



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Laura Slendzokaite

BIOLOGINIO BETONO SAVYBIŲ TYRIMAS

**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL SELF-HEALING CONCRETE
PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vilnius, 2023

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Laura Slendzokaite

BIOLOGINIO BETONO SAVYBIŲ TYRIMAS

**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL SELF-HEALING CONCRETE
PROPERTIES**

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijų studijų programa, valstybinis kodas 6211FX018

Biotechnologijos studijų kryptis

Vadovas

prof. dr. Jaunius Urbonavičius
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Konsultantas

dokt. Augusta Ivaškė
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Lietuvių kalbos konsultantas

lekt. dr. Vaida Buivydienė
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė)

Vilnius, 2023

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Studijų kryptis: Biotechnologijos
Studijų programa: Nanobiotechnologija , valstybinis kodas 6211FX018
Specializacija: Nanobiotechnologija

TVIRTINU
Katedros vedėjas
Jaunius Urbonavičius
2023-05-24

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS

Nr. NBTfm-21-3787

Vilnius

Studentas (-ė): Laura Slendzokaitė

Baigiamojo darbo tema: Biologinio betono savybių tyrimas

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas pagal numatytą studijų kalendorinį grafiką.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Baigiamojo darbo užduotis: Ištirti sepiolito tinkamumą bakterijų imobilizavimui ir panaudojimui biologinio savaime išgyjančio betono gamyboje. Optimizuoti imobilizuojamų bakterijų kiekį sepiolite. Įvertinti skirtingų bakterijų rūšių gebėjimą vykdyti mineralizaciją. Ištirti skirtingų rūšių bakterijų gyvybingumą betono matricoje. Ištirti biologinio betono plyšių užpildymo efektyvumą.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantai: Augusta Ivaškė.

Vadovas profesorius Jaunius Urbonavičius

<table border="1"> <tr><td>Vilniaus Gedimino technikos universitetas</td></tr> <tr><td>Fundamentinių mokslų fakultetas</td></tr> <tr><td>Chemijos ir bioinžinerijos katedra</td></tr> </table>		Vilniaus Gedimino technikos universitetas	Fundamentinių mokslų fakultetas	Chemijos ir bioinžinerijos katedra	<table border="1"> <tr> <td>ISBN</td> <td>ISSN</td> </tr> <tr> <td>Egz. sk.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Data-.....-.....</td> <td></td> </tr> </table>		ISBN	ISSN	Egz. sk.		Data-.....-.....	
Vilniaus Gedimino technikos universitetas												
Fundamentinių mokslų fakultetas												
Chemijos ir bioinžinerijos katedra												
ISBN	ISSN											
Egz. sk.												
Data-.....-.....												
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Antrosios pakopos studijų Nanobiotechnologijos programos magistro baigiamasis darbas</td> </tr> <tr> <td>Pavadinimas</td> <td>Biologinio betono savybių tyrimas</td> </tr> <tr> <td>Autorius</td> <td>Laura Slendzokaite</td> </tr> <tr> <td>Vadovas</td> <td>Jaunius Urbonavicius</td> </tr> </table>				Antrosios pakopos studijų Nanobiotechnologijos programos magistro baigiamasis darbas		Pavadinimas	Biologinio betono savybių tyrimas	Autorius	Laura Slendzokaite	Vadovas	Jaunius Urbonavicius	
Antrosios pakopos studijų Nanobiotechnologijos programos magistro baigiamasis darbas												
Pavadinimas	Biologinio betono savybių tyrimas											
Autorius	Laura Slendzokaite											
Vadovas	Jaunius Urbonavicius											
		<table border="1"> <tr> <td></td> <td>Kalba: lietuvių</td> </tr> </table>			Kalba: lietuvių							
	Kalba: lietuvių											
<table border="1"> <tr> <td> Anotacija Baigiamajame magistro darbe nagrinėjamos savaime atsikuriančio biologinio betono gerinimo galimybės, eksperimentiškai vertintas technologijos efektyvumas. Atliktas tyrimas su skirtingų rūšių bakterijų kamienais <i>A. pseudofirmus</i>, <i>S. cohnii</i> ir <i>H. halodurans</i>, kurie formuoja sporas, gali išgyventi šarminėje betono aplinkoje ir nusodinti kalcio karbonatą. Bakterijų sporos su maistinėmis medžiagomis imobilizuotos ant mineralinės medžiagos - sepiolito, kuris tarnauja kaip nešiklis. Naudojant nešiklį siekiama apsaugoti bakterijų sporas nuo tiesioginio kontakto su betono matrica. Gauti rezultatai parodė, kad bakterijų sporų gyvybingumo sumažėjimas per 21 dieną neužtikrina tyrime naudoto nešiklio efektyvumo ir tinkamumo apsaugoti bakterijų sporas. Atliktas mineralizacijos vertinimo tyrimas patvirtino, kad bakterijų kamienai geba nusodinti kalcio karbonatą. Tai patvirtina ir plyšių užpildymo efektyvumo eksperimentų rezultatai. Plyšys, kurio plotis buvo 0,106 mm, visiškai užpildytas per 14 dienų bandiniuose su <i>H. halodurans</i> bakterijų sporomis. Betono bandiniuose su imobilizuotomis <i>A. pseudofirmus</i> bakterijų sporomis, pastebėtas visiškas plyšio užpildymas per 35 dienas, kai jis buvo 0,128 mm, o su <i>S. cohnii</i> bakterijų sporomis didžiausias plyšio gijimo koeficientas per 35 dienas buvo 0,505, kai plyšio plotis - 0,105 mm. Didesni plyšiai (> 0,128 mm) per stebėtą laikotarpį užpildyti nebuvo. Išnagrinėjus literatūrą ir gautus rezultatus, pateikiamos baigiamojo darbo išvados ir rekomendacijos. Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas. Darbo apimtis - 58 p. teksto be priedų, 12 iliustr., 11 lent., 58 bibliografiniai šaltiniai. Atskirai pridedami darbo priedai. </td> </tr> </table>				Anotacija Baigiamajame magistro darbe nagrinėjamos savaime atsikuriančio biologinio betono gerinimo galimybės, eksperimentiškai vertintas technologijos efektyvumas. Atliktas tyrimas su skirtingų rūšių bakterijų kamienais <i>A. pseudofirmus</i>, <i>S. cohnii</i> ir <i>H. halodurans</i>, kurie formuoja sporas, gali išgyventi šarminėje betono aplinkoje ir nusodinti kalcio karbonatą. Bakterijų sporos su maistinėmis medžiagomis imobilizuotos ant mineralinės medžiagos - sepiolito, kuris tarnauja kaip nešiklis. Naudojant nešiklį siekiama apsaugoti bakterijų sporas nuo tiesioginio kontakto su betono matrica. Gauti rezultatai parodė, kad bakterijų sporų gyvybingumo sumažėjimas per 21 dieną neužtikrina tyrime naudoto nešiklio efektyvumo ir tinkamumo apsaugoti bakterijų sporas. Atliktas mineralizacijos vertinimo tyrimas patvirtino, kad bakterijų kamienai geba nusodinti kalcio karbonatą. Tai patvirtina ir plyšių užpildymo efektyvumo eksperimentų rezultatai. Plyšys, kurio plotis buvo 0,106 mm, visiškai užpildytas per 14 dienų bandiniuose su <i>H. halodurans</i> bakterijų sporomis. Betono bandiniuose su imobilizuotomis <i>A. pseudofirmus</i> bakterijų sporomis, pastebėtas visiškas plyšio užpildymas per 35 dienas, kai jis buvo 0,128 mm, o su <i>S. cohnii</i> bakterijų sporomis didžiausias plyšio gijimo koeficientas per 35 dienas buvo 0,505, kai plyšio plotis - 0,105 mm. Didesni plyšiai (> 0,128 mm) per stebėtą laikotarpį užpildyti nebuvo. Išnagrinėjus literatūrą ir gautus rezultatus, pateikiamos baigiamojo darbo išvados ir rekomendacijos. Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas. Darbo apimtis - 58 p. teksto be priedų, 12 iliustr., 11 lent., 58 bibliografiniai šaltiniai. Atskirai pridedami darbo priedai.								
Anotacija Baigiamajame magistro darbe nagrinėjamos savaime atsikuriančio biologinio betono gerinimo galimybės, eksperimentiškai vertintas technologijos efektyvumas. Atliktas tyrimas su skirtingų rūšių bakterijų kamienais <i>A. pseudofirmus</i>, <i>S. cohnii</i> ir <i>H. halodurans</i>, kurie formuoja sporas, gali išgyventi šarminėje betono aplinkoje ir nusodinti kalcio karbonatą. Bakterijų sporos su maistinėmis medžiagomis imobilizuotos ant mineralinės medžiagos - sepiolito, kuris tarnauja kaip nešiklis. Naudojant nešiklį siekiama apsaugoti bakterijų sporas nuo tiesioginio kontakto su betono matrica. Gauti rezultatai parodė, kad bakterijų sporų gyvybingumo sumažėjimas per 21 dieną neužtikrina tyrime naudoto nešiklio efektyvumo ir tinkamumo apsaugoti bakterijų sporas. Atliktas mineralizacijos vertinimo tyrimas patvirtino, kad bakterijų kamienai geba nusodinti kalcio karbonatą. Tai patvirtina ir plyšių užpildymo efektyvumo eksperimentų rezultatai. Plyšys, kurio plotis buvo 0,106 mm, visiškai užpildytas per 14 dienų bandiniuose su <i>H. halodurans</i> bakterijų sporomis. Betono bandiniuose su imobilizuotomis <i>A. pseudofirmus</i> bakterijų sporomis, pastebėtas visiškas plyšio užpildymas per 35 dienas, kai jis buvo 0,128 mm, o su <i>S. cohnii</i> bakterijų sporomis didžiausias plyšio gijimo koeficientas per 35 dienas buvo 0,505, kai plyšio plotis - 0,105 mm. Didesni plyšiai (> 0,128 mm) per stebėtą laikotarpį užpildyti nebuvo. Išnagrinėjus literatūrą ir gautus rezultatus, pateikiamos baigiamojo darbo išvados ir rekomendacijos. Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas. Darbo apimtis - 58 p. teksto be priedų, 12 iliustr., 11 lent., 58 bibliografiniai šaltiniai. Atskirai pridedami darbo priedai.												
<table border="1"> <tr> <td> Prasminiai žodžiai: biologinis betonas, bakterijos, sporos, plyšių sandarinimas, mineralinė medžiaga, sepiolitas, nešiklis, bakterijų gyvybingumas, biomineralizacija, savaiminis gijimas. </td> </tr> </table>				Prasminiai žodžiai: biologinis betonas, bakterijos, sporos, plyšių sandarinimas, mineralinė medžiaga, sepiolitas, nešiklis, bakterijų gyvybingumas, biomineralizacija, savaiminis gijimas.								
Prasminiai žodžiai: biologinis betonas, bakterijos, sporos, plyšių sandarinimas, mineralinė medžiaga, sepiolitas, nešiklis, bakterijų gyvybingumas, biomineralizacija, savaiminis gijimas.												

