

SỬ DỤNG DIATOMITE CỐ ĐỊNH VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* HU58 CHO BÊ TÔNG TỰ LIỀN VẾT NÚT

Nguyễn Ngọc Trí Huỳnh⁽¹⁾, Phạm Văn Hùng⁽¹⁾,

Nghị Mai Phương⁽¹⁾, Nguyễn Khánh Sơn⁽¹⁾

⁽¹⁾ Trường Đại học Bách Khoa (VNU-HCM)

Ngày nhận 29/12/2016; Chấp nhận đăng 29/01/2017; Email: nnthuynh@hcmut.edu.vn

Tóm tắt

Vi khuẩn được sử dụng như một thành phần của phối liệu bê tông nhằm tạo ra các sản phẩm khoáng đặc trưng. Các sản phẩm khoáng này đóng vai trò cải thiện tính chất cơ lý của vật liệu bê tông ở cả giai đoạn sớm lẫn dài ngày. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 được sử dụng cùng với diatomite Lâm Đồng, nhằm tạo ra vật liệu bê tông vi khuẩn có khả năng tự liền trong thời gian dài. Khả năng tự liền được khảo sát trong thời gian 24 tháng. Các phương pháp phân tích thành phần khoáng và vi cấu trúc vật liệu cho thấy mức độ hình thành các sản phẩm khoáng từ vi khuẩn ở dạng các tinh thể calcite tăng theo thời gian. Với các mẫu vừa (40x40x160mm), cả cường độ chịu nén (61MPa so với 57MPa) và cường độ chịu uốn (11MPa so với 9MPa) đạt cao hơn so với mẫu đối chứng không có vi khuẩn. Với quy mô mẫu lớn hơn, các mẫu bê tông (150x150x150mm) có cường độ chịu nén khoảng 18% so với mẫu bê tông thường không vi khuẩn (ở mốc 60 ngày). Nhằm kiểm soát quá trình tạo khoáng của vi khuẩn tốt hơn, vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 cùng các chất dinh dưỡng được cố định trong diatomite dưới dạng các viên nén trước khi trộn vào bê tông. Để khảo sát, vết nứt (1-1,8mm) được tạo ra trên các mẫu trụ sau khi xi măng kết thúc đông rắn. Các kết quả về thử nghiệm độ thấm nước qua vết nứt này chứng minh cho khả năng làm liền vết nứt của vi khuẩn.

Từ khóa: bê tông tự liền, calcite, *Bacillus subtilis*, bê tông vi khuẩn

Abstract

MATERIALS ANALYSIS AND PHYSIO-MECHANICAL PERFORMANCE OF TAILOR-MADE MORTAR/CONCRETE WITH BACTERIA

According to recent studies, physio-mechanical properties of concrete materials could be improved at both early and later age by the incorporation of precipitated product from bacteria. In this experiment, we studied the use of *Bacillus subtilis* HU58 protected in diatomite micro-pores structure to formulate bacterial concrete. The results obtained from mineral composition and microstructure analysis revealed that an increasing crystallinity of calcite precipitated by bacteria over incubation time. Such generating product prove its useful in the enhancement of both compressive and flexural strengths of bacteria modified mortar in comparison with controlled Portland cement mortar: 61MPa > 57MPa (in compression) and 11MPa > 9MPa (in flexion). Similar results was obtained on sample series of bacterial concrete with higher compressive strength (around 18 %) after 60 days. Furthermore, we could take into account a self-healing ability on artificial crack (from 1 to 1.8mm in width) with formulated mortars that contain diatomite immobilized bacteria.

