فسفات، فلوراید و کلسیم از شیرابه دفن گاه زباله سراوان با استفاده از فرایند

رسوب زیستی کلسیم کربنات، مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۴ (۱۰)، ۱۴۴۵-۱۴۳۱. <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.364169.669556>



© نویسنده‌گان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijswr.2023.364169.669556>

## مقدمه

افزایش روزافزون حجم پسماندها و تنوع آنها سبب پیچیدگی چگونگی مدیریت آنها شده است. در سطح جهان، دفن زباله رایج‌ترین روش مدیریت پسماند است و ۹۵ درصد از زباله‌های تولید شده دفن می‌شوند. اگرچه دفن زباله ساده‌ترین و نسبتاً ارزان‌ترین روش دفع زباله است اما مشکل اصلی، شیرابه تولید شده در مکان دفن پسماند است (Luo et al., 2019). شیرابه پسماندهای دفن شده دارای مواد شیمیایی بسیار خطرناک و مضر است که از طریق رواناب‌ها وارد آب‌های سطحی و یا از طریق آبشویی وارد آب‌های زیرزمینی می‌شوند و کیفیت آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهند. آب‌های زیرزمینی عمدتاً به عنوان آب آشامیدنی در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و آلودگی آن یکی از نگرانی‌های مهم زیست‌محیطی است (Li et al., 2020). شیرابه تولید شده ترکیبی از مواد شیمیایی گوناگون است که حاصل پسماندهای دارای مواد آلی و معدنی فراوان بوده و غالباً دارای چندین نوع آلودگی‌ها به طور هم‌زمان است (Khalil et al., 2018).

به طور کلی در میان آلاینده‌های موجود در آب، فسفر و فلورايد ( $F^-$ ) به عنوان دو عنصر بحرانی در پیکره زیست‌بوم‌های آبی شناخته شده‌اند. افزایش مداوم سطح فسفات در سیستم‌های آبی سبب رشد بی‌اندازه جلبک‌های فتوسنتزی و سیانوباکترهای سمی و در نهایت فرایند اوتروفیکاسیون<sup>۱</sup> می‌شود (Li et al., 2020). آلودگی آب به فلورايد به دلیل آسیب‌های جدی که به سلامت انسان وارد می‌کند به یک مسئله مهم جهانی تبدیل شده است (Lacson et al., 2021) و مصرف طولانی مدت و بیش از حد آن می‌تواند سبب فلوتوروزیس<sup>۲</sup> دندانی و اسکلتی و همچنین اثرات غیرقابل برگشت بر اعصاب، ریه، کلیه و کبد شود (Liu et al., 2021). افزون بر این، یون‌های کلسیم در منابع آبی مشکلات زیادی همراه با پیامدهای اقتصادی گسترده ایجاد می‌کنند که شامل پوسته پوسته شدن شدید در خطوط لوله به دلیل رسوب کلسیم به صورت نمک‌های سولفات، فسفات و یا کربنات و نقص در راکتورهای بی‌هوازی تصفیه شیرابه است (Van Langerak et al., 1997).

فن‌آوری رسوب زیستی کلسیم کربنات<sup>۳</sup> (MICP) به طور گسترده به عنوان یک روش نوین برای تصفیه منابع آبی آلوده گزارش شده است (Peng et al., 2020; Yan et al., 2020). این فرایند توسط باکتری‌های هیدرولیز کننده اوره (اورتولیتیک<sup>۴</sup>) انجام می‌شود. آزنیم اوره‌آز در این فرایند اوره را به یک مول کربنات و دو مول آمونیاک هیدرولیز می‌کند و سبب آزادسازی یون‌های کربنات ( $CO_3^{2-}$ ) و آمونیوم ( $NH_4^+$ ) می‌شود. یون کربنات آزاد شده به درون آب می‌تواند با کلسیم موجود به فرم کلسیم کربنات (کلسیت) رسوب و کلسیم را از محیط حذف کند (Kang et al., 2014). در طی این فرایند، یاخته‌های میکروبی و متابولیت‌های آنها مکان‌های هسته‌زایی را برای رسوب مواد معدنی تشکیل شده توسط نمک‌های کلسیم فراهم می‌کنند (Yin et al., 2021). گزارش شده است که پس از غیرفعال شدن فرآورده‌های تولید شده در فرایند MICP، یون فلورايد از طریق کریستاله شدن القایی (تبلور القایی) و جذب سطحی حذف می‌شود (Wang et al., 2021). سطح یاخته باکتری به عنوان هسته مرکزی تشکیل رسوب در فرایند MICP عمل می‌کند، بنابراین بودن یاخته‌های باکتری در حذف  $F^-$  به دلیل جایگاه اتصال بیشتر، مزایای ویژه‌ای دارد که می‌تواند هسته‌زایی و رشد کریستال را آسان کند (Wang et al., 2021).

همچنین نشان داده شده است که افزایش غلظت مواد آلی در فرایند MICP با بالابردن قلیائیت محیط کارایی حذف فلورايد و فسفات را از طریق واکنش‌های زیر (روابط ۱ تا ۳) امکان‌پذیر می‌سازد (Banerjee, 2015; Deng et al., 2016):



غلظت بالای مواد آلی در محیط سبب افزایش متابولیسم ریزجانداران شده و یاخته‌ها جایگاه‌های بیشتری را فراهم می‌کنند که سبب می‌شود کریستال‌های حاوی فلورايد در یاخته‌ها رسوب کنند. بودن گروه‌های عاملی منفی روی سطح یاخته سبب جذب کلسیم می‌شود (De Muynck et al., 2010) و سپس یون‌های فلورايد توسط جاذبه الکترواستاتیکی کلسیم جذب سطحی می‌شوند (Gogoi et al., 2015).

1 Eutrophication

2 Fluorosis

3 Microbiologically Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP)

4 Ureolytic

## پیشینه پژوهش

تاکنون طیف گسترده‌ای از فن‌آوری‌ها از جمله جذب سطحی، رسوب، فیلتراسیون غشایی، تبادل یونی، انعقاد الکتریکی و الکترولیز به منظور حذف و بازیابی فسفر و فلوراید از منابع آبی مورد بررسی قرار گرفته است. اما استفاده از این روش‌های فیزیکی و شیمیایی به سبب هزینه بالا، محصولات جانبی مضر و مشکل در بازیابی محصولات ایجاد شده با محدودیت مواجه شده است (Wang et al., 2022). همچنین وجود هم‌زمان آلاینده‌های متعدد در منابع آبی سبب توجه گسترده بر تصفیه هم‌زمان این آلاینده‌ها برای اتخاذ یک فن‌آوری مقرون به صرفه و دوست‌دار محیط‌زیست شده است (Rahman, 2020).

پژوهش‌های زیادی در مورد رسوب کلسیم کربنات توسط باکتری‌ها انجام و گزارش شده است که باکتری‌های گوناگونی قادر به رسوب کلسیم کربنات با فرایندهای مختلف هستند. باکتری‌های اصلی درگیر در این فرآیند شامل باکتری‌های فتوسنتزکننده، باکتری‌های کاهنده سولفات و نیترات و باکتری‌های اورتولیتیک هستند (Ansari et al., 2020). استفاده از باکتری‌های اورتولیتیک در این فرآیند سبب ایجاد قلیابیت در طی فرآیند MICP می‌شود و این فن‌آوری را در حذف هم‌زمان  $F^-$ ،  $Ca^{2+}$  و  $NO_3^-$  موثرتر و پایدارتر می‌سازد (Wang et al., 2021).

در پژوهشی گزارش شد که در فرآیند هیدرولیز اوره با تشکیل کلسیم کربنات زیستی، فسفات و سایر یون‌ها رسوب کرده و از محیط خارج می‌شوند (Gowthaman et al., 2021). همچنین پژوهشی در رابطه با پتانسیل حذف بی‌هوازی فلوراید و کلسیم از آب زیرزمینی با باکتری جدید *Cupriavidus*<sup>۱</sup> به روش رسوب زیستی کلسیم انجام شد و به ترتیب کارایی ۸۷ و ۶۵ درصدی حذف فلوراید و کلسیم توسط این باکتری در شرایط بی‌هوازی به دست آمد. این پژوهش نخستین گزارش در مورد فرآیند MICP در شرایط بی‌هوازی برای حذف فلوراید و کلسیم در آب‌های زیرزمینی است و نشان می‌دهد حذف این یون‌ها در شرایط بی‌هوازی حتی می‌تواند بیشتر از شرایط هوازی باشد (Liu et al., 2021). همچنین نشان داده شده است که سویه *H12 / سینتوپاکتر*<sup>۲</sup> مقدار زیادی کربنات و هیدروکسید را در فرآیند نیترات‌زدایی تولید می‌کند که سبب رسوب هم‌زمان کلسیم و فلوراید می‌شود و جایگاه‌های برون‌یاخته‌ای زیادی را برای رسوب زیستی فراهم می‌کند (Su et al., 2020).

