Evaluating the Potential of Alkalophilic Bacteria to Enhance Concrete Durability

Javad Hamedi *
Professor, Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, jhamedi@ut.ac.ir
Sedighe Koochakzade
M.Sc, Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, koochakzade@ut.ac.ir
Mohamad Saleh Labafzade
Assistant Professor, Research center of Passive defense, Imam Hussein Comprehensive University Tehran, Iran, labaf@sharif.edu
Hamid Moghimi
Assistant Professor, Microbial Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Nowadays, concrete has been widely used as one of the best and most practical building materials in various types of structures. Concrete permeability is a factor that reduces its stability and decreases the service life of concrete structures. This study has been conducted with the aim of finding bacteria able to repair concrete surface in order to reduce its permeability.

Materials and Methods: Isolated bacteria from alkaline soils of north and center of Iran were subjected to primary and secondary screening for producing urease enzyme and calcium carbonate precipitation. Selected isolates were cultured in specific broth medium for calcium carbonate precipitation. Then, the rate of their growth and calcium carbonate production were compared. Produced calcium carbonate, by the premier isolate, was verified using XRD. The ability of this isolate was evaluated in the repair of the concrete surface porosity and the reduction of its permeability by Scanning Electron Microscopy (SEM).

Results: The results of primary and secondary screening showed that *Bacillus* sp. UTMC 2623 produces the highest amount of calcium carbonate precipitation (8.8 g/L) in three days. Its XRD analysis confirmed the presence of crystalline calcium carbonate in dried bacterial precipitate. SEM analysis showed that this bacterium creates the best coating on the concrete surface along with the calcium source.

Discussion and conclusion: The present study is a report on the repairing activity of *Bacillus* sp. UTMC 2623 which can be used to find other native and promising microorganisms in concrete surface repair.

Key words: Urease, Calcium Carbonate, Surface Repair, Permeability, Concrete Stability, *Bacillus*

* Corresponding author
Received: April 15, 2018 / **Accepted:** July 24, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۸۱- ۶۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۲

ارزیابی توان باکتری‌های قلیادوست در بهبود پایایی بتن

جواد حامدی*: استاد، بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir
صدیقه کوچک‌زاده: کارشناس ارشد، بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، koochakzade@ut.ac.ir
محمدصالح لباف‌زاده: استادیار، دانشکده و پژوهشکدهٔ پدافند غیرعامل، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران، labaf@sharif.edu
حمید مقیمی: استادیار، بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: بتن، یکی از بهترین و کاربردی‌ترین مصالح ساختمانی در انواع سازه‌ها، امروزه استفادهٔ فراگیری یافته است. نفوذپذیری بتن عاملی است که پایایی بتن را کاهش می‌دهد و از عمر مفید سازهٔ بتنی می‌کاهد. هدف پژوهش حاضر، یافتن باکتری‌هایی با توانمندی ترمیم سطح بتن به‌منظور کاهش نفوذپذیری آن است.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های جداشده از خاک‌های قلیایی شمال و مرکز ایران ازنظر توان تولید آنزیم اوره‌آز و رسوب کلسیم‌کربنات غربال‌گری اولیه و ثانویه شدند. جدایه‌های منتخب در محیط مایع مخصوص تولید رسوب کلسیم‌کربنات کشت شدند و میزان رشد و تولید محصول آنها با یکدیگر مقایسه شد. کلسیم‌کربنات تولیدی جدایهٔ برتر با مشخصه‌یابی XRD تأیید شد. توانمندی جدایهٔ برتر در ترمیم خلل‌وفرج سطحی بتن و کاهش نفوذپذیری آن با میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شد.

نتایج: پس‌از انجام غربال‌گری اولیه و ثانویه مشخص شد جدایهٔ *Bacillus* sp. UTMC 2623 بیشترین مقدار رسوب کلسیم‌کربنات (۸/۵ گرم‌درلیتر در مدت سه) را تولید می‌کند. مشخصه‌یابی XRD این جدایه وجود بلور کلسیم‌کربنات را در رسوب خشک‌شدهٔ باکتری تأیید کرد. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دادند باکتری در کنار منبع کلسیمی بهترین پوشش را بر سطح بتن ایجاد می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر گزارشی از عملکرد ترمیمی باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 است که در یافتن سایر ریزموجودات بومی ترمیم‌کنندهٔ سطح بتن استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اوره‌آز، کلسیم‌کربنات، ترمیم سطحی، نفوذپذیری، پایایی بتن، *باسیلوس*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بتن، یکی از کاربردی‌ترین مصالح ساختمانی، مخلوط ناهمگنی متشکل از سیمان، سنگدانه‌های درشت و ریز و آب است (۱). بتن استفاده‌شده در هر سازهٔ بتنی باید علاوه‌بر تأمین مقاومت مدنظر، پایایی (دوام) خود را در رویارویی با شرایط محیطی مختلف هنگام بهره‌برداری حفظ کند. نفوذپذیری بتن مهم‌ترین عاملی است که دوام بتن را کاهش می‌دهد و از میزان تخلخل و ارتباط بین منافذ داخل ساختار بتن تأثیر می‌پذیرد (۲). وجود ترک عامل دیگر مؤثر بر افزایش نفوذپذیری است (۳). چنانچه بتن دوام کمی داشته باشد برای حفظ قابلیت بهره‌برداری سازهٔ بتنی در مدت زمان عمر مفید آن باید هزینه‌های بسیار زیادی برای تعمیر و نگهداری آن صرف شود؛ این امر درحال‌حاضر بودجهٔ درخور توجهی از کشورها را به خود اختصاص می‌دهد و ازاین‌رو، مسئلهٔ دوام بتن اهمیت بسزایی در اقتصاد جهانی دارد (۲).

درحال‌حاضر، از پوشش‌های متنوع شیمیایی برای ترمیم و یا حفاظت سطح بتن استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر به‌علت قیمت زیاد، انبساط حرارتی متفاوت با بتن و ایجاد آلودگی زیست‌محیطی در روش‌های غیرزیستی به روش‌های ترمیم زیستی سطح بتن و مصالح ساختمانی به‌ویژه روش‌های میکروبی به‌عنوان عوامل تجدیدپذیر و سازگار با طبیعت بسیار توجه شده است (۴).

ترمیم زیستی به دو شکل سطحی (هنگام بهره‌برداری از سازه) یا عمقی (هنگام ساخت) برای افزایش دوام سازه استفاده می‌شود (۱). ماده‌ای که خلل‌وفرج بتن را پر می‌کند باید دارای بیشترین سازگاری با ساختار بتن باشد و ازاین‌رو باید بتواند اسیدیتهٔ زیاد بتن (حدود ۱۳ تا ۱۴) را تحمل کند (۵). در حالت ترمیم سطحی، باکتری به روش پاشیده‌شدن و یا غرقاب نمونهٔ بتن در ظرف حاوی باکتری در سطح بتن نفوذ می‌کند. هرچه عمق نفوذ باکتری بیشتر باشد تأثیرگذاری عملکرد کلسیم‌کربنات تولیدشده نیز بهتر خواهد بود. عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی ازجمله ساختار خلل‌وفرج بتن، میزان چسبندگی باکتری به شبکهٔ معدنی بتن و نسبت اندازهٔ باکتری به اندازهٔ خلل‌وفرج بر میزان نفوذ باکتری در سطح بتن تأثیر می‌گذارند. از سویی، باکتری‌هایی هیدرولیز اوره را انجام می‌دهند که داخل خلل‌وفرج هستند و به دیواره نچسبیده‌اند. این باکتری‌ها در محیط ترسیب با اتصال به یون‌های کلسیم موجود به‌شکل لخته درمی‌آیند و لخته‌شدن باکتری‌ها به ماندن آنها درون خلل‌وفرج کمک می‌کند. هرچه اندازهٔ خلل‌وفرج نسبت به باکتری بزرگ‌تر باشد باکتری‌های بیشتری در آن حضور دارند؛ بنابراین کلسیم‌کربنات بیشتری تولید می‌شود و تأثیر آن بر دوام بتن بیشتر خواهد شد (۶).