1. Tổng quan

Trong xu hướng phát triển bền vững, các vật liệu “thông minh” với khả năng tự liền, tự hàn gắn là một trong số những giải pháp mang nhiều triển vọng. Từ đó, việc chế tạo bê tông vi khuẩn hay bê tông sinh học là một bước phát triển tích cực trong lĩnh vực vật liệu xây dựng. Cơ chế sinh học trong vật liệu bê tông tự liền vết nứt mô phỏng theo hiện tượng liền xương tự nhiên của cơ thể người. Các vết nứt tế vi hoặc các vết nứt hờ được tạo thành trong pha nền xi măng thủy hóa có thể tự liền lại bằng chất kết dính tự nhiên từ bên trong. So với các kỹ thuật tự liền khác cho bê tông như tự liền hóa học hoặc tự liền tự nhiên, cơ chế tự liền sinh học có nhiều ưu thế hơn và đồng thời thân thiện hơn với môi trường [1]. Trong vật liệu bê tông. Quá trình tạo khoáng sinh học cho phép lấp đầy, làm liền và ngăn các vết nứt cũng như các khuyết tật và lỗ xóp mao quản phát triển sau quá trình đóng rắn của xi măng. Các nghiên cứu hiện tại về mảng đề tài này cho thấy có nhiều chủng vi khuẩn khác nhau trong điều kiện phòng thí nghiệm có thể tạo ra vật liệu bê tông có khả năng tự liền vết nứt theo cơ chế này.

Các chủng vi khuẩn có khả năng chịu môi trường kiềm cao, chịu được nhiệt thủy hóa và các điều kiện khắc nghiệt trong bê tông đã được nghiên cứu và ứng dụng. *Bacillus pasteurii* và *Bacillus pseudofirmus cohnii* DSM 8715 đã được nghiên cứu và cho khả năng chế tạo bê tông tự liền [2]. Dung dịch vi khuẩn và chất dinh dưỡng cần thiết bao gồm calcium lactate hoặc urea và CaCl_2 với mật độ vi khuẩn đủ cao cho khả năng tạo khoáng [2]. Theo nghiên cứu của Al-Thawadi và Ghosh cùng cộng sự, hầu hết các kết quả khả thi đều cho thấy khoáng calcite tạo thành từ bên trong bê tông do tác nhân vi khuẩn tiếp tục phát triển theo thời gian với tạo ra hiệu ứng tự liền [3]. Trong phạm vi của nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào hai nội dung chính. Thứ nhất, chúng tôi cố gắng làm sáng tỏ cơ chế tự liền kết hợp giữa sử dụng vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 và diatomite với cấu trúc xóp tự nhiên làm môi trường bảo vệ, cố định vi khuẩn. Từ mục đích này, vi khuẩn và các chất dinh dưỡng sẽ được trộn với diatomite dạng bột và tạo hình dạng viên hình trụ bọc hồ xi măng. Sau đó, các viên diatomite đã cố định vi khuẩn này được sử dụng để nghiên cứu khả năng tự liền của vật liệu bê tông, cũng như độ bền cơ của vữa xi măng. Cuối cùng, khả năng, hiệu quả cố định vi khuẩn trong cấu trúc xóp của diatomite, cộng với thí nghiệm chống thấm nước qua vết nứt sẽ được thảo luận và phân tích với các mẫu vật liệu.

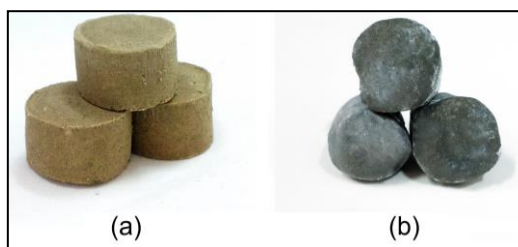
2. Phương trình, bảng và hình vẽ

Dung dịch vi khuẩn được chuẩn bị từ urea, CaCl_2 , và vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 (mật độ 10^9 cfu/g) với tỷ lệ phối trộn cho trong bảng 1. Chúng tôi sử dụng nguồn nguyên liệu diatomite Lâm Đồng tự nhiên. Diatomite nguyên liệu có hàm lượng silica dạng gel khoảng 70% khối lượng, các khoáng alumino-silicate chiếm 20%. Hỗn hợp phối liệu đồng nhất của vi khuẩn, chất dinh dưỡng và bột diatomite sấy khô được trộn đều trong 10 phút bằng máy trộn vừa kiểu hành tinh. Với một lượng khoáng sét tương đối cao trong thành phần, hỗn hợp diatomite đáp ứng được phương pháp tạo hình ép dẻo để tạo ra các viên hình trụ cao 10mm, đường kính 10mm (hình 1). Tỷ lệ giữa dung dịch vi khuẩn và bột diatomite được giữ cố định ở 1,26% khối lượng xi măng trong mẫu. Các viên diatomite sau đó được phủ hồ xi măng ($w/c=0,5$) và phơi khô tự nhiên trong không khí trước khi sử dụng như một thành phần cốt liệu cho bê tông.