<table border="1"> <tr><td>Vilnius Gediminas Technical University</td></tr> <tr><td>Faculty of Fundamental Sciences</td></tr> <tr><td>Department of Chemistry and Bioengineering</td></tr> </table>		Vilnius Gediminas Technical University	Faculty of Fundamental Sciences	Department of Chemistry and Bioengineering	<table border="1"> <tr> <td>ISBN</td> <td>ISSN</td> </tr> <tr> <td>Copies No.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Date-.....-.....</td> <td></td> </tr> </table>		ISBN	ISSN	Copies No.		Date-.....-.....	
Vilnius Gediminas Technical University												
Faculty of Fundamental Sciences												
Department of Chemistry and Bioengineering												
ISBN	ISSN											
Copies No.												
Date-.....-.....												

Master Degree Studies Nanobiotechnology study programme Master's Graduation Thesis	
Title	Investigation of Biological Self-Healing Concrete Properties
Author	Laura Slendzokaitė
Academic supervisor	Jaunius Urbonavičius

	Thesis language: Lithuanian
--	------------------------------------

Annotation The final master's thesis examines the possibilities of improving self-healing biological concrete, experimentally evaluated the efficiency of the technologies. A study was carried out with different types of bacterial strains <i>A. pseudofirmus</i>, <i>S. cohnii</i> and <i>H. halodurans</i>, which form spores, can survive alkali in concrete environment and precipitate calcium carbonate. The spores of bacteria with nutrients are immobilized in a mineral substance, sepiolite, which serves as a carrier. A carrier is used to protect bacterial spores from direct contact with the concrete matrix. The obtained results showed that the decrease in the viability of bacterial spores within 21 days does not ensure the effectiveness and suitability of the carrier used in the study to protect bacterial spores. A mineralization evaluation study was conducted and confirmed that the bacterial strains can precipitate calcium carbonate. This is also confirmed by the results of the crack filling efficiency experiments. A crack with a width of 0.106 mm was cured in 14 days in samples with <i>H. halodurans</i> spores. In concrete samples with immobilized <i>A. pseudofirmus</i> bacterial spores, a noticeable crack filling was observed in 35 days when it was 0.128mm, while with <i>S. cohnii</i> spores the highest bacterial recovery factor in 35 days was 0.505, when the crack area was 0.105 mm. Larger cracks (> 0.128 mm) did not heal during the observation period. After analyzing the literature and the results obtained, the conclusions and recommendations of the thesis are presented. Thesis consists of 58 p. text without appendices, 12 pictures, 11 tables, 58 bibliographical entries. Appendices are included.
--

Keywords: biological concrete, bacteria, spores, crack sealing, mineral material, sepiolite, carrier, bacterial viability, biomineralization, self-healing.

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	8
LENTELIŲ SĄRAŠAS	10
SANTRUMPOS	11
ĮVADAS	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Savaimė išgyjantis betonas	14
1.1.1. Mikro kapsulės	14
1.1.2. Absorbuojantys polimerai	15
1.1.3. Priedai skatinantys betono užsigydymą	15
1.1.4. Bakterijų įkapsuliavimas	16
1.2. Bakterijų gyvybingumas betone	17
1.3. Biomineralizacija	19
1.3.1. Biomineralizacijos keliai	19
1.3.2. Plyšio sandarinimas	22
1.4. Imobilizavimas	24
1.4.1. Imobilizavimo medžiagos	24
1.4.2. Bioreagentų imobilizavimas	26
1.5. Genetiškai modifikuotų bakterijų panaudojimas ir rizikų valdymas	27
2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI	29
2.1. Medžiagos ir prietaisai	29
2.1.1. Medžiagos	29
2.1.2. Tirpalai ir terpės	29
2.1.3. Prietaisai	30
2.1.4. Bakterijų kamienai	31
2.2. Metodai	31
2.2.1. Naktinės kultūros auginimas	31
2.2.2. Bakterijų sporų paruošimas	31

2.2.3.	Bakterijų gyvybingumo tikrinimas skiedimų-sėjimo metodu	32
2.2.4.	Sporų formavimosi įvertinimas mikroskopu	32
2.2.5.	Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tikrinimas	33
2.2.6.	Bakterijų ir maistinių medžiagų imobilizavimas mineraluose	33
2.2.7.	Bakterijų skaičiaus sepiolite nustatymas	34
2.2.8.	Betono mėginio ruošimas ir bakterijų gyvybingumo tikrinimas	34
2.2.9.	Betono bandinių savaiminio gijimo stebėjimas vandenyje.....	35
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	37
3.1.	Sporų įvertinimas mikroskopu	37
3.2.	Bakterijų sporų suspensijos gyvybingumo tikrinimas.....	39
3.3.	Bakterijų sporų suspensijos imobilizavimo mineraluose vertinimas	39
3.4.	Bakterijų sporų gyvybingumo betono matricoje vertinimas	41
3.5.	Betono bandinių savaiminio gijimo stebėjimas vandenyje	43
3.6.	Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tikrinimas.....	49
	IŠVADOS.....	51
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52
	A Priedas	59

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

1 pav. Bakterijų elgesys betone. Įtrūkimo paviršiuje esančias bakterijas suaktyvinamos vandens molekulių ir vykdydamos MICP nusodina kalcito kristalus, kad užsandarintų plyšį ir apsaugotų betoną nuo išorinio cheminio poveikio (Šovljanski et al., 2022)	23
2 pav. Savaiminio gijimo efekto priklausomybė nuo įtrūkimo pločio, esant plačiam įtrūkimui eksperimentiškai stebimas sandarinimo efektas skiriasi nuo teoriškai numatyto (Šovljanski et al., 2022).....	24
3 pav. Betono bandinių paruošimas gijimo procesui: A) Betono bandiniai maišomi ir kietinami formose; B) Iš formos išimtas betono bandinys; C) D) Bandinys po plyšio paruošimo ir suklijavimo; E) Bandinių paruošimas gydymui vandens vonelėje.....	35
4 pav. Bakterijų nuotraukos naudojant šviesinio mikroskopo 1000 kartų didinimą, žaliai mėlyna spalva nusidažiusios - bakterijų sporos, rožine – vegetatyvinės ląstelės. A) C) E) bakterijos prieš sporuliaciją po vienos paros šarminėje mitybinėje terpėje (nuotraukose matyti mėlynos spalvos dažų artefaktai) (<i>A. pseudofirmus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>H. halodurans</i>); B) D) F) bakterijos po 4 dienų sporuliacijos galutinėje paruoštoje suspensijoje (<i>A. pseudofirmus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>H. halodurans</i>)	38
5 pav. Betono bandinys po 3 dienų kietėjimo su jame matomomis imobilizuoto sepiolito dalelėmis (raudonos rodyklės).....	41
6 pav. Į sepiolitą įkapsuliuotų <i>A. pseudofirmus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>H. halodurans</i> bakterijų gyvybingumas cemento matricoje po 3, 7 ir 14 dienų.....	43
7 pav. Betono bandinių su imobilizuotomis <i>H. halodurans</i> bakterijomis savaiminio gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,106 mm. Matavimai atlikti prieš eksperimentą (0 diena), po 7 ir 14 dienų, apačioje pateiktas plyšių gijimo efektyvumo (H_c) grafikas su priklausomybe nuo laiko	45
8 pav. Betono bandinių plyšių nuotraukos: A) B) bandinių su sepiolite imobilizuotomis <i>H. halodurans</i> bakterijomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,085 ir 0,118 mm. C) bandinio su sepiolite imobilizuotomis <i>A. pseudofirmus</i> bakterijomis gijimo mikroskopinis stebėjimo rezultatas, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,128 mm. Dešinėje pateiktas plyšių gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų stebėtas pilnas plyšio užsandarinimas ($H_c = 1$)	47

9 pav. Kontrolinio betono bandinio su maistinėmis medžiagomis imobilizuotu sepiolitu be bakterijų sporų gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,101 mm. Dešinėje pateiktas plyšio gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų stebėtas dalinis plyšio užsandarinimas ($H_c = 0,674$)	48
10 pav. Betono bandinio su sepiolite imobilizuotomis <i>S. cohnii</i> bakterijų sporomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,105 mm. Dešinėje pateiktas plyšio gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų plyšio užpildymo efektyvumas buvo 0,505.....	48
11 pav. <i>A. pseudofirmus</i> , <i>S. cohnii</i> ir <i>H. halodurans</i> bakterijų mineralizacijos vykdymo tyrimas. Terpėse su kalcio acetatu ir kalcio laktatu bakterijos nusodino kalcio karbonato kristalus (kristalų susidarymo vieta pažymėta rodyklėmis), lyginant su kontrolinėmis grupėmis, kuriose kristalai nesusidarė	50
12 pav. Betono bandinių plyšių nuotraukos: A) bandinių su sepiolite imobilizuotomis <i>H. halodurans</i> bakterijomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, pradinis plyšio plotis (p_i) sumažėjo nuo 0,337 mm iki 0,177 mm, gijimo efektyvumo koeficientas po 35 dienų – 0,474; B) bandinio su sepiolite imobilizuotomis <i>A. pseudofirmus</i> bakterijomis gijimo mikroskopinis stebėjimo rezultatas, pradinis plyšio plotis (p_i) nuo 0,109 mm sumažėjo iki 0,090 mm, gijimo efektyvumo koeficientas – 0,176.....	59

LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 lentelė Optimalaus pH ir maksimalaus gydymo efektyvumo palyginimas skirtingiems mikroorganizmams	16
2 lentelė Kapsuliavimo medžiagos	25
3 lentelė. Tyrime naudotos cheminės medžiagos ir jų tiekėjai	29
4 lentelė. Tyrime naudoti tirpalai ir jų sudėtis	29
5 lentelė. Tyrime naudotos terpės ir jų sudėtis.....	30
6 lentelė. Tyrime naudoti prietaisai.....	30
7 lentelė. Betono bandinių sudėtis	34
8 lentelė. Bakterijų sporų suspensijos koncentracijos nustatytos skiedimo – sėjimo metodu .	39
9 lentelė. Bakterijų sporų imobilizavimo mineraluose vertinimas.....	40
10 lentelė. Prieš gijimo procesą vidutiniškai apskaičiuotas plyšių plotis	44
11 lentelė. Pradiniai plyšių pločiai ir gijimo koeficientai skirtingų bakterijų kultūrų mėginiuose	44

SANTRUMPOS

DNR	deoksiribonukleorūgštis
DPA	dipikolino rūgštis
KFV	kolonijas formuojantys vienetai
MICP	mikroorganizmų sukeltas kalcio karbonato nusodinimas (angl. <i>Microbially induced calcium carbonate precipitation</i>)
OT	optinis tankis
SAP	aukščiausios rūšies absorbuojantys polimerai (angl. <i>Super-absorbent polymers</i>)
SF	skiedimo faktorius
Tris	tris(hidroksimetil)aminometanas
UV	ultravioletinė spinduliuotė