ترمیم زیستی از چندین مسیر فتوتروفیک و هتروتروفیک انجام می‌شود. مسیرهای هتروتروفیک در مقایسه با انواع اتوتروفیک و غیرزیستی رسوب بیشتری تولید می‌کنند و شامل تجزیهٔ اوره، آمونیفیکاسیون آمینواسیدها، تنفس، اکسیداسیون متان، احیای سولفات و احیای نیترات هستند (۷). مسیر اوره‌آز از پرکاربردترین مسیرها است که در آن به ترمیم سطحی و عمقی بتن و مصالح ساختمانی دیگر بسیار توجه شده است. در این مسیر، آنزیم اوره‌آز درون باکتری هتروتروف یک مول اوره را به دو مول یون آمونیوم و دو مول یون هیدروکسید تبدیل می‌کند و اسیدیته را افزایش می‌دهد. کلسیم که در محیط به حالت اشباع است به دیوارهٔ

باکتری دارای بار منفی جذب می‌شود و کربنات‌کلسیم تولید می‌کند. اگر باکتری تولیدکنندهٔ کلسیم‌کربنات در بتن قرار گرفته باشد با تولید کلسیم‌کربنات و بسته‌شدن منافذ مانند لایه‌ای روی بتن عمل می‌کند. رابطهٔ نهایی واکنش به‌شکل رابطهٔ ۱ است (۸):

$$CO(NH_2)_2+2H_2O\rightarrow 2NH_4^{+}+CO_3^{2-}$$ رابطهٔ ۱

مزایای این مسیر شامل سرعت زیاد و تک‌آنزیمی‌بودن (۸)، فراگیربودن آنزیم و پیش‌ساز آن و نیازهای کم تغذیه‌ای (۵) و در نتیجه صرفهٔ اقتصادی، کنترل‌پذیربودن و درخور توجه بودن مقدار رسوب تولیدشده طی این مسیر است (۸).

ترمیم زیستی در موارد متعددی بررسی شده است و *باسیلوس*ها بیشترین کاربری را در میان باکتری‌های بررسی‌شده داشته‌اند. حفاظت از سنگ‌آهک با استفاده از باکتری‌های تولیدکنندهٔ کلسیم‌کربنات (۹)، ترمیم سنگ‌های بناهای تاریخی با استفاده از گونه‌هایی از *میکروکوکوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* (۱۰) و شبکهٔ آلی ماکرومولکول‌های گرفته‌شده از *میتیلوس کالیفرنیانوس*[1] (۱۱)، بررسی تأثیر باکتری *باسیلوس پاستوری* در ترمیم ترک‌های بتن (۱۲) و ساخت سیمان زیستی (۱۳)، کاربرد باکتری *میکسوکوکوس زانتوس* در حفاظت و ترمیم سنگ‌های تزیینی (۱۴)، بررسی تأثیر باکتری *باسیلوس اسفریکوس* بر دوام و ترمیم ترک‌ها در بتن (۱۵ و ۱۶)، استفاده از گونهٔ *باسیوس CT-5* و گونه‌هایی از *شیوانلا* برای افزایش مقاومت فشاری ملات سیمان (۲ و ۱۷) نمونه‌هایی از پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه در کشورهای مختلف هستند. همچنین پژوهش‌هایی در زمینهٔ نقش ترمیم زیستی باکتری‌ها در بهبود دوام بتن در ایران انجام شده‌اند که به برخی از آنها اشاره می‌شود:

وهابی و همکاران در سال ۱۳۹۱ به بررسی تأثیر حضور باکتری جداسازی‌شده از خاک قلیایی در مخلوط ملات ماسه سیمان بر افزایش مقاومت فشاری نمونه‌های ملات پرداختند (۱۸). وهابی در پژوهش دیگری اثر ترمیمی باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس AK01* را در کاهش نفوذپذیری سطح بتن نشان داد (۱۹). نصوحیان در سال ۱۳۹۲ از باکتری تولیدکنندهٔ اوره‌آز و کلسیم‌کلراید در ساخت نمونه‌های بتنی برای افزایش مقاومت فشاری و کاهش جذب آب نمونه‌های بتنی بهره گرفت (۲۰). سرگزی و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی اثر استفاده از مخلوط اوره، کلسیم‌کلراید و باکتری با درصدهای مختلف در آب اختلاط به‌منظور یافتن بیشترین مقاومت فشاری و کمترین جذب آب پرداختند (۲۱). همچنین پژوهش دیگری نشان داد کاربرد باکتری در آب اختلاط بتن با پرکردن منافذ بتن باعث زیادشدن مقاومت الکتریکی و کاهش خوردگی میلگرد و در نتیجه افزایش دوام بتن می‌شود (۲۲).

پژوهش‌های انجام‌شده امیدبخش‌بودن کاربرد باکتری را در بهبود ویژگی‌های مربوط به دوام بتن نشان می‌دهند. اگرچه بیشتر یافته‌ها بر ترمیم عمقی بتن تمرکز دارند که برای ساخت بتن بادوام بسیار مناسب است به افزایش دوام سازه‌های موجود کمکی نمی‌کنند. باتوجه‌به اهمیت بتن و هزینهٔ درخور توجه تخریب و ساخت دوبارهٔ سازه‌های درحال بهره‌برداری از یک سو و کمبود مطالعه‌های انجام‌شده در زمینهٔ ارزیابی توان ریزموجودات بومی کشور ازنظر ترمیم بتن از سوی دیگر، پژوهش حاضر با هدف یافتن ریزموجودات بومی ترمیم‌کنندهٔ بتن به بررسی ریزموجودات قلیادوست جداشده از خاک‌های برخی مناطق قلیایی شمال و مرکز ایران و ارزیابی توانمندی جدایه‌های منتخب در ترمیم و بهبود سطحی بتن پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قلیادوست و نمک‌قلیادوست: به‌منظور دستیابی به جدایه‌های باکتریایی قلیادوست و نمک‌قلیادوست، نمونه‌برداری از برخی مناطق قلیایی کشور انجام و اسیدیتهٔ هریک از خاک‌ها سنجیده شد. اسیدیتهٔ زیاد بتن علت جداسازی باکتری‌های قلیادوست و دستیابی احتمالی به جدایه‌های بیشتر علت جداسازی باکتری‌های نمک‌قلیادوست بود. چهار نمونه خاک با اسیدیتهٔ قلیایی‌تر از میان خاک‌های جمع‌آوری‌شده و نیز تمام خاک‌های موجود در مجموعهٔ ریزموجودات دانشگاه تهران انتخاب شدند. برای جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها از محیط جامد هوریکوشی[۲] استفاده شد. ترکیبات این محیط در جدول ۱ آمده است. برای جداسازی باکتری‌های نمک‌قلیادوست، ۴ درصد نمک سدیم‌کلراید به محیط یادشده افزوده شد. اسیدیتهٔ محیط بر اساس دستور ساخت محیط بین ۹ و ۱۰ تنظیم شد و سوسپانسیون هریک از خاک‌ها با رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} در پلیت‌های جداسازی کشت شد. پلیت‌ها به‌مدت حداکثر دو روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. جدایه‌ها پس‌از خالص‌سازی برای آزمایش‌های غربال‌گری اولیه و ثانویه استفاده شدند (۲۳).

جدول ۱- ترکیبات محیط‌کشت هوریکوشی (۲۴)

ردیف	ماده	مقدار (گرم‌برلیتر)
۱	گلوکز	۱۰
۲	پپتون	۵
۳	عصاره مخمر	۵
۴	آگار	۱۵
۵	KH_2PO_4	۱
۶	$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲
۷	Na_2CO_3	۱۰

بررسی تولید آنزیم اوره‌آز و کلسیم‌کربنات: در مرحلهٔ غربال‌گری اولیه، وجودداشتن یا نداشتن آنزیم اوره‌آز در جدایه‌های آزمایش‌شده بررسی شد. هیدرولیز یک مول اوره توسط باکتری دارای اوره‌آز دو مولکول آمونیاک و یک مولکول دی‌اکسیدکربن تولید می‌کند (رابطهٔ ۲):

رابطهٔ ۲ $H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2+H_2O\rightarrow 2NH_3+CO_2$

آمونیاک تولیدشده اسیدیته را افزایش می‌دهد و باعث تغییر رنگ معرف از بیرنگ به بنفش می‌شود که تولید اوره‌آز توسط باکتری را نشان می‌دهد (۲۵)؛ هرچه رنگ بنفش تولیدشده بیشتر باشد اوره بیشتری هیدرولیز شده است.

جدایه‌های خالص‌شده در محیط مایع کریستنسن (جدول ۲) در لوله و در مقایسه با شاهدهای منفی، مثبت، بدون اوره و بدون باکتری کشت و به‌مدت شش روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. از مقایسهٔ چشمی نمونه‌ها با شاهدها تغییر رنگ محیط‌کشت و میزان آن به‌طورکیفی بررسی شد (۲۵).

جدول ۲- ترکیبات محیط‌کشت کریستنسن برای آزمون تولید آنزیم اوره‌آز (۲۵)

ردیف	ماده	مقدار (گرم‌برلیتر)
۱	پپتون	۱
۲	گلوکز	۱
۳	اوره	۲۰
۴	فنل رد	۰/۰۱۲
۵	KH_2PO_4	۲

جدایه‌های منتخب به‌منظور بررسی تولید کلسیم‌کربنات روی محیط جامد ترسیب کلسیم‌کربنات کشت و در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. رشد جدایه‌ها هر پنج روز یک بار بررسی شد.