Bảng 1. Tỷ lệ phối trộn dung dịch vi khuẩn (1,26% khối lượng xi măng) trong các mẫu vữa

	<i>Bacillus subtilis</i> HU58	Urea	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Nutrient Broth	Tổng
Phần trăm khối lượng	0,49	0,44	0,22	0,11	1,26

Hình 1. Viên diatomite cố định vi khuẩn (a) và viên diatomite sau khi bọc hồ xi măng (b)



Các vật liệu khác dùng cho phối liệu bê tông bao gồm xi măng Portland Hà Tiên PC40, cát tiêu chuẩn, cốt liệu đá ($D_{\max} = 20\text{mm}$) và nước máy. Nguyên liệu dùng cho chế tạo bê tông thỏa mãn các tiêu chuẩn chất lượng Việt Nam TCVN. Một lượng nhỏ dung dịch vi khuẩn (1,26% khối lượng xi măng) được thêm vào hỗn hợp vữa tươi giống như một phụ gia hóa học nhằm tạo ra vữa vi khuẩn. Các mẫu vữa dạng thanh $40 \times 40 \times 160\text{mm}$ (vữa vi khuẩn và vữa đối chứng không vi khuẩn) được tạo hình và dưỡng hộ trong điều kiện phòng thí nghiệm (theo TCVN 6016:1995) đến các mốc đo cường độ cơ học. Các mẫu bê tông đối chứng mác M300 cũng được chế tạo theo tiêu chuẩn Việt Nam. Mẫu bê tông vi khuẩn được chế tạo theo hai nhóm. Một nhóm sử dụng các viên diatomite cố định vi khuẩn (0,5% khối lượng xi măng), trộn như một dạng cốt liệu cho bê tông. Nhóm còn lại sử dụng dung dịch vi khuẩn (0,5% khối lượng xi măng) trộn trực tiếp với nước máy. Tất cả các mẫu bê tông được tạo hình trong khuôn lập phương, mẫu kích thước $150 \times 150 \times 150\text{mm}$. Sau khi tháo khuôn, các mẫu được dưỡng hộ trong điều kiện phòng thí nghiệm trong 60 ngày để đo cường độ chịu nén. Với thí nghiệm về khả năng tự liền, chúng tôi sử dụng các mẫu hình trụ (đường kính 90mm). Mẫu trụ này được cắt thành từng lát dày 20cm tại mốc 14 ngày tuổi. Sau đó, các mẫu được bẻ gãy thành 2 phần (dùng phương pháp ép chèn). Các mẫu đã bẻ gãy được giữ lại đúng vị trí và dưỡng hộ trong bể nước máy. Các mẫu này sau đó 28 ngày được vớt lên để tiến hành các phân tích vi cấu trúc và đánh giá mức độ tự liền.