IVADAS

Natūraliųjų šaltinių mažėjimas ir jų atsinaujinimo sutrikimai kelia vis daugiau susirūpinimo. Betonas yra viena iš pagrindinių statybinių medžiagų, plačiai naudojama dėl mažos kainos, tvirtų savybių, paprasto pagaminimo, atsparumo ugniai. Tačiau veikiant aplinkos veiksniams laikui bėgant susidaro maži ar didesni įtrūkimai dėl medžiagos traukimosi, apkrovos, temperatūros variacijų ar žemės drebėjimų (Zhu & Dittrich, 2016). Mokslininkai ėmė nagrinėti betono ilgaamžiškumo problemą, siekdami išsaugoti dabartinius išteklius, pailginti medžiagos naudojimo ir gyvavimo laiką be papildomų pastangų ateityje (Pungrasmi et al., 2019). Gerinant medžiagos savybes, didėja jos patrauklumas bei naudingumas. Betono konstrukcijos pačios geba sumažinti atsiradusius nedidelius plyšius, tačiau tai gali būti įgyvendinta tik tinkamomis sąlygomis, pavyzdžiui, esant tinkamam drėgnumui (Ferrara et al., 2018). Vietoj to, kad būtų kuriamos stipresnės naujos medžiagos, efektyviau yra paruošti jas savaiminiam susitaisymui, taip sumažinant kaštus tvarkymo darbams ir pailginant medžiagų gyvavimo trukmę (Fahimizadeh et al., 2020). Naujų būdų paieškos sukurti tvaresnį ir tvirtesnį, mažiau trūkinėjantį betoną, priartino prie inovacijos – savaime atsikuriančio betono. Tokia metodo idėja gimė stebint natūralų augalų ir gyvūnų odos gijimą. Savaime atsikuriantis betonas, dar kitaip žinomas kaip biologinis betonas, tai mišinys, kuriame be tradicinių komponentų: cemento, smėlio ir vandens, taip pat yra priedų, pavyzdžiui, nanodalelių, polimerų ar bakterijų ir joms reikalingų maistinių medžiagų (Jang et al., 2021).

Biologinis betonas vis dažniau pripažįstamas kaip ekologiškas sprendimas, galintis pakeisti senąsias statybines medžiagas. Moksliniai įrodymai gali nukreipti tinkama linkme tobulinant mikroorganizmų naudojimą biocementavimo mechanizmuose, gaminant biologines statybines medžiagas, kurios būtų panašios į įprastinius išteklius. (Iqbal et al., 2021). Tiriami nauji metodai ir technikos siekiant išsiaiškinti ir įvertinti, kaip bakterijos gali padėti atkurti betone atsiradusius įtrūkimus. Savaiminiame atsinaujinančiame betone priklauso nuo daugelio veiksnių, tokių kaip bakterijų tipas, nešikliai, bakterijų gyvavimo laikas, bakterijų aktyvacija ir bakterijų įvedimo būdai (Khaliq & Ehsan, 2016). Toks panaudojimas išsaugotų betono savybes, ilgaamžiškumą, be papildomo žmogaus darbo.

Mokslinių tyrimų duomenimis, mineralinė medžiaga yra tinkama aplinka bakterijų sporoms imobilizuoti ir naudoti savaime atsikuriančiame betone (Sandalci et al., 2021). Šiame moksliniame darbe tiriama mineralinės medžiagos, sepiolito, kaip imobilizavimo priemonės bakterijų sporoms tinkamumas, kuriant savaime atsikuriantį betoną. Tyrimo naujumas atsispindi metodikos tobulinime, siekiama sumažinti barjerą tarp betono matricos ir gydymo elementų, išvengiant papildomo kapsuliavimo etapo, tuo pačiu norima išsiaiškinti technologijos

efektyvumas, kaip nešiklio medžiaga apsaugo bakterijų sporas esant tiesioginiam kontaktui su betonu. Remiantis literatūros apžvalga, kuriamas metodas pasižymi aktualiomis savybėmis: išvengiama papildomo laiko ir resursų kapsuliavimo etapui, supaprastinama imobilizavimo eiga.

Darbo tikslas – ištirti sepiolito tinkamumą bakterijų imobilizavimui ir panaudojimui biologinio savaime atsikuriančio betono gamyboje.

Darbo tikslui pasiekti iškelti uždaviniai:

1. Optimizuoti imobilizuojamų bakterijų kiekį sepiolite.
2. Įvertinti skirtingų bakterijų rūšių gebėjimą vykdyti mineralizaciją.
3. Ištirti skirtingų rūšių bakterijų gyvybingumą betono matricoje.
4. Ištirti biologinio betono plyšių užpildymo efektyvumą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Savaimė išgyjantis betonas

Betonas yra viena iš pagrindinių konstrukcinių medžiagų pasaulyje, nes pasižymi patraukliomis savybėmis kaip maža kaina, tvirtumas ir atsparumas jėgai. Betonas turi didelę gniuždomosios apkrovos laikomąją galią. Nepaisant šių savybių pagrindinė problema su kuria susiduriama yra tai, kad betonas jautrus įtrūkimams, nes turi santykinai silpną atsparumą tempimui. Įtrūkimai gali atsirasti dėl susitraukimo kietėjant, perkrovos, temperatūros pokyčių, žemės drebėjimų (Riad et al., 2022). Gamybos proceso metu ar veikiant išorinėms jėgoms atsiradusios tuštumos ir pažeidimai gali sukelti didesnius įtrūkimus ateityje. Vandens patekimas per kapiliarines poras ar įtrūkimus sukelia armatūros pažeidimus taip žymiai sumažindamas betono gyvavimo trukmę (Lucas et al., 2016). Norint išsaugoti betono savybes, įtrūkimus būtina sutvarkyti laiku. Tradiciniai priežiūros metodai, tokie kaip betono paviršiaus sandarinimas, glaistymas, betono keitimas, konstrukcijų tvirtinimas (Shen et al., 2021) ar cheminių klijų panaudojimas, yra netik brangūs, reikalaujantys daug laiko, bet gali būti atliekami tik kai pažeidimai pastebimi žmogaus (Riad et al., 2022).

Betone yra stebimas autogeninis savigydos metodas (Amran et al., 2022; Riad et al., 2022) dėl natūralaus ilgalaikio hidratacijos proceso cemente pasižymi savybe iki tam tikro laipsnio natūraliai atsinaujinti savaimė. Hidratacijos procesas gali tęstis ilgą laiką po sukietėjimo, dėl šios priežasties pradiniai įtrūkimai gali natūraliai užsidaryti esant drėgnoms sąlygoms. Natūrali galimybė savaimė užsigydyti gali būti pagreitinta betono matricą papildant specifiniais priedais ir/ar įkapsuliuojant bakterijas su mitybinėmis medžiagomis (van Tittelboom & de Belie, 2013). Toks mechanizmas, kuris priklauso nuo priedų, pridėtų į betono matricą, dar vadinamas – autonominiu savaiminio gijimo mechanizmu (Amran et al., 2022). Savaiminiam betono gijimui palengvinti naudojami metodai, tokie kaip mikrokapsulės, absorbuojantys polimerai, priedai, bakterijų įkapsuliavimas arba šių metodų modifikacijos juos derinant tarpusavyje.

1.1.1. Mikrokapsulės

Betono įtrūkimų taisymui gali būti pritaikytos kapsulinės arba mikrovaskulinės sistemos, kuriose yra atrinktų savaimė gydančių medžiagų, pavyzdžiui, kapsulės užpildomos skystomis gydomosiomis medžiagomis, tokiomis kaip metilmetakrilatas (Van Tittelboom & De Belie, 2013), kalcio nitratas, epoksidinė derva, poliuretanai ir absorbuojantys polimerai (Amran et al., 2022). Esant betono pažeidimui atsiradęs įtrūkimas sulaužo kapsulės pluoštą ir reagentas

išlaisvinamas iš vamzdelio (Van Tittelboom & De Belie, 2013). Išlaisvinus gydomąją medžiagą, plyšio sukurta erdvė užpildoma polimerizacijos, gydomaisiais produktais ir betonas suremontuojamas. Šios sistemos efektyvumas yra santykinai mažas, nes išskiriamosios medžiagos gali nepakakti pažeistai vietai užpildyti (Lucas et al., 2016). Norint naudoti mikrokapsulių gydymo būdą, svarbu atkreipti dėmesį į kapsulių paruošimą, jų mechanines savybes ir, kad po gydymo kapsulės vietoje susidaro ertmė, kurią taip pat reikia užpildyti (Shen et al., 2021).

1.1.2. Absorbuojantys polimerai

Įtrūkimų užpildymui gali būti pritaikomi aukščiausios rūšies absorbuojantys polimerai (*angl. Super-absorbent polymers, SAP*). Hidrogeliai sudaryti iš hidrofilinių kryžminiais ryšiais sujungtų polimerų, intensyviai brinkdami gali sugerti didelį kiekį skysčių ir sudaryti netirpius gelius. SAP įmaišomas į betono mišinį, o vėliau susiformavus plyšiui ir į jį patekus drėgmės, gelis išbrinksta ir uždaro tuštumą (Snoeck et al., 2014). Kaip ir bet kurie cheminio betono priedai, SAP galiojimo laikas yra ribotas, turi būti laikomasi griežtų saugojimo ir naudojimo rekomendacijų, tačiau cheminiai pokyčiai laikui bėgant gali paveikti sorbcijos savybes, o tai gali veikti ir betoną (Mechtcherine et al., 2021). Tyrimas atskleidė, kad cementinėje matricoje esantys SAP yra stabilūs iki 8 metų ir beveik nesuyra. Tai svarbu, nes jie gali būti veiksmingai naudojami sandarinimo ir gydymo tikslais iki mažiausiai 8 metų statybos eksploatavimo trukmės, o tai rodo didesnę gijimo pajėgumą, palyginti su kontroliniu mėginiu be SAP (Snoeck & De Belie, 2019).

1.1.3. Priedai skatinantys betono užsigydymą

Tam tikri cemento priedai gali ištverti tolesnę betono hidrataciją po pradinio kietėjimo etapo, o tai leidžia išlaikyti medžiagų savybes ir prisidėti prie betono savaiminio užsigydymo (Huang & Ye, 2015). Nustatyta, kad lakiųjų pelenų (*angl. fly ash*), SiO_2 ir Al_2O_3 mišinių, kalkių ar kai kurių karbonatų derinių naudojimas betono mišinyje paskatina ilgalaikius hidratacijos reiškinius, suteikiančius betonui savaiminio gijimo savybių. Visi šie priedai pasirodė esą veiksmingi skatinant betono rekristalizaciją kartu su plyšių užpildymu ir užtikrina šį procesą per trumpą laiką (Lucas et al., 2016). Šio autogeninio gijimo sėkmė labai priklauso nuo betone likusio nehidratuoto cemento ir pridėto mineralo kiekio. Iki šiol tai apsiribojo mažesniu gyjančių įtrūkimų pločiu, ilgesniu gijimo laiku ir stiprumo grąžinimu. Autogeninis gijimas, priešingai nei autologinis, nereikalauja, kad savaiminį gijimą stimuliuojantis agentas būtų pašalintas iš kapsulės ar tiekimo tinklo (Amran et al., 2022).

