

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

چکیده

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

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

نتایج: پس از انجام غربال‌گری اولیه و ثانویه مشخص شد جدایه *Bacillus sp. UTMC 2623* بیشترین مقدار رسوب کلسیم کربنات (۸/۵ گرم در لیتر در مدت سه) را تولید می‌کند. مشخصه‌یابی XRD این جدایه وجود بلور کلسیم کربنات را در رسوب خشک‌شده 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 ترمیم‌کننده سطح بتن استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اوره‌آز، کلسیم کربنات، ترمیم سطحی، نفوذپذیری، پایایی بتن، باسیلوس

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

بتن، یکی از کاربردی‌ترین مصالح ساختمانی، مخلوط ناهمگنی متشکل از سیمان، سنگدانه‌های درشت و ریز و آب است (۱). بتن استفاده‌شده در هر سازه بتنی باید علاوه بر 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 سازه بتنی در مدت زمان عمر مفید آن باید هزینه‌های بسیار زیادی برای تعمیر و نگهداری آن صرف شود؛ این امر در حال حاضر بودجه درخور توجهی از کشورها را به خود اختصاص می‌دهد و از این رو، مسئله دوام بتن اهمیت بسزایی در اقتصاد جهانی دارد (۲).

در حال حاضر، از پوشش‌های متنوع شیمیایی برای ترمیم و یا حفاظت سطح بتن استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر به علت 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 به عنوان 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 خلل و فرج بتن را پر می‌کند باید دارای بیشترین سازگاری با ساختار بتن باشد و از این رو باید بتواند اسیدیته زیاد بتن (حدود ۱۳ تا

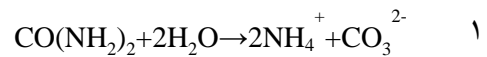
۱۴) را تحمل کند (۵). در حالت ترمیم سطحی، باکتری به روش پاشیده‌شدن و یا غرقاب نمونه بتن در ظرف حاوی باکتری در سطح بتن نفوذ می‌کند. هرچه عمق نفوذ باکتری بیشتر باشد تأثیرگذاری عملکرد کلسیم کربنات تولیدشده نیز بهتر خواهد بود. عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی از جمله ساختار خلل و فرج بتن، میزان چسبندگی باکتری به شبکه معدنی بتن و نسبت اندازه باکتری به اندازه خلل و فرج بر میزان نفوذ باکتری در سطح بتن تأثیر می‌گذارند. از سویی، باکتری‌هایی هیدرولیز اوره را انجام می‌دهند که داخل خلل و فرج هستند و به دیواره نچسبیده‌اند. این باکتری‌ها در محیط ترسیب با اتصال به یون‌های کلسیم موجود به شکل لخته درمی‌آیند و لخته‌شدن باکتری‌ها به ماندن آنها درون خلل و فرج کمک می‌کند. هرچه اندازه خلل و فرج نسبت به باکتری بزرگ‌تر باشد باکتری‌های بیشتری در آن حضور دارند؛ بنابراین کلسیم کربنات 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 تجزیه اوره، آمونیاکاسیون 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 هتروتروفیک 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 دیواره

ملاط ماسه سیمان بر افزایش مقاومت فشاری نمونه‌های ملاط پرداختند (۱۸). وهابی در پژوهش دیگری اثر ترمیمی باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس AKO1 را در کاهش نفوذپذیری سطح بتن نشان داد (۱۹). نصحیان در سال ۱۳۹۲ از باکتری تولیدکننده اوره آز و کلسیم کلراید 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، کلسیم کلراید و باکتری با درصد‌های مختلف در آب اختلاط به منظور 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 زیاد شدن مقاومت الکتریکی و کاهش خوردگی میلگرد و در نتیجه افزایش دوام بتن می‌شود (۲۲).

پژوهش‌های انجام شده امیدبخش بودن 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. باتوجه به اهمیت بتن و هزینه درخور توجه تخریب و ساخت دوباره سازه‌های در حال بهره‌برداری از یک سو و کمبود مطالعه‌های انجام شده در زمینه ارزیابی توان ریزموجودات بومی کشور از نظر ترمیم بتن از سوی دیگر، پژوهش حاضر با هدف یافتن ریزموجودات بومی ترمیم‌کننده بتن به بررسی ریزموجودات قلیادوست جدا شده از خاک‌های برخی مناطق قلیایی شمال و مرکز ایران و ارزیابی توانمندی جدایه‌های منتخب در ترمیم و بهبود سطحی بتن پرداخته است.

باکتری دارای بار منفی جذب می‌شود و کربنات کلسیم تولید می‌کند. اگر باکتری تولیدکننده کلسیم کربنات در بتن قرار گرفته باشد با تولید کلسیم کربنات و بسته شدن منافذ مانند لایه‌ای روی بتن عمل می‌کند. رابطه نهایی واکنش به شکل رابطه ۱ است (۸):



مزایای این مسیر شامل سرعت زیاد و تک آنزیمی بودن (۸)، فراگیر بودن آنزیم و پیش‌ساز آن و نیازهای کم تغذیه‌ای (۵) و در نتیجه صرفه اقتصادی، کنترل‌پذیر بودن و درخور توجه بودن مقدار رسوب تولید شده طی این مسیر است (۸).

