

## بررسی تأثیر فرایندهای متابولیک باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر خواص مکانیکی و جذب آب بتن

امین جعفرنیا

کارشناس ارشد، گروه عمران، دانشکده و پژوهشکده مهندسی و پدافند غیرعامل، دانشگاه جامع امام حسین (ع).

محمد فیاض\*

استادیار، گروه عمران، دانشکده و پژوهشکده مهندسی و پدافند غیرعامل، دانشگاه جامع امام حسین (ع).

میر مرتضی سادات ابراهیمی

استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع).

### چکیده

بتن یکی از پرمصرف‌ترین مصالح ساختمانی در جهان است. محققین زیادی در تلاش هستند که بتوانند ضعف‌های بتن را رفع و هزینه‌های تعمیر و نگهداری آن را کاهش دهند. در سال‌های اخیر روش‌های نوینی برای بهبود خواص مکانیکی و دوامی بتن مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. یکی از این روش‌ها استفاده از نوع خاصی از باکتری‌ها است که بتوانند با عملکرد خود در داخل بتن باعث ترمیم بتن شوند. باکتری‌های خانواده باسیلوس اغلب با تولید کربنات کلسیم قابلیت خود ترمیمی و پوشش ترک‌های ایجاد شده در بتن را دارند. باسیلوس سوبتیلیس باکتری است که در خاک زندگی می‌کند و توانایی تجزیه اوره و کلسیم لاکتات را دارد که منجر به تولید کربنات کلسیم می‌شود. مقایسه این دو متابولیک باکتری باسیلوس سوبتیلیس می‌تواند باعث کاهش هزینه‌های تحقیق شود. همچنین اضافه کردن هر ماده غیر معمول در بتن نباید تأثیر منفی در خواص بتن ایجاد کند. بدین منظور در این تحقیق سعی شده است تأثیر باکتری و همچنین اثر افزودنی‌های مورد نیاز به منظور ارزیابی عملکرد باکتری در ترمیم بتن مورد بررسی قرار گیرد. در این راستا ۶ طرح مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمایش‌های مقاومت نشان داد عملکرد تجزیه کلسیم لاکتات توسط باکتری باسیلوس سوبتیلیس نسبت به تجزیه اوره بهتر بوده و باعث افزایش مقاومت فشاری به میزان ۵۵ درصد و کاهش میزان جذب آب بتن حاوی باکتری و کلسیم لاکتات بیش از ۲۲ درصد نسبت به طرح شاهد می‌گردد. همچنین میزان رسوب کربنات کلسیم در عملکرد تجزیه کلسیم لاکتات بیشتر از عملکرد تجزیه اوره است. ساختار ریز مقیاس نمونه‌های بتنی که توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی برداشت گردید نیز مؤید نتایج به دست آمده است.

واژه‌های کلیدی: باکتری، ترمیم بتن، ترک، ریز مقیاس، مقاومت فشاری، باسیلوس.

## ۱- مقدمه

محققین برای افزایش طول عمر باکتری از روش‌هایی مثل کپسول‌های حاوی باکتری در آب اختلاط استفاده کردند. تا زمانی که باکتری در بتن، در شرایط محیطی غنی از کلسیم وجود داشته باشد، رسوبات کربنات کلسیم در ماتریس بتن شکل گرفته و خواص بتن را بهبود می‌دهد. ونگ و همکاران [۱۴] در طی تحقیقات خود عملکرد رسوب کلسیت باکتری محصور در هیدرو ژل را بررسی کردند. آن‌ها با استفاده از محصور کردن اسپورهای باکتری باسیلوس/سفریکوس<sup>۳</sup> و افزایش طول عمر باکتری در بتن، توانستند خصوصیات از جمله مقاومت فشاری و دوام آن را بهبود بخشند، از جمله مزایای این روش می‌توان به ارتقاء درصد خود ترمیمی در پر کردن ترک‌ها و در کاهش بیشتر نفوذ آب در بتن اشاره کرد. نمونه‌های حاوی اسپورهای کپسوله شده با هیدرو ژل برتری خود را در مقایسه با نمونه‌های کنترلی در خود ترمیمی نشان دادند. به طوری که عرض ترک‌های حدوداً ۰,۵ میلی‌متر را ترمیم کرده است.

از دیگر روش‌های استفاده از ترکیب باکتریایی، تزریق هفتگی باکتری در لوله‌های از قبل تعبیه شده در بتن است. در این روش لوله‌هایی مخصوص، قبل از بتن‌ریزی در قالب‌های تعیین شده جاسازی می‌شوند؛ پس از قالب برداری، لوله‌ها در مکان خود تثبیت شده، سپس در زمان‌های مورد نظر باکتری‌ها در غلظت‌های مطلوب به لوله‌ها تزریق می‌شوند. این فرآیند می‌تواند به دفعات مورد نظر بر روی نمونه‌ها انجام شود. در این روش نیز محیط عمل‌آوری بتن باید حاوی مقادیر کافی کلسیم باشد. نتایج حاصله در این روش نشان می‌دهد میزان رسوب باکتری در مکان‌های مورد انتظار بیشتر بوده و در برخی خواص مکانیکی بتن، مانند مقاومت خمشی نتیجه مطلوب‌تری حاصل می‌گردد [۱۵].

پوشش باکتری یک رویکرد کارآمد برای بتن خود ترمیم مبتنی بر باکتری است تا بتواند ظرفیت تولید مواد معدنی باکتریایی را در طول زمان حفظ کند [۱۶]. به گونه‌ای که استفاده از میکروارگانیسم‌های بی حرکت شده و به اصطلاح به خواب رفته (اسپور) بر روی سیلیکا ژل یا کربن فعال یک راه حل مناسب از لحاظ مالی است. در این روش از باکتری‌های خاصی که مقاومت مناسبی در برابر محیط‌های قلیایی دارند استفاده می‌شود. این

بتن پرکاربردترین مصالح صنعت ساختمان محسوب می‌شود. یافتن راهکارهایی برای بهبود و نگهداری بهتر از آن می‌تواند کمک فراوانی در صرفه‌جویی هزینه‌ها انجام دهد. یک روش نوین در ترمیم و نگهداری بتن، استفاده از باکتری‌ها است. برخی از باکتری‌های خانواده باسیلوس<sup>۱</sup> توانایی تولید کربنات کلسیم را دارا می‌باشند. مجاورت اوره یا کربنات کلسیم و آنزیم‌هایی که باکتری‌ها از خود تولید می‌کنند باعث تولید کربنات کلسیم می‌شوند [۱-۲]. محققین زیادی در سراسر جهان در دو دهه اخیر در تلاش هستند که بتوانند با استفاده از این روش به خود ترمیمی بتن دست یابند و به عنوان یک روش موفق آن را در صنعت به کار بگیرند.