3. Kết quả

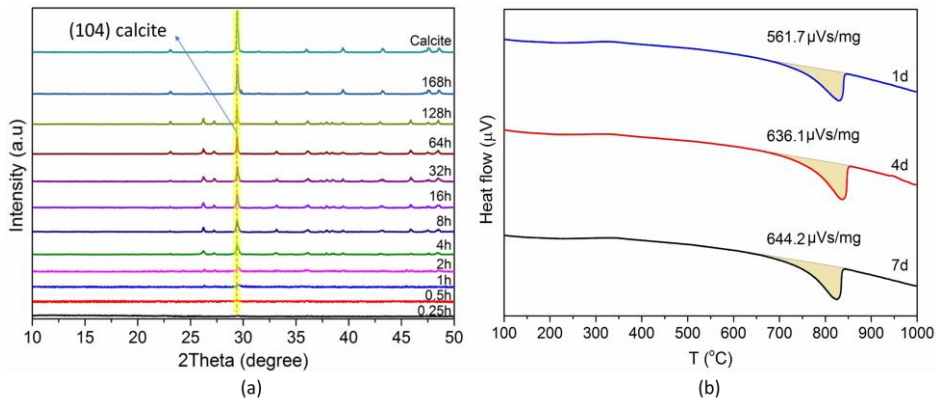
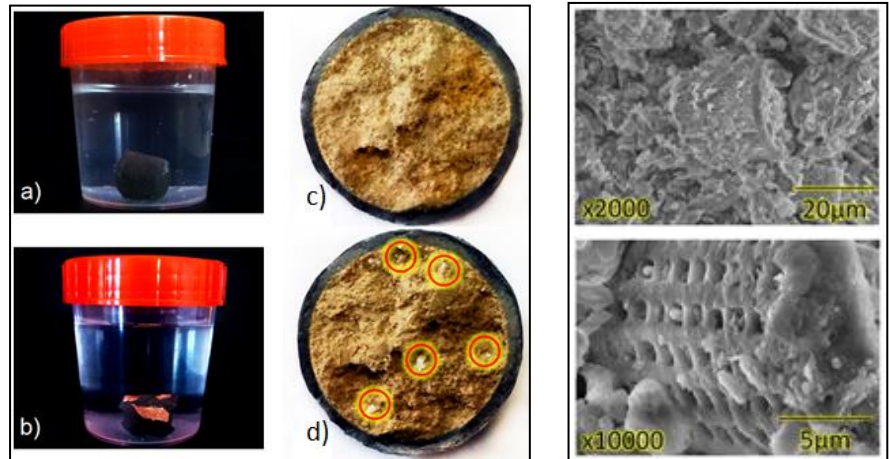
3.1. Khả năng tạo calcite trong cấu trúc xốp của diatomite

Như đã đề cập, chúng tôi đặt mục tiêu kiểm soát quá trình tạo khoáng bằng các viên diatomite với cấu trúc xốp tự nhiên. Hình 2 mô tả thí nghiệm viên diatomite cố định vi khuẩn ngâm trong nước máy: viên còn nguyên vẹn bọc hồ xi măng (a) và viên bị bẻ ra làm hai phần (b). Trong hình 1c và 1d, có thể nhận thấy trên bề mặt gãy của viên diatomite (sau 3 ngày), có sự xuất hiện nhiều sản phẩm rắn màu trắng. Từ hình ảnh bên trong viên diatomite cố định vi khuẩn, ta nhận thấy có sự khác biệt rõ ràng. Bên trong viên không bị phá hủy ban đầu, khi ngâm trong nước, vi khuẩn được bảo vệ bởi diatomite và lớp vỏ hồ xi măng nên hầu như không có cơ hội tiếp xúc nước và không khí bên ngoài. Tuy nhiên, sau khi viên bị phá hủy và ngâm lại vào nước, vi khuẩn tiếp xúc đầy đủ với nước và không khí, quá trình hoạt động tạo calcite của vi khuẩn diễn ra. Có thể thấy rõ các vị trí màu trắng bên trong mẫu. Phần bột này nhiều khả năng là các tinh thể calcite với màu trắng đặc trưng.

Chúng tôi tách lấy và cho các sản phẩm màu trắng này qua sàng $90\mu\text{m}$ để phân tích thành phần khoáng. Kết quả phân tích XRD (hình 3) cho thấy có sự tăng liên tục cường độ peak nhiễu xạ đặc trưng của calcite trong các mẫu theo thời gian. Phương pháp phân tích nhiệt lượng vi sai DSC cũng được sử dụng để đánh giá sự tạo thành calcite thông qua peak thu nhiệt đặc trưng của quá trình phân hủy calcite ở 840°C . Các kết quả phân tích này cho thấy, rõ ràng theo thời gian trong môi trường đầy đủ độ ẩm, không khí, quá trình tạo khoáng của vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 diễn ra trong cấu trúc xốp của diatomite. Trong ảnh vi cấu trúc SEM (hình 2), có thể thấy được vi khuẩn tại