ترمیم زیستی در موارد متعددی بررسی شده است و باسیلوس‌ها بیشترین کاربری را در میان باکتری‌های بررسی شده داشته‌اند. حفاظت از سنگ آهک با استفاده از باکتری‌های تولیدکننده کلسیم کربنات (۹)، ترمیم سنگ‌های بناهای تاریخی با استفاده از گونه‌هایی از میکروکوکوس و باسیلوس سوبتیلیس (۱۰) و شبکه آلی ماکرومولکول‌های گرفته شده از میتیلوس کالیفرنیا نوس^۱ (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 تزئینی (۱۴)، بررسی تأثیر باکتری باسیلوس اسفریکوس بر دوام و ترمیم ترک‌ها در بتن (۱۵ و ۱۶)، استفاده از گونه باسیوس CT-5 و گونه‌هایی از شیوانلا برای افزایش مقاومت فشاری ملاط سیمان (۲) و (۱۷) نمونه‌هایی از پژوهش‌های انجام شده در این زمینه در کشورهای مختلف هستند. همچنین پژوهش‌هایی در زمینه 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 جداسازی شده از خاک قلیایی در مخلوط

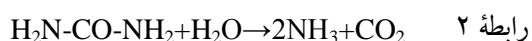
مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قلیادوست و

نمک قلیادوست: به منظور دستیابی به جدایه‌های باکتریایی قلیادوست و نمک قلیادوست، نمونه‌برداری از برخی مناطق قلیایی کشور انجام و اسیدیته هریک از خاک‌ها سنجیده شد. اسیدیته زیاد بتن علت جداسازی باکتری‌های قلیادوست و دستیابی احتمالی به جدایه‌های بیشتر علت جداسازی باکتری‌های نمک قلیادوست بود. چهار نمونه خاک با اسیدیته قلیایی تر از میان خاک‌های جمع‌آوری شده و نیز تمام خاک‌های موجود در مجموعه ریز موجودات 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 نمک قلیادوست، ۴ درصد نمک سدیم کلراید به محیط یادشده افزوده شد. اسیدیته 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 به مدت حداکثر دو روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی برای آزمایش‌های غربال‌گری اولیه و ثانویه استفاده شدند (۲۳).

بررسی تولید آنزیم اوره‌آز و کلسیم کربنات: در

مرحله غربال‌گری اولیه، وجود داشتن یا نداشتن آنزیم اوره‌آز در جدایه‌های آزمایش شده بررسی شد. هیدرولیز یک مول اوره توسط باکتری دارای اوره‌آز دو مولکول آمونیاک و یک مولکول دی‌اکسید کربن تولید می‌کند (رابطه ۲):



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 خالص شده در محیط مایع کریستنن (جدول ۲) در لوله و در مقایسه با شاهد‌های منفی، مثبت، بدون اوره و بدون باکتری کشت و به مدت شش روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. از مقایسه چشمی نمونه‌ها با شاهد‌ها تغییر رنگ محیط کشت و میزان آن به‌طور کیفی بررسی شد (۲۵).

جدول ۲- ترکیبات محیط کشت کریستنن برای آزمون تولید آنزیم اوره‌آز (۲۵)

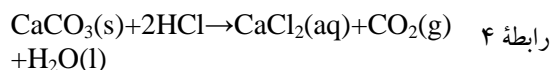
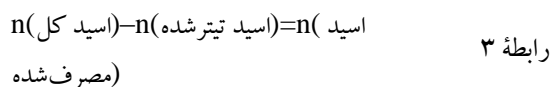
ردیف	ماده	مقدار (گرم بر لیتر)
۱	پپتون	۱
۲	گلوکز	۱
۳	اوره	۲۰
۴	فنل رد	۰/۰۱۲
۵	KH ₂ PO ₄	۲

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

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت هوریکوشی (۲۴)

ردیف	ماده	مقدار (گرم بر لیتر)
۱	گلوکز	۱۰
۲	پپتون	۵
۳	عصاره مخمر	۵
۴	آگار	۱۵
۵	KH ₂ PO ₄	۱
۶	MgSO ₄ .7H ₂ O	۰/۲
۷	Na ₂ CO ₃	۱۰

سدیم هیدروکسید تیتراکننده و بر اساس دو واکنش زیر تعیین می‌شود (رابطه‌های ۳ و ۴) (۲۷).



انتخاب سوبه برتر بر اساس زمان رشد: از آنجا که

تولید کلسیم کربنات بخشی از متابولیسم باکتری در نظر گرفته می‌شود هرچه رشد باکتری بیشتر باشد تولید محصول بیشتر می‌شود. سه جدایه منتخب در محیط مایع تولید کلسیم کربنات (جدول ۳ بجز آگار) در فلاسک ۱ لیتری کشت شدند و یک فلاسک شاهد برای هر فلاسک نمونه برداری در نظر گرفته شد. میزان رشد جدایه‌های منتخب به مدت سه روز در فواصل زمانی ۱۲ ساعته بررسی شد. در هر بار نمونه برداری، ۵۰ میلی‌لیتر نمونه برداشته و جذب نوری (OD^۳) و اسیدیته آن اندازه‌گیری و ثبت شد. نمودار OD بر حسب زمان برای هر جدایه رسم و زمان رسیدن به OD بیشینه تعیین شد. شدت ویژه رشد برای هر یک از باکتری‌ها بر اساس رابطه ۵ محاسبه شد. OD_t و OD₀ جذب‌های خوانده شده در زمان رشد بیشینه (t که برای سه باکتری متفاوت است) و t₀ در فاز لگاریتمی رشد باکتری هستند.

$$\text{رابطه ۵} \quad OD_t = OD_{t_0} e^{\mu t}$$

انتخاب سوبه برتر بر اساس تولید بیشینه محصول:

غلظت مناسب پیش‌سازهای کلسیم کربنات عامل دیگر مؤثر بر افزایش تولید محصول است. سه غلظت مساوی از کلسیم کلراید و اوره با مقادیر ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار برای مطالعه انتخاب شدند (۲۸). سه جدایه ۱۴۷، ۱۱۰ و

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

جدول ۳- ترکیبات سازنده محیط ترسیب کلسیم کربنات (۲۶)

ردیف	مقدار (گرم بر لیتر)	ماده
۱	۲۰	اوره
۲	۱۷	آگار
۳	۲/۱۲	NaHCO ₃
۴	۱۰	NH ₄ Cl
۵	۳	Nutrient Broth
۶	۴/۴۱	CaCl ₂ .2H ₂ O