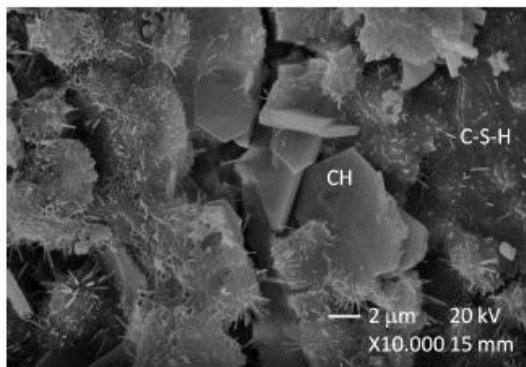
باکتری را می‌توان با ایده‌های مختلفی به بتن اضافه کرد. این ایده‌ها شامل استفاده از باکتری در آب اختلاط بتن [۳]، اصلاح سطحی بتن توسط باکتری [۴-۵]، آغشته سازی سنگ‌دانه‌ها به باکتری [۶-۷]، کپسوله کردن باکتری [۸]، استفاده از باکتری به صورت حالت پایدار و بی حرکت<sup>۲</sup> بر روی سیلیکاژل یا کربن فعال [۹-۱۰] و استفاده از باکتری در لوله‌های تعبیه شده در بتن است [۱۱].

در روش استفاده از باکتری در آب اختلاط بتن غلظت مشخصی از باکتری استفاده می‌گردد و منجر به تولید بتنی با خواص بهبود یافته می‌شود. کاهش جذب آب، افزایش مقاومت فشاری و افزایش مقاومت کششی نمونه‌های حاوی باکتری از جمله خواص مکانیکی است که گزارش شده است [۱۲]. به طور مثال حسینی [۱۳] در طی تحقیقاتی به بررسی اثرات اصلاح باکتریایی در آب اختلاط بتن بر مقاومت فشاری، جذب آب و نفوذپذیری کلرید در بتن سبک پرداخت. نتایج نشان داد که به طور متوسط ۱۰ درصد کاهش جذب آب، ۲۰ درصد افزایش مقاومت فشاری و ۲۰ درصد کاهش جذب کلرید اتفاق افتاده است.

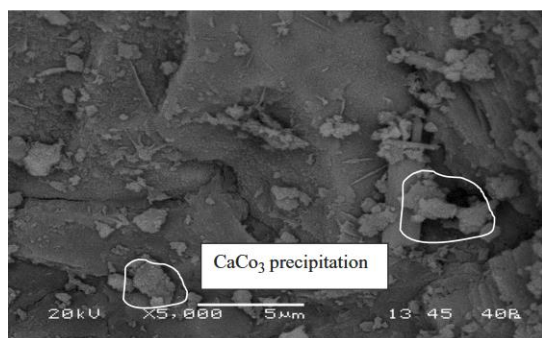
کپسوله کردن میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش پایداری دستگاه‌های میکروبی شده و کاربرد آن‌ها، تحت شرایط حاد محیطی مانند حلال آلی و اسیدی را امکان‌پذیر می‌کند. این فن‌آوری فرآیندی نوآورانه را جهت تثبیت باکتری فراهم می‌آورد که به منظور افزایش عملکرد و پایداری باکتری به کار می‌رود.

<sup>۲</sup> *Bacillus sphaericus*

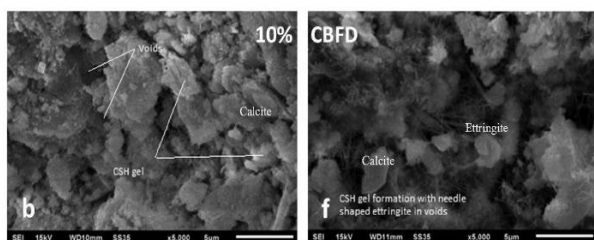
<sup>۱</sup> *Bacillus*  
<sup>۲</sup> *Spores*



شکل ۱- نمونه عکس SEM بتن معمولی توسط تریگو [۲۵]



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی در مطالعه داویس و همکاران بر روی بتن باکتری [۲۶]



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی در مطالعه ناندا و همکاران [۲۷]

در این تحقیق به بررسی عملکرد دو متابولیک باکتری باسیلوس سوبتیلیس برای تولید رسوب کربنات کلسیم پرداخته شده است. ارزیابی تأثیر لاکتات و اوره در دو فرآیند اشاره شده در بالا بر روی نمونه‌های بتن تاکنون مورد توجه محققین نبوده که می‌تواند بهترین عملکرد باکتری را تعیین نماید. به منظور ارزیابی تأثیر متابولیک‌های اشاره شده علاوه بر نتایج مقاومت مکانیکی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیز استفاده شده است.

## ۲- روش تحقیق

### ۲-۱- انتخاب باکتری

باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس می‌توانند در حالت اسپور حدود

باکتری‌ها تا زمان شکل‌گیری ترک در بتن به حالت اسپور می‌مانند و پس از ایجاد ترک شروع به فعالیت کرده و مقدار زیادی کربنات کلسیم، جهت ترمیم ترک‌های موجود در ماتریس بتن می‌کنند. با این حال این روش هنوز برای استفاده در مقیاس بزرگ غیر عملی بوده و هزینه بر است [۱۷].

جانکرز و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که استفاده از اسپورهای باکتریایی که اثرات باکتری بر روی مقاومت بتن قابل توجه نیست کاهش مقاومت کمتر از ۱۰ درصد برای نمونه‌های ۳،۷ و ۲۸ روزه نشان داده شده است. باین حال می‌توان آن را برای تعمیر ترک‌ها و بهبود دوام بتن بسیار مؤثر دانست [۱۸].

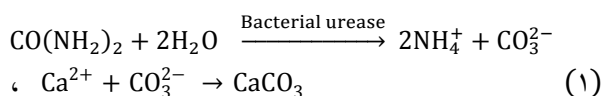
استفاده از باکتری در بتن برای ترمیم و بهبود آن در مجموع به سه روش زیر قابل دسته‌بندی است:

الف- اضافه کردن باکتری به صورت مستقیم در مخلوط بتن.

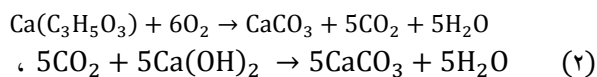
ب- قرار دادن باکتری در پوشش و اضافه کردن آن در مخلوط بتن.

ج- استفاده از محلول باکتری برای ترمیم بتن پس از ایجاد ترک. در این میان، استفاده از باکتری برای خودترمیمی بتن، روشی جدید محسوب می‌شود. لازمه استفاده از باکتری در بتن، در وهله اول بررسی تأثیر باکتری و افزودنی‌های همراه بر خواص بتن است. باکتری باسیلوس سوبتیلیس قادر است با دو عملکرد رسوب کربنات کلسیم را تولید نموده و منجر به ترمیم شود.