دفن‌گاه زباله سراوان بزرگ‌ترین دفن‌گاه شمال کشور است و مساحت آن به ۱۳ هکتار می‌رسد. نیمی از زباله تولیدی استان گیلان هر روز به این محل برده می‌شود. زباله‌هایی که در دفن‌گاه زباله انباشته می‌شوند بیشتر زباله‌های آلی و معدنی هستند که بدون هیچ‌گونه تیمار اولیه در دفن‌گاه سراوان دفن می‌شوند و در فرآیند تجزیه شیرابه تولید می‌کنند. به‌طور میانگین، در دفن‌گاه سراوان ۴-۵ لیتر شیرابه در ثانیه در روزهای خشک و حدود ۱۸ لیتر شیرابه در ثانیه در روزهای بارانی تولید می‌شود (Mojiri et al., 2017; Shariatmadari et al., 2018). از آنجا که جداسازی زباله‌ها پیش از دفن انجام نمی‌شود، در شیرابه عناصری با منشا زباله‌های خانگی و صنعتی مانند کلسیم، فسفر، فلوراید و فلزهای سنگین دیده می‌شوند. بنابراین شیرابه به یک ماده آلاینده خطرناک تبدیل شده و با توجه به بالا بودن سطح بارش‌ها در شمال کشور، شیرابه می‌تواند منابع آبی و خاکی بیشتری را در پایین دست آلوده کند. بنابراین، حذف آلودگی‌های موجود در شیرابه سراوان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی پژوهش‌های بسیار اندکی در رابطه با بررسی عملکرد باکتری‌های بومی در مکان‌های دفن زباله برای فرآیند MICP انجام شده است (Rajasekar et al., 2021). بنابراین، در این پژوهش ابتدا پتانسیل باکتری‌های جدا شده از شیرابه دفن‌گاه زباله سراوان در فرآیند MICP مورد ارزیابی قرار گرفت و یک سویه جداسازی شد. سپس کارایی سویه جدا شده در کنار یک باکتری شاخص در فرآیند MICP برای حذف فسفات، فلوراید و کلسیم از شیرابه بررسی شد.

## روش‌شناسی پژوهش

### نمونه‌برداری از شیرابه و آنالیز آن

این پژوهش در سال ۱۴۰۱ در دانشگاه گیلان انجام شد. شیرابه از دفن‌گاه زباله سراوان (37°4'18" N; 49°37'53" E) نمونه‌برداری و ویژگی‌های آن شامل pH، غلظت املاح محلول، BOD<sup>۳</sup>، COD<sup>۴</sup>، غلظت کاتیون‌ها و آنیون‌ها و غلظت فلزهای سنگین به روش‌های

1 *Cupriavidus* sp.

2 *Acinetobacter* sp.

3 Biochemical Oxygen Demand

4 Chemical Oxygen Demand

استاندارد اندازه‌گیری شد (APHA, 1998).

### تهیه و بازکشت باکتری شاخص و جداسازی باکتری تولید کننده اوره‌آز از شیرابه

باکتری شاخص اسپوروسارسینا پاستوری<sup>۱</sup> (PTCC1645) از بانک میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) تهیه شد و در محیط کشت جامد نوترینت آگار<sup>۲</sup> (NA) بازکشت شد. سپس باکتری به محیط کشت NBU<sup>۳</sup> (نوترینت برات با ۳۳۳ میلی‌مولار اوره منتقل و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با هوادهی دائمی بر روی شیکر (۱۱۰ rpm) تکثیر شد (Achal et al., 2009). پس از ۴۸ ساعت یعنی در مرحله انتهایی فاز رشد نمایی، باکتری با سانتریفیوژ کردن (۱۰۰۰۰ rpm؛ به مدت ۵ دقیقه) از محیط کشت جدا شده و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

برای جداسازی یک سویه باکتری تولید کننده اوره‌آز، از شیرابه سری رقت تهیه شد و رقت‌ها به‌منظور غنی‌سازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم اوره‌آز در محیط کشت NA حاوی یک مولار اوره کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انکوباسیون شدند (Alef and Nannipieri, 1995). سپس چند کلونی با فنوتیپ مشخص از این محیط جدا و در محیط اوره-آگار (یک مولار اوره) به صورت خطی کشت داده شدند. کلونی‌های رشد کرده روی این محیط پس از چند بار بازکشت خالص‌سازی شدند (Al-Thawadi, 2008). برای تعیین کیفیت آنزیم آوره‌آز باکتری‌ها و توان اوره‌آزی آن‌ها از محیط کشت اوره‌آگار بیس (کریستسن)<sup>۴</sup> استفاده شد. برای تمامی جدایه‌ها تغییر رنگ محیط کشت UBA به صورتی (ارغوانی) مورد ارزیابی قرار گرفت (Qian et al., 2010). سپس سویه جدا شده‌ای (سویه B) که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود برای ادامه آزمایش انتخاب شد (شکل ۱).



شکل ۱. تغییر رنگ شناساگر فنل رد در محیط کشت UBA به دلیل فعالیت اوره‌آزی (از رنگ نارنجی به رنگ بنفش)

### آزمایش زیست‌پالایی در شیرابه

آزمایش زیست‌پالایی به صورت فاکتوریل ۳×۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (مجموع ۳۶ نمونه) اجرا شد. فاکتورها شامل باکتری سیمان کننده در سه سطح (بدون مایه‌زنی، مایه‌زنی با سویه B جدا شده از شیرابه و مایه‌زنی با اسپوروسارسینا پاستوری) به عنوان فاکتور اول، اوره در دو سطح (صفر و دو درصد) به عنوان فاکتور دوم و کلسیم کلراید در دو سطح (صفر و ۵۰ mM) به عنوان فاکتور سوم بودند. برای بررسی اثر تیمارها به حجم مشخصی از شیرابه (غیراستریل) در ارلن ترکیبی از فاکتورها (به عنوان تیمار) اضافه شد. ارلن‌ها به مدت یک هفته در شرایط هوازی و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباسیون شدند. سپس رسوب تشکیل شده در ارلن‌ها با کاغذ صافی جدا، و در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس خشک و توزین شدند. در بخش صاف شده غلظت یون‌های فسفات، فلوراید و کلسیم با دستگاه یون کروماتوگرافی (IC850-Metrohm) و pH نیز با روش پتانسیومتری با دستگاه pH متر (ORION 420A) اندازه‌گیری شد. ویژگی‌های رسوب تشکیل شده نیز با آنالیز XRD (Xpert Pro MPD- Panalytical) و SEM (FEI Quanta 200) بررسی شد.

### آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز آماری شدند. برای مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی از آزمون توکی در سطح احتمال خطای ۵ درصد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

1 *Sporosarcina pasteurii*  
2 Nutrient Agar  
3 Nutrient Broth Urea  
4 Urea Agar Base (Christensen)

## یافته‌های پژوهشی و بحث

### ویژگی‌های شیرابه

برخی از ویژگی‌های شیرابه مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است. نسبت BOD/COD در شیرابه پایین بود (۰/۴۴) که بیانگر مقدار کم ترکیب‌های قابل تجزیه می‌باشد. با توجه به غلظت بسیار زیاد آنیون‌هایی مانند فسفات، نیترات، کلراید، فلوراید و کاتیون‌های منیزیم و آمونیوم در شیرابه، جمع‌آوری و تصفیه آن پیش از وارد شدن به محیط طبیعی ضروری است. مقدار فلزهای سنگین در شیرابه کم بود و از آن‌جا که مقدار بالای فلزهای سنگین نظیر آهن، نیکل، کروم، کبالت، منگنز و سرب موجب مهار پالایش زیستی می‌شوند، بنابراین غلظت کم این فلزها برای زیست‌پالایی به روش MICP بازدارنده نیست. همچنین pH قلیایی شیرابه محیط مناسبی را برای فرایند MICP فراهم می‌کند که در پژوهش‌های گذشته نیز به آن اشاره شده است (Naveed et al., 2020; Yan et al., 2020). از آن‌جا که pH در آب‌های زیرزمینی عموماً در حدود ۹-۶ است برای حذف آلاینده‌ها توسط فرایند MICP مناسب است. pH حدود هفت برای حذف آلاینده‌ها مناسب گزارش شده است (Wang et al., 2022).