1.1.4. Bakterijų įkapsuliavimas

Vienas iš svarbiausių betono autonominio savaiminio gijimo metodų yra bakterijų įvedimas į matricą. Norint pradėti gijimą tik po pažeidimo, bakterijos imobilizuojamos skaidulose ar kapsuliuojamos. Tačiau iškyla sukurtų talpyklų pasiskirstymo problema, kadangi betonas yra nevienalytė medžiaga, turinti platų dalelių ir porų dydžio diapazoną (Lucas et al., 2016).

Biologinis įtrūkimų taisymas padeda sumažinti dideles betono priežiūros išlaidas ekologijai draugišku būdu. Į betono mišinį patalpinamos bakterijos vykdančios kalcio karbonato nusodinimą ir jų maistinės medžiagos. Tikimasi, kad bakterijos padidins betono ilgaamžiškumą *in situ* nusodindamos kalcio karbonatą, tokiu būdu užpildydamos betone atsiradusius plyšius. Norint panaudoti šį metodą reikia išspręsti pagrindinius iššūkius, kurie nėra palankūs bakterijų gyvenimui betono matricoje: didelis šarmingumas (pH iki 13), aukšta temperatūra ir slėgis gaminimo metu, mažas ir ribotas deguonies aprūpinimas. Dėl šių betono savybių bakterijų kamienas turi būti atsparus šarminei aplinkai ir sugebėti formuoti sporas, kad galėtų išgyventi tokiomis ekstremaliomis sąlygomis. Specifiniai mikroorganizmai gali būti įterpiami į betono matricą (Lee & Park, 2018). Remiantis skirtingais eksperimentų duomenimis 1 lentelėje pateikti susisteminti duomenys, kokiomis sąlygomis skirtingų rūšių bakterijos geba išgyventi ir koks yra jų betono plyšių taisymo efektyvumas. Bakterijoms, naudojamoms įterpimui į betoną, optimalus pH išgyvenimui yra apie 9 – 11.

1 lentelė Optimalaus pH ir maksimalaus gydymo efektyvumo palyginimas skirtingiems mikroorganizmams

Bakterijų rūšis	pH	Gydymo efektyvumas
<i>Bacillus cohnii</i>	11,00	Maksimalus plyšio užgydymas 0,56 mm, gniuždymo efektyvumas padidėjo 30 %.
<i>Bacillus pasteurii</i>	9,25	Maksimalus plyšio užgydymas 3,80 mm, gniuždymo efektyvumas padidėjo 40 %.
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	11,00	Maksimalus plyšio užgydymas 1,8 mm, CaCO ₃ nusodinimo efektyvumas 86 %

Adaptuota iš (Shen et al., 2021)

Mikrobų sukeltas kalcio karbonato nusodinimas (angl. *Microbially induced calcium carbonate precipitation*, MICP) – biogeocheminis procesas, kurio metu mikroorganizmai nusodina kalcio karbonatą (Alazhari et al., 2018; Lee & Park, 2018). Aplinkos pasikeitimai, sukeliantys mineralizaciją, yra pH pokyčiai, kalcio jonų koncentracija ir

ištirpusios anglies koncentracija. Pagrindinės sąlygos, kurios turi būti įgyvendintos norint mikroorganizmus naudoti biologinio betono gamyboje: 1) pakankamas savaiminio gijimo efektyvumas, kai betone yra įtrūkimas, (Lee & Park, 2018) 2) kalcio karbonato nusodinimą atliekančių bakterijų prisitaikymas prie šarminės aplinkos, 3) gebėjimas gaminti didelį kiekį kalcio karbonato, 4) atlaikyti aukštą slėgį, sugebėti pasisavinti deguonį, nepalankiomis sąlygomis (Khaliq & Ehsan, 2016).

1.2. Bakterijų gyvybingumas betone

Bakterijos, įterptos į betoną, turėtų suaktyvėti susidarius įtrūkimams ir optimaliai nusodinti kalcio karbonatą, kad taip įvyktų, mikroorganizmai turi išgyventi žalingas sąlygas betono matricoje. Statybinis mišinys pasižymi tankia struktūra, kurios poringumas mažesnis nei 1 %, o porų dydis mažesnis nei 0,1 – 0,5 μm , palyginimui, bakterijų dydis svyruoja nuo 1 iki 2 μm . Taigi, yra tikimybė, kad bakterijos betono hidratacijos metu susislėgs (Pungrasmi et al., 2019).

Betono pH paprastai yra apie 12, jame mažai drėgmės ir deguonies – tai ypač nepalankios sąlygos bakterijoms. Nustatyta, kad efektyviam MICP būtinas aeravimas, o bakterijų gyvybingumas mažėja didėjant pH (Lee & Park, 2018). Didelės mechaninės jėgos betono maišymo metu taip pat gali pažeisti bakterijas (Wang et al., 2014). Dėl šių nepalankių sąlygų, turi būti įvertintas įterpiamųjų bakterijų išgyvenamumas, ilgalaikis gyvybingumas (Lee & Park, 2018) ir išspręstas bakterijų kiekio optimizavimas (Shen et al., 2021). Kalcio karbonato nusodinimas vykdant MICP pasitarnauja kaip plyšių užpildymas, mažinantis konstrukcijos poringumą. Be MICP, papildomų medžiagų, tokių kaip ryžių lukštų pelenai, silicio dioksido garai ar lakieji pelenai, įtraukimas kaip daliniai cemento pakaitalai statybinėse medžiagose galėtų dar labiau sumažinti jų poringumą. Būtent MICP sumažinus statybinių medžiagų poringumą, pagerėjo jų mechaninės savybės, MICP padidino gniuždymo stiprumą ir sumažino statybinių medžiagų vandens sugėrimą (Iqbal et al., 2021). Betono aplinkos veiksniai gali paveikti bakterijų aktyvumą, mažindami proliferaciją (augimą, vystymąsi ir dauginimąsi) ir skatindami sporų susidarymą – sporuliaciją. Temperatūros, pH, deguonies ir mineralų koncentracijos pokyčiai keičia sporuliacijos eigą, tačiau svarbiausi šio proceso indikatoriai yra maistinių medžiagų trūkumas ir mikroorganizmų populiacijos tankis. Pereinant nuo proliferacijos iki latentinės fazės, bakterijos riboja medžiagų apykaitos veiklą ir saugo genetinę medžiagą, kol vėl susidarys palankios sąlygos (Šovljanski et al., 2022). Bakterijų sporos pasižymi didesniu atsparumu žalingoms sąlygoms nei vegetatyvinės ląstelės (Paine, 2016). *Bacillus* genties nariai geba formuoti sporas esant žalingam aplinkos poveikiui, kurių išgyvenamumas siekia daugiau nei 200 metų (Khaliq & Ehsan, 2016). Sporų išorinis baltyminis

apvalkalas apsaugo jas nuo fermentų, mechaninių pažeidimų ir cheminių tirpiklių, o sporų žievę sudaro peptidoglikanų sluoksnis, kuris suteikia atsparumo organiniams tirpikliams bei karščiui, taip išlaikydami sporą ramybės būsenoje. Nedideli rūgštyse tirpūs baltymai sporos šerdyje apsaugo DNR nuo UV pažeidimų. Sporų šerdyje gausu dipikolino rūgšties (DPA), kuri sujungia divalenčius metalo jonus, dažniausiai Ca^{2+} , taip sumažindama vandens kiekį. Dėl šių savybių sporų injekcijos ar sporų įkapsuliacija yra efektyvesnis būdas prailginti bakterijų išgyvenimą (Paine, 2016). Svarbu pabrėžti, kad dar nėra aišku, ar žuvę mikroorganizmai gali pasyviai paveikti mineralizaciją, veikdami kaip kalcio karbonato nusodinimo centrai (Basaran Bundur et al., 2015).

Eksperimentais nustatytas bakterijų išgyvenamumas betono matricoje parodė, kad bakterijas *Bacillus megaterium* įterpus į betono skiedinį stebimas drastiškas gyvybingų ląstelių sumažėjimas, po 28 dienų išgyvenimo dažnis buvo tik 0,1%, tačiau pastebėtas didesnis išgyvenamumas galutiniame mišinyje naudojant lakiuosius pelenus. Padaryta prielaida, kad dėl didesnio porų skaičiaus dėl lakiųjų pelenų bakterijos gauna geresnę aeraciją ir geriau auga (Achal et al., 2011). *L. boronitolerans* YS11 ir *Bacillus sp.* AK13 bakterijų įterptų į cemento mišinį su maistinėmis medžiagomis išgyvenamumas buvo 8,5 karto mažesnis nei naudojant imobilizuotų bakterijų ruošinius (Jang et al., 2021). Panašūs rezultatai gauti naudojant *S. pasteurii* bakterijas, gyvybingų ląstelių skaičius betono pastoje per pirmąją parą sumažėjo 80%. Po 7 ir 28 dienų mišinyje aptikta tik 1 ir 0,4 %, atitinkamai, gyvybingų ląstelių, iš kurių apie 50% buvo sporos (Basaran Bundur et al., 2015). Anksčiau aprašytų eksperimentų duomenys patvirtina prastą į betoną įterptų gyvų ir neapsaugotų bakterijų veikimą (Lee & Park, 2018). Be bakterijų tipo labai svarbus ir nešiklio, į kurį įkapsuliuojamos bakterijų sporos pasirinkimas (plačiau 1.4.1 skyriuje). Mokslininkai naudoja skirtingus nešiklius, kad įvertintų ir padidintų bakterijų išgyvenamumą betone bei sustiprintų savaiminio gijimo proceso efektyvumą (Khaliq & Ehsan, 2016). Keramzito dalelės vertinamas kaip tinkamas bakterijų sporų nešiklis, dėl savo itin porėtos struktūros, mažos kainos, patogaus pritaikymo ir didelės vandens sugėrimo gebos (Jiang, Jia, Jiang, et al., 2020). Eksperimentiškai nustatyta, kad padengus keramzito daleles apsauginiais sluoksniais (pavyzdžiui, stireno – akrilato emulsijos sluoksniais, magnio oksido ir magnio hidroksido pagrindu pagamintos dangos ar vandens pagrindo latekso ir akrilo kompozito danga) bakterijų gyvybingumas padidėja 10 kartų, o kuo didesnis bakterijų gyvybingumas, tuo didesnis gydymo efektyvumas (Jakubovskis et al., 2021).

Vandens trūkumas ir laisvo vandens kiekio sumažėjimas betono matricoje dėl cemento hidratacijos pokyčių gali būti stipriai susijęs su minimaliu vegetatyvinių bakterijų, kurios tiesiogiai liečiasi su betonu, išgyvenamumu (Šovljanski et al., 2022). Remiantis tyrimų duomenimis bakterijų sporos gebėjo išgyventi geriau, tačiau spaudimas dėl laipsniško betono

susitraukimo galiausiai sunaikina ir sporas. Taigi, ląstelių įterpimas į nešiklius yra būtinas norint sukurti betoną, kuris ilgą laiką galėtų gyti savaime (Lee & Park, 2018). Susidariusi kapsulių sistema turi būti inertiška sąlytyje su bakterijomis, pakankamai stipri, kad atlaikytų betono maišymo procesą, neturi neigiamai paveikti betono mechaninių savybių ir būti pakankamai trapi, kad atsidarytų, kai atsiranda įtrūkimų (Šovljanski et al., 2022). Svarbu paminėti, kad mikroorganizmų optimalus skaičius yra kertinis dalykas, nes esant per dideliui skaičiui mikroorganizmų, dalis jų gali žūti ir tai turės tam tikrą poveikį betonui, įskaitant mechanines savybes ir vandens pralaidumą. Iš kitos pusės, jei sumaišoma labai mažai organizmų, įtrūkimų gijimo efektyvumas nebus patenkintas, todėl turi būti išspręsta santykio tarp konkretaus mikroorganizmo skaičiaus ir įtrūkimo dydžio problema (Shen et al., 2021).