سنجش تولید کلسیم کربنات به وسیله تیتراسیون

برگشتی: جدایه‌های منتخب مرحله پیش به منظور سنجش دقیق‌تر توانمندی تولید رسوب کلسیم کربنات در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع ترسیب (جدول ۳) کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند (۲۷). پس از ۴۸ ساعت، مایع درون هر فلاسک به لوله فالكون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و زیست‌توده حاصل در کوره با دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا خشک شود و به وزن ثابت برسد. مقدار کلسیم کربنات 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 کلسیم کربنات در اسید حل و سپس باقیمانده اسید با سدیم هیدروکسید تیترا می‌شود و مقدار مول و جرم کلسیم کربنات موجود در رسوب با محاسبه مقدار

رسوب حاصل در فور با دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۲۷). سپس، نمونه به منظور تأیید ساختار بلوری کلسیم کربنات و ترکیب شیمیایی آن مشخصه‌یابی XRD شد. طیف پرتوهای پراش یافته با استفاده از دستگاه اکسپرت-پرو^۵ و آند مسی (۴۰ کیلوولت، ۴۰ میلی‌آمپر) جذب و در زاویه دو تتا برابر با ۲۰ تا ۶۹/۹ درجه اسکن شد.

ترمیم سطحی نمونه تیمار شده با باکتری: نمونه‌های بتنی با ابعاد ۵×۵×۵ سانتی‌متری با طرح اختلاط ۳۰۰ کیلوگرم سیمان، ۱۸۰ لیتر آب و ۶۴۰ کیلوگرم ریزدانه ماسه‌ای (نسبت آب به سیمان برابر با ۰/۶) ساخته و به مدت ۲۸ روز در آب خوراکی تیمار شدند. بتن ۹۰ روزه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. سه گروه بررسی ترمیم شامل (۱) باکتری، محیط کشت و کلسیم کلراید، (۲) باکتری و محیط کشت و (۳) باکتری و کلسیم کلراید برای مقایسه در نظر گرفته شدند. به منظور ایجاد ترمیم سطحی، کشت یک‌روزه جدایه برتر در محیط جامد هوریکوشی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. پیش کشت سالم از کشت یک‌روزه تهیه و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. پس از ۷۲ ساعت، ۱۰ میلی‌لیتر پیش کشت به ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اصلی موجود در فلاسک ۱ لیتری تلقیح شد. ترکیبات محیط مدنظر از تغییر مقدار برخی ترکیبات به کاررفته در جدول ۳ به دست آمد: مقدار اوره استفاده شده بر اساس سه غلظت بررسی شده ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار به ترتیب به مقادیر ۱۲، ۲۴ و ۳۶ گرم در لیتر تغییر یافت و کلسیم کلراید و آگار از آن حذف شدند. سه تکرار برای هر سه گروه در نظر گرفته شد. محیط کشت‌ها

۱۶۷ در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط پیش کشت (جدول ۴) به فلاسک‌های ۱ لیتری تلقیح و پس از سه روز گرماگذاری برای نمونه ۱۴۷ و سه روز و نیم گرماگذاری برای نمونه‌های ۱۱۰ و ۱۶۷ به محیط کشت اصلی تلقیح شدند.

جدول ۴- ترکیبات سازنده محیط پیش کشت (۲۶)

ماده	مقدار (گرم بر لیتر)	ردیف
NaHCO ₃	۲/۱۲	۳
NH ₄ Cl	۱۰	۴
Nutrient Broth	۳	۵

نمونه برداری برای بررسی میزان رسوب تولید شده به روش تیتراسیون برگشتی در فواصل زمانی ۲ تا ۱۱ روز برای سه جدایه انجام شد. نمودار میزان تولید برابر زمان برای هر باکتری در سه غلظت استفاده شده رسم شد. شدت ویژه تولید بر اساس رابطه ۶ برای هر جدایه محاسبه شد که در آن μ شدت ویژه رشد و \bar{x} میانگین زیست‌توده تولید شده است.

رابطه ۶ $r_x = \mu \bar{x}$
 بازده تولید کلسیم کربنات توسط باکتری از رابطه ۷ محاسبه شد که در آن، مقدار کلسیم کربنات تولیدی بر حسب گرم در لیتر طی زمان تولید محصول (برای هر باکتری با دیگری متفاوت است) و مقدار زیست‌توده باکتری بر حسب گرم در لیتر در همین زمان است.

$$\text{رابطه ۷} \quad Y = \frac{\text{مقدار تولید}}{\text{مقدار زیست‌توده}} \times 100 = \text{بازده تولید}$$

مشخصه‌یابی پراش پرتوی ایکس (XRD) به منظور تأیید تولید کلسیم کربنات به وسیله جدایه برتر: از محیط کشت تولید کلسیم کربنات حاوی جدایه برتر با سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه رسوب‌گیری شد و

۵ دقیقه، ۲۸ چرخه تکثیر شامل واسرشتی ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۵۵ ثانیه‌ای آغازگر در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، سنتز ۷۵ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و باقی ماندن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل فرایند سنتز انجام شد. محصول نهایی پس از خالص‌سازی روی ژل آگارز برای تعیین توالی استفاده شد. به منظور توالی‌یابی، باندها مدنظر به کمک کیت از ژل استخراج شد و به شرکت ماکروژن - کره جنوبی ارسال شد. تعیین توالی براساس روش تغییر یافته سنجر 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 جدایه خالص به دست آمد. **غربال‌گری جدایه‌ها بر اساس توانمندی تولید آنزیم اوره‌آز:** از ۱۴۲ جدایه بررسی شده، 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 پس از این مدت، پیتون موجود در محیط تجزیه می‌شد و با محصولات قلیایی خود پاسخ مثبت کاذب ایجاد می‌کرد. ۱۸ جدایه منتخب از نظر واکنش گرم، مثبت و دارای رشد زیاد بودند (جدول ۵). جدایه‌ها بر اساس نوع رنگ تولید شده یاسی و بنفش که به‌طور کیفی نشان‌دهنده میزان هیدرولیز اوره است به ترتیب به ++ و +++ تقسیم‌بندی شدند.