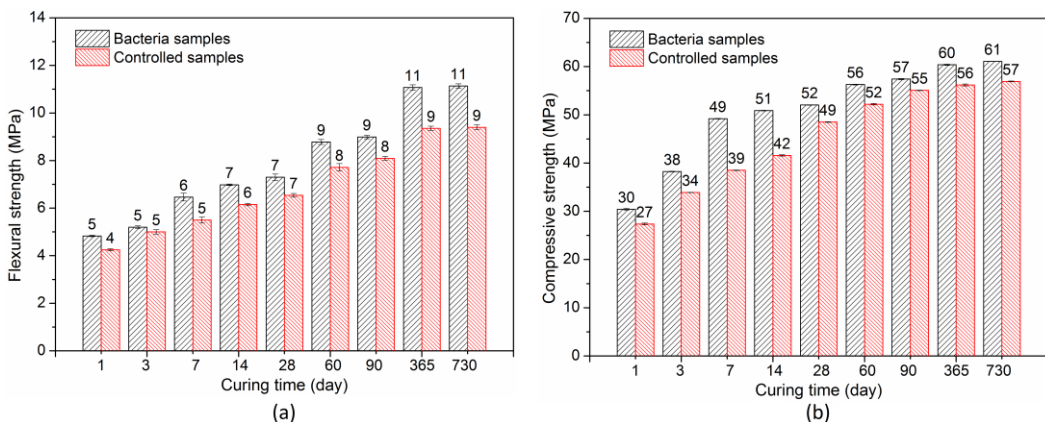
các vị trí lỗ xốp của diatomite. Khi so sánh với các nghiên cứu về hình thái vi khuẩn của Zweers cùng cộng sự, [4] và ảnh TEM của *Bacillus subtilis* trong nghiên cứu của Yoon [5], có sự tương đồng rõ rệt giữa cấu trúc dạng que đặc trưng của vi khuẩn. Hơn nữa, sau thời gian 5 tháng, chỉ có một lượng nhỏ vi khuẩn sụt giảm ($2,7 \times 10^8$ cfu/g) so với mật độ HU58 ban đầu là 10^9 cfu/g. Có đến 80% lượng vi khuẩn vẫn còn sống và có khả năng tạo khoáng trong viên diatomite.

Hình 2. Trái: (a) viên diatomite trong nước; (b) viên diatomite bề đôi ngâm trong nước; (c) bề mặt bên trong viên diatomite đã bề đôi; (d) calcite tạo thành bên trong viên diatomite. Right: ảnh SEM diatomite cố định vi khuẩn



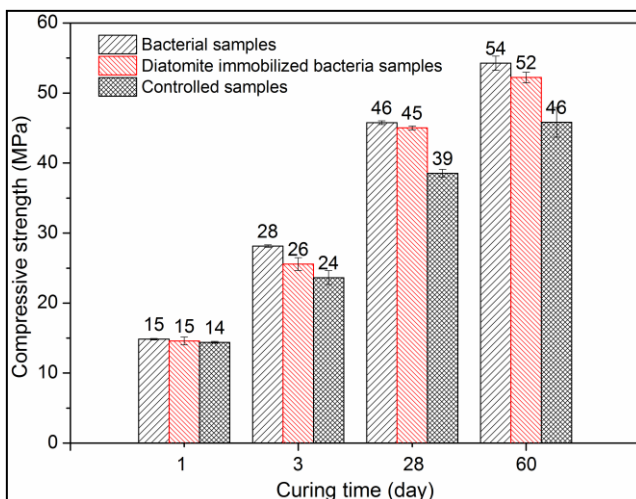
Hình 3. (a) phổ XRD của các sản phẩm màu trắng trong viên diatomite; (b) kết quả phân tích nhiệt DSC của các sản phẩm trắng