ترکیبات محیط یادشده در جدول ۳ آمده است. حضور بلورهای کلسیم‌کربنات در حاشیهٔ کلنی جدایه‌ها زیر میکروسکوپ استریو با بزرگنمایی ۱۰× بررسی شد (۲۶).

جدول ۳- ترکیبات سازندهٔ محیط ترسیب کلسیم‌کربنات (۲۶)

ردیف	مقدار (گرم‌برلیتر)	ماده
۱	۲۰	اوره
۲	۱۷	آگار
۳	۲/۱۲	$NaHCO_3$
۴	۱۰	NH_4Cl
۵	۳	Nutrient Broth
۶	۴/۴۱	$CaCl_2.2H_2O$

سنجش تولید کلسیم‌کربنات به‌وسیلهٔ تیتراسیون برگشتی: جدایه‌های منتخب مرحلهٔ پیش به‌منظور سنجش دقیق‌تر توانمندی تولید رسوب کلسیم‌کربنات در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع ترسیب (جدول ۳) کشت و در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و روی شیکر با ۱۵۰ دوردردقیقه گرماگذاری شدند (۲۷). پس‌از ۴۸ ساعت، مایع درون هر فلاسک به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و ۴۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و زیست‌تودهٔ حاصل در کوره با دمای ۱۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد تا خشک شود و به وزن ثابت برسد. مقدار کلسیم‌کربنات موجود در رسوب به روش تیتراسیون برگشتی اندازه‌گیری شد. تیتراسیون برگشتی برای تعیین حضور و مقدار رسوبات نامحلول در آب یک نمونه به کار می‌رود. در این روش، ابتدا رسوب کلسیم‌کربنات در اسید حل و سپس باقیماندهٔ اسید با سدیم‌هیدروکسید تیتر می‌شود و مقدار مول و جرم کلسیم‌کربنات موجود در رسوب با محاسبهٔ مقدار سدیم‌هیدروکسید تیترکننده و بر اساس دو واکنش زیر تعیین می‌شود (رابطه‌های ۳ و ۴)(۲۷).

رابطهٔ ۳ $n(\text{اسید})=n(\text{اسید کل})-n(\text{اسید تیترشده})$ (مصرف‌شده)

رابطهٔ ۴ $CaCO_3(s)+2HCl\rightarrow CaCl_2(aq)+CO_2(g)+H_2O(l)$

انتخاب سویهٔ برتر بر اساس زمان رشد: ازآنجاکه تولید کلسیم‌کربنات بخشی از متابولیسم باکتری در نظر گرفته می‌شود هرچه رشد باکتری بیشتر باشد تولید محصول بیشتر می‌شود. سه جدایهٔ منتخب در محیط مایع تولید کلسیم‌کربنات (جدول ۳ بجز آگار) در فلاسک ۱ لیتری کشت شدند و یک فلاسک شاهد برای هر فلاسک نمونه‌برداری در نظر گرفته شد. میزان رشد جدایه‌های منتخب به‌مدت سه روز در فواصل زمانی ۱۲ساعته بررسی شد. در هر بار نمونه‌برداری، ۵۰ میلی‌لیتر نمونه برداشته و جذب نوری (OD^3) و اسیدیتهٔ آن اندازه‌گیری و ثبت شد. نمودار OD بر حسب زمان برای هر جدایه رسم و زمان رسیدن به OD بیشینه تعیین شد. شدت ویژهٔ رشد برای هریک از باکتری‌ها بر اساس رابطهٔ ۵ محاسبه شد. OD_t و OD_0 جذب‌های خوانده‌شده در زمان رشد بیشینه (t که برای سه باکتری متفاوت است) و t_0 در فاز لگاریتمی رشد باکتری هستند.

رابطهٔ ۵ $OD_t = OD_{t0}\ e^{\mu t}$

انتخاب سویهٔ برتر بر اساس تولید بیشینه محصول: غلظت مناسب پیش‌سازهای کلسیم‌کربنات عامل دیگر مؤثر بر افزایش تولید محصول است. سه غلظت مساوی از کلسیم‌کلراید و اوره با مقادیر ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار برای مطالعه انتخاب شدند (۲۸). سه جدایهٔ ۱۴۷، ۱۱۰ و

۱۶۷ در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط پیش‌کشت (جدول ۴) به فلاسک‌های ۱ لیتری تلقیح و پس‌از سه روز گرماگذاری برای نمونهٔ ۱۴۷ و سه روز و نیم گرماگذاری برای نمونه‌های ۱۱۰ و ۱۶۷ به محیط‌کشت اصلی تلقیح شدند.

جدول ۴- ترکیبات سازندهٔ محیط پیش‌کشت (۲۶)

ردیف	مقدار (گرم‌برلیتر)	ماده
۳	۲/۱۲	$NaHCO_3$
۴	۱۰	NH_4Cl
۵	۳	Nutrient Broth

نمونه‌برداری برای بررسی میزان رسوب تولیدشده به روش تیتراسیون برگشتی در فواصل زمانی ۲ تا ۱۱ روز برای سه جدایه انجام شد. نمودار میزان تولید در برابر زمان برای هر باکتری در سه غلظت استفاده‌شده رسم شد. شدت ویژهٔ تولید بر اساس رابطهٔ ۶ برای هر جدایه محاسبه شد که در آن μ شدت ویژهٔ رشد و $\bar{x}$ میانگین زیست‌توده تولیدشده است.

رابطهٔ ۶ $$r_x = \mu\bar{x}$$

بازدهٔ تولید کلسیم‌کربنات توسط باکتری از رابطهٔ ۷ محاسبه‌شد که در آن، مقدار کلسیم‌کربنات تولیدی بر حسب گرم‌درلیتر طی زمان تولید محصول (برای هر باکتری با دیگری متفاوت است) و مقدار زیست‌توده باکتری بر حسب گرم‌درلیتر در همین زمان است.

رابطهٔ ۷ $$\text{بازدهٔ تولید} = \frac{\text{مقدار تولید}}{\text{مقدار زیست‌توده}} \times 100$$

مشخصه‌یابی پراش پرتوی ایکس (XRD)[۴] به‌منظور تأیید تولید کلسیم‌کربنات به‌وسیلهٔ جدایهٔ برتر: از محیط‌کشت تولید کلسیم‌کربنات حاوی جدایهٔ برتر با سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه رسوب‌گیری شد و رسوب حاصل در فور با دمای ۱۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شد (۲۷). سپس، نمونه به‌منظور تأیید ساختار بلوری کلسیم‌کربنات و ترکیب شیمیایی آن مشخصه‌یابی XRD شد. طیف پرتوهای پراش‌یافته با استفاده از دستگاه اکسپرت-پرو[۵] و آند مسی (۴۰ کیلوولت، ۴۰ میلی‌آمپر) جذب و در زاویهٔ دو تتا برابر با ۲۰ تا ۶۹/۹ درجه اسکن شد.

ترمیم سطحی نمونهٔ تیمارشده با باکتری: نمونه‌های بتنی با ابعاد ۵×۵×۵ سانتی‌متری با طرح اختلاط ۳۰۰ کیلوگرم سیمان، ۱۸۰ لیتر آب و ۶۴۰ کیلوگرم ریزدانهٔ ماسه‌ای (نسبت آب به سیمان برابر با ۰/۶) ساخته و به‌مدت ۲۸ روز در آب خوراکی تیمار شدند. بتن ۹۰روزه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شد. سه گروه بررسی ترمیم شامل ۱) باکتری، محیط‌کشت و کلسیم‌کلراید، ۲) باکتری و محیط‌کشت و ۳) باکتری و کلسیم‌کلراید برای مقایسه در نظر گرفته شدند. به‌منظور ایجاد ترمیم سطحی، کشت یک‌روزهٔ جدایهٔ برتر در محیط جامد هوریکوشی و دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد تهیه شد. پیش‌کشت سالم از کشت یک‌روزه تهیه و در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۰۰ دوردردقیقه گرماگذاری شد. پس‌از ۷۲ ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر پیش‌کشت به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع اصلی موجود در فلاسک ۱ لیتری تلقیح شد. ترکیبات محیط مدنظر از تغییر مقدار برخی ترکیبات به‌کاررفته در جدول ۳ به دست آمد: مقدار اورهٔ استفاده‌شده بر اساس سه غلظت بررسی‌شدهٔ ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار به‌ترتیب به مقادیر ۱۲، ۲۴ و ۳۶ گرم‌درلیتر تغییر یافت و کلسیم‌کلراید و آگار از آن حذف شدند. سه تکرار برای هر سه گروه در نظر گرفته شد. محیط‌کشت‌ها

پس‌از دو روز گرماگذاری در ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به ظروف شیشه‌ای یکسان منتقل شدند و در شرایط استریل، نمونه‌های بتنی در آنها غرقاب و به‌مدت ۴۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس نمونه‌ها از محیط‌کشت خارج و با حوله خشک شدند و به‌مدت سه روز به‌منظور ترسیب در محلول کلسیم‌کلراید ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار گرماگذاری شدند (۲۹).