رابطه ۱ نحوه تولید کربنات کلسیم به وسیله باکتری باسیلوس سوبتیلیس با تجزیه اوره را نشان می‌دهد.



رابطه ۲ نحوه تولید کربنات کلسیم با فرایند متابولیک تجزیه کلسیم لاکتات را نشان می‌دهد [۲۳].



در بررسی ریز ساختار بتن، تاگو و همکاران مطالعاتی انجام داده‌اند و با کمک تصاویر میکروسکوپی (شکل ۱) به بررسی و تشخیص پیوندهای شیمیایی بتن پرداخته‌اند [۲۵].

داویس و همکاران و همچنین ناندا و همکاران مطالعات جداگانه‌ای بر روی بتن حاوی باکتری انجام داده‌اند و برای بررسی دقیق‌تر از تصاویر میکروسکوپی (شکل‌های ۲ و ۳) استفاده کردند [۲۶ و ۲۷].

۲۰۰ سال عمر داشته باشند ولی در زمان فعالیت حدود ۲-۳ ماه عمر

می کنند [۱۹] این باکتری توانایی فعالیت همزمان تجزیه لاکتات کلسیم و اوره را برای تولید کلسیم لاکتات را دارد [۲۰]. از بین باکتری های موجود باکتری *Bacillus subtilis* به علت موجود بودن در ایران، سازگاری باکتری با محیط بتن و فعالیت همزمان لاکتات کلسیم و اوره انتخاب گردید. به منظور استفاده به عنوان عامل ترمیم کننده بتن، باکتری ها می بایست قادر به تولید مقادیر زیادی کلسیم کربنات در محیط قلیایی بتن و مقاومت در برابر فشار بالا در بتن باشند. برای این منظور، سویه *Bacillus subtilis* *PTCC 1254* مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *Bacillus subtilis* یک باکتری گرم مثبت با توانایی تشکیل اسپور بالا است که می تواند محیط های خشن و ناملایم را تحمل نماید و زنده بماند. اسپورها می توانند فشارهای مکانیکی و شیمیایی بالا و محیط قلیایی را تحمل کنند و این امر آن ها را به عنوان یک انتخاب ایده آل برای استفاده در مخلوط بتن مطرح می کند. باکتری های *Bacillus subtilis* قادرند با دو عملکرد کربنات کلسیم را تولید نمایند [۲۴]. برای بررسی تأثیر هر یک از این مواد طرح مخلوط هایی در نظر گرفته شد که بتوان اثر آن ها را در

خواص بتن مورد بررسی قرار داد.

## ۲-۲- طرح مخلوط

طرح مخلوط بتن مورد استفاده بر اساس ACI-211 به صورت جدول زیر آماده شده است. مقادیر داده شده در جدول برای یک مترمکعب بتن محاسبه شده است. طرح شاهد که در جدول تحت عنوان N بیان شده است؛ بدون هیچ گونه باکتری و افزودنی مطرح شده است. در طرح مخلوط BU باکتری در آب اختلاط بتن با غلظت  $10^8$  cell/ml اضافه می شود. آقای وانگ در مقاله خود اشاره کرده است که میزان حداقلی برای غلظت باکتری cell/ml  $10^7$  است. همچنین بیان می کند که حداکثر مقدار غلظت باید  $10^9$  cell/ml باشد تا بهترین عملکرد باکتری را شاهد باشیم [۲۳]. برای عملکرد باکتری به صورت بی هوازی و تجزیه اوره برای تولید کربنات کلسیم عصاره مخمر، اوره و کلسیم نترات به مخلوط اضافه می شود. طرح مخلوط BL شامل باکتری با غلظت  $10^8$  cell/ml، عصاره مخمر و کلسیم لاکتات است. برای بررسی اثر جداگانه هر کدام از افزودنی ها (باکتری، لاکتات، اوره) نمونه هایی طبق جدول ۱ طرح ریزی شد.

جدول ۱- طرح مخلوط ها

| L       | U       | BL      | BU      | B       | N       |                        |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------------|
| ۱۹۲/۸۱  | ۱۹۲/۸۱  | ۱۹۲/۸۱  | ۱۹۲/۸۱  | ۱۹۲/۸۱  | ۱۹۲/۸۱  | آب (کیلوگرم)           |
| ۳۳۸/۲۶  | ۳۳۸/۲۶  | ۳۳۸/۲۶  | ۳۳۸/۲۶  | ۳۳۸/۲۶  | ۳۳۸/۲۶  | سیمان (کیلوگرم)        |
| ۱۸۴۸/۹۳ | ۱۸۴۸/۹۳ | ۱۸۴۸/۹۳ | ۱۸۴۸/۹۳ | ۱۸۴۸/۹۳ | ۱۸۴۸/۹۳ | سنگدانه (کیلوگرم)      |
| .       | .       | $10^8$  | $10^8$  | $10^8$  | .       | باکتری (Cell/ml)       |
| ۳۳۸     | ۳۳۸     | ۳۳۸     | ۳۳۸     | .       | .       | عصاره مخمر (گرم)       |
| ۳/۳۸    | ۳/۳۸    | .       | ۳/۳۸    | .       | .       | اوره (کیلوگرم)         |
| ۱۰/۱۵   | .       | ۱۰/۱۵   | .       | .       | .       | کلسیم لاکتات (کیلوگرم) |
| .       | ۳/۳۸    | .       | ۳/۳۸    | .       | .       | کلسیم نترات (کیلوگرم)  |

## ۳-۲- کشت باکتری

Broth (حاوی ۰/۵ گرم پیتون و ۰/۳ گرم عصاره گوشت) در یک لیتر آب مقطر کشت می شوند. سپس، ۰/۰۱ گرم  $MnSO_4$  H<sub>2</sub>O به محیط کشت اضافه می شود تا میزان اسپور زایی را افزایش دهد و pH برابر ۷ تنظیم می شود [۹]. محیط مایع ساخته شده با اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد

به منظور استفاده از باکتری ها به عنوان یک عامل ترمیم کننده بتن، باکتری ها باید قادر به تولید مقادیر زیادی کربنات کلسیم در محیط قلیایی بتن و مقاومت در برابر فشار بالا در بتن باشند. با توجه به گزارش های ارائه شده، باکتری ها در محیط مایع Nutrient



شکل ۴- کشت و تولید باکتری مورد نیاز. الف: کشت باکتری در فرماتور. ب: سانتریفیوژ کردن محلول باکتری. ج: محلول باکتری پس از کشت و سانتریفیوژ



شکل ۵- الف: دانه بندی سنگ دانه ها. ب: آزمایش تمیزی ماسه

### ۳- نتایج تحقیق

با توجه به فرآیند زمانی هیدراتاسیون، نمونه های مکعبی در سنین ۷، ۲۸ و ۹۰ روزه تحت بارگذاری فشاری قرار گرفتند. نتایج مقاومت فشاری که شامل متوسط گیری از نتایج سه نمونه متوالی برای هر طرح است در جدول ۲ ارائه شده است.