Išlieka daug iššūkių, susijusių su savigydos mechanizmo supratimu ir bakterijų panaudojimo betone optimizavimu. Užtikrinti bakterijų išgyvenamumą yra didžiausias iššūkis, su kuriuo susiduriama norint vystyti savaime išgyjančio betono panaudojimą. Tikrasis įkapsuliuotų bakterijų išgyvenamumas po patekimo į betoną vis dar nėra iki galo aiškus, trūksta informacijos apie bakterijų gyvenimo būdą betono matricoje (Lee & Park, 2018).

1.3. Biomineralizacija

1.3.1. Biomineralizacijos keliai

Moksliniais tyrimais bandoma sukurti savaime įtrūkimus užpildantį betoną, kuris potencialiai sumažintų taisymų kainą ir reikalautų mažiau žmogaus darbo bei priežiūros. Vienas iš būdų panaudoti mikroorganizmų vykdomą kalcio karbonato (kalcito) nusodinimo būdą. Šis metodas naudoja metabolinį bakterijų aktyvumą ir mineralines medžiagas betono viduje, kad susidarytų neorganinė medžiaga, šiuo atveju, kalcio karbonatas, kaip gydomasis junginys. Bakterijų kalcio nusodinimas nėra galimas, jei aplinkoje nėra vandens (Paine, 2016). Bakterijų sienelėse esančios neigiamai įkrautos funkcinės grupės absorbuoja iš aplinkos turimus katijonus, tokius kaip Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ar Zn^{2+} ir inicijuoja mineralų nusodinimą (Jain et al., 2021).

Trys pagrindiniai keliai, kuriais MICP gydo betoną: fermentinis karbamido skaidymas, nitratų disimiliacija ir aerobinis kalcio druskų metabolizmas:

Fermentinis karbamido skaidymas – vienas iš dažniausiai aptinkamų metodų, kurį naudoja šarminėms sąlygoms atsparūs, ureaziniu aktyvumu pasižymintys bakterijų kamienai, kalcio karbonato nusodinimui. Pagrindiniai bakterijų kamienai naudojami biologinio betono gijimo eksperimentuose: *Bacillus pasteurii*, *Bacillus aerius*, *Bacillus sphaericus*, *Sporosarcina aquimarina*, *Bacillus megaterium* (Shen et al., 2021). Šio tipo bakterijos geba

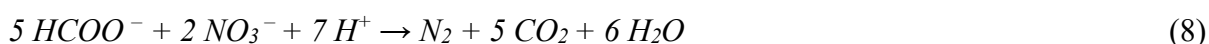
skaidyti karbamidą į amonio ir karbonato jonus, kitas žingsnis, kai su Ca^{2+} jonais (sąveikaujančiais su ląstelės sienele) susijungęs karbonato jonas suformuoja kalcio karbonatą (Achal & Pan, 2011). Amonio jono atsiradimas betone šarmina terpę ir be to, statybinėse medžiagose esantis amonis gali būti bakterijų nitrifikuotas į azoto rūgštį. Tai savo ruožtu gali reaguoti su kalcitu ir sudaryti kalcio nitrata, kuris yra labai tirpus komponentas, prisidedantis prie statybinių medžiagų gadinimo (Anbu et al., 2016). Mikrobinis kalcio karbonato nusodinimas yra sudėtingas kompleksinis biocheminių reakcijų mechanizmas (1 – 7 lygtys). Esant aktyviai ureazei, vienas molis karbamido suskaidomas į tarpinius produktus, kurių vienas yra amoniakas ir vienas molis karbamo rūgšties (1 lygtis), kuri spontaniškai hidrolizuojama į dar vieną molį amoniako ir anglies rūgšties (2 lygtis). Anglies rūgštis išsibalansuoja vandenyje, sudarydama bikarbonatą (HCO_3^-) (3 lygtis), kaip ir dvi amoniako molekulės (po vieną iš 1 ir 2 reakcijos), vandenyje protonuojasi susidarydamos amonio ir hidroksido jonus (4 lygtis). Dėl pastarųjų reakcijų pakyla aplinkos pH (Burne & Chen, 2000; Hammes et al., 2003) ir tai savo ruožtu gali pakeisti bikarbonato pusiausvyrą, todėl susidaro karbonato jonai (5 lygtis) (Hammes et al., 2003). CaCO_3 nusodinimas atsiranda bakterijos ląstelės paviršiuje, jei tirpale yra pakankamai kalcio ir karbonato jonų (6, 7 lygtys, 1 pav.) (Anbu et al., 2016).



Teoriškai, 1 mol kalcio karbonato suformuojamas esant 1 mol karbamido. Teoriniai skaičiavimai ne visada pasiteisina, nes biocheminė reakcija yra vykdoma dalyvaujant bakterijos fermentui – ureazei, dėl šios priežasties susidariusio galutinio produkto kiekis priklauso nuo fermento aktyvumo, o ne reagentų koncentracijų. Šiam procesui reikalingas deguonis, inicijuoti bakterijų sporų aktyvumą, o tai gali būti reikšmingas faktorius betono savigydos procese (de Belie et al., 2018).

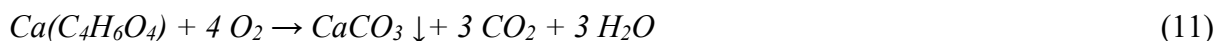
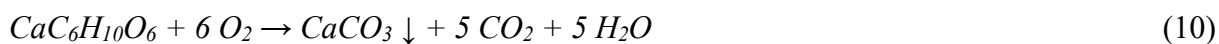
Nitratų disimiliacija – pastaruoju metu, denitrifikuojančios bakterijos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Halomonas halodenitrificans*, *Diaphorobacter nitroreducens*) (Castro-Alonso et al., 2019; Lee & Park, 2018) panaudojamos dėl jų savybės tinkamai veikti riboto deguonies sąlygomis. Esant ribotam deguonies prieinamumui, nitratas naudojamas kaip alternatyvus elektronų akceptorius organinės anglies oksidacijoje (De Belie et al., 2018). Šis

biologiškai sukeltas denitrifikacijos procesas vyksta per kelias reakcijas, kurios palengvinamos įvairiais fermentiniais procesais (Jain et al., 2021). Reakcijos metu nesusidaro toksiškų šalutinių produktų, tačiau toksiški nitritai ir azoto oksidas gali kauptis, jei slopinamas kuris nors iš keturių skirtingų fermentų, dalyvaujančių denitrifikacijos procese (Zhu & Ditttrich, 2016). Denitrifikacijos reakcijoje sunaudojami H^+ jonai (susidaro šarminė aplinka) (8 lygtis), tačiau esant kalcio jonams, ląstelės aplinkoje pradedama nusodinti kalcio karbonatą. Greitas $CaCO_3$ nuosėdų susidarymas aplink ląsteles sunaudoja susidariusius laisvuosius OH^- jonus ir CO_2 , o tai nesukelia didelio pH pokyčio (9 lygtis) (Erşan et al., 2015).



Pagrindinis denitrifikacijos trūkumas, palyginti su ureolize, buvo mažesnis $CaCO_3$ nusodinimo greitis, kuris priklauso nuo pradinės bakterijų koncentracijos, jų augimo greičio ir kiekvienos bakterijos specifinio metabolinio aktyvumo reakcijos aplinkoje. Organinių medžiagų oksidacija mažai deguonies turinčioje aplinkoje sumažina bakterijų augimą ir sulėtina kalcio karbonato nusodinimo greitį. Antra, įrodyta, kad specifinis bakterijų aktyvumas mažėja bėgant laikui ir didėjant plyšio gyliui, tačiau skirtingai nei urealitinės bakterijos, denitrifikuojantys kamieniai gali augti ir veikti esant ribotam deguonies kiekiui, o tai, nepaisant mažesnio nusodinimo greičio, įgalina ilgalaikį plyšio taisymą (Erşan et al., 2015).

Aerobinis kalcio druskų metabolizmas – palankiomis sąlygomis bakterijos skatina organinės kalcio druskos (pirmtako), pavyzdžiui, kalcio acetato arba kalcio laktato, oksidaciją į kalcio karbonatą (Alazhari et al., 2018). *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus cohnii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus mucilaginous* L3, *Enterococcus faecalis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* pagrindinės neureazinio aktyvumo bakterijų rūšys naudojamos savaime atsikuriančio betono studijose (Shen et al., 2021). Metabolizmas gali vykti kai bakterijoms gyvuoti yra tinkamos aplinkos sąlygos (atitinkama temperatūra, pH), taip pat bakterijos augimui būtinų maistinių medžiagų (mielių ekstrakto), vandens ir deguonies (Alazhari et al., 2018). Kalcio laktatas (10 lygtis, (Shen et al., 2021)) arba kalcio acetatas (lygtis 11, (Alazhari et al., 2018)) dažnai naudojami junginiai kalcio karbonato nusodinimo reakcijai (Shen et al., 2021). Galutiniai kalcio nusodinimo produktai – vanduo ir anglies dioksidas, abu šie produktai yra suderinami su betono matrica. Esant anglies dioksidui ir vandeniui gali susidaryti silpna anglies rūgštis, o iš jos kalcio hidroksidas (12 lygtis) (Alazhari et al., 2018).