جدول ۱. برخی از ویژگی‌های شیرابه مورد بررسی

پارامتر	مقدار	پارامتر	مقدار
pH	۸/۵۷	روی	ND
رنگ	۵	لیتیم	۰/۸۳
کدورت	۷۳۰۰	مس	۰/۳۳۳
COD	۲۳۳۰	سرب	۰/۲۲۵
BOD	۱۰۲۳	کروم	۰/۱۳۸
TDS	۱۰۰۱۳	کادمیوم	۰/۰۰۰۷
آمونیم	۱۰۴۰	کبالت	۰/۰۷۳
کلسیم	۶۰	نیکل	۰/۲۷
منیزیم	۱۰۹	سلنیوم	ND
سدیم	۱۲۹۰	نیتريت	۴۵/۹
پتاسیم	۶۰۹/۲	نیترات	۸۷/۶
آهن	۳/۴۸۸	فسفات	۳۷/۶۹
منگنز	۰/۰۹۲	فلوراید	۱۸۵/۲
سولفات	۲۷/۳	کلراید	۷۰۴/۷
کل کلی‌فرمها*	۲۵۰	باکتری‌های هتروترف*	۷۰۰

COD: اکسیژن‌خواهی شیمیایی، BOD: اکسیژن‌خواهی زیستی، TDS: غلظت کل جامدات محلول، رنگ بر حسب CU، کدورت بر حسب NTU و سایر پارامترها به جز pH دارای واحد  $\text{mg L}^{-1}$  می‌باشند. ND: به معنی غیر قابل تشخیص و \* تعداد باخته باکتریایی در ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد.

### نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری جدا شده

پس از غربال‌گری اولیه جدایه بر اساس مقدار بالاتر تولید آنزیم اوره‌آز، برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن از جمله آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم<sup>۱</sup>، اسپور، کاتالاز و تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که جدایه مورد آزمایش گرم-مثبت و بررسی آن در زیر میکروسکوپ نشان داد که به شکل کروی (کوکسی) بود. نتایج رنگ‌آمیزی اسپور جدایه نیز، اسپوردار بودن آن را تایید نمود. همچنین نتیجه آزمون تحرک جدایه تولیدکننده اوره‌آز، منفی بود. نتیجه آزمون کاتالاز باکتری مثبت بود که بیانگر هوازی یا بی‌هوازی اختیاری بودن آن می‌باشد. پژوهش‌های بسیاری حاکی از آن است که باکتری‌های کارا در فرایند MICP بیشتر از نوع باسیل‌های گرم-مثبت و هوازی هستند که از جمله این باکتری‌ها می‌توان به *باسیلوس سابتلیس*<sup>۲</sup> و *باسیلوس تورینجنسیس*<sup>۳</sup> اشاره کرد (Ganendra et al., 2014).

### آنالیز واریانس تاثیر تیمارها

در جدول ۲ آنالیز واریانس تاثیر تیمارها بر پارامترهای اندازه‌گیری شده آمده است. نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد تاثیر همه تیمارها

1 Gram staining

2 *Bacillus subtilis*

3 *Bacillus thuringiensis*

و برهم کنش آنها بر کلسیم محلول پس از فرایند MICP معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). تاثیر باکتری، اوره و کلسیم کلراید و همچنین برهم کنش باکتری و اوره در کلسیم کلراید بر فلوراید محلول معنی دار شد ( $p < 0.05$ ). از بین تیمارها تنها اثر کلسیم کلراید و برهم کنش آن با باکتری بر فسفات محلول معنی دار بود ( $p < 0.01$ ). همچنین تاثیر اوره کلسیم کلراید و برهم کنش دوتایی آنها ( $p < 0.01$ ) و همچنین برهم کنش سه تایی فاکتورها بر pH معنی دار شد ( $p < 0.05$ ) در حالی که تنها تاثیر کلسیم کلراید بر رسوب ایجاد شده معنی دار بود ( $p < 0.01$ ) (جدول ۲).

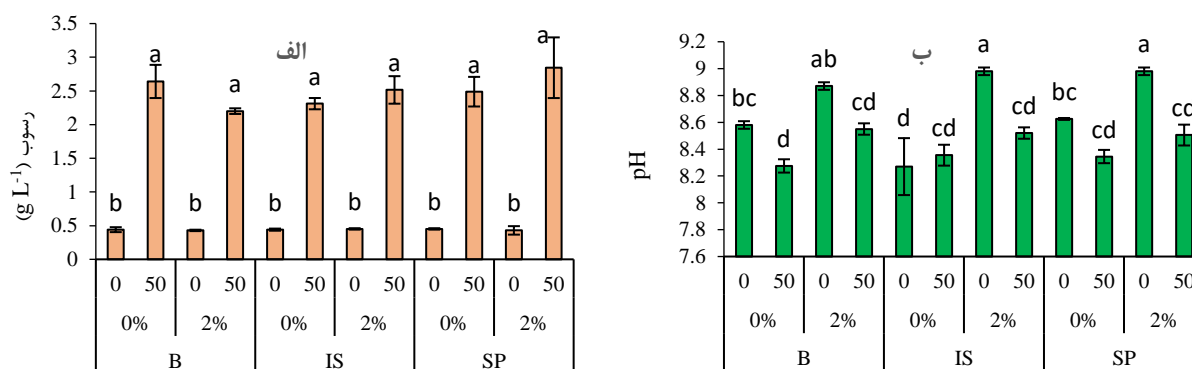
جدول ۲. تجزیه واریانس تاثیر تیمارها بر پارامترهای اندازه گیری شده

میانگین مربعات					درجه آزادی	منبع تغییرات
کلسیم	فلوراید	فسفات	pH	رسوب		
۱۳۱/۸*	۶۲۰۳**	۴/۶۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۳ <sup>ns</sup>	۲	باکتری (B)
۴۳۸۹**	۳۸۶۷**	۰/۳۸۹ <sup>ns</sup>	۰/۶۳۷**	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۱	اوره (U)
۲۷۷۳**	۱۰۵۵۷**	۹۴۹**	۰/۵۱۳**	۲۵/۴**	۱	کلسیم کلراید (C)
۱۵۷/۶*	۱۳۱/۳ <sup>ns</sup>	۲۴/۴**	۰/۰۱۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۰ <sup>ns</sup>	۲	B × U
۱۳۶/۳*	۱۶۱۲**	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۴۳ <sup>ns</sup>	۲	B × C
۵۰۶۰**	۷۷۷/۳*	۰/۰۴۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۹۵**	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۱	U × C
۱۵۵/۸*	۹۳/۰۹ <sup>ns</sup>	۳/۹۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۳۶*	۰/۰۸۹ <sup>ns</sup>	۲	B × U × C
۲۲/۹۴	۱۲۵/۹	۲/۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۳۱	۲۴	خطا
۲۱/۹۷	۸/۵۸۱	۱۳/۶	۰/۸۸۴	۱۱/۹	-	ضرب تغییرات

\*\* و \* به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد خطاست و <sup>ns</sup> بیانگر معنی دار نبودن است.

#### مقدار رسوب تشکیل شده و pH

مقدار رسوب ایجاد شده و pH در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشترین مقدار رسوب در تیمار دارای باکتری شاخص در حضور اوره و کلسیم کلراید (۲/۸۴ گرم بر لیتر) ایجاد شد که تفاوت آماری معنی دار با دیگر تیمارهای دارای کلسیم نداشت. به طور کلی، مقدار رسوب در تیمارهای دارای کلسیم کلراید بیشتر بود که پیش بینی می شد. اما حضور اوره در تیمارهای دارای باکتری (شاخص و جدا شده) سبب افزایش محتوای رسوب نسبت به تیمارهای بدون اوره شد. با این حال، مقدار رسوب در تیمار بدون باکتری و اوره در حضور کلسیم کلراید نیز قابل توجه بود که اگرچه دلیل آن روشن نیست اما احتمالاً در پی کاهش pH در این تیمار (شکل ۲-ب) و نبود باکتری های تخصصی اورئولیتیک که با تولید آمونیوم کاهش pH را جبران می کنند، سایر یونها و همچنین مواد آلی شیرابه در رسوب یافته اند. اگرچه آنالیز رسوب هر تیمار به طور جداگانه انجام نشد اما کمترین مقدار فسفر محلول در این تیمار (شکل ۳-الف) به نوعی تأیید می کند که بخش زیادی از آن به فرم رسوب مونوآمونیوم فسفات، کلسیم فسفات و استروویت حذف شده است. بالا بودن قابل توجه پتاسیم در شیرابه (جدول ۱) تشکیل استروویت پتاسیم را ممکن می کند. یادآوری می شود که جرم مولی کلسیم فسفات حدود سه برابر کلسیم کربنات است. در پژوهش های دیگر به حذف فسفات به فرم استروویت از شیرابه لندفیل اشاره شده است (Huang et al., 2014; Farhangi et al., 2021).