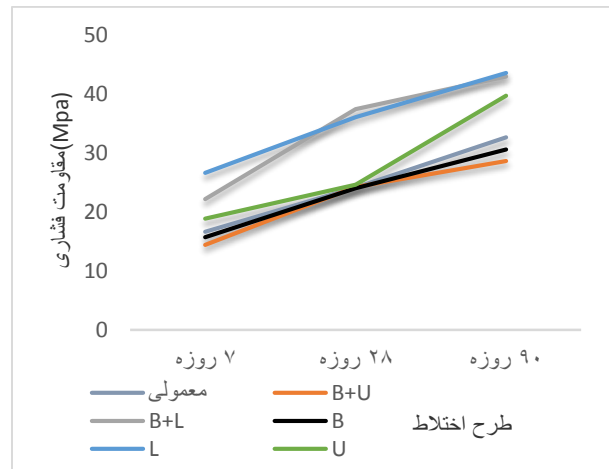
مطابق جدول ۲ و شکل ۶، روند افزایش مقاومت متناسب با افزایش درجه هیدراتاسیون در تمامی طرح ها دارای الگوی مشابهی است. تغییرات رخ داده در مقاومت های ۷ روزه نیز با الگوی ۹۰ روزه تطابق داشته و در این سن بیشترین افزایش مقاومت مربوط به BL و L به میزان ۳۳٪ و ۶۰٪ و کمترین افزایش نیز مربوط به U به میزان ۱۳٪ است. در بلند مدت، به جز طرح های BU و B که دارای اندکی افت مقاومت هستند، سایر نمونه ها دارای مقاومت بیشتری نسبت به نمونه شاهد می باشند به نحوی که BL و L با اختلاف بیش از ۳۰٪ دارای بیشترین افزایش بوده و پس از آن طرح U دارای افزایش مقاومت ۲۱٪ بوده است. این روند در ۲۸ روزه بخصوص در BU تغییر نموده و این طرح نیز مشابه سایر طرح ها به غیر از طرح B دارای مقاومت بیشتری نسبت به نمونه شاهد است. مقدار افزایش مقاومت در این سن دارای حداکثر خود بوده و

استریل گردید. پس از تلقیح، کشت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. به منظور اطمینان از عدم آلودگی و صحت کار، لام باکتری تهیه و بارنگ آمیزی گرم مشاهده گردید. برای کشت باکتری در حجم بالا از دستگاه فرماتور استفاده می گردد. ابتدا محیط کشت مایع Nutrient Broth با حجم ۵ لیتر ساخته و در محفظه فرماتور قرار گرفت. سپس محیط کشت و ظرف فرماتور جهت ایجاد شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پوند اتوکلاو شدند. مقدار ۶۰ میلی لیتر از باکتری تازه رشد داده شده به محیط کشت فرماتور تزریق شد. شرایط رشد در فرماتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و همزن ۱۵۰ دور در دقیقه تنظیم شد. پس از انجام انکوباسیون، به منظور تولید اسپور محیط کشت به سردخانه به مدت ۴۸ ساعت منتقل گردید. از محیط کشت باکتری رنگ آمیزی گرم و جذب نوری انجام شد. جهت تعیین غلظت باکتری، جذب نوری با طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و منحنی و معادله غلظت سلول های باکتریایی محاسبه گردید. سپس ۵ لیتر محیط کشت حاوی اسپور سانتریفیوژ (به مدت ۷ دقیقه ۵۰۰۰ دور در دقیقه) و رسوب آن در ۵۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به حالت محلول درآمد. پس از کشت باکتری سویه *Bacillus subtilis* PTCC 1254 نمونه ای از آن روی لام، رنگ آمیزی گرم شد و باسیل های بنفش رنگ در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. رنگ آمیزی گرم این نمونه پس از زمان سردخانه گذاری، اسپور های باکتری را نشان دادند. پس از کشت باکتری، جذب نوری با طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر تولید بیشتر باکتری، از دستگاه فرماتور مطابق شکل ۴- الف استفاده شد. پس از کشت باکتری در فرماتور، محلول باکتری در سانتریفیوژ قرار گرفت (شکل ۴- ب). پس از سانتریفیوژ کردن باکتری و محیط کشت، باکتری های جدا شده جمع آوری شدند (شکل ۴- ج).

پس از تهیه مصالح به مقدار مورد نیاز آزمایش های مربوط به دانه بندی (شکل ۵- الف)، جذب آب، تمیزی ماسه (شکل ۵- ب)، چگالی سنگ دانه ها انجام شد. شن تهیه شده مقدار زیادی خاک و ماسه داشت که برای رفع این مسئله، شن شست و شو داده شده و از الک نمره ۴ استفاده شد.

به سایر موارد، به منظور بررسی ریز ساختار بتن در این طرح‌ها، تصویر برداری ESEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی محیطی) و SEM (میکروسکوپ الکترونی روبشی) در خصوص طرح‌های BL و L انجام گرفت. برای دقت بیشتر و اطمینان از نتایج از میکروسکوپ ESEM استفاده شده است. با میکروسکوپ الکترونی محیطی روبشی، عموماً ویژگی‌های اساسی SEM نظیر قدرت تفکیک، عمق تمرکز، تنوع سیگنالها و پردازش سیگنالها را حفظ کرده است. همچنین در ESEM مشاهده دینامیک سیستم گاز-مایع-جامد در میکروسکوپ الکترونی محیطی امکانپذیر است.

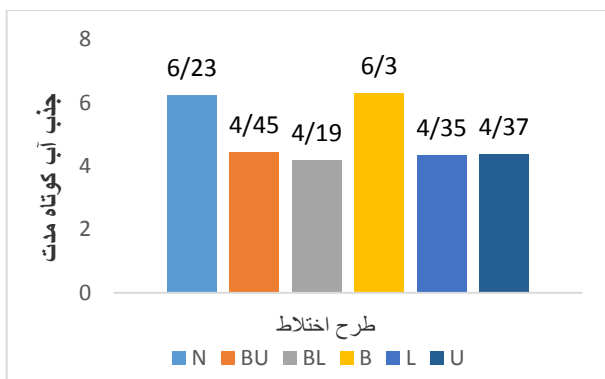
بیشترین مقدار افزایش مربوط به طرح BL به میزان ۵۵٪ و طرح L به میزان ۵۰٪ است.