پس از دو روز گرماگذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به ظروف شیشه‌ای یکسان منتقل شدند و در شرایط استریل، نمونه‌های بتنی در آنها غرقاب و به مدت ۴۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس نمونه‌ها از محیط کشت خارج و با حوله خشک شدند و به مدت سه روز به‌منظور ترسیب در محلول کلسیم کلراید ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار گرماگذاری شدند (۲۹).

بررسی ترمیم سطحی نمونه‌های بتنی تیمار شده با

میکروسکوپ الکترونی روبشی: نمونه‌های مکعبی تیمار شده در ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر بریده شدند و پس از صاف کردن سطح، یک نمونه از هر تکرار با طلا پوشانده شد و نمونه‌های آماده روی پایه مناسب نصب شدند. پس از رسیدن دستگاه به خلأ، تصویر سطح نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی سرن^۶ A1S2100 با بزرگنمایی‌های ۵۰× و ۴۰۰× مشاهده و ثبت شد.

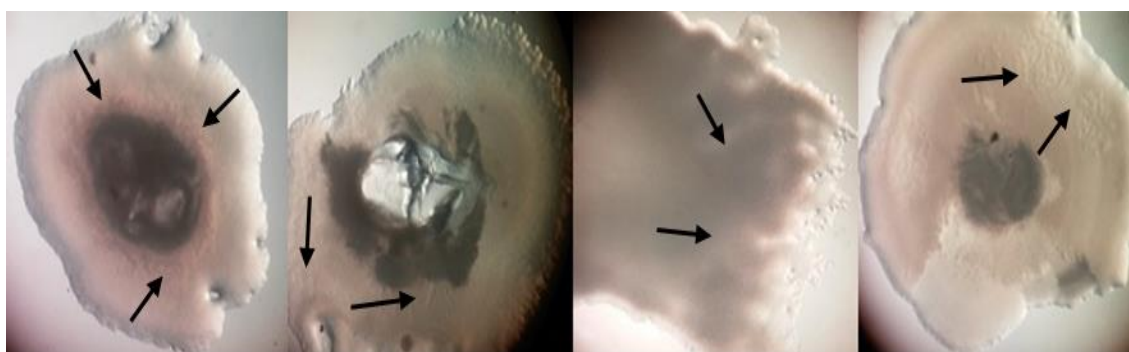
شناسایی مولکولی جدایه منتخب: جدایه برتر در محیط BHI مایع کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. ۳ تا ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت ۲۴ ساعته به ویال استریل منتقل و زیست توده حاوی باکتری با چرخش به مدت ۱ دقیقه در میکروفیوژ با شتاب ۱۸۵۱۶g از محیط کشت جدا و DNA آن به وسیله کیت استخراج خارج شد. تکثیر ژن *16S rRNA* جدایه برتر ۱۶۷ با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید با استفاده از آغازگرهای 9F و 1541R (5'- 9F: 3'- AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3' و 1541R: 5'- AGG AGG TGA TCC ACC CGC -3' A) و آنزیم امپلیکون مستر میکس^۸ انجام شد. واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت

جدول ۵- نتایج هیدرولیز اووره و ویژگی‌های میکروسکوپی ۱۸ جدایه پس از ۴۸ ساعت

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

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

غربال‌گری جدایه‌های منتخب بر اساس توانمندی تولید رسوب کلسیم کربنات: نتایج کشت ۱۸ جدایه مولد اووره از روی محیط جامد تولید کلسیم کربنات نشان‌دهنده وجود رسوب کربنات کلسیم توسط جدایه‌های ۱۱۰، ۱۴۷، ۱۶۷ و ۱۶۸ است (شکل ۱)، پیکان‌ها محل بلورهای رسوب کربنات کلسیم را در نزدیکی حاشیه کلنی‌ها نشان می‌دهند).



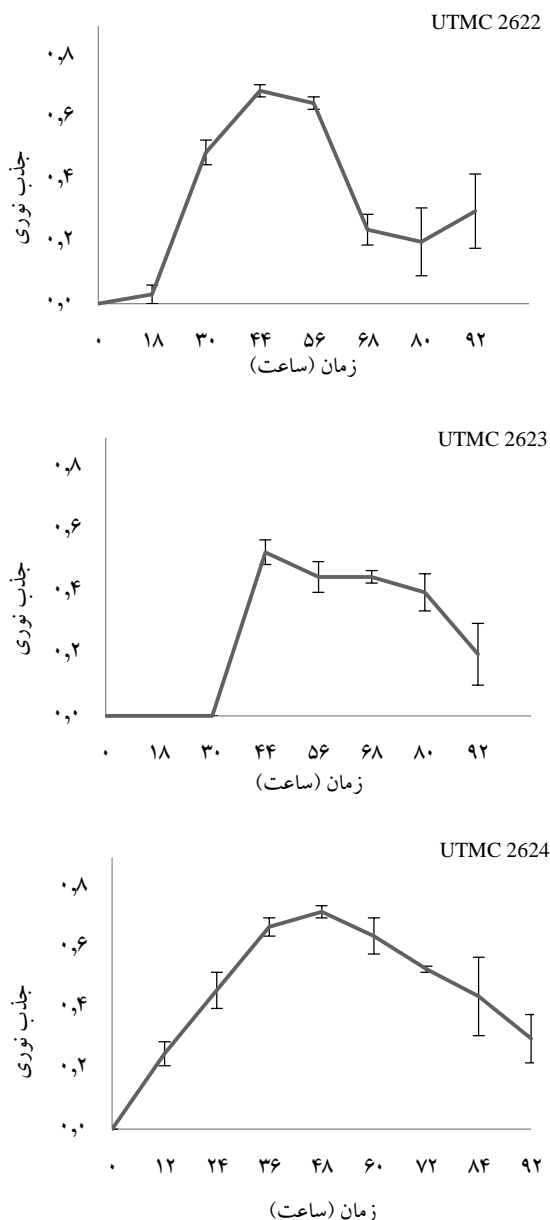
شکل ۱- تصاویر ریخت‌شناسی کلنی‌های جدایه‌های ۱۶۷، ۱۴۷، ۱۶۸ و ۱۱۰ در محیط جامد مناسب برای تولید کربنات کلسیم به ترتیب از چپ به راست

جدول ۶ آمده است. از میان سه جدایه منتخب، جدایه ۱۶۷ کمترین درصد شباهت را به سویه مشابه یافت شده داشت. جدایه‌های یادشده در مجموعه ریزموجودات دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند.