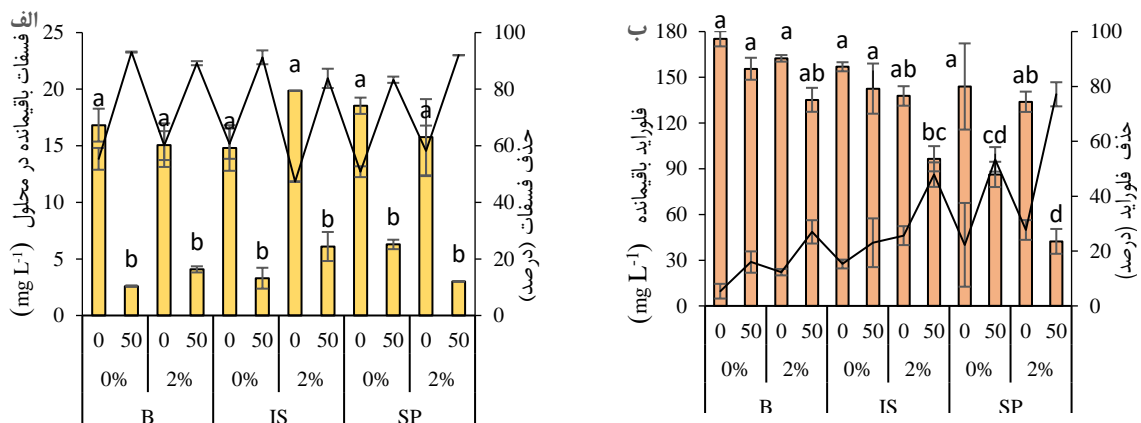
شکل ۲. مقدار رسوب (الف) و pH (ب) در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون. B، IS و SP به ترتیب بیانگر تیمار بدون مایه زنی با باکتری، مایه زنی شده با سویه جدا شده از شیرابه و مایه زنی شده با اسپوروسارسینا پاستوری هستند. حروف متفاوت روی ستون ها نشان دهنده معنی دار بودن ( $p < 0.05$ ) تفاوت میانگین هاست.

در تیمارهای بدون کلسیم کلراید مقدار pH نسبت به تیمارهای دارای کلسیم کلراید بیشتر بود و در تیمارهای دارای باکتری و اوره و بدون کلسیم کلراید نسبت به تیمار شاهد ۰/۴ واحد افزایش نشان داد (شکل ۲). کلسیم کلراید یک ترکیب یونی محلول در آب است که در زمان انحلال گرما تولید می‌کند. به دنبال افزودن کلسیم کلراید قدرت یونی محلول افزایش می‌یابد که این امر سبب کاهش ضریب فعالیت یون‌های هیدروکسیل و هیدروژن می‌شود. تفاوت اندازه یون‌های هیدروکسیل و هیدروژن و کوچک‌تر بودن اندازه یون هیدروژن سبب بیشتر بودن ضریب فعالیت آن و در نتیجه کاهش pH می‌شود (Sposito, 2008). باکتری‌های تولید کننده اوره نیز اگرچه با مصرف یون هیدروژن ( $H^+$ ) اوره را هیدرولیز می‌نمایند که این امر می‌تواند سبب بالا رفتن pH شود. اما این واکنش منجر به تولید آمونیوم قابل توجه می‌شود که از دلایل اصلی بالا رفتن pH است. در سوی دیگر، یون بی‌کربنات تولید شده در فرایند هیدرولیز اوره ( $HCO_3^- = CO_3^{2-} + H^+$ ) تولید یون هیدروژن و کربنات می‌کند که در فرایند تشکیل کلسیم کربنات ( $Ca^{2+} + CO_3^{2-} = CaCO_3$ )، یون کربنات مصرف شده و هیدروژن مصرفی هم در مسیر هیدرولیز اوره جبران می‌شود (Burt et al., 2018). در این پژوهش نیز حضور اوره در همه تیمارهای نظیر سبب افزایش pH شد (Kang et al., 2014).

### حذف فسفات، فلوراید و کلسیم از شیرابه

میانگین غلظت فسفات و راندمان حذف آن در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون در شکل ۳- الف نشان داده شده است. غلظت یون فسفات در همه تیمارها با توجه به مقدار اولیه آن ( $37/69 \text{ mg L}^{-1}$ ; جدول ۱) کاهش یافت. کمترین مقدار آن ( $2/59 \text{ mg L}^{-1}$ ) در تیمار بدون مایه‌زنی باکتری، افزودن اوره و در حضور کلسیم کلراید و بیشترین مقدار آن ( $19/86 \text{ mg L}^{-1}$ ) در تیمار مایه‌زنی شده با باکتری بومی، افزودن اوره و بدون کلسیم کلراید به دست آمد. حضور کلسیم کلراید تنها عاملی بود که سبب کاهش معنی‌دار غلظت فسفات و یا به عبارتی افزایش حذف آن در بین تیمارها شد. بیشترین درصد حذف فسفات (با توجه به غلظت اولیه فسفات؛ جدول ۱) در تیمار بدون مایه‌زنی باکتری و اوره و در حضور کلسیم کلراید مشاهده شد (۹۳ درصد) که اختلاف معنی‌داری با تیمار دارای باکتری شاخص همراه با اوره و کلسیم کلراید نشان نداد (۹۲ درصد). درصد حذف فسفات در این تیمار (۹۲ درصد) نسبت به تیمار شاهد (تیمار بدون مایه‌زنی باکتری، اوره و کلراید کلسیم؛  $55/37$  درصد)  $1/6$  برابر بود.

با توجه به نمودار درصد حذف فسفات از ۴۷ تا ۹۳ درصد متغییر بود. همچنین در همه تیمارهایی که دارای کلسیم کلراید بودند درصد حذف فسفات بالا بود (از ۸۳ تا ۹۳ درصد). این موضوع نشان می‌دهد که با افزودن اوره و کلسیم کلراید بیش از ۸۳ درصد از فسفات از فاز محلول شیرابه حذف شد. بنابراین نقش کلسیم کلراید در حذف فسفات بیشتر از باکتری و حتی اوره است. رسوب فسفات به فرم مونوآمونیوم فسفات، کلسیم فسفات و استروویت در پژوهش‌های دیگر (Huang et al., 2014; Farhangi et al., 2021) گزارش شده است.



شکل ۳. درصد حذف و مقدار فسفات باقی مانده (الف) و درصد حذف و مقدار فلوراید باقی مانده (ب) در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون. B، IS و SP به ترتیب بیانگر تیمار بدون مایه‌زنی با باکتری، مایه‌زنی شده با سویه جدا شده از شیرابه و مایه‌زنی شده با/اسپوروسارسینا باستوری هستند. خطوط ممتد درصد حذف را نشان می‌دهند. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌هاست. ( $p < 0/05$ )

میانگین غلظت فلوراید و راندمان حذف آن در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون در شکل ۳- ب نشان داده شده است. غلظت یون فلوراید در همه تیمارها با توجه به مقدار اولیه آن ( $185/2 \text{ mg L}^{-1}$ ; جدول ۱) کاهش یافت. کمترین مقدار آن ( $42/34 \text{ mg L}^{-1}$ )