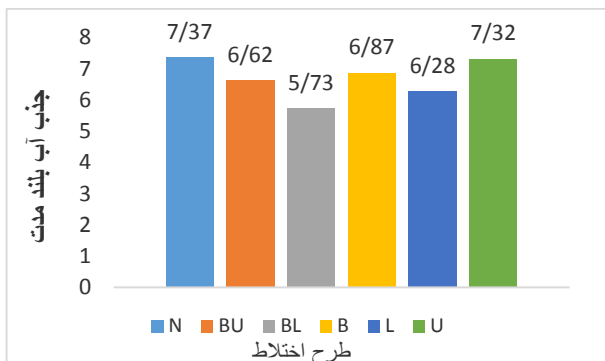
شکل ۶- روند تغییرات مقاومت فشاری

جدول ۲- میانگین مقاومت مکعبی (Mpa)

| طرح اختلاط | روزه ۷ | روزه ۲۸ | روزه ۹۰ |
|------------|--------|---------|---------|
| N          | ۱۶/۶۷  | ۲۴/۱۵   | ۳۲/۶۹   |
| BU         | ۱۴/۴۴  | ۲۴/۲۹   | ۲۸/۶۹   |
| BL         | ۲۲/۲۳  | ۳۷/۴۹   | ۴۳/۷    |
| B          | ۱۵/۷۳  | ۲۴/۰۴   | ۳۰/۶۲   |
| L          | ۲۶/۶۷  | ۳۶/۱۳   | ۴۳/۶۵   |
| U          | ۱۸/۸۸  | ۲۴/۶۴   | ۳۹/۸    |



شکل ۷- میزان جذب آب کوتاه مدت

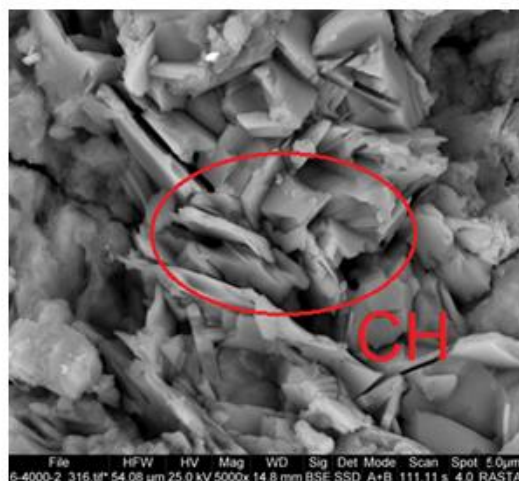
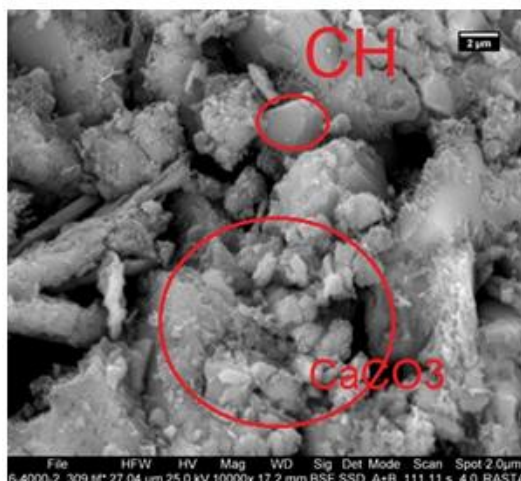


شکل ۸- میزان جذب آب بلندمدت

شکل ۹- الف نمونه عکس SEM طرح L در ابعاد ۵ میکرون مشاهده می‌شود. در این نمونه که از لاکتات استفاده و از بکارگیری باکتری اجتناب شده است، حضور انبوه بلورهای هیدروکسید کلسیم قابل رویت است. در شکل ۹-ب نیز نمونه‌ای از تصاویر SEM برداشت شده در ابعاد ۲ میکرون از طرح BL مشاهده می‌شود. در این شکل نیز حضور متراکم بلورهای هیدروکسید کلسیم و کربنات کلسیم در کنار سایر بلورهای متداول بتن قابل رویت است. این بلورها در شکل ۱۰ نیز که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی محیطی برداشت شده قابل مشاهده است.

با توجه به ارتباط مستقیم مقاومت و نفوذپذیری و به منظور ارزیابی تأثیر کاهش تخلخل بر افزایش مقاومت، آزمون جذب آب کوتاه مدت و بلندمدت مطابق استاندارد ASTM C642 انجام گردید. روش انجام این آزمون بدین صورت است که پس از ساخت و عمل آوری نمونه‌ها در سن ۲۸ روزگی، نمونه از آب خارج گردیده، وزن کشی می‌شود. سپس نمونه درون خشک کن با دمای ۱۰۵ درجه به مدت یک و ۲۴ ساعت قرار گرفته و از دستگاه خارج و مجدداً توزین می‌گردد. نتایج متوسط گیری میزان جذب آب در شکل‌های ۷ و ۸ ارائه شده است. طرح BL کمترین میزان جذب آب کوتاه و بلندمدت را دارا است، پس از آن به ترتیب طرح‌های L، BU، B، U و N است. به عبارتی میزان جذب آب و تخلخل تمامی نمونه‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته است لکن طرح‌های حاوی لاکتات دارای حداقل جذب آب بوده‌اند. با توجه به بهبود خصوصیات مکانیکی طرح‌های حاوی لاکتات نسبت





الف  
ب  
شکل ۹- عکس SEM، مربوط به طرح الف (L و ب) BL

محسوب می‌شود [۲۱-۲۲]. این باکتری قلیا دوست نیز است و در خاک به فراوانی یافت می‌شود. از اینرو می‌تواند به عنوان یک افزودنی مناسب برای بتن مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۳- ترکیبات یافت شده در EDX در طرح BL

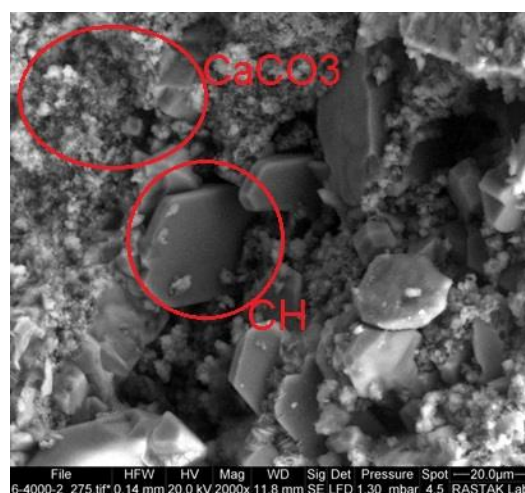
| Element | Weight % | Atomic % | Net Int. |
|---------|----------|----------|----------|
| C K     | 3.86     | 7.05     | 23.43    |
| O K     | 44.89    | 61.59    | 255.46   |
| MgK     | 1.96     | 1.77     | 47.28    |
| AlK     | 3.01     | 2.45     | 97.29    |
| SiK     | 8.78     | 6.86     | 357.03   |
| S K     | 0.56     | 0.38     | 24.44    |
| CaK     | 34.78    | 19.05    | 1233.53  |
| FeK     | 2.16     | 0.85     | 41.08    |

جدول ۴- ترکیبات یافت شده در EDX در طرح L

| Element | Weight % | Atomic % | Net Int. |
|---------|----------|----------|----------|
| C K     | 6.05     | 10.8     | 44.45    |
| O K     | 43.64    | 58.44    | 341.44   |
| MgK     | 1.81     | 1.59     | 59.71    |
| AlK     | 2.67     | 2.12     | 118.21   |
| SiK     | 12.18    | 9.29     | 674.46   |
| S K     | 0.63     | 0.42     | 35.39    |
| CaK     | 30.92    | 16.53    | 1441.36  |
| FeK     | 2.09     | 0.8      | 53.06    |

این باکتری صرفنظر از خواص بهبود عملکرد، کارآیی بتن را نیز از طریق افزایش روانی ارتقاء می‌دهد. در طرح‌های BL، L، BU و U در هنگام اختلاط شاهد افزایش روانی و اسلامپ از ۷۵ میلی‌متر برای نمونه شاهد به حدود ۱۷۰ میلی‌متر بودیم.