بررسی ترمیم سطحی نمونه‌های بتنی تیمارشده با میکروسکوپ الکترونی روبشی[۶]: نمونه‌های مکعبی تیمارشده در ابعاد ۰/۵×۰/۵سانتی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر بریده شدند و پس‌از صاف‌کردن سطح، یک نمونه از هر تکرار با طلا پوشانده شد و نمونه‌های آماده روی پایهٔ مناسب نصب شدند. پس‌از رسیدن دستگاه به خلأ، تصویر سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی سرن[۷] A1S2100 با بزرگنمایی‌های ۵۰× و ۴۰۰۰× مشاهده و ثبت شد.

شناسایی مولکولی جدایهٔ منتخب: جدایهٔ برتر در محیط BHIمایع کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. ۳ تا ۵ میلی‌لیتر از محیط‌کشت ۲۴ساعته به ویال استریل منتقل و زیست‌تودهٔ حاوی باکتری با چرخش به‌مدت ۱ دقیقه در میکروفیوژ با شتاب ۱۸۵۱۶g از محیط‌کشت جدا و DNA آن به‌وسیلهٔ کیت استخراج خارج شد. تکثیر ژن *16S rRNA* جدایهٔ برتر ۱۶۷ با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید با استفاده از آغازگرهای 9F و 1541R (9F: 5’- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3’ و 1541R: 5’- AGG AGG TGA TCC ACC CGC A -3’) و آنزیم امپلیکون مستر میکس[۸] انجام شد. واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۲۸ چرخهٔ تکثیر شامل واسرشتی ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال ۵۵ ثانیه‌ای آغازگر در دمای ۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد، سنتز ۷۵ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و باقی‌ماندن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل فرایند سنتز انجام شد. محصول نهایی پس‌از خالص‌سازی روی ژل آگارز برای تعیین توالی استفاده شد. به‌منظور توالی‌یابی، باند مدنظر به کمک کیت از ژل استخراج شد و به شرکت ماکروژن- کرهٔ جنوبی ارسال شد. تعیین توالی براساس روش تغییریافتهٔ سنگر انجام و نتایج آن در پایگاه اطلاعاتی EZtaxon و مرکز بین‌المللی اطلاعات زیست‌فناوری[۹] (NCBI) با روش هم‌ردیفی ارزیابی شد.

نتایج

از کشت و خالص‌سازی چهار نمونه خاک قلیایی برگزیده روی پلیت ۱۴۲ جدایهٔ خالص به دست آمد.

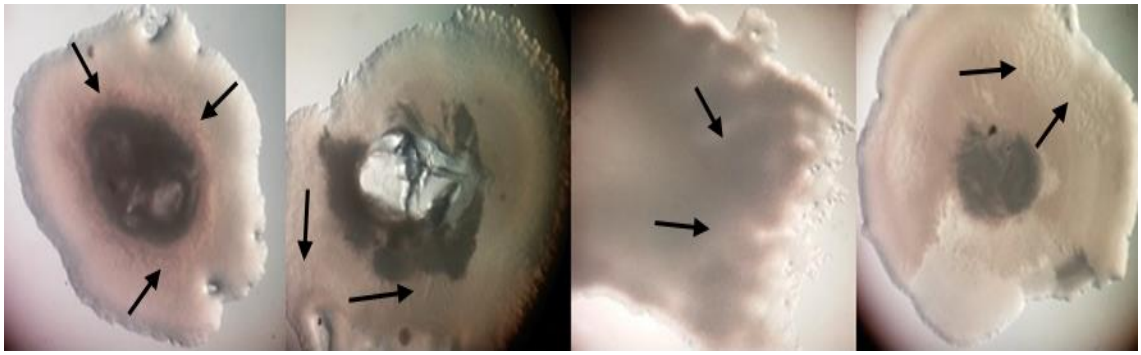
غربال‌گری جدایه‌ها بر اساس توانمندی تولید آنزیم اوره‌آز: از ۱۴۲ جدایهٔ بررسی‌شده، ۱۸ جدایه انتخاب شدند که بیشترین رشد و هیدرولیز اوره را در کمترین زمان از آغاز آزمون داشتند. بررسی هیدرولیز اوره در محیط کریستنسن تنها تا ۴۸ ساعت معتبر بود زیرا پس‌از این مدت، پپتون موجود در محیط تجزیه می‌شد و با محصولات قلیایی خود پاسخ مثبت کاذب ایجاد می‌کرد. ۱۸ جدایهٔ منتخب ازنظر واکنش گرم، مثبت و دارای رشد زیاد بودند (جدول ۵). جدایه‌ها بر اساس نوع رنگ تولیدشدهٔ یاسی و بنفش که به‌طور کیفی نشان‌دهندهٔ میزان هیدرولیز اوره است به‌ترتیب به ++ و +++ تقسیم‌بندی شدند.

جدول ۵- نتایج هیدرولیز اوره و ویژگی‌های میکروسکوپی ۱۸ جدایه پس‌از ۴۸ ساعت

ریخت‌شناسی سویه	تولیدشدن یا نشدن اسپور	میزان آنزیم تولیدشده	شمارهٔ جدایه	ریخت‌شناسی سویه	تولیدشدن یا نشدن اسپور	میزان آنزیم تولیدشده	شمارهٔ جدایه
میله‌ای	+	+++	۱۶۷	میله‌ای	-	++	۱۴۰
میله‌ای	+	++	۴۳	میله‌ای	+	+++	۴۶
میله‌ای	+	++	۱۱۰	میله‌ای	+	+++	۱۸۹
میله‌ای	-	+++	۱۹	میله‌ای	+	+++	۳۴
میله‌ای کوتاه	+	++	۳۰	میله‌ای	+	+++	۲۴
میله‌ای	-	++	۱۴۶	میله‌ای	-	++	۱۴۷
میله‌ای	-	++	۸۸	میله‌ای	-	++	۸۵
میله‌ای	-	++	۵۵	میله‌ای	+	++	۱۶۸
میله‌ای	-	++	۱۵۱	میله‌ای	-	++	۶۹

غربال‌گری جدایه‌های منتخب بر اساس توانمندی تولید رسوب کلسیم‌کربنات: نتایج کشت ۱۸ جدایهٔ مولد اوره‌آز روی محیط جامد تولید کلسیم‌کربنات نشان‌دهندهٔ وجود رسوب کربنات‌کلسیم توسط جدایه‌های ۱۱۰، ۱۴۷، ۱۶۷ و ۱۶۸ است (شکل ۱، پیکان‌ها محل بلورهای رسوب کربنات‌کلسیم را در نزدیکی حاشیهٔ کلنی‌ها نشان می‌دهند).

رسوب حاصل از کشت مایع چهار جدایهٔ منتخب در محیط مایع تولید کلسیم‌کربنات پس‌از شرکت در تیتراسیون برگشتی، تشکیل کلسیم‌کربنات را در جدایه‌های ۱۶۷، ۱۴۷ و ۱۱۰ تأیید کرد و نشان داد به ترتیب ۰/۳، ۰/۱و ۰/۸گرم‌برلیتر کلسیم کربنات در مدت دو روز تولید شده است.