در تیمار با مایه‌زنی باکتری شاخص، افزودن اوره و کلسیم کلراید به دست آمد که با سایر تیمارها به‌جز مایه‌زنی با همین باکتری، بدون اوره و دارای کلسیم کلراید تفاوت آماری معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). بیشترین مقدار فلوراید ( $175/26 \text{ mg L}^{-1}$ ) در تیمار شاهد (بدون مایه‌زنی باکتری، اوره و کلسیم کلراید) به دست آمد که با تیمارهای بدون مایه‌زنی با باکتری، بدون اوره و کلسیم کلراید تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. درصد حذف فلوراید در تیمار دارای باکتری شاخص و جدا شده همراه با اوره و کلسیم کلراید به ترتیب ۷۷ و ۴۸ درصد بود که در مقایسه با تیمار شاهد به ترتیب ۱۴/۴ و ۹ برابر افزایش یافته بود. زیرا حضور باکتری‌ها می‌تواند مکان‌های فعال‌تری را برای کاتیون‌های فلزی فراهم کند (Leng and Soares, 2021; Naveed et al., 2020) و با افزایش اتصال نمک‌های کلسیم به سطوح باکتری‌ها در فرایند MICP حذف فلوراید نیز افزایش می‌یابد (Ali et al., 2021). در تمامی تیمارهای دارای کلسیم کلراید درصد حذف فلوراید بیشتر از سایر تیمارها بود، درحالی‌که درصد حذف فلوراید در تیمارهای بدون افزودن کلسیم کلراید و اوره کمتر بود. با این حال همبستگی بین درصد حذف فلوراید و کلسیم معنی‌دار نبود ( $p = 0/57$ ;  $0/12$ ) همبستگی بین پارامترها نشان داد که مقدار رسوب با حذف فلوراید با مقدار pH شیرابه مرتبط است، به‌گونه‌ای که با افزایش pH، فلورزدایی کم شد که می‌توان آن را به افزایش رقابت یون‌های هیدروکسیل با فلوراید در pH های بالا مرتبط دانست (Chen et al., 2019; He et al., 2019; Li et al., 2020; Zhu et al., 2020). در پژوهشی گزارش شد که حذف فلوراید توسط سویه WZ39 سودوموناس<sup>۱</sup> در فرایند MICP در شرایط pH خنثی به بیشینه مقدار خود می‌رسد (Wang et al., 2021). همچنین گفته شده کارایی حذف فلوراید در شرایط pH خنثی به بیشترین مقدار می‌رسد که می‌تواند در نتیجه فعالیت متابولیکی قوی باکتری سودوموناس WZ39 در فرایند MICP باشد (Lai et al., 2020). غلظت کلسیم و pH اثر بسیار معنی‌داری در حذف فلوراید در فرایند رسوب زیستی کلسیم کربنات در حضور اسیتوباکتر H12 دارد (Su et al., 2020). فعالیت متابولیکی ریزجانداران MICP، شرایط محیطی مانند pH و غلظت  $\text{CO}_3^{2-}$  را تغییر می‌دهد که به طور غیرمستقیم سبب حذف فلوراید می‌شود (Maity et al., 2018). چهار فاکتور مرتبط با مکانیزم حذف فلوراید غلظت کلسیم، pH، غلظت کربنات و وجود مکان‌های هسته‌زایی هستند که سه فاکتور اول می‌توانند توسط متابولیسم باکتریایی تغییر کنند و در نهایت، گروه‌های عاملی با بار منفی پلی‌مرهای برون‌یاخته‌ای<sup>۲</sup> (EPS) بر روی سطوح باکتری به عنوان مکان هسته‌زایی عمل می‌کنند (Mukherjee et al., 2017).

جدول ۲. ضرایب همبستگی بین پارامترهای مورد مطالعه

رسوب	pH	حذف فسفات	حذف فلوراید	حذف کلسیم
رسوب	۱			
pH	۰/۵۷**			
حذف فسفات	۰/۹۴**	۱		
حذف فلوراید	۰/۶۲**	۰/۴۸*	۱	
حذف کلسیم	۰/۴۴*	۰/۴۶*	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۱

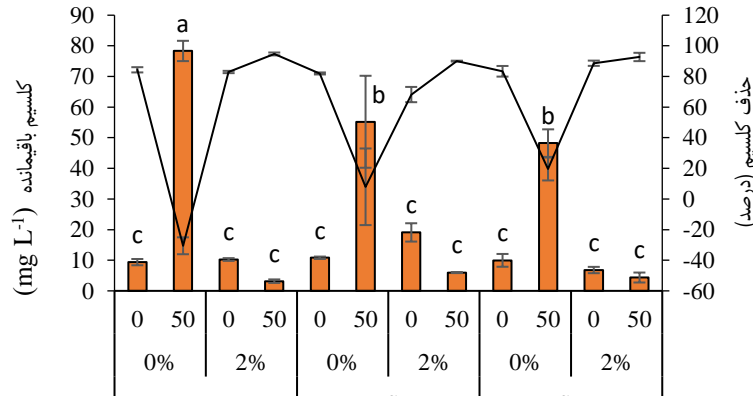
\* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال پنج و یک درصد و <sup>ns</sup> بیانگر چشم‌گیر نبودن در سطح ۵ درصد است

میانگین غلظت و راندمان حذف کلسیم در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون در شکل ۴ نشان داده شده است. بیشترین درصد حذف کلسیم در تیمار بدون باکتری همراه با کلسیم کلراید و اوره مشاهده شد که البته تفاوت آماری معنی‌داری با تیمارهای بدون اوره دارای کلسیم کلراید نداشت. در تیمار شاهد بدون باکتری و اوره و دارای کلسیم کلراید نه تنها حذفی مشاهده نشد بلکه مقدار کلسیم باقی‌مانده در شیرابه از مقدار اولیه آن بیشتر شد. درحالی‌که میانگین حذف کلسیم در تیمار بدون باکتری پس از افزودن اوره در حضور کلسیم کلراید نسبت به این تیمار به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. به نظر می‌رسد به دلیل بالا رفتن pH بر اثر بودن اوره (در مقایسه با تیمار دارای کلسیم کلراید بدون اوره)، شرایط برای تشکیل رسوب  $\text{CaF}_2$  فراهم شده و کلسیم همراه با فلوراید رسوب یافته است. افزایش درصد حذف فلوراید در این تیمار (۲۶ درصد) در مقایسه با تیمار دارای کلسیم کلراید بدون اوره (۱۵ درصد) (شکل ۳-ب) این امر را تأیید می‌کند. در سوی دیگر، از آنجا که شیرابه استریل نبوده است، در تیمار دارای اوره باکتری‌های بومی شیرابه نیز در حذف کلسیم طی فرایند MICP نقش ایفا کرده‌اند. میانگین مقدار باقی‌مانده کلسیم در تیمارهای بدون مایه‌زنی با باکتری، دارای باکتری جدا شده و دارای باکتری شاخص به ترتیب ۲۵/۲۸، ۲۲/۷۷ و ۱۷/۳۴ میلی‌گرم در لیتر بود که توانمندی بیشتر باکتری شاخص در حذف کلسیم از شیرابه را نشان

1 *Pseudomonas* sp. WZ39

2 Extracellular polymeric substance

می‌دهد اگرچه تفاوت معنی‌داری با باکتری جدا شده از شیرابه نداشت. با این حال استفاده از ریزجانداران بومی شیرابه، نگرانی زیست محیطی بسیار کمتری نسبت به مایه‌زنی با باکتری شاخص که به طور بالقوه می‌تواند پویایی میکروبی محیط را تغییر دهد ایجاد می‌کند، ضمن این‌که هزینه فرایند را نیز کاهش می‌دهد. علاوه بر این مواد خطرناک موجود در شیرابه ممکن است سبب ایجاد سمیت برای ریزجانداران غیربومی شوند و کارایی فرایندهای زیست‌پالایی را کاهش دهند.



شکل ۴. درصد حذف و مقدار کلسیم باقی‌مانده در تیمارهای مختلف پس از یک هفته انکوباسیون. IS و SP به ترتیب بیانگر تیمار بدون مایه‌زنی با باکتری، مایه‌زنی شده با سویه جدا شده از شیرابه و مایه‌زنی شده با اسپوروسارسینا باستوری هستند. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن ( $p < 0.05$ ) تفاوت میانگین‌هاست.

در تیمارهای دارای کلسیم کلراید، با افزایش نسبت کلسیم به فسفات باقی‌مانده درصد فلوراید افزایش یافت. افزایش نسبت کلسیم به فسفات می‌تواند شرایط تشکیل هیدروکسی آپاتیت ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) را افزایش دهد. تشکیل هیدروکسی آپاتیت به حذف فلوراید از طریق تبادل یونی کمک می‌کند (Wimalasiri et al., 2021). به طور کلی سه مسیر برای حذف فلوراید پیشنهاد شده است؛ تبادل یونی، هم‌رسوبی و جذب شیمیایی<sup>۱</sup>. در فرایند تبادل یونی، فلوراید می‌تواند جایگزین هیدروکسیل در  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  شود. فلوراید نسبت به  $\text{OH}^-$  دارای شعاع یونی کوچکتری است و فرایند جایگزینی هم‌شکل به سهولت انجام می‌شود (Kang et al., 2019). هم‌رسوبی فلوراید با کلسیم و فسفات آزاد نیز سبب تشکیل  $\text{CaF}_2$  و  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  می‌شود (Wang et al., 2022) که بیانگر نقش کلیدی فسفات در فرایند فلورزدایی می‌باشد (Sternitzke et al., 2012). گزارش شده است که سنگ آهک به تنهایی نمی‌تواند در حذف فلوراید کارایی داشته باشد. در حالی که با افزودن فسفات، حذف فلوراید به دنبال فرایند تبادل یونی با رسوب  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  و همچنین هم‌رسوبی با فسفات به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Nath and Dutta, 2010). در این پژوهش نیز حضور فسفات در شیرابه همراه با تشکیل رسوب زیستی کلسیم کربنات طی فرایند MICP در حذف فلوراید از شیرابه اثر مثبت داشت زیرا رسوب  $\text{CaCO}_3$  بر روی سطح باکتری‌ها سبب ناپویا شدن فلوراید توسط جذب شیمیایی می‌شود. اگرچه تبادل یونی و هم‌رسوبی در فرایند فلورزدایی در مقایسه با جذب شیمیایی نقش مهم‌تری دارند (Wang et al., 2022).