در آزمایش‌های مکانیکی ۷ روزه بتن طرح BL و L افزایش مقاومت فشاری به میزان چشم‌گیری را نسبت به طرح بتن معمولی (N) را نشان



شکل ۱۰- عکس ESEM طرح BL

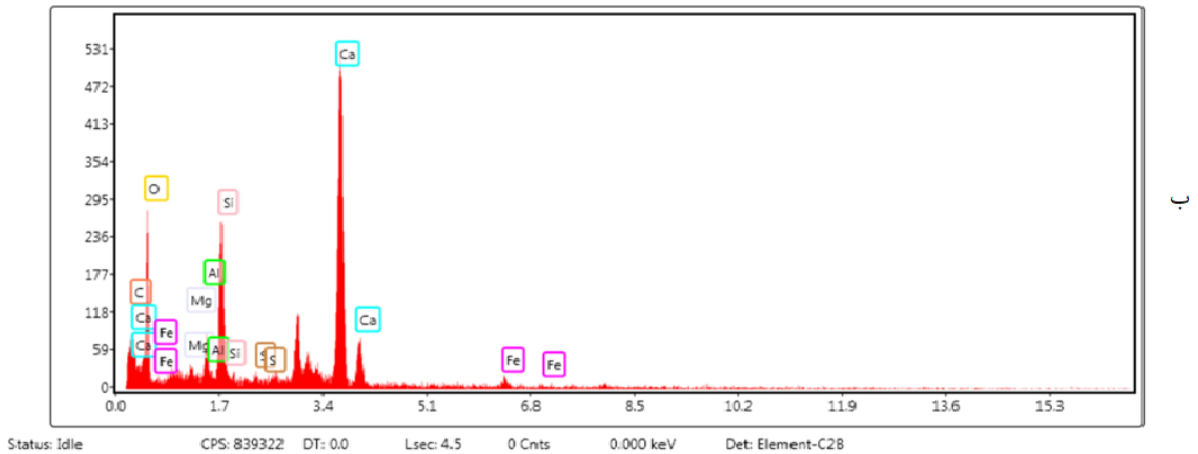
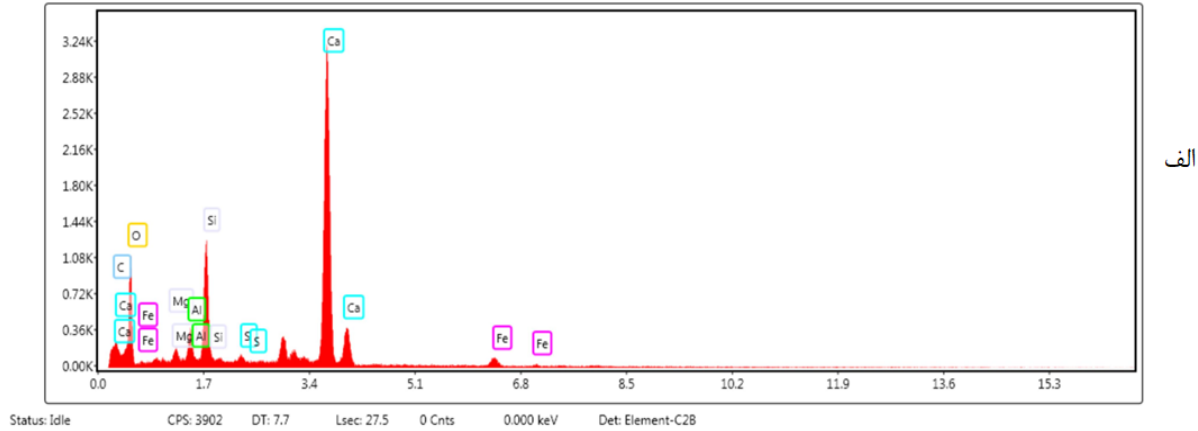
شکل ۱۱ آزمایش EDX روی طرح BL و L را نشان می‌دهد. آنالیز EDAX توانایی‌های منحصر به فردی در مقایسه با دیگر روش‌های تعیین عنصری مانند XRF و ICP دارد. این روش می‌تواند عناصر سبکی همانند اکسیژن، کلسیم و کربن را تشخیص دهد. در نتیجه امتیاز بزرگی برای تخمین این عناصر در نمونه‌های بتنی را دارد. نمودار EDX طرح BL (شکل ۱۱-الف) میزان بیشتری از وجود Ca را نسبت به طرح L (شکل ۱۱-ب) نشان می‌دهد (بیش از ۶ برابر) که این امر نشان دهنده فعالیت باکتری در بتن طرح BL است. فعالیتهای باکتری نهایتاً منجر به تولید کربنات کلسیم بیشتری شده است.

#### ۴- تحلیل نتایج

باکتری باسیلوس سوبتیلیس باکتری بی‌خطری برای سلامت انسان

کششی نیز قابل مشاهده بود. طرح BL افزایشی به میزان ۲۶٪ و طرح L افزایشی ۲۳٪ از خود نشان داد که می‌تواند مربوط به قلیایی بودن محیط در سنین اولیه بوده که باکتری را در حالت اسپور حفظ می‌نماید.