شکل ۱- تصاویر ریخت‌شناسی کلنی‌های جدایه‌های ۱۶۷، ۱۴۷، ۱۶۸ و ۱۱۰ در محیط جامد مناسب برای تولید کربنات‌کلسیم به‌ترتیب از چپ به راست

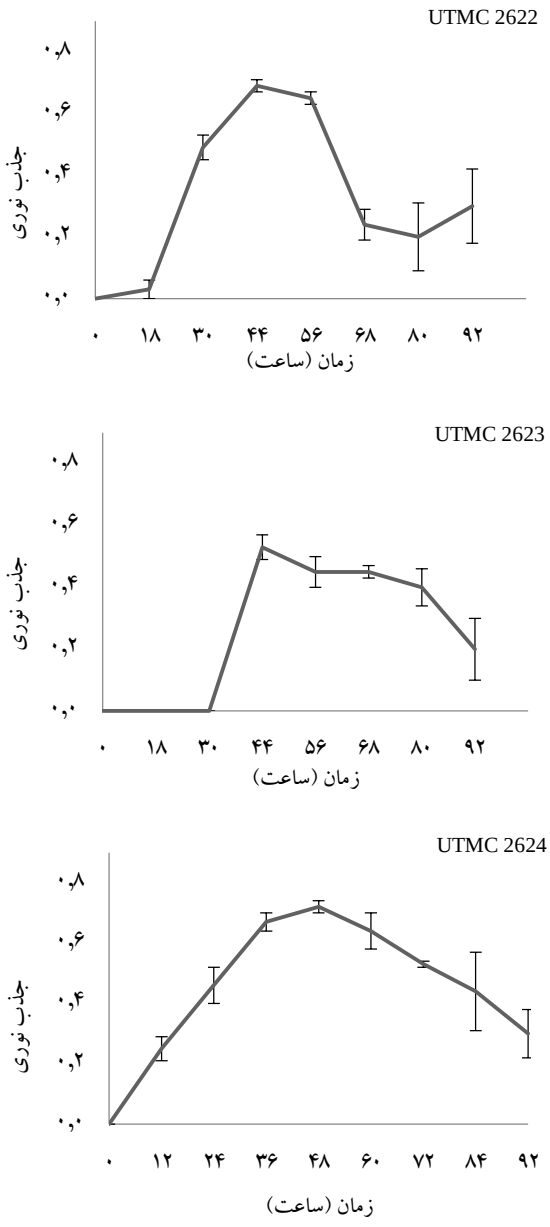
نتایج شناسایی مولکولی و تعیین توالی سه جدایهٔ برتر: نتیجهٔ مقایسهٔ توالی سه سویهٔ برتر با سویه‌های مشابه در بانک‌های ژنی و کد دسترسی ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای سه جدایهٔ مدنظر در جدول ۶ آمده است. از میان سه جدایهٔ منتخب، جدایهٔ ۱۶۷ کمترین درصد شباهت را به سویهٔ مشابه یافت‌شده داشت. جدایه‌های یادشده در مجموعهٔ ریزموجودات دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند.

جدول ۶- نتایج آزمون شناسایی مولکولی ژن *16S rRNA* برای سه جدایهٔ منتخب ۱۴۷، ۱۶۷ و ۱۱۰

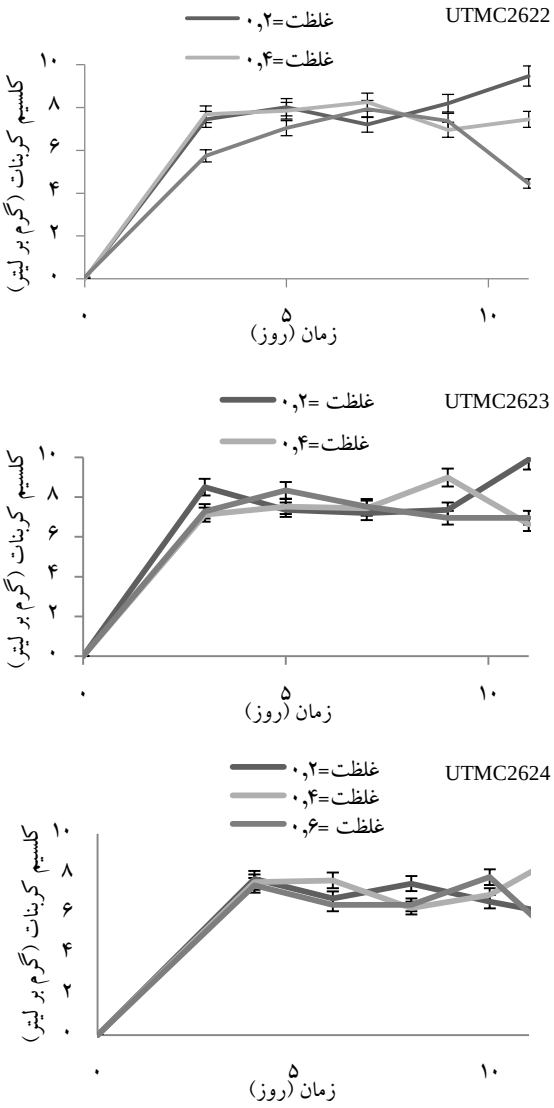
ردیف	کد آزمایشگاه	کد مجموعهٔ ریزموجودات دانشگاه تهران	کد دسترسی در NCBI	درصد شباهت	سویه مشابه	تعداد نوکلئوتید خوانش‌شده
۱	۱۶۷	۲۶۲۳	AM051268.2	۹۷/۰۱	*Bacillus alkalisediminis*	۱۳۳۸
۲	۱۱۰	۲۶۲۲	EU841500.1	۹۸/۹۱	*Bacillus horikoshi*	۱۲۸۴
۳	۱۴۷	۲۶۲۴	KP409413.1	۹۷/۷۹	*Bacillus clausii*	۷۷۴

بررسی منحنی رشد جدایه‌های منتخب: در شکل ۲ تراکم نوری بیشینه برای سه باکتری نشان داده شده است. تراکم نوری در هر زمان تا حد زیادی نشان‌دهندهٔ میزان رشد در آن زمان است (شکل ۲). میزان ویژهٔ رشد برای سه جدایهٔ برتر در بازهٔ زمانی t_0 (زمان شروع فاز لگاریتمی رشد) تا t (زمان رسیدن به بیشینه تراکم نوری که برای سه باکتری متفاوت است) محاسبه شده است. شدت ویژهٔ رشد برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2624 در مدت زمان ۴۸ ساعت برابر ۰/۰۰۳ بر ساعت، برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2622 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر ۰/۰۰۳ بر ساعت و برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر با ۰/۰۰۶ بر ساعت است.

بررسی غلظت بهینهٔ پیش‌سازهای کلسیم‌کلراید و اوره برای تولید رسوب: در شکل ۳ میزان تولید سه سویهٔ برتر در طول مدت آزمایش در سه غلظت مساوی اوره-کلسیم‌کلراید با مقادیر ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ مول‌برلیتر نشان داده شده است. شدت ویژهٔ تولید برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2624 در مدت زمان ۴۸ ساعت برابر ۳×۱۰^{-۶} گرم‌برلیتر، برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2622 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر $۱/۸\times۱۰^{-۶}$ گرم‌برلیتر و برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر $۲/۹\times۱۰^{-۶}$ گرم‌برلیتر است.



شکل ۲- نمودار تغییرات تراکم نوری سه جدایهٔ برتر در طول زمان برای دستیابی به زمان رشد بیشینه



شکل ۳- نمودار مقایسهٔ میزان تولید رسوب کلسیم‌کربنات توسط سه جدایهٔ برتر در سه غلظت مساوی اوره-کلسیم‌کلراید با مقادیر ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ مول‌برلیتر در طول زمان