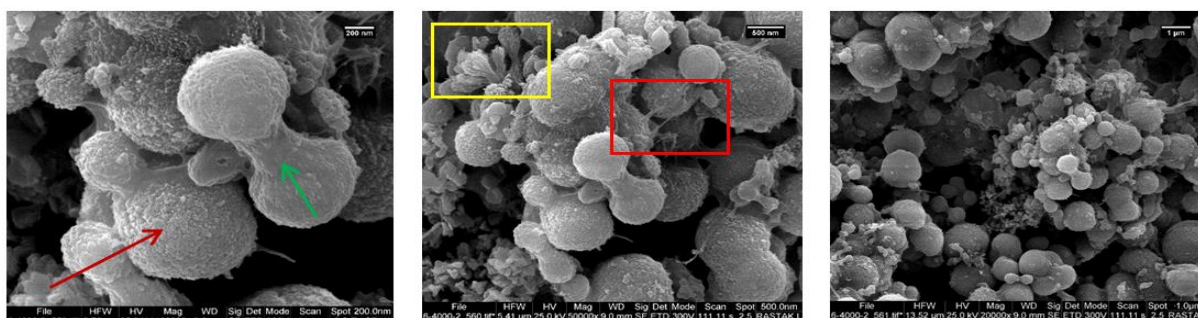
مقدار فلوراید و فسفات باقی‌مانده با افزایش نسبت کلسیم به فلوراید کاهش پیدا کرد. هم‌رسوبی فلوراید، کلسیم و فسفات یکی از مسیرهای فلورزدایی است. افزایش قدرت یونی کلسیم در تیمارهای دارای کلسیم کلراید سبب افزایش رسوب نمک‌های کلسیم می‌شود و بنابراین حذف فلوراید را به شکل  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  و  $\text{CaF}_2$  می‌بخشد (Wang et al., 2022). با افزایش غلظت کلسیم کارایی فلورزدایی به تدریج بهبود می‌یابد. به نقش حیاتی گروه‌های عاملی کربوکسیل، هیدروکسیل و آمینو بر روی EPS باکتریایی در معدنی شدن زیستی از طریق کلات کردن کاتیون‌های فلزی نیز اشاره شده است (Tang et al., 2021). افزایش  $\text{Ca}^{2+}$  سبب هسته‌زایی در سطح باکتری Naveed (et al., 2020; Wang et al., 2021) و افزایش جذب سطحی و هم‌رسوبی فلوراید و حذف آن از محیط می‌شود. گزارش شده است که سویه WZ39 سودوموناس جایگاه‌های اتصال فراوانی را برای نمک‌های کلسیم در مراحل اولیه هسته‌زایی فراهم می‌کند (Wang et al., 2022). بنابراین، با وجود تعدد ریزجانداران، فعالیت باکتری‌ها به سبب اتصال و رشد کلسیم اضافی بر روی یاخته‌های آن‌ها محدود می‌شود و کارایی حذف کلسیم و فلوراید کاهش می‌یابد (Terzis and Laloui, 2019). گزارش شده است که غلظت‌های زیاد کلسیم کارایی رسوب و حذف کلسیم را کاهش می‌دهد (Lambert and Randall, 2019). در این پژوهش نیز افزایش نسبت کلسیم به فلوراید سبب کاهش در کارایی

حذف کلسیم در بیشتر تیمارها شد (شکل ۳ و ۴).

بودن غلظت بالایی از مواد آلی در فرایند MICP کارایی این فرایند و قلیابیت محیط را افزایش می‌دهد. در این پژوهش نیز در شیرابه مقادیر زیادی مواد آلی وجود دارد که مکان‌های مناسبی را برای هم‌رسوبی کلسیم، فلوراید و فسفات فراهم می‌کنند (روابط ۱ تا ۳) و حذف این یون‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد (Banerjee, 2015; Deng et al., 2016). از سویی، غلظت بالای مواد آلی در شیرابه سبب افزایش متابولیسم ریزجانداران شده و یاخته‌ها جایگاه‌های بیشتری را برای رسوب فراهم می‌کنند. بنابراین، هنگامی که فرایند MICP در شیرابه رخ می‌دهد، باکتری‌ها و EPS به جایگاه موثری برای رسوب کلسیم تبدیل می‌شوند. کلسیم کربنات زیستی بر روی سطح خود هسته تشکیل می‌دهد و به تدریج رشد می‌کند و کانی‌های حاوی فلوراید را تشکیل می‌دهد. وجود گروه‌های منفی روی سطح یاخته سبب جذب کلسیم می‌شود (De Muynck et al., 2010) و سپس یون‌های فلوراید توسط جاذبه الکترواستاتیکی کلسیم جذب سطحی می‌شوند (Gogoi et al., 2015).

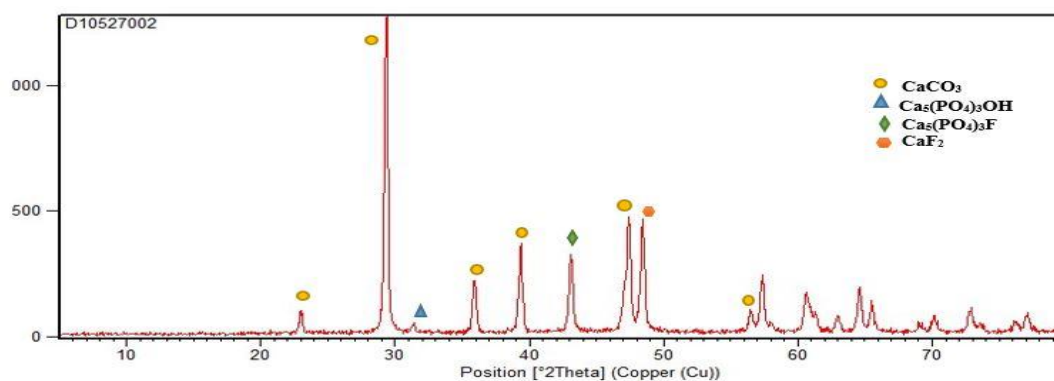
بررسی رسوب تشکیل شده با SEM و پراش پرتو ایکس (XRD)

به منظور بررسی رسوب تشکیل شده آنالیزهای SEM (شکل ۵) و XRD (شکل ۶) انجام شد. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص است تشکیل دانه‌بندی سوزنی شکل، ترشحات باکتریایی در حاشیه رسوب که می‌توانند به عنوان مکان‌های هسته‌زایی برای تسریع کریستالیزاسیون عمل کنند (Qin et al., 2020) و همچنین ساختار خوشه‌ای رسوب ایجاد شده قابل مشاهده است. نتایج ما با نتایج پژوهش‌گران دیگر (Ansari et al., 2020; Wang et al., 2021) مطابقت دارد.



شکل ۵. نتایج آنالیز SEM رسوب حاصل. به ترتیب از راست به چپ بزرگنمایی افزایش یافته است. فلش قرمز مربوط به هسته‌زایی، فلش سبز مربوط به باکتری در حال تقسیم، کادر زرد رسوبات خوشه‌ای و کادر قرمز تراوش‌های برون یاخته‌ای می‌باشد.

نتایج آنالیز XRD (شکل ۶) نشان داد که پیک‌های مشاهده شده در  $2\theta$ ، ۲۳، ۲۹/۴، ۳۶، ۳۹/۴، ۴۸/۵ و ۵۶/۵ مربوط به رسوب کلسیم کربنات است که رسوب غالب تشکیل شده در شیرابه می‌باشد. پیک‌های موجود در  $2\theta$ ، ۳۱/۳ و ۴۳/۶ نیز می‌تواند مربوط به تشکیل رسوب  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  و  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  و پیک مشاهده شده در موقعیت  $2\theta$ ، ۴۷ مربوط به رسوب  $\text{CaF}_2$  باشد که پس از جذب سطحی  $\text{F}^-$  ایجاد شده است.