3.2. Độ bền cơ của các mẫu vi khuẩn



Hình 4. Cường độ chịu uốn (a) và cường độ chịu nén (b) của các mẫu vữa vi khuẩn

Kết quả đo trong hình 4 cho thấy, cả cường độ chịu uốn và chịu nén của các mẫu vữa vi khuẩn đều cao hơn so với mẫu đối chứng không vi khuẩn. Sau mốc thời gian 2 năm dưỡng hộ, cường độ chịu nén và chịu uốn của mẫu vữa vi khuẩn lần lượt đạt 61MPa và 11MPa so với 57MPa và 9MPa của mẫu đối chứng. Trong quy mô mẫu nhỏ, dung dịch vi khuẩn được phân tán trực tiếp vào hỗn hợp phối liệu mà không sử dụng viên nén diatomite. Quá trình tạo khoáng calcite trong pha nền xi măng thủy hóa diễn ra mãnh liệt ngay từ đầu. Cường độ chịu nén khi sử dụng *Bacillus subtilis* HU58 (cao hơn 36% so với mẫu đối chứng) cho kết quả tốt hơn khi so sánh với kết quả sử dụng *Shewanella* trong nghiên cứu của Ghosh cùng cộng sự [6] (cao hơn 25% so với mẫu đối chứng).

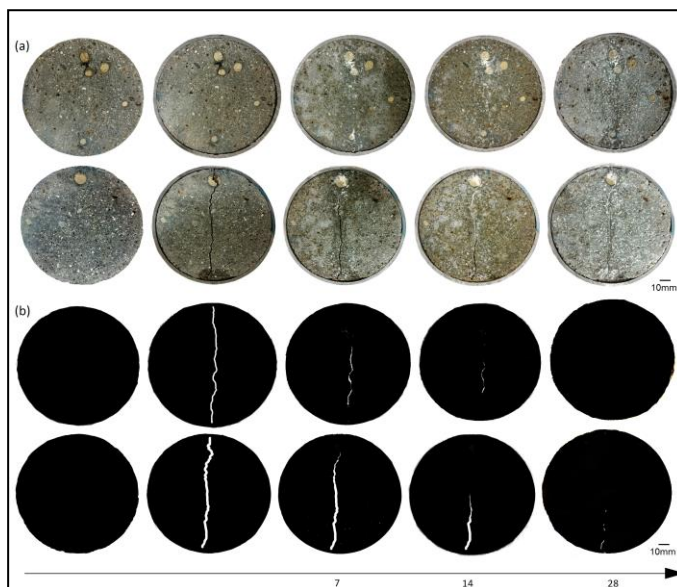


Hình 5. Cường độ chịu nén của mẫu bê tông vi khuẩn và mẫu đối chứng

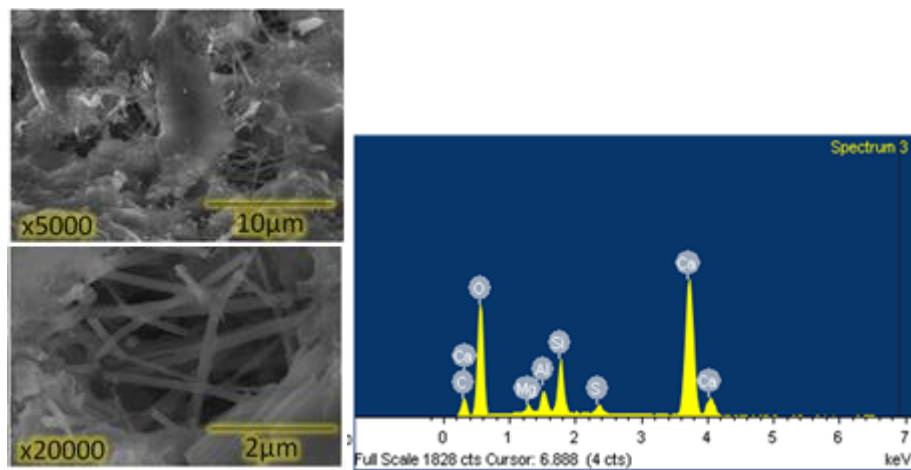
Với các kết quả đo cường độ chịu nén trong hình 5, cả hai nhóm mẫu vi khuẩn (vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định trong diatomite) đều cho kết quả cao hơn mẫu đối chứng. Các mẫu bê tông khi sử dụng vi khuẩn cố định trong diatomite cho giá trị cường độ thấp hơn so với mẫu bê tông vi khuẩn trộn trực tiếp không cố định. Có thể nhận thấy, vi khuẩn được bảo vệ trong cấu trúc xốp của diatomite và lớp vỏ hồ xi măng bọc quanh viên, khả năng tiếp xúc với môi trường ngoài thuận lợi cho quá trình tạo khoáng không cao bằng vi khuẩn tự do. Tuy nhiên, với mức tăng 17% so với mẫu đối chứng, mẫu bê tông vi khuẩn cố định trong diatomite vẫn cho kết quả cao hơn so với nghiên cứu của Wang [7] sử dụng diatomite dạng bùn và trộn chung với nước (cao hơn 15% so với mẫu đối chứng). Các kết quả cho thấy được hiệu quả bảo vệ vi khuẩn khỏi môi trường khắc nghiệt của bê tông trong thời gian dài, từ đó phát huy được khả năng tạo khoáng sinh học, giúp gia tăng cường độ và tạo hiệu ứng tự liền vết nứt.