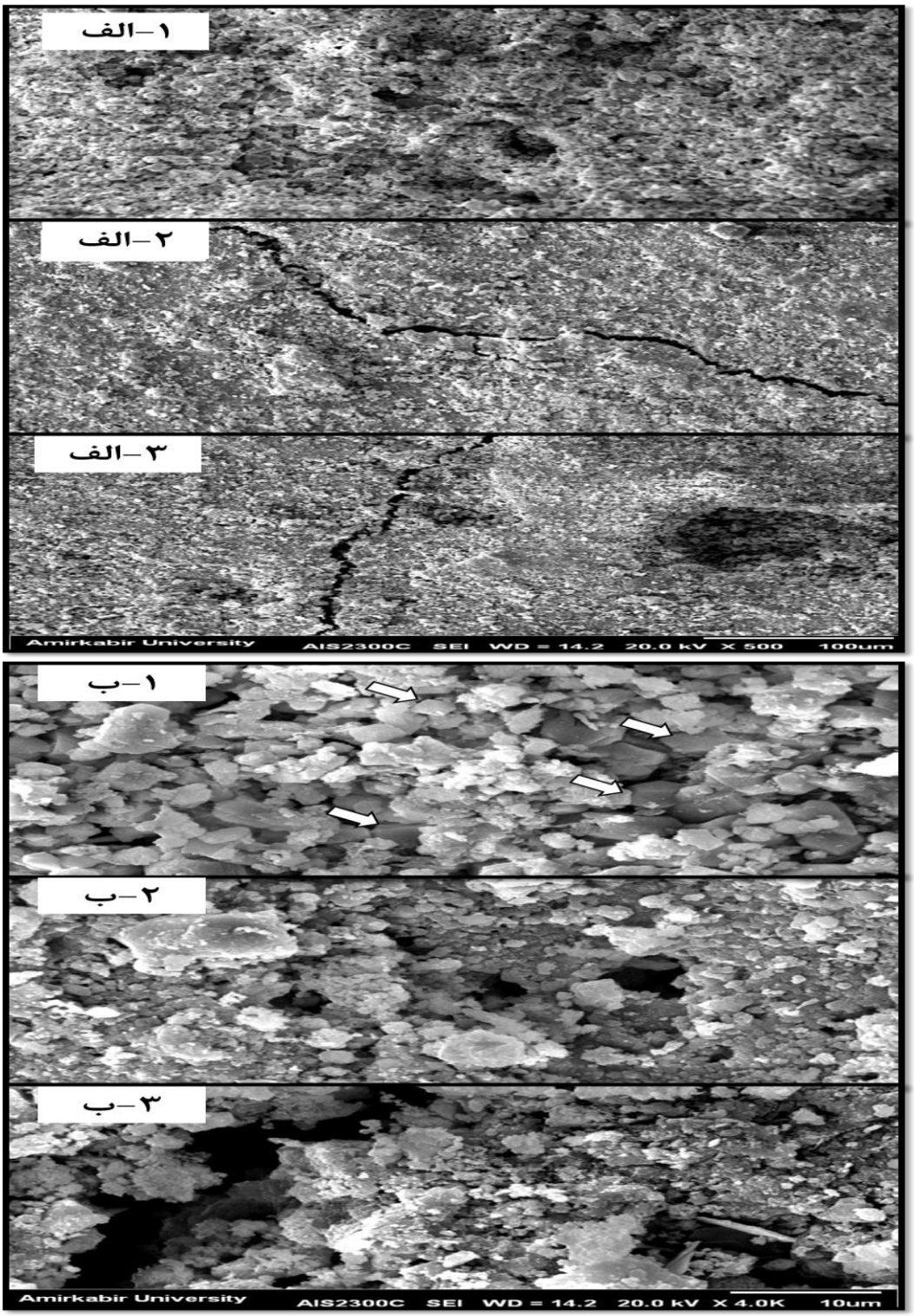
تجزیه‌وتحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس تک‌متغیره با دو فاکتور[10] در نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۶ انجام و وجودداشتن یا نداشتن تفاوت معنادار با سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P\leq$۰/۰۵) بررسی شد. بر اساس آزمون پست هاک[11] انجام‌شده برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2622 تفاوت تأثیر دو غلظت ۰/۲ و ۰/۶ مولار و دو غلظت ۰/۴ و ۰/۶ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید بر میزان تولید کلسیم‌کربنات معنادار است ($P\leq$۰/۰۵)؛ بنابراین غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ مولار ازنظر تأثیر بر تولید باهم تفاوتی ندارند. باتوجه‌به آزمون توکی انجام‌شده، اختلاف تولید کلسیم‌کربنات در روزهای مختلف نسبت به هم بی‌معنا ($P>$۰/۰۵) و نسبت به لحظهٔ صفر معنادار ($P\leq$۰/۰۵) است. باتوجه‌به دو آزمون انجام‌شده و به‌منظور صرفه‌جویی در مصرف مادهٔ اولیه و زمان، غلظت ۰/۲ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید و زمان پنج روز برای به‌دست‌آوردن بیشترین تولید انتخاب شد. بر اساس آزمون پست هاک انجام‌شده برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 تأثیر سه غلظت ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید بر میزان تولید کلسیم‌کربنات اختلاف معناداری ندارد ($P>$۰/۰۵). باتوجه‌به آزمون توکی انجام‌شده، اختلاف تولید کلسیم‌کربنات در روزهای مختلف نسبت به هم بی‌معنا و نسبت به لحظهٔ صفر معنادار است. باتوجه‌به دو آزمون انجام‌شده و به‌منظور صرفه‌جویی در مصرف مادهٔ اولیه و زمان، غلظت ۰/۲ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید و زمان سه روز برای به‌دست‌آوردن بیشترین تولید انتخاب شد. بر اساس آزمون پست هاک انجام‌شده برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2624 تأثیر دو غلظت ۰/۴ و ۰/۶ مولار از اوره- کلسیم‌کلراید بر میزان کلسیم‌کربنات اختلاف معناداری دارد ($P<0.05$)؛ اما تفاوت تأثیر غلظت ۰/۲ مولار نسبت به دو غلظت ۰/۴ و ۰/۶ مولار بر میزان کلسیم‌کربنات معنادار نیست ($P>0.05$). از سویی باتوجه‌به آزمون توکی[12] انجام‌شده اختلاف معناداری در میزان تولید کلسیم‌کربنات در روزهای مختلف وجود ندارد ($P>$۰/۰۵) و تنها اختلاف معنادار در مقایسهٔ هریک از زمان‌های بررسی‌شده با لحظهٔ صفر مشاهده می‌شود ($P\leq$۰/۰۵). باتوجه‌به دو آزمون انجام‌شده به‌منظور دستیابی به محصول بیشتر بدون در نظرگرفتن زمان، غلظت ۰/۴ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید انتخاب شد. باتوجه‌به تحلیل اعداد به‌دست‌آمده برای هر باکتری

ازنظر میزان مصرف مادهٔ اولیه، مدت زمان رسیدن به تولید و میزان تولید، باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 بیشترین میزان تولید کلسیم‌کربنات را در کمترین زمان یعنی سه روز داشت و غلظت ۰/۲ مولار اوره-کلسیم‌کلراید غلظت مناسب‌تر انتخاب شد. بازدهٔ تولید این جدایه در غلظت ۰/۲ مولار از اوره-کلسیم‌کلراید طی مدت پنج روز برابر با ۶/۱۶ بود.

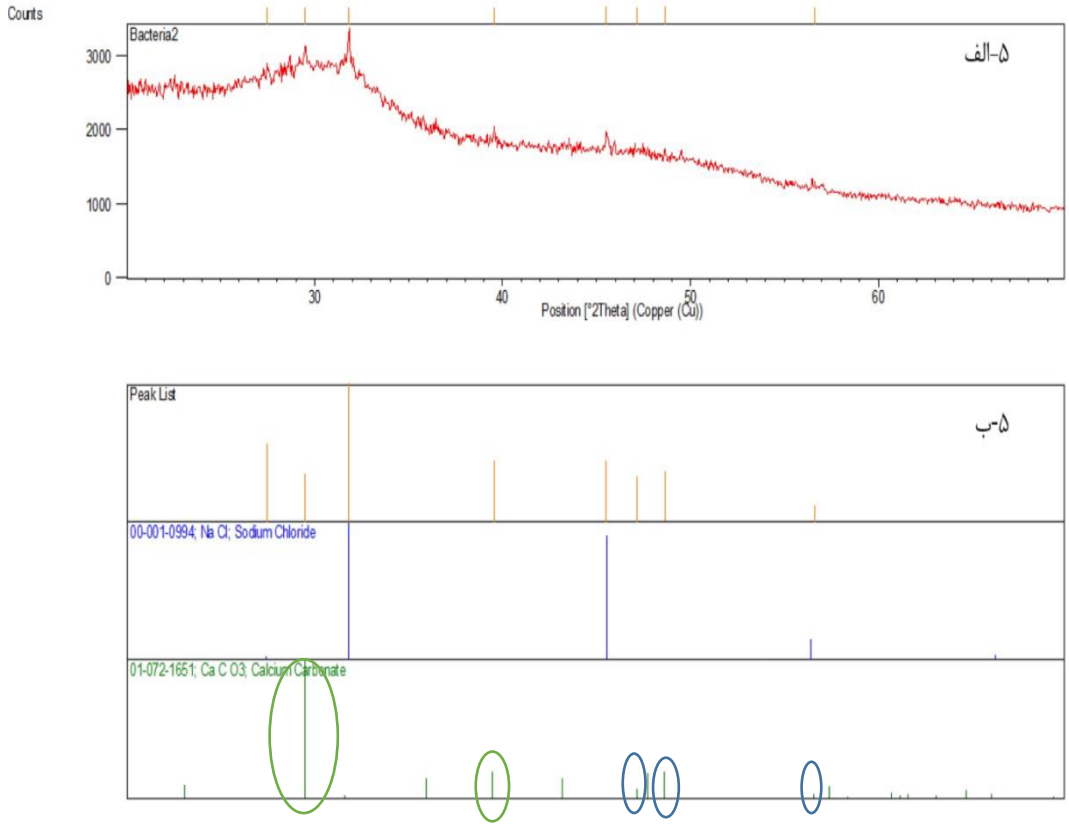
با توجه به نتایج تحلیل آماری داده‌های شکل ۳ و نتایج شناسایی مولکولی آنها مبنی بر شباهت کمتر این سویه به سویهٔ مشابه *باسیلوس آلکالی سدیمینیس*[۱۳]، *Bacillus* sp. UTMC 2623 جدایهٔ برتر انتخاب و بررسی ترمیم سطحی بتن و مشخصه‌یابی XRD تنها برای این جدایه انجام شد.