نتایج شناسایی مولکولی و تعیین توالی سه جدایه پرتو: نتیجه مقایسه توالی سه سویه برتر با سویه‌های مشابه در بانک‌های ژنی و کد دسترسی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای سه جدایه مدنظر در

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

ردیف	کد آزمایشگاه	کد مجموعه ریز موجودات دانشگاه تهران	کد دسترسی در NCBI	درصد شباهت	سویه مشابه	تعداد نوکلئوتید خوانش شده
۱	۱۶۷	۲۶۲۳	AM051268.2	۹۷/۰۱	<i>Bacillus alkalisediminis</i>	۱۳۳۸
۲	۱۱۰	۲۶۲۲	EU841500.1	۹۸/۹۱	<i>Bacillus horikoshi</i>	۱۲۸۴
۳	۱۴۷	۲۶۲۴	KP409413.1	۹۷/۷۹	<i>Bacillus clausii</i>	۷۷۴



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

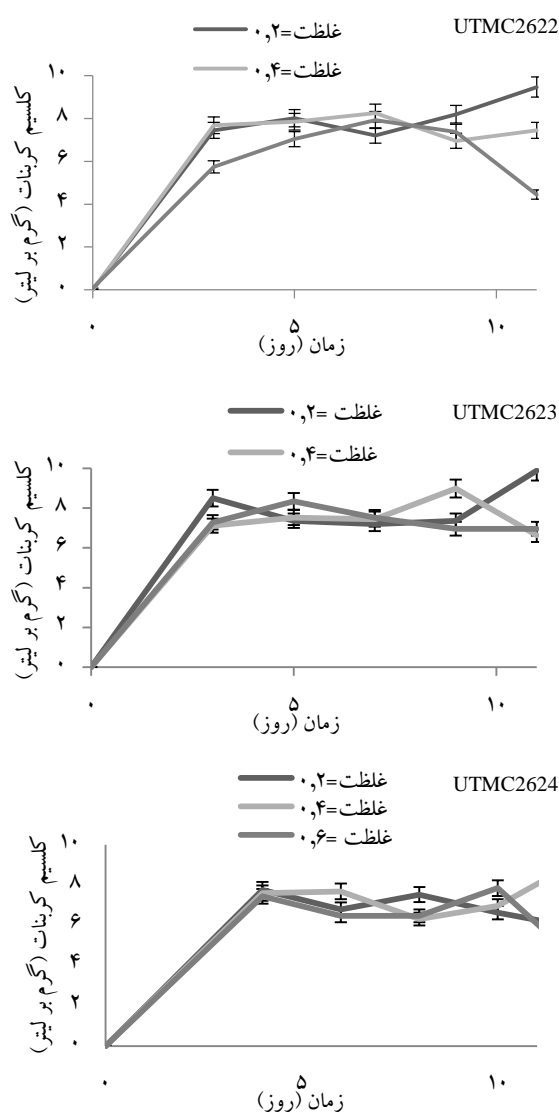
بررسی منحنی رشد جدایه‌های منتخب: در شکل ۲

تراکم نوری بیشینه برای سه باکتری نشان داده شده است. تراکم نوری در هر زمان تا حد زیادی نشان‌دهنده میزان رشد در آن زمان است (شکل ۲). میزان ویژه رشد برای سه جدایه برتر در بازه 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 ویژه رشد برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2624 در مدت زمان ۴۸ ساعت برابر 0.003 بر ساعت، برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2622 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر 0.003 بر ساعت و برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر با 0.006 بر ساعت است.

بررسی غلظت بهینه پیش‌سازهای کلسیم کلراید و

اوره برای تولید رسوب: در شکل ۳ میزان تولید سه سویه برتر در طول مدت آزمایش در سه غلظت مساوی اوره-کلسیم کلراید با مقادیر 0.2 ، 0.4 ، 0.6 مول بر لیتر نشان داده شده است. شدت ویژه تولید برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2624 در مدت زمان ۴۸ ساعت برابر 3×10^{-6} گرم بر لیتر، برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2622 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر $1/8 \times 10^{-6}$ گرم بر لیتر و برای باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 در مدت زمان ۴۴ ساعت برابر $2/9 \times 10^{-6}$ گرم بر لیتر است.