3.3. Khả năng tự liền vết nứt

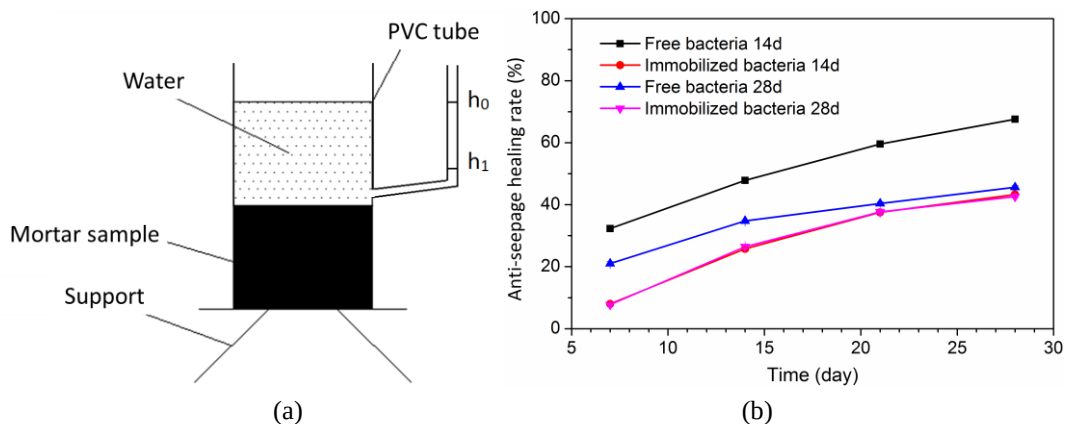
Hình 6. Ảnh chụp vết nứt 1,8mm được lấp đầy theo thời gian (a) và ảnh âm bản (b)



Thí nghiệm đánh giá mức độ tự liền qua các mẫu trụ (đường kính 90mm, chiều dày 20mm) với vết nứt được tạo ra có chiều rộng 1,8mm. Hình 6a cho thấy vết nứt cắt ngang qua làm vỡ viên diatomite cố định vi khuẩn ra. Trong khoảng thời gian dưỡng hộ ẩm từ 3 đến 28 ngày, hai phần của lát mẫu hình trụ liền lại với nhau. Phân tích vi cấu trúc bằng phương pháp SEM kết hợp thành phần hóa EDX cho kết quả ở hình 7. Sản phẩm khoáng calcite được hình thành dưới dạng các tinh thể hình que rõ ràng (hình 7). Cả phân tích định tính và phân tích định lượng được sử dụng để chứng minh cho sự hình thành calcite làm liền vết nứt theo thời gian. Có thể nhận thấy vi khuẩn được kích hoạt khả năng tạo khoáng khi viên nén diatomite bị phá vỡ. Vi khuẩn cùng các chất dinh dưỡng gặp môi trường ngoài thuận lợi tạo khoáng lấp đầy là dần làm kín vết nứt. So sánh với kết quả trong nghiên cứu của Wang [8], sử dụng *Bacillus sphaericus* LMG 22557, vết nứt với chiều rộng tối đa 0,97mm; nghiên cứu của chúng tôi sử dụng diatomite dạng viên nén cố định *Bacillus subtilis* HU58 cho phép làm liền vết nứt 1,8mm.