شکل ۶. نتایج آنالیز XRD رسوب حاصل



## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در این پژوهش حذف یون‌های فسفات، کلسیم و فلوراید از شیرابه دفن‌گاه سراوان در فرایند رسوب زیستی کلسیم کربنات توسط یک باکتری اورئولیتیک در کنار باکتری شاخص *اسپوروسارسینا پاستوری* بررسی شد. نتایج نشان داد که برای حذف فسفات از شیرابه صرفاً به کلسیم کلراید و زمان نیاز است. درحالی که برای حذف فلوراید علاوه بر کلسیم کلراید به اوره و باکتری‌های اورئولیتیک هم نیاز است. در خصوص حذف فلوراید؛ مشخصاً نقش باکتری بارزتر از اوره و کلسیم کلراید بود اما اثر سینرژیستی اوره، کلسیم کلراید و باکتری *اسپوروسارسینا پاستوری* کاملاً متفاوت و بالاتر است. بیشترین درصد حذف فسفات، فلوراید و کلسیم در تیمارهای دارای باکتری مربوط به باکتری شاخص طی فرایند رسوب زیستی کلسیم کربنات بود با این حال باکتری بومی نیز در حذف این یون‌ها موفق عمل کرد و بنابراین می‌توان از پتانسیل باکتری‌های بومی موجود در شیرابه برای حذف آلاینده‌ها استفاده نمود.

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

## REFERENCE

- Achal, V., Mukherjee, A. Basu, P.C., & Reddy, M. S. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 981-988. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0578-z>.
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press.
- Ali, A., Wu, Z. Z., Li, M., & Su, J. F. (2021). Carbon to nitrogen ratios influence the removal performance of calcium, fluoride, and nitrate by *Acinetobacter* H12 in a quartz sandfilled biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 333, 125154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125154>
- Al-Thawadi, SM. (2008). High strength in situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Ph.D. thesis. Perth Western Australia. Murdoch University. 264.
- Ansari, A., Peña-Bahamonde, J., Fanourakis, S. K., Hu, Y., & Rodrigues, D. F. (2020). Microbially-induced mineral scaling in desalination conditions: Mechanisms and effects of commercial antiscalants. *Water research*, 179, 115863. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115863>.
- APHA, AWWA, WEF. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC.
- Banerjee, A. (2015). Groundwater fluoride contamination: A reappraisal. *Geoscience Frontier*, 6 (2), 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2014.03.003>
- Burt, C. D., Cabrera, M. L., Rothrock Jr, M. J., & Kissel, D. E. (2018). Urea hydrolysis and calcium carbonate precipitation in gypsum-amended broiler litter. *Journal of Environmental Quality*, 47(1), 162-169. <https://doi.org/10.2134/jeq2017.08.0337>.
- Chen, C. L., Park, S. W., Su, J. F., Yu, Y. H., Heo, J. E., Kim, K. D., & Huang, C. (2019). The adsorption characteristics of fluoride on commercial activated carbon treated with quaternary ammonium salts (Quats). *Science of the Total Environment*, 693, 133605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133605>.
- Deng, L., Liu, Y., Huang, T., & Sun, T. (2016). Fluoride removal by induced crystallization using fluorapatite/calcite seed crystals. *Chemical Engineering Journal*, 287, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.011>.
- De Muynck, W., De Belie, N., & Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering*, 36(2), 118-136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.02.006>.
- Farhangi, M. B., Ghasemzadeh, Z., Ghorbanzadeh, N., Khalilrad, M., & Unc, A. (2021). Phosphate removal from landfill leachate using ferric iron bioremediation under anaerobic condition. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 23, 1576-1587. <https://doi.org/10.1007/s10163-021-01239-y>
- Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Arvaniti, E. C., Hosseinkhani, B., Ramos, J. A., Rahier, H., & Boon, N. (2014). Formate oxidation-driven calcium carbonate precipitation by *Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4659-4667. <https://doi.org/10.1128/AEM.01349-14>.
- Gogoi, S., Nath, S. K., Bordoloi, S., & Dutta, R. K. (2015). Fluoride removal from groundwater by limestone treatment in presence of phosphoric acid. *Journal of Environmental Management*, 152, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.031>.
- Gowthaman, S., Yamamoto, M., Nakashima, K., Ivanov, V., & Kawasaki, S. (2021). Calcium phosphate

- biocement using bone meal and acid urease: An eco-friendly approach for soil improvement. *Journal of Cleaner Production*, 319, 128782. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128782>.
- He, Y., Zhang, L., An, X., Wan, G., Zhu, W., & Luo, Y. (2019). Enhanced fluoride removal from water by rare earth (La and Ce) modified alumina: Adsorption isotherms, kinetics, thermodynamics and mechanism. *Science of the Total Environment*, 688, 184-198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.175>.
- Huang H, Xiao D, Zhang Q, Ding L (2014) Removal of ammonia from landfill leachate by struvite precipitation with the use of low-cost phosphate and magnesium sources. *Journal of Environmental Management*, 145, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.06.021>.
- Kang, C. H., Han, S. H., Shin, Y., Oh, S. J., & So, J. S. (2014). Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2907-2915. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0737-1>.
- Kang, S., Seo, J. T., Park, S. H., Jung, I. Y., Lee, C. Y., & Park, J. W. (2019). Qualitative analysis on crystal growth of synthetic hydroxyapatite influenced by fluoride concentration. *Archives of Oral Biology*, 104, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.05.022>.
- Khalil, C., Al Hageh, C., Korfali, S., & Khnayer, R. S. (2018). Municipal leachates health risks: Chemical and cytotoxicity assessment from regulated and unregulated municipal dumpsites in Lebanon. *Chemosphere*, 208, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.151>.
- Lacson, C. F. Z., Lu, M. C., & Huang, Y. H. (2021). Fluoride-containing water: A global perspective and a pursuit to sustainable water defluoridation management-An overview. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124236. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124236>.
- Lai, Y., Yu, J., Liu, S., Liu, J., Wang, R., & Dong, B. (2021). Experimental study to improve the mechanical properties of iron tailings sand by using MICP at low pH. *Construction and Building Materials*, 273, 121729. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121729>.
- Lambert, S. E., & Randall, D. G. (2019). Manufacturing bio-bricks using microbial induced calcium carbonate precipitation and human urine. *Water Research*, 160, 158-166. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.069>.
- Leng, Y., & Soares, A. (2021). The mechanisms of struvite biomineralization in municipal wastewater. *Science of the Total Environment*, 799, 149261. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149261>.
- Li, F., Jin, J., Shen, Z., Ji, H., Yang, M., & Yin, Y. (2020). Removal and recovery of phosphate and fluoride from water with reusable mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ mSiO<sub>2</sub>@ mLDH composites as sorbents. *Journal of Hazardous Materials*, 388, 121734. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121734>.
- Liu, J., Su, J., Ali, A., Wang, Z., & Zhang, R. (2022). Potential of a novel facultative anaerobic denitrifying *Cupriavidus* sp. W12 to remove fluoride and calcium through calcium bioprecipitation. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 126976. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126976>.
- Liu, J., Peng, Y., Li, C., Gao, Z., & Chen, S. (2021). A characterization of groundwater fluoride, influencing factors and risk to human health in the southwest plain of Shandong Province, North China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111512. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111512>.
- Luo, H., Cheng, Y., He, D., & Yang, E. H. (2019). Review of leaching behavior of municipal solid waste incineration (MSWI) ash. *Science of the Total Environment*, 668, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.004>.
- Maity, J. P., Hsu, C. M., Lin, T. J., Lee, W. C., Bhattacharya, P., Bundschuh, J., & Chen, C. Y. (2018). Removal of fluoride from water through bacterial-surfactin mediated novel hydroxyapatite nanoparticle and its efficiency assessment: adsorption isotherm, adsorption kinetic and adsorption thermodynamics. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 9, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.11.001>.
- Mojiri, A., Zhou, J. L., Ratnaweera, H., Ohashi, A., Ozaki, N., Kindaichi, T., & Asakura, H. (2021). Treatment of landfill leachate with different techniques: an overview. *Water Reuse*, 11(1), 66-96. <https://doi.org/10.2166/wrd.2020.079>.
- Mukherjee, S., Sahu, P., & Halder, G. (2017). Microbial remediation of fluoride-contaminated water via a novel bacterium *Providencia vermicola* (KX926492). *Journal of Environmental Management*, 204, 413-423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.051>.
- Nath, S. K., & Dutta, R. K. (2010). Enhancement of limestone defluoridation of water by acetic and citric acids in fixed bed reactor. *Clean–Soil, Air, Water*, 38(7), 614-622. <https://doi.org/10.1002/clen.200900209>.
- Naveed, M., Duan, J., Uddin, S., Suleman, M., Hui, Y., & Li, H. (2020). Application of microbially induced calcium carbonate precipitation with urea hydrolysis to improve the mechanical properties of soil. *Ecological Engineering*, 153, 105885. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105885>.