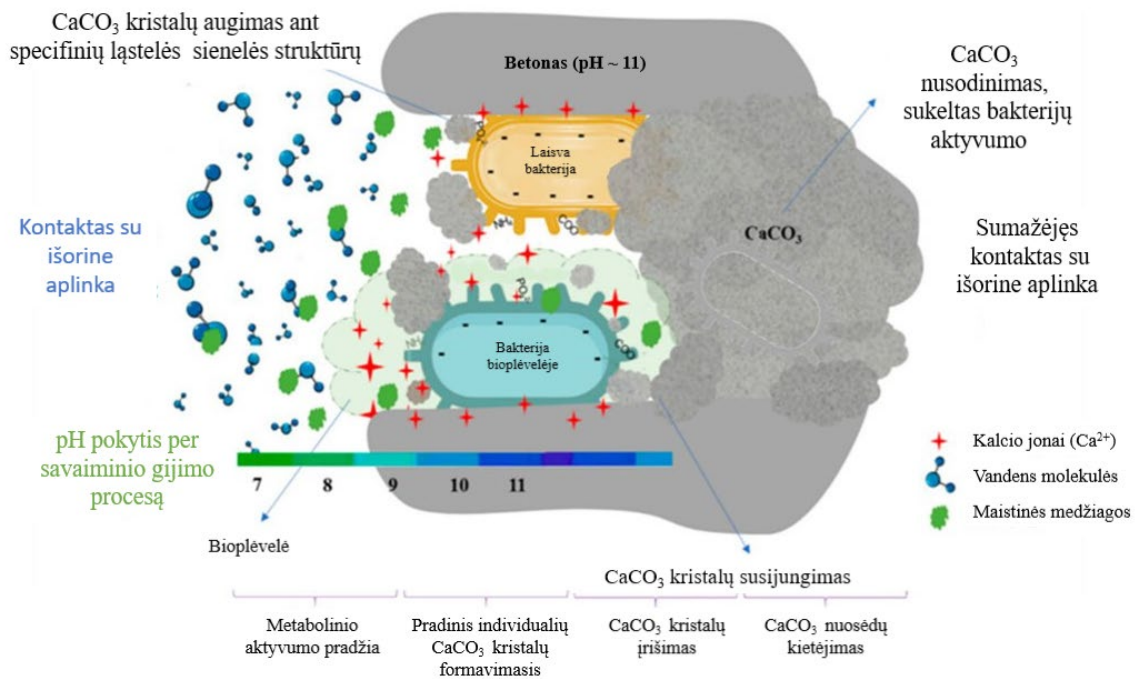




Svarbu paminėti, kad naudojant kalcio chloridą, kaip kalcio pirmtaką (prekursorių), betono mišinyje padaugėja chlorido jonų, kurie susiję su korozijos procesais (Alazhari et al., 2018). Tuo tarpu, naudojant kalcio acetatą ($\text{Ca}(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4)$) sumažinamos išlaidos ir galimas poveikis aplinkai, nes junginys yra elektronų donoras ir kalcio jonų tiekėjas, taip pašalinamas papildomas CaCl_2 arba kitų cheminių medžiagų naudojimas kalcio jonų arba elektronų donorų tiekimui (Jain et al., 2021). Apibendrinant, ureazinės bakterijos vykdo reakcijų grandinę naudodamos ląstelinę fermentą, kad nusodintų kalcio karbonato kristalus, o neureazinės bakterijos vykdo reakcijas paversdamos organinę rūgštį į kalcio karbonatą, šios taip pat pasižymi privalumu, kad vykstant reakcijai nesusidaro kenksmingos amoniako dujos, taip prisidedama prie ekologiško betono kūrimo ir aplinkos apsaugos (Shen et al., 2021).

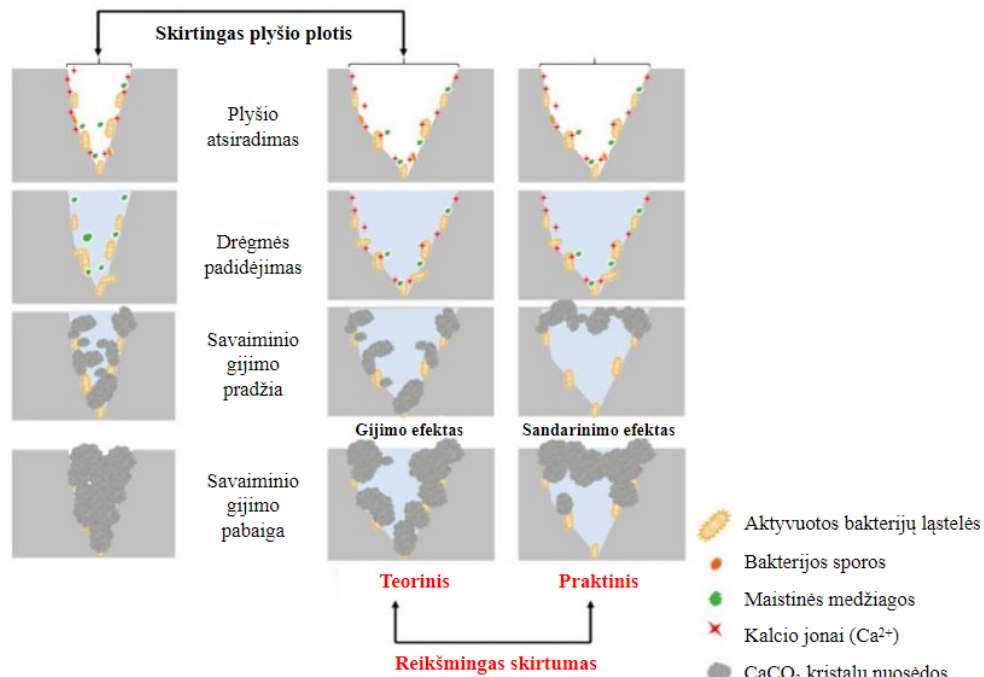
1.3.2. Plyšio sandarinimas

Biomineralizacijos rezultatas biologiniame betone yra cheminė reakcija tarp Ca^{2+} ir CO_3^{2-} jonų bakterijos aplinkoje, kurio galutinis produktas CaCO_3 kristalų formavimas ant elektroneigiamai įkrautos ląstelės sienelės. Didelė bakterijų koncentracija įtrūkimo vietoje padidina kalcio karbonato susidarymo greitį, tačiau aplink ląstelę susidarę kristalai gali dalinai arba visiškai sutrikdyti tolimesnę karbonato gamybą. Savaiminio gydymo efekto gerinimui į betono matricą įterpus užląstelines polimerines medžiagas, padidėja ląstelių sukibimas ir susidaro bioplėvelė. Savaiminio gijimo schema pavaizduota žemiau pateiktame pirmame paveiksle. Paveiksle paaiškinamas bakterijų elgesys su bioplėvelės susidarymu arba be jo ant betono paviršiaus savaiminio gijimo metu (Šovljanski et al., 2022). Bioplėvelės matrica leidžia daugybei bakterijų ląstelių prisitvirtinti prie substrato, o ji susideda iš įkrautų ir neutralių polisacharidų grupių, kurios ne tik jungiasi prie paviršių, bet ir tarnauja kaip jonų mainų sistema jonams „sugauti“ ir kaupti iš aplinkos (Hoffmann et al., 2021). Tai koreliuoja su neigiamai įkrauta ląstelės sienele, o polimeriniai paviršiai linkę būti neigiamai įkrauti ir turi didelį afinitetą katijoninėms medžiagoms, tokioms kaip kalcio jonai. Tačiau ši struktūra taip pat gali slopinti CaCO_3 nuosėdų susidarymą, todėl norint pradėti savaiminio gijimo poveikį, būtina suskaidyti bioplėvelę (Šovljanski et al., 2021).



1 pav. Bakterijų elgesys betone. Įtrūkimo paviršiuje esančias bakterijas suaktyvinamos vandens molekulių ir vykdydamos MICP nusodina kalcito kristalus, kad užsandarintų plyšį ir apsaugotų betoną nuo išorinio cheminio poveikio (Šovljanski et al., 2022)

Kitas svarbus aspektas, plyšio dydis, kuris taip pat gali apriboti savaiminio gijimo efektyvumą (žiūr. 2 pav.) (Šovljanski et al., 2022). Savaiminio gydymo strategijų potencialas tinkamai ir efektyviai uždaryti įtrūkimų plotį vis dar kelia didelį susirūpinimą (Amran et al., 2022). Jei plyšio plotis yra labai didelis, savaiminio gijimo efektas negali apimti viso plyšio, nes bakterijų ląstelės neturi pakankamai pajėgumų nusodinti reikiamą CaCO₃ kiekį, sandarinimo procentas mažėja, didėjant plyšio pločiui (Zhang et al., 2019), nors to paties skaičiaus bakterijų siauresniame plyšyje gali pakakti visam gijimo efektui. Tai yra kritinis taškas, kai būtina optimizuoti bakterijų ląstelių skaičių ir CaCO₃ produktyvumą.



2 pav. Savaiminio gijimo efekto priklausomybė nuo įtrūkimo pločio, esant plačiam įtrūkimui eksperimentiškai stebimas sandarinimo efektas skiriasi nuo teoriškai numatyto (Šovljanski et al., 2022)

Iš antro paveikslo matyti, kad pabrėžiamas esminis skirtumas tarp teoriškai ir eksperimentiškai gautų rezultatų savaiminio gijimo betone (Šovljanski et al., 2022). Trumpai tariant, daugeliu atvejų savaiminio gijimo efektas baigdavosi įtrūkimo sandarinimu, sudarant tam tikrą tiltą tarp įtrūkimo kraštų. Esant tokiai situacijai, savaiminio gijimo poveikis gali būti sustabdytas, nes susidariusios sandarinimo nuosėdos nepraleidžia deguonies ir sukelia deguonies trūkumą giliau esančiame plyšyje, dėl to sustoja bakterijų veikla (Nielsen et al., 2020). Nors tinkamomis sąlygomis platus mikroorganizmų spektras gali būti naudojamas išgydyti didesnius nei 0,30 mm įtrūkimus, skirtingi mikroorganizmai, gali turėti skirtingą gydomąjį poveikį. Savaiminio gyjančio betono rezultatams svarbūs tokie veiksniai: nešiklių sistema, bakterijų sąveika su nešikliais ir mitybinėmis medžiagomis (Shen et al., 2021).

1.4. Imobilizavimas

1.4.1. Imobilizavimo medžiagos

Pagrindinis nešiklių ir kapsulių naudojimo tikslas yra apsaugoti gydomąsias medžiagas (bakterijų sporas) nuo nepalankių betono aplinkos sąlygų: aukšto pH ir

temperatūros, taip pat užkirsti kelią nepageidaujamam medžiagos išskyrimui (Esaker et al., 2021). Pagrindinės kapsuliavimui naudojamos medžiagos pateiktos lentelėje nr. 2:

2 lentelė Kapsuliavimo medžiagos

Kapsuliavimo medžiagų grupė	Pavyzdžiai
Porėtos medžiagos	Diatomitinė žemė, molio agregatai, perlitas
Mikrokapsulės	grafito nanoplokštelės
Hidrogeliai	Joniniai hidrogeliai, nejoniniai hidrogeliai

Porėtos medžiagos (Alazhari et al., 2018; Lee & Park, 2018) – paprastai pasižymi porėtomis paviršiaus savybėmis ir gerai sugeria vandenį (Shen et al., 2021). Žinomi pavyzdžiai: i) diatomitinė žemė (angl. *diatomaceous earth*) tai smulkūs porėti milteliai, pastebėta, kad sporos prisitvirtina prie dalelių, o ne įsiskverbia į jų vidų; (Alazhari et al., 2018) ii) lengvi agregatai (angl. *lightweight aggregate*) (Lee & Park, 2018) – plačiai naudojamas metodas, dėl savo paprastumo ir mažos kainos. Pagrindinės imobilizavimui naudojamos medžiagos: molio agregatai, perlitas. Panaudojant molio agregatus bakterijų sporos ir maistinės medžiagos imobilizuojami kartu, kai tuo tarpu naudojant perlitą komponentai imobilizuojami atskirai (de Belie et al., 2018). Bakterijų imobilizavimas perlite apsaugo bakterijas nuo betono sąveikos ir aukšto pH, nes medžiaga pasižymi didelėmis ertmėmis, jose gali būti susikaupusio laisvo deguonies, o atsiradus įtrūkimams bakterijos būtų lengviau veikiamos vandeniu, nes dėl didelio porėtumo perlitas pasižymi dideliu vandens sugėrimu. Šios natūralios neorganinės akytos medžiagos dažniausiai naudojamos kaip perspektyvūs nešikliai savaimė gyjančio betono tvarioje gamyboje, nes jie puikiai suderinami su betonu ir pasižymi didesniu imobilizuojamu bakterijų kiekiu, mažesniu įtėpiu ir ekonomiškumu (Shen et al., 2021).