Hình 7. Ảnh SEM và phổ EDX sản phẩm lấp đầy vết nứt



Hình 8. Sơ đồ bố trí thí nghiệm đánh giá khả năng tự liền (a) và biểu đồ tốc độ liền vết nứt theo thời gian của mẫu vi khuẩn tự do và vi khuẩn cố định (b)

Hình 8 mô tả thí nghiệm về khả năng chống thấm nước qua vết nứt tự liền theo thời gian. Các kết quả đo cho phép đánh giá khả năng tự liền qua công thức tốc độ chống thấm nước = $(V_0 - V_t)100\%/V_t$, trong đó, V_0 là tốc độ thấm nước ban đầu, V_t là tốc độ thấm nước của mẫu tự liền tại thời điểm t . Có sự khác biệt về độ dốc trên đường cong tốc độ tự liền giữa hai nhóm mẫu khi chọn mốc tạo vết nứt là 14 và 28 ngày tuổi. Do sự giảm mật độ vi khuẩn, khả năng tự

liền của mẫu vi khuẩn tự do (không được bảo vệ trong diatomite) giảm theo thời gian. Thời điểm tạo vết nứt càng lâu, mật độ vi khuẩn còn sống càng thấp, khả năng tự liền càng thấp. Ngược lại, mật độ vi khuẩn được duy trì ở mức cao, không có sự khác biệt về độ dốc trong đồ thị về khả năng tự liền của mẫu diatomite cố định vi khuẩn.

4. Kết luận

Trong phạm vi của nghiên cứu này, diatomite Lâm Đồng giúp cố định và bảo vệ vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58. Sản phẩm khoáng calcite tạo thành nhờ hoạt tính sinh học vi khuẩn khi viên diatomite vỡ ra, vi khuẩn trong các lỗ xốp của diatomite được tiếp xúc với môi trường ngoài. Khi trộn các viên diatomite cố định vi khuẩn vào vữa, sau thời gian 2 năm, cường độ chịu nén và chịu uốn của mẫu cao hơn so với mẫu đối chứng không vi khuẩn lần lượt là 7% và 22%. Cường độ chịu nén của mẫu bê tông có viên nén diatomite cố định vi khuẩn cũng cao hơn mẫu đối chứng (14% ở 60 ngày). Các kết quả phân tích góp phần chứng minh và làm rõ cho cơ chế tự liền vết nứt nhờ vào hoạt tính sinh học vi khuẩn. Kết quả đo độ thấm nước qua vết nứt cho thấy hiệu quả của việc cố định vi khuẩn trong diatomite khi chế tạo bê tông tự liền. Hiệu quả tự liền sau 28 ngày đạt được rất cao. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ đi vào định lượng và khảo sát động học kết tinh calcite nhờ vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 trong bê tông với môi trường nước máy và nước biển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Talaiekhazan, A. Keyvanfar, A. Shafaghat, R. Andalib, M.A. Majid, M.A. Fulazzaky, et al., *A Review of Self-healing*. Concrete Research Development, J. Environ. Treat. Tech. 2 (2014) 1–11.
- [2] S.K. Ramachandran, V. Ramakrishnan, S.S. Bang, *Remediation of concrete using microorganisms*, ACI Mater. J. 98 (2001).
<http://www.concrete.org/Publications/InternationalConcreteAbstractsPortal.aspx?m=details&i=10154> (accessed February 26, 2015).
- [3] S.M. Al-Thawadi, *Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand*, J Adv Sci Eng Res. 1 (2011) 98–114.
- [4] J.C. Zweers, I. Barák, D. Becher, A.J. Driessen, M. Hecker, V.P. Kontinen, et al., *Towards the development of Bacillus subtilis as a cell factory for membrane proteins and protein complexes*, Microb. Cell Factories. 7 (2008) 10.
- [5] K.-Y. Yoon, J.H. Byeon, J.-H. Park, J. Hwang, *Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles*, Sci. Total Environ. 373 (2007) 572–575.
- [6] V. Wiktor, H.M. Jonkers, *Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete*, Cem. Concr. Compos. 33 (2011) 763–770.
- [7] R. Pei, J. Liu, S. Wang, M. Yang, *Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete*, Cem. Concr. Compos. 39 (2013) 122–130.
- [8] J.Y. Wang, H. Soens, W. Verstraete, N. De Belie, *Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores*, Cem. Concr. Res. 56 (2014) 139–152.