($P \leq 0.05$)؛ بنابراین غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ مولار از نظر تأثیر بر تولید باهم تفاوتی ندارند. با توجه به آزمون توکی انجام شده، اختلاف تولید کلسیم کربنات در روزهای مختلف نسبت به هم بی‌معنا ($P > 0.05$) و نسبت به لحظه صفر معنادار ($P \leq 0.05$) است. با توجه به دو آزمون انجام شده و به منظور صرفه‌جویی در مصرف ماده اولیه و زمان، غلظت ۰/۲ مولار از دوره-کلسیم کلراید و زمان پنج روز برای به دست آوردن بیشترین تولید انتخاب شد. بر اساس آزمون پست‌هاک انجام شده برای باکتری *Bacillus sp. UTMC 2623* تأثیر سه غلظت ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ مولار از دوره-کلسیم کلراید بر میزان تولید کلسیم کربنات اختلاف معناداری ندارد ($P > 0.05$). با توجه به آزمون توکی انجام شده، اختلاف تولید کلسیم کربنات در روزهای مختلف نسبت به هم بی‌معنا و نسبت به لحظه صفر معنادار است. با توجه به دو آزمون انجام شده و به منظور صرفه‌جویی در مصرف ماده اولیه و زمان، غلظت ۰/۲ مولار از دوره-کلسیم کلراید و زمان سه روز برای به دست آوردن بیشترین تولید انتخاب شد. بر اساس آزمون پست‌هاک انجام شده برای باکتری *Bacillus sp. UTMC 2624* تأثیر دو غلظت ۰/۴ و ۰/۶ مولار از دوره-کلسیم کلراید بر میزان کلسیم کربنات 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 کلسیم کربنات معنادار نیست ($P > 0.05$). از سویی با توجه به آزمون توکی^{۱۱} انجام شده اختلاف معناداری در میزان تولید کلسیم کربنات در روزهای مختلف وجود ندارد ($P > 0.05$) و تنها اختلاف معنادار در مقایسه هر یک از زمان‌های بررسی شده با لحظه صفر مشاهده می‌شود ($P \leq 0.05$). با توجه به دو آزمون انجام شده به منظور دستیابی به محصول بیشتر بدون در نظر گرفتن زمان، غلظت ۰/۴ مولار از دوره-کلسیم کلراید انتخاب شد. با توجه به تحلیل اعداد به دست آمده برای هر باکتری



شکل ۳- نمودار مقایسه میزان تولید رسوب کلسیم کربنات توسط سه جدایه برتر در سه غلظت مساوی دوره-کلسیم کلراید با مقادیر ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ مول بر لیتر در طول زمان

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس تک‌متغیره با دو فاکتور^{۱۱} در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام و وجود داشتن یا نداشتن تفاوت معنادار با سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P \leq 0.05$) بررسی شد. بر اساس آزمون پست‌هاک^{۱۱} انجام شده 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 دوره-کلسیم کلراید بر میزان تولید کلسیم کربنات معنادار است

و بلورهای نامنظم شکل‌های ۴-ب-۲ و ۴-ب-۳ مشاهده می‌شود. در شکل ۴-ب-۲ بیشتر ترکیبات تشکیل شده روی سطح بی‌شکل دیده می‌شوند که نشان‌دهنده هیدراتاسیون ذاتی بتن و ترکیبات محیط کشت و رسوبات سریع تشکیل شده است؛ همچنین در این قسمت پوشاندگی کمتری روی خلل و فرج سطح بتن دیده می‌شود. در شکل ۴-ب-۳ نیز رسوبات بی‌شکل با پوشاندگی 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.

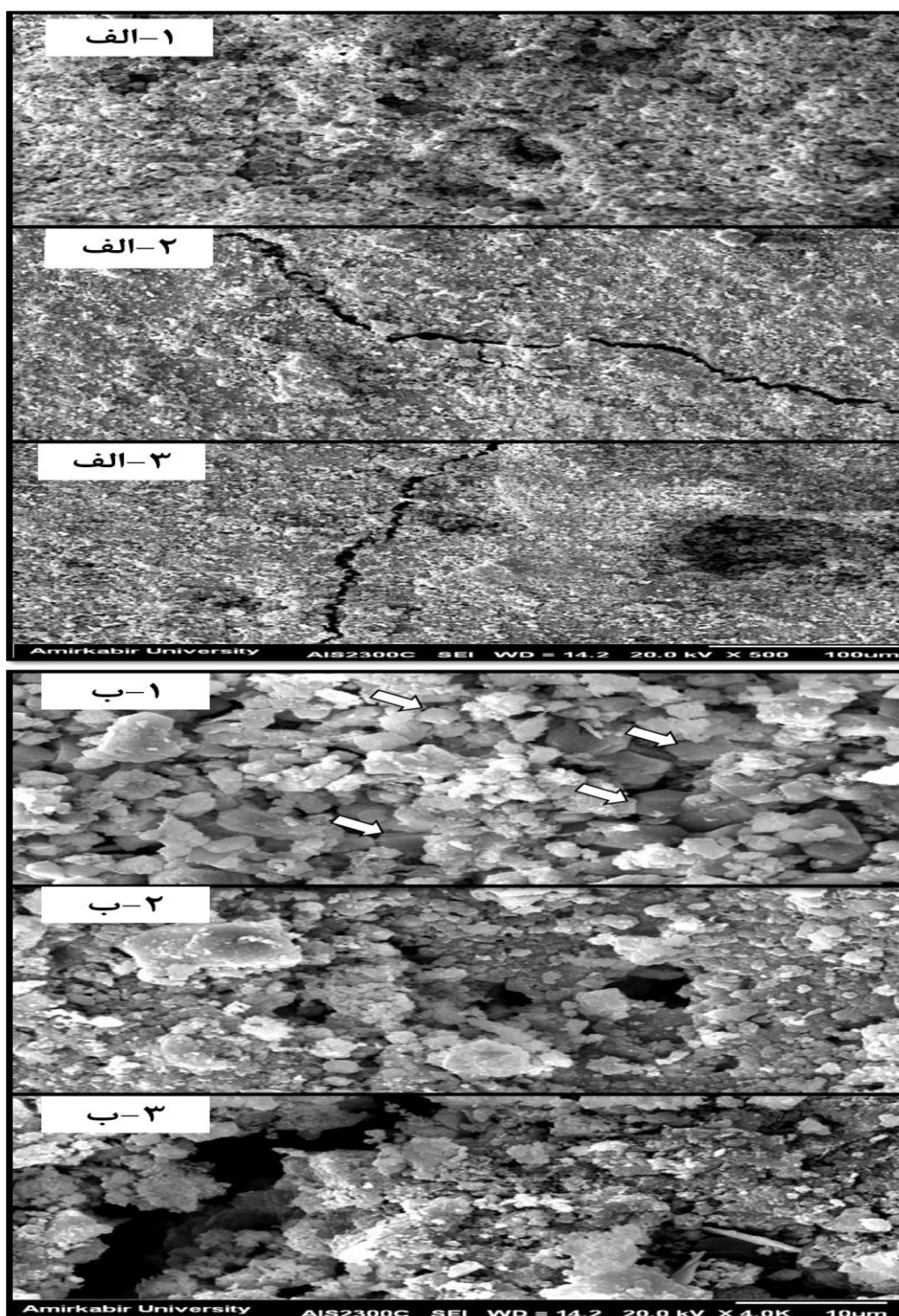
مشخصه‌یابی پراش پرتو ایکس: پیش‌ازاین، طبیعت بلوری رسوبات کلسیم کربنات تشکیل شده در فرایند ترمیم باکتریایی اثبات شده است (۳۰). از آنجاکه روش مشخصه‌یابی پراش پرتو ایکس ساختار بلوری را در نمونه تشخیص می‌دهد از آن برای تأیید یا رد حضور بلورهای کلسیم کربنات در رسوب حاصل از باکتری استفاده می‌شود. در شکل ۵ نتیجه مشخصه‌یابی XRD رسوب خشک‌شده باکتری باکتری *Bacillus sp. UTMC 2623* ارائه شده است. در شکل ۵-الف پیک‌های مربوط به بلورهای موجود در رسوب یادشده نشان داده شده است. از آنجاکه رسوب دارای مواد آلی باقیمانده از زیست توده باکتری و سایر مواد رسوب کرده در محیط است پیک‌ها تیز^{۱۴} نیستند و اغتشاش‌هایی^{۱۵} در فاصله 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 کلسیم کربنات با پنج پیک به دست آمده از مشخصه‌یابی رسوب هماهنگ هستند. اندیس‌های میلر پیک‌های مدنظر در جدول ۷ آمده است. اندیس‌های میلر زاویه هریک از وجوه یک بلور را نسبت به محورهای x، y و z در فضا نشان می‌دهند (۳۱).