می‌دهند. این روند افزایشی در مقاومت فشاری ۲۸ روزه طرح‌ها نیز ادامه داشت؛ به نحوی که طرح BL افزایشی ۵۵٪ نسبت به بتن معمولی و طرح L افزایشی حدود ۵۰٪ داشت. این بهبود مقاومت در مقاومت



شکل ۱۱- نمودار EDX طرح الف (BL) و ب (L)

مدت (شکل ۷) می‌توان ملاحظه نمود حضور باکتری، اوره و لاکتات منجر به کاهش نفوذپذیری در تمامی طرح‌ها شده است لکن این کاهش نفوذپذیری بر خلاف آنچه پاورز با رابطه ۳ بیان نمود الزاما رابطه مستقیمی با افزایش مقاومت ندارد [۲۷]. به عنوان مثال مطابق شکل ۹ باکتری تا حدودی تخلخل را کاهش داده است ولی مقاومت ۹۰ روزه طرح BL حتی دچار افت هم شده است.

$$S = S_0 e^{-kp} \quad (۳)$$

که در آن S مقاومت ماده دارای تخلخل،  $S_0$  مقاومت ذاتی ماده در حالت تخلخل صفر و k مقدار ثابتی است. رفتار اشاره شده در بالا بیشتر به خصوصیات مواد جامد تولید شده در ریزساختار بتن بر می‌گردد. حضور کربنات کلسیم‌ها اگرچه ساختار بتن را متراکم تر می‌نماید لکن این ترکیبات دارای مقاومت

طرح‌های BU، B و U مقاومت مکانیکی نزدیکی به طرح بتن معمولی داشتند و از این رو می‌توان نتیجه گرفت که افزودنی در این طرح‌ها تأثیری در بهبود مقاومت مکانیکی بتن ندارند.

در جذب آب کوتاه مدت، همه طرح‌ها به جز طرح B، کاهش را نشان دادند که از بین آن‌ها طرح BL کمتر بود. در جذب آب بلندمدت نیز کمترین میزان جذب آب نسبت به بقیه طرح‌ها متعلق به BL است و در مجموع تمام نمونه‌ها دارای کاهش جذب نسبت به نمونه شاهد هستند. این رفتار مربوط به تولید مواد جامد هیدروکسید کلسیم و کربنات کلسیم در ریز ساختار بتن می‌شود. به عبارت دیگر حضور انبوه این بلورهای جامد از یکسو مقاومت را افزایش و از سوی دیگر تخلخل و جذب آب بتن را کاهش می‌دهد. با مقایسه نتایج مربوط به مقاومت (شکل ۶) و جذب آب کوتاه



کربن فعال، پرلیت، متاکائولین می‌وانند بدین منظور استفاده شوند [۲۳].

### ۵- نتیجه گیری

نتایج آزمایشهای مقاومت و جذب آب نشان داد اضافه نمودن باکتری به همراه مواد مغزی و لاکتات کلسیم سبب بهبود خواص مکانیکی و دوام می‌شود. اضافه کردن این باکتری به تنهایی در بتن یا به همراه اوره تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقاومت فشاری و نفوذپذیری بتن نداشت. با مقایسه تصاویر میکروسکوپی با مطالعات ریزساختار سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت عامل اصلی بهبود عملکرد بتن، افزایش تراکم بلورهای منشوری شکل هیدروکسید کلسیم و بلورهای کربنات کلسیم است که حفرات مویینه موجود در بتن را ترمیم نموده‌اند.

با مقایسه طرح‌های مطالعه شده می‌توان نتیجه گرفت کلسیم لاکتات نیز به تنهایی سبب افزایش مقاومت و کارایی به میزان چشم‌گیری می‌شود. از اینرو این ماده می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی مناسب جهت افزایش مقاومت و اسلامپ بتن مورد استفاده قرار گیرد.

باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* می‌توانند در حالت اسپور حدود ۲۰۰ سال عمر داشته باشند ولی در زمان فعالیت حدود ۲-۳ ماه عمر می‌کنند. در صورتیکه از باکتری‌ها به عنوان خودترمیمی بتن استفاده می‌شود می‌بایست آن‌ها را در پوشش‌هایی محافظت نمود. در بین انواع روش‌های محافظت، استفاده از سنگدانه‌های متخلخل از نظر تأثیر بر خواص بتن و هم به لحاظ اقتصادی بهتر می‌باشند. سنگدانه‌های متاکائولینی به علت فراوانی و همچنین تأثیر مثبت بر خواص بتن (مقاومت فشاری و جذب آب) گزینه مناسبی می‌تواند باشد.

### ۶- مراجع

- [1] Ahmad, S. H. and S. P. Shah. "Structural properties of high strength concrete and its implications for precast prestressed concrete." *PCI Journal* 30(6): 92-119. (1985)
- [2] Dhama, N. K., et al. "Improvement in strength properties of ash bricks by bacterial calcite." *Ecological Engineering* 39: 31-35. (2012).
- [3] Jagannathan, P., et al. "Studies on the mechanical properties of bacterial concrete with two bacterial species." *Materials Today: Proceedings*

کمتری نسبت به هیدروکسید کلسیم‌هایی است که در حضور لاکتات وجود می‌آیند. از اینرو مقاومت طرح BL نیز نسبت به B بیشتر است.

در طرح BL میزان مقاومت فشاری ۲۸ روزه نسبت به L بیشتر است و با توجه میزان جذب آب آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که باکتری در طول این مدت فعالیت خود را انجام داده است. مقاومت ۹۰ روزه میزان یکسانی از مقاومت را نشان می‌دهد که علت این امر می‌تواند ناشی از عدم فعالیت باکتری‌ها و از بین رفتن آن‌ها در طول مدت پس از یک یا دو ماه باشد.

به منظور بررسی دقیقتر منشاء پدیده‌ها و مقایسه طرح‌های BL و L که از نظر مقاومتی و جذب آب نسبت به بقیه طرح‌ها بهتر بودند، از آزمون SEM و ESEM استفاده شده است. عکس‌های نمونه-ی BL تراکم لایه‌های بتن را نسبت به L نشان می‌دهد و می‌توان نتیجه گرفت که باکتری فعالیت خود را انجام داده است. با مقایسه تصاویر مربوط به طرح BL و L (شکل ۱۱) با نتایج مطالعه تریگو بر روی نمونه بتن‌های معمولی، افزایش تراکم بلورهای منشوری شکل CH مشخص است [۲۵]. تشکیل این بلورها به دلیل مقاومت مناسب نسبت به دیگر ساختارهای تشکیل شده در بتن نظیر اترینگات از یکسو و پر نمودن ریز حفرات مویینه از سوی دیگر موجب بهبود عملکرد دو طرح BL و L نسبت به سایر طرح‌ها شده است.

در مطالعات محدودی که بر ویژگی ترمیمی باکتری متمرکز شده‌اند نظیر مطالعه داویس و همکاران و ناندا و همکاران، حضور بلورهای  $CaCO_3$  بر روی لایه‌های CH قابل رویت است. نتایج این تحقیق نیز همانگونه که در شکل ۹ و ۱۰ نشان داده شد تشکیل این بلورها را تایید می‌نماید. با توجه به افزایش تراکم این بلورها در طرح BL نسبت به نتایج مطالعات اشاره شده می‌توان علت اصلی را تشدید فرایندهای متابولیک در حضور لاکتات دانست. حضور این دسته از ترکیبات نیز با توجه به ویژگی پرکنندگی، منجر به بهبود عملکرد نمونه‌ها در آزمایش‌های مقاومت و جذب آب شده‌اند.