بررسی ترمیم سطحی بتن توسط جدایهٔ برتر: نمونه‌های تیمارشدهٔ گروه‌های یک، دو و سه که در ابعاد ۰/۵ ×۰/۵ سانتی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر آماده‌سازی شده بودند با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی سطحی شدند. در شکل ۴ میکروگراف میکروسکوپ الکترونی سطح نمونهٔ تیمارشده با باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 در سه گروه ۱) باکتری، کلسیم‌کلراید و اوره ۲) باکتری و ۳) کلسیم‌کلراید و اوره نشان داده شده است. در شکل ۴- الف سطح نمونه‌های تیمارشده با بزرگنمایی ۵۰۰× نشان داده شده است. ضخامت و تراکم لایهٔ تشکیل‌شده روی سطح در شکل ۴-الف-۱ نسبت به ۴-الف-۲ و ۴-الف-۳ کاملاً مشخص است. این لایه نشان‌دهندهٔ پوشانندگی سطحی ناشی از تیمار باکتریایی در حضور اوره و کلسیم‌کلراید است. در شکل ۴-ب سطح همان نمونه‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰۰× نمایش داده شده است. در شکل ۴-ب-۱ تعداد زیادی ساختارهای بلوری با ابعاد حدود ۲ تا ۵ میکرون به‌شکل شبه‌مکعب یا چندوجهی با اضلاع متفاوت دیده می‌شود. تراکم و ساختار نسبتاً بلوری لایهٔ تشکیل‌شده روی سطح بتن در شکل ۴-ب-۱ در مقایسه با ساختارهای پراکنده و بلورهای نامنظم شکل‌های ۴-ب-۲ و ۴-ب-۳ مشاهده می‌شود. در شکل ۴-ب-۲ بیشتر ترکیبات تشکیل‌شده روی سطح بی‌شکل دیده می‌شوند که نشان‌دهندهٔ هیدراتاسیون ذاتی بتن و ترکیبات محیط‌کشت و رسوبات سریع تشکیل‌شده است؛ همچنین در این قسمت پوشانندگی کمتری روی خلل‌وفرج سطح بتن دیده می‌شود. در شکل ۴-ب-۳ نیز رسوبات بی‌شکل با پوشانندگی کمتری نسبت به شکل ۴-ب-۲ دیده می‌شود. همان‌طور که در مشخصه‌یابی XRD تأیید شد بیشتر رسوبات کربنات دیده‌شده با شکل شبیه به مکعب از نوع کلسیت است.

مشخصه‌یابی پراش پرتو ایکس: پیش‌ازاین، طبیعت بلوری رسوبات کلسیم‌کربنات تشکیل‌شده در فرایند ترمیم باکتریایی اثبات شده است (۳۰). ازآنجاکه روش مشخصه‌یابی پراش پرتو ایکس ساختار بلوری را در نمونه تشخیص می‌دهد از آن برای تأیید یا رد حضور بلورهای کلسیم‌کربنات در رسوب حاصل از باکتری استفاده می‌شود. در شکل ۵ نتیجهٔ مشخصه‌یابی XRD رسوب خشک‌شدهٔ باکتری *باسیلوس آلکالی سدیمینیس* ارائه شده است. در شکل ۵-الف پیک‌های مربوط به بلورهای موجود در رسوب یادشده نشان داده شده است. ازآنجاکه رسوب دارای مواد آلی باقیمانده از زیست‌تودهٔ باکتری و سایر مواد رسوب‌کرده در محیط است پیک‌ها تیز[۱۴] نیستند و اغتشاش‌هایی[۱۵] در فاصلهٔ بین آنها مشاهده می‌شود. در شکل ۵-ب مجموعه پیک‌های گرفته‌شده با نزدیک‌ترین مجموعه پیک‌های مرجع مقایسه شده است و همان‌طور که ملاحظه می‌شود پنج پیک مرجع کلسیم‌کربنات با پنج پیک به‌دست‌آمده از مشخصه‌یابی رسوب هماهنگ هستند. اندیس‌های میلر پیک‌های مدنظر در جدول ۷ آمده است. اندیس‌های میلر زاویهٔ هریک از وجوه یک بلور را نسبت به محورهای x، y و z در فضا نشان می‌دهند (۳۱).



شکل ۴- الف. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح نمونه‌های تیمارشده در سه گروه ۱) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623، کلسیم‌کلراید و اوره ۲) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 ۳) کلسیم‌کلراید و اوره (بزرگنمایی ۵۰۰×)، ب. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح نمونه‌های تیمار شده در سه گروه ۱) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 و کلسیم‌کلراید و اوره ۲) باکتری Bacillus sp. UTMC 2623 ۳) کلسیم‌کلراید و اوره (بزرگنمایی ۴۰۰۰×)



شکل ۵- الف. الگوی مشخصه‌یابی XRD رسوب خشک‌شدهٔ باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623، ب. مقایسهٔ پیک‌های به‌دست‌آمده از مشخصه‌یابی با پیک‌های مرجع بلور های سدیم‌کلراید و کلسیم‌کربنات

جدول ۷- اندیس‌های میلر زوایای پراش بلور کلسیم‌کربنات تولیدشده توسط باکتری

زاویه ۲تتا (درجه)	اندیس میلر
۲۹/۴۸	۱۰۴
۳۹/۴۳	۱۱۳
۴۷/۱۶	۰۲۴
۴۸/۶۱	۱۱۶
۵۶/۵۵	۲۱۱

بحث و نتیجه‌گیری

بتن یکی از مصالح ساختمانی بسیار مهم و پرکاربرد است که ماهیت متخلخل آن امکان ورود آب و انواع مواد تخریب‌کننده را ممکن می‌کند و دوام سازه را کاهش می‌دهد (۳۲). امروزه برای کاهش هزینه‌های تولید و نگهداری بتن، محصولات جانبی بسیاری از صنایع مانند خاکستر بادی و سربارهٔ کورهٔ آهن‌گدازی به‌عنوان جایگزین سیمان در مخلوط بتن استفاده می‌شوند (۳۳). برای سازه‌های درحال بهره‌برداری نیز مواد شیمیایی متعددی ازجمله اپوکسی و سیلان‌ها به کار می‌روند که هزینهٔ زیاد و مشکلات زیست‌محیطی آنها موجب توجه به باکتری‌ها (عوامل تجدیدپذیر و سازگار با طبیعت) شده است (۴). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند سویهٔ *Bacillus* sp.

UTMC 2623 با استفاده از مسیر اوره‌آز و منبع کلسیم می‌تواند ۸/۵ گرم‌درلیتر رسوب کلسیم‌کربنات طی سه روز تولید کند. این مقدار در مقایسه با مقدار کلسیم‌کربنات تولیدشده توسط باکتری‌های به‌کاررفته در مطالعه‌های پژوهشگران دیگر درخور توجه است؛ برای نمونه، بر اساس پژوهش کنگ[۱۶] و همکاران باکتری *لیزینی باسیلوس اسفریکوس* توانایی تولید ۹/۸ گرم‌درلیتر رسوب کلسیم‌کربنات دارد (۳۴). ازآنجاکه این جدایه در اسیدیتهٔ زیاد (حدود ۹ تا ۱۰) قابلیت رشد و عملکرد دارد و باکتری ترمیم‌کنندهٔ سطح بتن باید بتواند اسیدیتهٔ زیاد بتن را تحمل کند (۳۵) به نظر می‌رسد توانمندی زیادی برای ترمیم سطحی بتن داشته باشد. نتایج مشخصه‌یابی XRD نیز حضور بلور کلسیم‌کربنات را در رسوب حاصل از جدایهٔ برتر تأیید می‌کنند. مشاهده‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی افزایش تولید بلور ناشی از وجود باکتری را نشان می‌دهند و این حقیقت را تأیید می‌کنند که حضور باکتری و منبع کلسیم نقش مهمی در میزان ترمیم خلل‌وفرج و یا ترک‌های سطحی بتن دارد. ترسیب زیستی انجام‌شده از مسیر اوره‌آز با وجود تمام مزایای برشمرده مشکلاتی دارد که تاکنون از به‌کاربردن آن در مقیاس گستردهٔ تجاری جلوگیری کرده است؛ برای نمونه، آمونیوم تولیدشده در مسیر اوره‌آز برای انسان و ریزموجودات خاک خطرناک است. باکتری‌ها این آمونیوم را به نیتریک‌اسید تبدیل می‌کنند و با کلسیم‌کربنات موجود واکنش می‌دهند و ترکیب محلول کلسیم‌نیترات را تولید می‌کنند که به‌طور خطرناکی موجب ازبین‌رفتن سازه می‌شود. گنندرا[۱۷] و همکاران نوعی ترسیب زیستی را بررسی کردند که باکتری *متیلوکوکوس پرووس* OBBP[۱۸] انجام می‌دهد. این باکتری از مسیر اوره‌آز برای تولید کلسیم‌کربنات استفاده نمی‌کند و بنابراین آمونیوم تولید نمی‌کند بلکه از طریق اکسیداسیون فرمات در پیش‌ساز کلسیم‌فرمات داده شده به آن در محیط ترسیب، کلسیم‌کربنات را رسوب می‌دهد (۳۶). مشکل دیگر، پیچیدگی و سرعت کم مسیر اوره‌آز برای ترسیب زیستی و بستگی کامل آن به شرایط محیط اطراف مانند دما، اسیدیته، غلظت دهنده‌ها و پذیرنده‌های الکترون و سرعت پراکندگی مواد غذایی و محصولات است؛ بنابراین تجاری‌سازی ترمیم زیستی کار آسانی نیست (۳۷). به‌منظور کاربرد تجاری ترسیب زیستی، منابع تغذیه‌ای باکتری و پیش‌ساز استفاده‌شده باید ازنظر اقتصادی به صرفه و به‌همین‌علت ارزان و دردسترس باشند؛ برای نمونه، کاربرد شیرابهٔ ذرت که در پژوهش‌های پیشین به‌عنوان محیط کشت استفاده شده است گزینهٔ مناسبی است (۳۸) هرچند محصولات جانبی تولیدشدهٔ ناشی از به‌کاربردن این محیط‌ها باید بررسی شوند تا برای محیط‌زیست خطرناک نباشند (۳۷). تاکنون باکتری‌های متعددی از جنس *باسیلوس* به‌علت فراگیربودن و مقاومت زیاد اسپورهایشان به عوامل فیزیکی و شیمیایی در ترمیم سطحی و عمقی بتن مطالعه شده‌اند (۳۹). *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس اسفریکوس* ازجمله ترمیم‌کننده‌های سطحی هستند (۳۴) اما تاکنون گزارشی مبنی بر عملکرد ترمیمی باکتری *باسیلوس آلکالی سدیمینیس* ارائه نشده است. این باکتری همان‌طورکه اشاره شد به‌طور درخور توجهی کلسیم‌کربنات تولید می‌کند و از خاک ایران جداسازی شده است. نتایج پژوهش حاضر در معرفی این گونه به‌عنوان ترمیم‌کنندهٔ زیستی بومی سطح بتن استفاده می‌شوند.