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

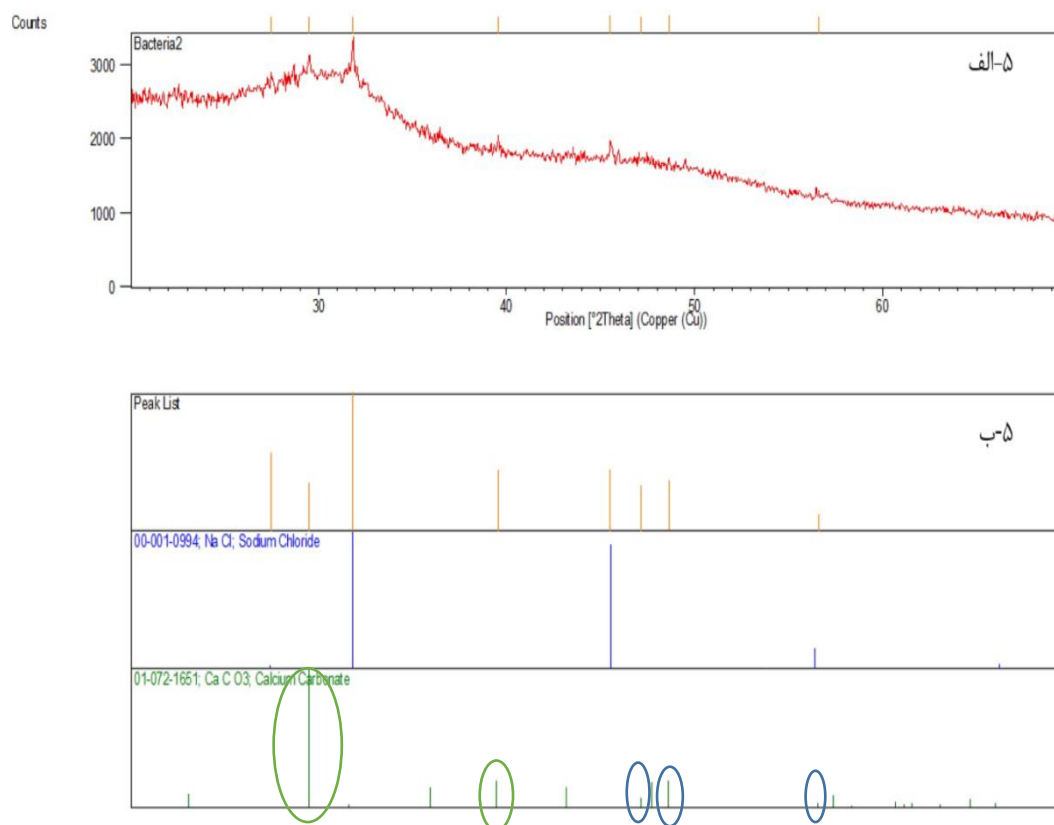
با توجه به نتایج تحلیل آماری داده‌های شکل ۳ و نتایج شناسایی مولکولی آنها مبنی بر شباهت کمتر این سویه به سویه مشابه *Bacillus sp. UTMC 2623*، بررسی ترمیم سطحی بتن و مشخصه‌یابی XRD تنها برای این جدایه انجام شد.