برای حفاظت از باکتری و نگهداری از آن‌ها در مرحله ترمیم نیاز است که آن‌ها در محفظه‌ای قرار گیرند. یکی از روش‌های محافظت، قرار دادن در داخل سنگدانه یا مواد معدنی یا هیدرو ژل‌ها است. سنگدانه‌های متخلخل یا جاذب آب نظیر زئولیت،

- encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete." *Construction and Building Materials* 68: 110-119. (2014).
- [17] Zhang, J., et al. "Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete." *Construction and Building Materials* 148: 610-617. . (2017).
- [18] Jonkers, H. M., et al. "Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete." *Ecological Engineering* 36(2): 230-235. (2010).
- [19] Christiansen, G. "General microbiology, seventh edition: by Hans G. Schlegel, Cambridge University Press; Cambridge, 1993; xvii + 655 pages. \$34.95 (pbk). \$100.00 (hb)." *FEBS Letters* 356(2): 372. (1994).
- [20] De Belie, N., et al. 19 - Bacteria-based concrete. *Eco-Efficient Repair and Rehabilitation of Concrete Infrastructures*. F. Pacheco-Torgal, R. E. Melchers, X. Shi et al., Woodhead Publishing: 531-567. . (2018).
- [21] Schlangen, E. and S. Sangadji . "Addressing infrastructure durability and sustainability by self healing mechanisms-Recent advances in self healing concrete and asphalt." *Procedia Engineering* 54: 39-57. (2013).
- [22] *Bacillus subtilis (ATCC®19659™) CDC/NIH Guidelines . "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 4th Edition, (1999).*
- [23] De Belie, N., Wang, J., Bundur, Z. B., & Paine, K. Bacteria-based concrete. In *Eco-efficient repair and rehabilitation of concrete infrastructures* (pp. 531-567). Woodhead Publishing. . (2018)
- [24] Schlegel, H. G., & Zaborosch, C.. *General microbiology*. Cambridge university press. (1993).
- [25] Trigo, A. P. M., & Liborio, J. B. L. Doping technique in the interfacial transition zone between paste and lateritic aggregate for the production of structural concretes. *Materials Research*, 17(1), 16-22. (2014).
- [26] Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar, P., & Jha, S. Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7(1), 22-38. (2016)
- [27] Siddique, R., Nanda, V., Kadri, E. H., Khan, M. I., Singh, M., & Rajor, A. Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. *Construction and Building Materials*, 106, 461-469. (2016).
- [28] Mehta, P. K., & Monteiro, P. J. *Concrete: microstructure, properties, and materials*. McGraw-Hill Education. (2014).
- 5(2, Part 3): 8875-8879. (2018).
- [4] Kalhori, H. and R. Bagherpour. "Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete." *Construction and Building Materials* 148: 249-260. (2017).
- [5] De Muynck, W., et al. "Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials." *Cement and concrete research* 38(7): 1005-1014. (2008).
- [6] Zhang, J., et al. "Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete." *Construction and Building Materials* 148: 610-61. . (2017)
- [7] Xu, Jing, et al. "Self-healing of concrete cracks by ceramsite-loaded microorganisms." *Advances in Materials Science and Engineering*. (2018).
- [8] Van Tittelboom, Kim, Willem De Muynck, Nele De Belie, et al. "Bacteria Protect and Heal Concrete and Stone. " *Wta Schriftenreihe*. Ed. Luc Schueremans. Vol. 33. Munich, Germany: International Association for Science and Technology of Building Maintenance and the Preservation of Monuments (WTA). 439–457. Print. . (2009)
- [9] Erşan, Y. Ç., et al. "Screening of bacteria and concrete compatible protection materials." *Construction and Building Materials* 88: 196-203. (2015).
- [10] Khaliq, W. and M. B. Ehsan . "Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques." *Construction and Building Materials* 102: 349-357. (2016).
- [11] Sangadji, S. and E. Schlangen . "Mimicking Bone Healing Process to Self Repair Concrete Structure Novel Approach Using Porous Network Concrete." *Procedia Engineering* 54: 315-326. (2013).
- [12] Mondal, S., et al. "Application of Bacteria in Concrete." *Materials Today: Proceedings* 4(9): 9833-9836. (2017).
- [13] Balam, N. H., et al. "Effects of bacterial remediation on compressive strength, water absorption, and chloride permeability of lightweight aggregate concrete." *Construction and Building Materials* 145: 107-116. (2017).
- [14] Wang, J., et al. "Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores." *Cement and concrete research* 56: 139-152. (2014).
- [15] Badihi, M. " Investigation of the Effect of Bacteria on Improved Permeability and Mechanical Properties of Polypropylene Fiber Reinforced Concrete." [dissertation]. Isfahan University of Technology, Isfahan. In Persian. .(2016)
- [16] Wang, J. Y., et al. "Application of hydrogel

## The effect of metabolic processes of *Bacillus subtilis* on mechanical properties and water absorption of concrete

Amin Jafarniya

Master of Science, Faculty of Engineering and Passive Defense, Imam Hossein University.

Mohammad Fayyaz \*

Assistant Professor, Faculty of Engineering and Passive Defense, Imam Hossein University.

Mir Morteza Sadat Ebrahimi

Assistant Professor, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University.

### Abstract

Concrete is one of the most widely used building materials in the world. Many researchers are working to overcome the weaknesses of concrete and reduce maintenance costs. In recent years, new methods for improving the mechanical and durability properties of concrete have been studied and researched. One of these methods is the use of a special type of bacteria that can repair the concrete with their performance inside the concrete. For this purpose, *Bacillus subtilis* PTCC 1254 strain was used. Adding any unusual material to the concrete should not adversely affect the properties of the concrete. For this purpose, in this study, an attempt has been made to investigate the effect of the bacteria as well as the effect of the necessary substances for bacterial function to repair concrete. To investigate these effects, 6 mixing designs were investigated. The control design, which is expressed in the text as N; has been proposed without any bacteria or additives. In the mixing design called BU, bacteria are added to the concrete mix water with a concentration of  $10^8$  cell/ml. Also for bacteria anaerobic function and urea decomposition for produce calcium carbonate, Yeast extract, urea, and calcium nitrate are added to the mixture. The mixing designs, called BL, contains bacteria with a concentration of  $10^8$  cell/ml, yeast extract and calcium lactate. In other mixing design, the bacterial effect alone (B), the lactate effect (L) and the urea effect without the presence of the bacterium (U) are investigated. To investigate the effectiveness of these materials, 28 and 90-day compressive strength tests, as well as concrete water absorption, were taken. The results of this study showed that the bacterium did not harm the properties of concrete. Also, the bacteria with calcium lactate improved the mechanical properties and permeability of concrete.

**Keywords:** Concrete, bacteria, self-healing, cracking, compressive strength, bacillus.

---

\* Corresponding Author: m.fayyaz@modares.ac.ir