References

(1) Neville AM. Properties of concrete: Longman London; 1995.

(2) Achal V., Mukherjee A., Reddy MS. Microbial concrete: way to enhance the durability of building structures. *Journal of materials in civil engineering* 2010; 23(6): 730-734.

(3) Jonkers HM. Bacteria-based self-healing concrete. *Heron* 2011; 56(1/2): 1-12.

(4) Achal V. Production of bacteria for structural concrete. *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering* 2015; 309-323.

(5) Li P., Qu W. Bacteria for concrete surface treatment. *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering* 2015; 325-358.

(6) De Muynck W., Leuridan S., Van Loo D., Verbeken K., Cnudde V., De Belie N., et al. Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(19): 6808-6820.

(7) Braissant O., Cailleau G., Dupraz C., Verrecchia EP. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sedimentary Research* 2003; 73(3): 485-490.

(8) De Belie N., Wang J. Bacteria-based repair and self-healing of concrete. *Journal of Sustainable Cement-Based Materials* 2016; 5(1-2): 35-56.

(9) Le Metayer-Levrel G., Castanier S., Orial G., Loubiere J-F., Perthuisot J-P. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology* 1999; 126(1-4): 25-34.

(10) Tiano P., Biagiotti L., Mastromei G. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of Microbiological Methods* 1999; 36(1-2): 139-145.

(11) Tiano P., Accolla P., Tomaselli L. Phototrophic biodeteriogens on lithoid surfaces: an ecological study. *Microbial Ecology* 1995; 29(3): 299-309.

(12) Ramachandran SK., Ramakrishnan V., Bang SS. Remediation of concrete using micro-organisms. *ACI Materials Journal-American Concrete Institute* 2001; 98(1): 3-9.

(13) Achal V., Mukherjee A., Basu P., Reddy MS. Strain improvement of Sporosarcina pasteurii for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2009; 36(7): 981-988.

(14) Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Chekroun KB., Gonzalez-Munoz MT. Conservation of ornamental stone by Myxococcus xanthus-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(4): 2182-2193.

(15) De Muynck W., Debrouwer D., De Belie N., Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research* 2008; 38(7): 1005-1014.

(16) Van Tittelboom K., De Belie N., De Muynck W., Verstraete W. Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research* 2010; 40(1): 157-166.

(17) Ghosh P., Mandal S., Chattopadhyay B., Pal S. Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research* 2005; 35(10): 1980-1983.

(18) Vahabi ARA., Sharafi H., Zahiri HS., Vali H., Noghabi KA. Application of a new method using microorganisms to increase the compressive strength of concrete. First National Conference on Concrete Industry, International Center for Advanced Science and Technology and Environmental Sciences, kerman, Iran. 2012.

(19) Vahabi A., Ramezanianpour AA., Sharafi H., Zahiri HS., Vali H., Noghabi KA. Calcium carbonate precipitation by strain Bacillus licheniformis AK01, newly isolated from loamy soil: a promising alternative for

sealing cement-based materials. *Journal of Basic Microbiology* 2015; 55(1): 105-111.

(20) Nosouhian F., Hasheminejad H. Effect of bacterial agents on improvement of concrete features. The 5th Annual national concrete conference of Iran, Tehran, 2013.

(21) Sargazi S., Dehmarde S., Bagheri M., Bokaiian V., Sohrabi MR. Investigation of Bacillus pasteuristic effect on compressive strength and absorption of self-compacting concrete. Eighth National Civil Engineering Congress, Iran, Babol. April 2014.

(22) Setare Bitaraf AGK. Improving the stability and impenetrability of concrete with the use of bacteria. 1st National Conference on Nitrava Concrete Drinking Reservoirs, Gilan, Iran; 2016.

(23) Horikoshi K. *Alkaliphiles-genetic properties and application of enzymes*. Tokyo: Kodansha Ltd; 2006

(24) Christensen WB. Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *Journal of Bacteriology* 1946; 52(4): 461.

(25) Hammes F., Boon N., de Villiers J., Verstraete W., Siciliano SD. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69(8): 4901-4909.

(26) Dean Jr WE. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. *Journal of Sedimentary Research* 1974; 44(1): 242-248.

(27) Wang J., Ersan YC., Boon N., De Belie N. Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016; 100(7): 2993-3007.

(28) De Muynck W., Cox K., De Belie N., Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation reduces the permeability of cementitious materials. *Sustainable Construction Materials and Technologies*. 2007: 411-416.

(29) Jonkers HM., Schlangen EA. Two component bacteria based self healing concrete. *Concrete Repair, Rehabilitation and Retrofitting* 2009; 119-120.

(30) Chessin H., Hamilton WC., Post B. Position and thermal parameters of oxygen atoms in calcite. *Acta Crystallographica* 1965; 18(4): 689-693.

(31) Ramezanianpour AA., Pidhayos M. *Concrete Recognition (Materials, Properties, Technologies)*. Tehran: Amir Kabir University Press; 2010

(32) Jonkers HM., Thijssen A., Muyzer G., Copuroglu O., Schlangen E. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological engineering* 2010; 36(2): 230-235.

(33) Kang C-H., Han S-H., Shin Y., Oh SJ., So J-S. Bioremediation of Cd by microbially induced calcite precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2014; 172(6): 2907-2915.

(34) Grubb JA., Limaye HS., Kakade AM. Testing pH of concrete. *Concrete International* 2007; 29(04): 78-83.

(35) Ganendra G., De Muynck W., Ho A., Arvaniti EC., Hosseinkhani B., Ramos JA., et al. Formate oxidation-driven calcium carbonate precipitation by Methylocystis parvus OBBP. *Applied and Environmental Microbiology* 2014; 80(15): 4659-4667.

(36) Anbu P., Kang C-H., Shin Y-J., So J-S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springer Plus* 2016; 5(1): 250.

(37) Achal V., Mukherjee A., Basu P., Reddy MS. Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by Sporosarcina pasteurii. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2009; 36(3): 433-438.

(38) Krieg N., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B., Paster B., Staley J. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Firmicutes, vol. 3. New York: *Springer*; 2011.

[1]- نوعی صدف دوکفه‌ای خوراکی که در سواحل آمریکای جنوبی یافت می‌شود.
[2]- Horikoshi
[3]- Optical density
[4]- X Ray Diffraction
[5]- XPERT-PRO
[6]- Scanning electron microscope
[7]- serron
[8]- Amplicon Master Mix
[9]- National Center for Biotechnology Information
[10]- Univariate ANOVA
[11]- Post hoc
[12]- Tukey
[13]- *Bacillus alkalisediminis*
[14]- sharp
[15]- noise
[16]- Kang
[17]- Ganenda
[18]- Methylocystis parvus OBBP