بررسی ترمیم سطحی بتن توسط جدایه برتر:

نمونه‌های تیمار شده 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 نمونه تیمار شده با باکتری *Bacillus sp. UTMC 2623* در سه گروه (۱) باکتری، کلسیم کلراید و اوره (۲) باکتری و (۳) کلسیم کلراید و اوره نشان داده شده است. در شکل ۴-الف سطح نمونه‌های تیمار شده با بزرگنمایی ۵۰۰× نشان داده شده است. ضخامت و تراکم لایه تشکیل شده روی سطح در شکل ۴-الف-۱ نسبت به ۴-الف-۲ و ۴-الف-۳ کاملاً مشخص است. این لایه نشان‌دهنده پوشاندگی سطحی ناشی از تیمار باکتریایی در حضور اوره و کلسیم کلراید است. در شکل ۴-ب سطح همان نمونه‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰× نمایش داده شده است. در شکل ۴-ب-۱ تعداد زیادی ساختارهای بلوری با ابعاد حدود ۲ تا ۵ میکرون به شکل شبه مکعب یا چندوجهی با اضلاع متفاوت دیده می‌شود. تراکم و ساختار نسبتاً بلوری لایه تشکیل شده روی سطح بتن در شکل ۴-ب-۱ در مقایسه با ساختارهای پراکنده



شکل ۴- الف. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح نمونه‌های تیمار شده در سه گروه (۱) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623، کلسیم کلراید و اوره (۲) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 (۳) کلسیم کلراید و اوره (بزرگنمایی $\times 500$)، ب. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی سطح نمونه‌های تیمار شده در سه گروه (۱) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 و کلسیم کلراید و اوره (۲) باکتری *Bacillus* sp. UTMC 2623 (۳) کلسیم کلراید و اوره (بزرگنمایی $\times 4000$)



شکل ۵- الف. الگوی مشخصه‌یابی XRD رسوب خشک‌شده باکتری *Bacillus sp.* UTMC 2623، ب. مقایسه پیک‌های به دست آمده از مشخصه‌یابی با پیک‌های مرجع بلورهای سدیم کلراید و کلسیم کربنات

جدول ۷- اندیس‌های میلر زوایای پراش بلور کلسیم کربنات تولیدشده توسط باکتری

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

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 سرباره

کوره آهن‌گدازی به عنوان جایگزین سیمان در مخلوط بتن استفاده می‌شوند (۳۳). برای سازه‌های در حال بهره‌برداری نیز مواد شیمیایی متعددی از جمله اپوکسی و سیلان‌ها به کار می‌روند که هزینه زیاد و مشکلات زیست‌محیطی آنها موجب توجه به باکتری‌ها (عوامل تجدیدپذیر و سازگار با طبیعت) شده است (۴). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهند سویه *Bacillus sp.*

کلسیم کربنات استفاده نمی‌کند و بنابراین آمونیوم تولید نمی‌کند بلکه از طریق اکسیداسیون فرمات در پیش‌ساز کلسیم فرمات داده شده به آن در محیط ترسیب، کلسیم کربنات 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). به منظور کاربرد تجاری ترسیب زیستی، منابع تغذیه‌ای باکتری و پیش‌ساز استفاده شده باید از نظر اقتصادی به صرفه و به همین علت ارزان و در دسترس باشند؛ برای نمونه، کاربرد شیرابه ذرت که در پژوهش‌های پیشین به عنوان محیط کشت استفاده شده است گزینه مناسبی است (۳۸). هرچند محصولات جانبی تولیدشده ناشی از به‌کاربردن این محیط‌ها باید بررسی شوند تا برای محیط‌زیست خطرناک نباشند (۳۷). تاکنون باکتری‌های متعددی از جنس *باسیلوس* به علت فراگیر بودن و مقاومت زیاد اسپوره‌ایشان به عوامل فیزیکی و شیمیایی در ترمیم سطحی و عمقی بتن مطالعه شده‌اند (۳۹). *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس اسفریکوس* از جمله ترمیم‌کننده‌های سطحی هستند (۳۴) اما تاکنون گزارشی مبنی بر عملکرد ترمیمی باکتری *باسیلوس آلکالی سدیمینیس* ارائه نشده است. این باکتری همان‌طور که اشاره شد به‌طور درخور توجهی کلسیم کربنات تولید می‌کند و از خاک ایران جداسازی شده است. نتایج پژوهش حاضر در معرفی این گونه به عنوان ترمیم‌کننده زیستی بومی سطح بتن استفاده می‌شوند.

UTMC 2623 با استفاده از مسیر اوره‌آز و منبع کلسیم می‌تواند ۸/۵ گرم در لیتر رسوب کلسیم کربنات طی سه روز تولید کند. این مقدار در مقایسه با مقدار کلسیم کربنات تولیدشده توسط باکتری‌های به‌کاررفته در مطالعه‌های پژوهشگران دیگر درخور توجه است؛ برای نمونه، بر اساس پژوهش کنگ^{۱۶} و همکاران باکتری *لیرینی باسیلوس اسفریکوس* توانایی تولید ۹/۸ گرم در لیتر رسوب کلسیم کربنات دارد (۳۴). از آنجا که این جدایه در اسیدیته زیاد (حدود ۹ تا ۱۰) قابلیت رشد و عملکرد دارد و باکتری ترمیم‌کننده سطح بتن باید بتواند اسیدیته زیاد بتن را تحمل کند (۳۵) به نظر می‌رسد توانمندی زیادی برای ترمیم سطحی بتن داشته باشد. نتایج مشخصه‌یابی XRD نیز حضور بلور کلسیم کربنات را در رسوب حاصل از جدایه 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 خلل و فرج و یا ترک‌های سطحی بتن دارد. ترسیب زیستی انجام شده از مسیر اوره‌آز با وجود تمام مزایای برشمرده مشکلاتی دارد که تاکنون از به‌کاربردن آن در مقیاس گسترده تجاری جلوگیری کرده است؛ برای نمونه، آمونیوم تولیدشده در مسیر اوره‌آز برای انسان و ریز موجودات خاک خطرناک است. باکتری‌ها این آمونیوم را به نیتریک‌اسید تبدیل می‌کنند و با کلسیم کربنات موجود واکنش می‌دهند و ترکیب محلول کلسیم‌نیترات را تولید می‌کنند که به‌طور خطرناکی موجب از بین رفتن سازه می‌شود. گندرا^{۱۷} و همکاران نوعی ترسیب زیستی را بررسی کردند که باکتری *متیلوکوکوس پرووس* OBPP^{۱۸} انجام می‌دهد. این باکتری از مسیر اوره‌آز برای تولید

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., Oriol 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., Ramezani-pour 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) Ramezaniapour 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* OBPP