Mikrokapsulės: grafito nanoplokštelės (Lee & Park, 2018). Grafito nanoplokštelės, dėl savo mažo dydžio yra geras gydomųjų agentų nešiklis, taip pat dėl savo mechaninių savybių gali pagerinti betono lankstumą, taip sumažinant įtrūkimų galimybę (Shen et al., 2021).

Hidrogeliai (Alazhari et al., 2018; Lee & Park, 2018) – pasižymi dideliu vandens sugėrimo pajėgumu ir gali išlaikyti vandens ar vandeninio tirpalo molekules jose neištirpdami. Tokio tinklo pagalba vandens molekulės iš hidrogelio gali būti lėtai atpalaiduojamos į aplinką. Naudojant hidrogelius kartu su MICP vykdančiais mikroorganizmais galima tikėtis dviejų privalumų: pirmiausia, hidrogelis panaudojamas kaip nešiklis bakterijų sporoms, apsaugantis maišymo ir hidratacijos metu, antra, išbrinkęs hidrogelis panaudojamas kaip vandens rezervuaras sporų aktyvacijai ir bakterijų aktyvumui atsiradus įtrūkimams betone. Hidrogelio

brinkimas priklauso nuo jo cheminių savybių ir aplinkos poveikio. Išskiriami dviejų tipų hidrogeliai: joniniai ir nejoniniai. Joniniai sugeria vandenį dėl stiprios dipolio jonų sąveikos tarp vandens ir jonų, pritvirtintų prie polimero grandinės, o nejoninių hidrogelių veikimas dažniausiai yra pagrįstas hidrofilinių grupių išsidėstymu polimero grandinėje. Joniniai hidrogeliai yra jautrūs teigiamai įkrautiems tirpalo jonams, todėl esant K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ar kitiems katijonams, tokio vandens pasisavinimas betone yra mažesnis, nei dejonizuoto vandens. Katijonai sąveikaudami su polimero funkcinėmis grupėmis sudaro kryžminius ryšius, didesnis kryžminių ryšių sudarymo laipsnis lemia mažesnę brinkimo pajėgumą. Tuo tarpu, nejoniniai hidrogeliai nėra jautrūs tirpale esantiems jonams (Wang et al., 2014).

Veiksmingas būdas apsaugoti bakterijų sporas nuo išorinio poveikio betono matricoje patalpinti jas mikrokapsulėje, dirbtinėje organinėje medžiagoje. Sporos pereina iš latentinės fazės į aktyvavimo būseną, kai atsiranda plyšys, sulūžta kapsulė ir pasiekia maistinės medžiagos bei susiformuoja savaiminiam gijimui tinkama aplinka (Shen et al., 2021).

Nešiklio pasirinkimas turėtų būti įvertinamas atsižvelgiant į konkrečias sąlygas ir numatomus tikslus. Kuriant savaiminio gydymo sistemą reikia atsižvelgti į keletą aplinkos veiksnių, tokių kaip temperatūra, drėgmės patekimas ir išoriniai jonai. Betoninėms konstrukcijoms, kuriose yra daug drėgmės arba drėgnoje aplinkoje, pirmenybė teikiama neorganinėms priemonėms, tuo tarpu organinės gydomosios medžiagos – kai betoninės konstrukcijos neturi tiesioginės prieigos prie vandens. Neorganinės medžiagos turi didesnę potencialą atgauti originalaus betono sandarumą, o organinės medžiagos pasižymi geresnėmis savybėmis, nes atgauna originalaus betono mechaninį stiprumą (Shen et al., 2021).

1.4.2. Bioreagentų imobilizavimas

Bioreagentai arba biologinės kilmės medžiagos, tai maistinės medžiagos bakterijoms (mielių ekstraktas) ir nusodinimo medžiagos (kalcio nitratas, karbamidas, kalcio acetatas ar laktatas) (Wang et al., 2014). Maistinės medžiagos gali būti įkapsuliuojamos atskiruose nešikliuose nei pačios bakterijos (H. Chen et al., 2016). Norint išgauti didžiausią savaime atsikuriančio betono efektyvumą, pagerinti stiprumą, būtina išlaikyti pridedamų priedų ir bakterijų proporcijas (Riad et al., 2022). Įkapsuliuojami komponentai gali būti: **1) Kalcio šaltinis:** kalcio nitratas - Ca^{2+} jonų šaltinis, denitrifikuojančioms bakterijoms, junginio savybės suderinamos su betono matrica, pastebėta, kad naudojant kalcio nitrata, padidėja cemento hidratacijos mechanizmas (Šovljanski et al., 2022). Karbamidas – naudojamas kaip pagrindinis mitybinis elementas. Bakterijos karbamidą suskaido į amoniaką ir anglies dioksidą. Pagrindinis šio metabolizmo minusas tas, kad susidaro kenksmingos amoniako dujos (de Belie et al., 2018). Organiniai kalcio junginiai – naudojami aerobinio kalcio druskų metabolizmui, tai kalcio

laktatas ar kalcio acetatas. Pridėjus šio junginio tiesiai į betono mišinį nėra stebimas galutinio betono stiprumo sumažėjimas. Efektyviam medžiagų panaudojimui organiniai kalcio junginiai taip pat yra įkapsuliuojami, o ne tiesiogiai įmaišomi į betoną. **2) Mielių ekstraktas** – ekstrakto sudėtyje yra aminorūgščių, peptidų, vandenyje tirpių vitaminų ir angliavandenių. Šis mišinys yra pagrindinis bakterijų mitybinis šaltinis, reikalingas jų augimui (Basaran Bundur et al., 2015). Mielų ekstraktas, dažniausiai naudojamas kaip anglies šaltinis karbamido hidrolizėje ir kaip azoto šaltinis metaboliniame kelyje. Tyrimais nustatyta, kad mielių ekstraktas tiesiogiai įmaišytas į betono mišinį sulėtino jo kietėjimą ir sumažino stiprumą, kai buvo naudojama 1% mielių ekstrakto nuo betono mišinio masės, tačiau naudojant mažiau nei 0,5 % žymių stiprumo pokyčių nebuvo fiksuota (Paine, 2016). **3) Baltymai** – peptonas, triptonas, triptono peptonas, tripsikazė ir tripsikazės peptonas, tai dalinai suskaidyti baltymai naudojami auginimo terpėse kaip pagrindinis aminorūgščių, peptidų, baltymų ir azoto šaltinis. Jie gaunami fermentiškai ar chemiškai suskaidant baltymų kompleksus (Paine, 2016). **4) Kitos medžiagos:** bakterijų gyvybingumui ir efektyviam kalcio nusodinimui vykdyti į kapsules gali būti įkapsuliuojami papildomi angliavandenių, pavyzdžiui, gliukozės, kiekiai. Bakterijų atsinaujinimui iš sporų svarbūs natrio junginiai, todėl jie taip pat gali būti įterpiami (Paine, 2016).

Kiekybinis ryšys tarp maistinių medžiagų ir mikroorganizmų vis dar nėra aiškus. Jei substrato koncentracija būtų per didelė, o mikroorganizmų nepakaktų, būtų švaistomi ištekliai ir padidėtų sąnaudos, tačiau jei substrato nepakaktų, sumažėtų kalcio karbonato nusodinimas ir savaiminio gijimo efektyvumas (Shen et al., 2021).

1.5. Genetiškai modifikuotų bakterijų panaudojimas ir rizikų valdymas

Siekiant pagerinti MICP pritaikymą betonui, atlikta genetinių modifikacijų su bakterijų kamienais. *Pseudomonas aeruginosa* MJK1 ir *Escherichia coli* MJK2 buvo transformuotos, kad gamintų žaliai fluorescuojantį baltymą ir atliktų karbamido skaidymą, toks kamieno pakeitimas leido tirti MICP. Šis metodas įgalina stebėti natūralų MICP procesą modelinėse sistemose (Connolly et al., 2013). Kai kurios mutacijos nukreiptos į specifinius MICP kelius. *Sporosarcina pasteurii* fenotipiniai mutantai, pasižymintys didesniu karbamido gamybos efektyvumu, siekiant maksimaliai padidinti kalcio nusodinimą, buvo sukurti naudojant ultravioletinę spinduliuotę. Šie mutantai taip pat buvo paveikti, kad augtų aukšto pH aplinkoje. Dėl šarminio pH betono viduje laukinio tipo bakterijų augimas ir ureazės aktyvumas gali būti neoptimalus gaminant naudingą kalcito kiekį (Achal et al., 2009).

Genų inžinerijos būdu sukurtos bakterijos turi didelį potencialą iš esmės pagerinti savaiminio gijimo efektyvumą. Tačiau genetiškai modifikuoti organizmai, šiuo atveju bakterijos, neturėtų plisti už numatytos srities ribų ir privalo būti apribotas genų pernešimas į

kitus nemodifikuotus organizmus. Nors galima užprogramuoti ląstelių mirtį, tačiau tai nėra patikimas kelias, nes genai tarp rūšių vis tiek gali būti perduodami, todėl genetiškai modifikuotas bakterijas pramonėje reikėtų naudoti atsargiai (Wegmann et al., 2017).

Nepaisant visų privalumų, kuriuos suteikia bakterijos ar modifikuoti jų kamieniai, mikroorganizmų naudojimo betone rizikos vertinimas turi apimti šiuos kriterijus: 1) išsamus apibūdinimas (taksonominis identifikavimas, bakterijų rūšių/padermių istorija pagal pripažintą patogeniškumą, genetiniai pokyčiai, ekologinės savybės); 2) bakterijų dauginimosi ir taikymo metodai turi atitikti saugos įstatymus (pavyzdžiui: atsparumas antibiotikams, genetinės modifikacijos); 3) biologinės medžiagos stabilumo, aktyvumo, pakavimo ir saugojimo nustatymai privalo laikytis nustatytos teisės reikalavimų; 4) išsamus nenuspėjamo pavojaus aplinkai ir sveikatai įvertinimas dėl genetiškai modifikuotų bakterijų išleidimo į aplinką (Ivanov et al., 2019; Šovljanski et al., 2022).