- Peng, D., Qiao, S., Luo, Y., Ma, H., Zhang, L., Hou, S., ... & Xu, H. (2020). Performance of microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Cd in water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123116. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123116>.
- Qian, C., Wang, R., Cheng, L., & Wang, J. (2010). Theory of Microbial Carbonate Precipitation and Its Application in Restoration of Cement-based Materials Defects. *Chinese Journal of Chemistry*, 28(5), 847-857. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201090156>.
- Qin, W., Wang, C. Y., Ma, Y. X., Shen, M. J., Li, J., Jiao, K., Tay, E.R., & Niu, L. N. (2020). Microbe-mediated extracellular and intracellular mineralization: environmental, industrial, and biotechnological applications. *Advanced Materials*, 32(22), 1-39. <https://doi.org/10.1002/adma.201907833>.
- Rahman, Z. (2020). An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. *Journal of Hazardous Materials*, 396, 122682. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122682>.
- Rajasekar, A., Moy, C. K., Wilkinson, S., & Sekar, R. (2021). Microbially induced calcite precipitation performance of multiple landfill indigenous bacteria compared to a commercially available bacteria in porous media. *Plos One*, 16(7), e0254676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254676>.
- Shariatmadari, N., Askari Lasaki, B., Eshghinezhad, H., & Alidoust, P. (2018). Effects of landfill leachate on mechanical behaviour of adjacent soil: a case study of Saravan landfill, Rasht, Iran. *International Journal of Civil Engineering*, 16, 1503-1513. <https://doi.org/10.1007/s40999-018-0311-2>.
- Sposito, G. (2008). *The chemistry of soils*. Oxford university press.
- Sternitzke, V., Kaegi, R., Audinot, J. N., Lewin, E., Hering, J. G., & Johnson, C. A. (2012). Uptake of fluoride from aqueous solution on nano-sized hydroxyapatite: examination of a fluoridated surface layer. *Environmental Science & Technology*, 46(2), 802-809. <https://doi.org/10.1021/es202750t>.
- Su, J. F., Zhang, H., Huang, T. L., Hu, X. F., Chen, C. L., & Liu, J. R. (2019). The performance and mechanism of simultaneous removal of fluoride, calcium, and nitrate by calcium precipitating strain *Acinetobacter* sp. H12. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 109855. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109855>
- Tang, S., Chang, X., Li, M., Ge, T., Niu, S., Wang, D., Jiang, Y.C., & Sun, S. (2021). Fabrication of calcium carbonate coated-stainless steel mesh for efficient oil-water separation via bacterially induced biomineralization technique. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126597>.
- Terzis, D., & Laloui, L. (2019). A decade of progress and turning points in the understanding of bio-improved soils: A review. *Geomechanics for Energy and the Environment*, 19, 100116. <https://doi.org/10.1016/j.gete.2019.03.001>.
- Van Langerak, E. P. A., Hamelers, H. V. M., & Lettinga, G. (1997). Influent calcium removal by crystallization reusing anaerobic effluent alkalinity. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 341-348. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00541-6).
- Wang, Z., Su, J., Ali, A., Zhang, R., Yang, W., Xu, L., & Zhao, T. (2021). Microbially induced calcium precipitation based simultaneous removal of fluoride, nitrate, and calcium by *Pseudomonas* sp. WZ39: Mechanisms and nucleation pathways. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125914. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125914>.
- Wang, Z., Su, J., Ali, A., Zhang, R., Yang, W., Xu, L., Shi, J., & Gao, Z. (2022). Synergistic removal of fluoride from groundwater by seed crystals and bacteria based on microbially induced calcium precipitation. *Science of the Total Environment*, 806, 150341. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150341>.
- Wimalasiri, A. V. K., Fernando, M. S., Williams, G. R., Dissanayake, D. P., de Silva, K. N., & de Silva, R. M. (2021). Microwave assisted accelerated fluoride adsorption by porous nanohydroxyapatite. *Materials Chemistry and Physics*, 257, 123712. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123712>
- Yan, H., Han, Z., Zhao, H., Pan, J., Zhao, Y., Tucker, M. E., Zhou, J.X., Yan, X.Y., Yang, H.Y., & Fan, D. (2020). The bio-precipitation of calcium and magnesium ions by free and immobilized *Lysinibacillus fusiformis* DB1-3 in the wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 252, 119826. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119826>
- Yin, T., Lin, H., Dong, Y., Li, B., He, Y., Liu, C., & Chen, X. (2021). A novel constructed carbonate-mineralized functional bacterial consortium for high-efficiency cadmium biomineralization. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123269. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123269>.
- Zhu, F., Guo, Z., & Hu, X. (2020). Fluoride removal efficiencies and mechanism of schwertmannite from  $\text{KMnO}_4/\text{MnO}_2\text{-Fe(II)}$  processes. *Journal of Hazardous Materials*, 397, 122789. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122789>.

## Phosphate, fluoride and calcium removal from Saravan landfill leachate using calcium carbonate bioprecipitation process

### EXTENDED ABSTRACT

#### Introduction:

Landfill leachates contain hazardous chemicals that enter surface and groundwater resources through runoff and leaching processes and affect their quality. Among the contaminants in landfill leachates, phosphorus (P) and fluoride (F) are known as two critical elements in contamination of aquatic ecosystems. So far, a wide range of technologies, mainly physicochemical methods have been adopted to remove P and F from water resources. However, the use of these methods has been limited due to the high cost, and harmful side products. The presence of multiple contaminants in landfill leachates has also caused acural attention to their simultaneous treatment leading to the adaptation of cost-effective and environmentally friendly technologies. Microbiologically induced calcium carbonate precipitation (MICP) technology has been widely reported as a new method for treating contaminated water resources. However, this technology has just started for landfill leachate treatment and the use of native ureolytic bacteria will increase its efficiency and cost effectiveness.

#### Materials and methods:

An ureolytic bacterium with the ability to precipitate calcium carbonate was isolated firstly from the Saravan landfill leachate (SLL). Then its potential, along with the indicator bacteria *Sporosarcina pasteurii*, in removing phosphate, fluoride and calcium ions from the SLL via calcium carbonate bioprecipitation process (MICCP) was investigated. An incubation experiment in the completely randomized design format with a factorial arrangement was performed with three replications in 2022 at University of Guilan. Factors included ureolytic bacteria in three levels (without bacteria, *S. pasteurii*, and isolated strain), urea in two levels (0 and 2% w/v) and calcium chloride in two levels (0 and 50 mM). Thus, a combination of 36 batch tests (12 treatments with three replications) was tested. Leachate was incubated for 7 days in a shaker-incubator (120 rpm, 30 °C). After that, the formed precipitate in the flasks was separated with filter paper, dried (110 °C), weighed, and then analyzed by XRD and SEM. In the supernatant, the concentration of phosphate, fluoride and calcium ions was measured, and their removal rate was calculated. pH was also measured in the supernatant.

#### Results and discussion:

The highest amount of precipitate ( $2.84 \text{ g L}^{-1}$ ) was formed in the treatment with indicator bacteria in the presence of urea and calcium chloride. Although more precipitate formation was expected in the treatments with calcium chloride, the presence of urea in the treatments with bacteria (indicator and isolated strain) increased the precipitate content compared to the treatments without urea. The highest phosphate removal rate was observed in the treatment without bacteria and urea and in the presence of calcium chloride (93%), which did not show a significant difference with the treatment with indicator bacteria, urea and calcium chloride (92%). Although the highest phosphate removal rate (93%) was observed in the presence of calcium chloride without bacteria and urea, isolated bacteria in the presence of urea and calcium chloride removed 77% and 48% of fluoride, which was 14.4 and 9 times greater than the control treatment, respectively. Calcium removal rate in the treatments with indicator and isolated bacteria was 93% and 90%, respectively. Although the removal rate of phosphate, calcium and fluoride was higher in the presence of the indicator bacteria compared to the isolated strain, their difference was not significant. The results of XRD analysis confirmed the peaks related to calcium carbonate precipitation (dominant precipitate formed in the leachate) with  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ , and  $\text{CaF}_2$ .

#### Conclusions:

Simultaneous removal of phosphate, fluoride and calcium from landfill leachates using bioremediation methods plays an important role in the aquatic ecosystems health. Application of native microorganisms, in addition to reducing costs, creates less environmental concern than indicator bacteria. Thus, it can be used to remove hazardous chemicals from landfill leachates through the MICP process.

**Keywords:** Biomineralization, Nnative Microorganisms, *Sporosarcina Pasteurii*, Urea.