2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir prietaisai

2.1.1. Medžiagos

Tyrimui naudotos cheminės medžiagos ir tiekėjai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Tyrime naudotos cheminės medžiagos ir jų tiekėjai

Medžiagos	Tiekėjai
Mėsos ekstraktas, imersinis aliejus	Merck
Peptonas, TRIS bazė	Roth
Agaras	Formedium
D(+)-Gliukozės monohidratas	VWR chemicals
KCl, Na ₂ CO ₃ , MnSO ₄ ·5H ₂ O	Reachim
MgSO ₄ ·7H ₂ O, NaHCO ₃ , kalcio laktato 5-hidratas, KH ₂ PO ₄ , CaCl ₂ , glicerolis	Carl Roth
Malachito žalias, safranino tirpalas, HCl, sepiolitas	Sigma – Aldrich
Mielių ekstraktas	Oxoid
Sacharozė	AppliChem
Cementas CEM-I 42,5R	Akmenės cementas, Lietuva

2.1.2. Tirpalai ir terpės

Tyrimo metu naudoti tirpalai ir jų sudėtis pateikiami 4 lentelėje.

4 lentelė. Tyrime naudoti tirpalai ir jų sudėtis

Tirpalo pavadinimas	Tirpalo sudėtis
1 M Na-seskvikarbonato tirpalas	43 g/l NaHCO ₃ , 53 g/l Na ₂ CO ₃ , distiliuotas vanduo
10 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 9	1,21 g/l TRIS, distiliuotas vanduo, pH koregavimui naudojamas HCl
0,5 % malachito žaliojo tirpalas	0,5 g/l malachito žaliojo tirpalas, distiliuotas vanduo

Tyrimo metu naudotos terpės ir jų sudėtis pateikiamos 5 lentelėje.

5 lentelė. Tyrime naudotos terpės ir jų sudėtis

Terpės pavadinimas	Terpės sudėtis
Šarminė mitybinė terpė	5 g/l peptono, 3 g/l mėsos ekstrakto, 100 ml 1 M Na-seskvikarbonato tirpalo, distiliuotas vanduo
Agarizuota šarminė mitybinė terpė	5 g/l peptono, 3 g/l mėsos ekstrakto, 100 ml 1 M Na-seskvikarbonato tirpalo, 15 g/l agaro, distiliuotas vanduo
Bakterijų sporuliacijos terpė	3,5 g/l sukrozės, 4 g/l mielių ekstrakto, 0,02 g/l KH_2PO_4 , 0,166 g/l CaCl_2 , 0,476 g/l KCl, 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 ml 1 M Na-seskvikarbonato tirpalo, distiliuotas vanduo.
B4 terpė	0,4 % mielių ekstrakto, 0,5 % gliukozės, 0,25 % kalcio acetato arba kalcio laktato, 1,4% agaro, 100 ml 1 M Na-seskvikarbonato tirpalo, distiliuotas vanduo.
Imobilizavimo terpė	80 g/l kalcio laktato 5-hidrato, 1 g/l mielių ekstrakto, distiliuotas vanduo

2.1.3. Prietaisai

Tyrimo metu naudoti prietaisai ir jų gamintojai pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė. Tyrime naudoti prietaisai

Prietaisai	Gamintojas
Analitinės svarstyklės ABJ 220-4NM	Kern
Svarstyklės EG2200-2NM	Kern
Autoklavas	Laboklav
Automatinės pipetės	Eppendorf
Centrifuga 5418 R	Eppendorf
Centrifuga 6-16K	Sigma
Centrifuga 2-16KL	Sigma
Laminarinio oro srauto boksas Mars Safety Classe 2	Scanlaf
Magnetinė maišyklė-kaitlentė C-MAG HS 7	Ika
Mikroskopas CX41LF	Olympus
Mikroskopo kamera PL-E422CU	Pixelink

Prietaisai	Gamintojas
pH-metras 1100 Series	Oaklon
Plyčio pločio matavimo mikroskopas DTX 90	Levenhuk
Spektrofotometras BioPhotometer plus	Eppendorf
Sūkurinis maišytuvas (vorteksas) G560E	Scientific Industries
Šaldiklis	Atlant
Šaldytuvas-šaldiklis	Liebherr
Termomikseris MKR 13	Ditabis
Termostatas FV-B2V-M/FC 1111	Friocell
Termostatuojama purtyklė Innova 44	New Brunswick Scientific
Žemos temperatūros krosnis 120/300 LSN11	Snol
Žemos temperatūros šaldiklis ULTRAFREEZER	Fiocchi

2.1.4. Bakterijų kamienai

Tyrimė naudojami bakterijų kamienai: *Alkalihalophilus pseudofirmus* (DSM 8715), *Sutcliffiella cohnii* (DSM 6307), *Halalkalibacterium halodurans* (DSM 497) įsigyti iš Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcijos (DSMZ, Vokietija).

2.2. Metodai

2.2.1. Naktinės kultūros auginimas

Bakterijų kultūros *A. pseudofirmus*, *S. cohnii*, *H. halodurans* auginamos 100 ml šarminės mitybinės terpės tūryje bakterijų auginimo kolbose per naktį 30 °C temperatūroje nuolat maišant (160 rpm).

2.2.2. Bakterijų sporų paruošimas

Bakterijų kultūros, išaugusios šarminėje mitybinėje terpėje, lygiomis dalimis persėjamos į sporuliacijos terpes ir auginamos 30 °C temperatūroje, nuolat maišant (140 rpm). Po 4 parų, vykdomas bakterijų sporų plovimas ir paruošiama galutinė suspensija tolimesniems bandymams (Jiang, Jia, Wang, et al., 2020). Sporų surinkimas atliekamas kiekvienai kultūrai atskirai, kultūras centrifuguojant (5000 rpm, 15 min) ir tris kartus praplaunant atšaldytu 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9) (Sharma et al., 2017; Wiktor & Jonkers, 2011). Suspensija kaitinama 80 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min., kad būtų sumažintas vegetatyvinių ląstelių kiekis (Sharma et al., 2017). Po inkubacijos sporų suspensija pakartotinai tris kartus

plaunama 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9), centrifuguojant tomis pačiomis sąlygomis (Sharma et al., 2017; Wiktor & Jonkers, 2011). Sporų suspensija naudojama tolimesniuose tyrimo žingsniuose arba saugoma 4 °C temperatūroje.

2.2.3. Bakterijų gyvybingumo tikrinimas skiedimų-sėjimo metodu

Norint kiekybiškai įvertinti bakterijų sporų gyvybingumą paruoštoje suspensijoje, būtina išmatuoti suspensijos optinį tankį (OT) spektrofotometru (600 nm bangos ilgyje) ir atlikti sporų kiekio suspensijoje nustatymą skiedimų-sėjimo metodu.

Išmatavus bakterijų suspensijos OT atliekamas skiedimas iki 1 optinio vieneto, kuriame yra apie 10^8 bakterijų sporų/ml. Atliekami serijiniai skiedimai naudojant Tris-HCl buferinį tirpalą (pH 9): 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe sėjama po 100 µl skiestos suspensijos turinčios 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Siekiant gauti statistiškai patikimą rezultatą, kiekvienas skiedimas persėjamas po tris lėkšteles. Inkubuojama 30 °C temperatūroje, po 24 val. skaičiuojamas užaugusių kolonijų skaičius ir įvertinamas jų gyvybingumas. Bakterijų sporų skaičius apskaičiuojamas pagal formulę (1):

$$\text{Bakterijų sporų skaičius (KfV/ml)} = KfV \times OT \times SF \times 10 \quad (1)$$

čia:

KfV – kolonijas formuojančių vienetų lėkštelėse vidurkis;

OT – sporų suspensijos optinis tankis;

SF – skiedimo faktorius;

10 – skiedimo faktorius sėjant į lėkštelę (išsėjama 0,1 ml bakterijų suspensijos, skiedimo faktorius – 10).

2.2.4. Sporų formavimosi įvertinimas mikroskopu

Bakterijų sporų formavimas vertinamas dažant bakterijų kultūrą Šeferio-Fultono metodu (Mormak & Casida, 1985) ir stebint binokuliariniu mikroskopu su imersiniu objektyvu. Palyginimui, kaip atrodo bakterijos prieš sporuliaciją, atliekamas naktinės kultūros (žiūr. 2.2.1) dažymas tuo pačiu metodu. Paruošta bakterijų sporų suspensija (žiūr. 2.2.2) skiedžiama, 10 µl užlašinama ir išdžiovinama ant mikroskopinio stikliuko, išdžiūvus mėginys fiksuojamas karščiu. Fiksuotas mėginys dažomas 0,5 % malachito žaliojo tirpalu 5 min. virš garų, dažams neleidžiant išdžiūti. Nuplaunama distiliuotu vandeniu. Šiame žingsnyje žaliai – melsva spalva nudažomos bakterijų endosporos. Vėliau 30 s dažoma safranino tirpalu, mėginys gerai

nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir džiovinamas. Safranino tirpalas nudažo vegetatyvines ląsteles raudonai – ruda spalva. Mikroskopuojama su imersiniu objektyvu (1000 kartų padidiniu) naudojant imersinį aliejų. Ląstelės fotografuojamos naudojant kompiuterinę programą „PixeLINK uScope Professional“.

2.2.5. Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tikrinimas

Bakterijų gebėjimas vykdyti CaCO_3 išsodinimą tiriamas atliekant mineralizacijos aktyvumo tyrimą. Sporos išsėjamos ant B4 mitybinės terpės paruoštos su kalcio laktatu ir atitinkamai su kalcio acetatu, terpės pH 9. Neigiamai kontrolei bakterijos išsėjamos ant B4 terpės be kalcio laktato ir kalcio acetato. Tiriamos bakterijų kultūros auginamos mitybinėje terpėje nustatyti ar geba nusodinti kalcio karbonatą, susidarę kristalai patvirtina, kad bakterijos vykdo mineralizaciją. Bakterijos auginamos 30 °C temperatūroje ir skaitmeniniu mikroskopu vertinama ar susidarė kalcio karbonato kristalai po 3 dienų. Statistiškai patikimiems rezultatams gauti kiekvienas eksperimentas su skirtingomis bakterijų kultūromis ir skirtingais kalcio pirmtakų junginiais B4 mitybinėje terpėje tirtas po 3 lėkšteles (Marvasi et al., 2012).

2.2.6. Bakterijų ir maistinių medžiagų imobilizavimas mineraluose

Bakterijų imobilizavimui naudojamas sepiolitas – mineralinė medžiaga, hidratuotas magnio silikatas. Pagal (Zhang et al., 2017) išleistą straipsnį bakterijų imobilizavimui paruošiamos dalelės džiovinamos ir apipurškiamos imobilizavimo terpe, kurią sudaro kalcio laktatas ir mielių ekstraktas. Remiantis mitybinių medžiagų įvedimu į sistemą pagal straipsnio autorius, šviežiai pagaminama ir filtruojama imobilizavimo terpė, tačiau imobilizavimo technika naudojama pagal (Sandalci et al., 2021) straipsnyje aprašyta metodiką. Bakterijų suspensija, kurios galutinė koncentracija mišinyje 10^8 bakterijų sporų/ml, patalpinama į 150 ml imobilizavimo terpės kartu su 13,5 g sepiolito. Paruošta suspensija inkubuojama 30 °C temperatūroje, 175 rpm, 24 val. Po inkubacijos impregnuotas sepiolito mišinys filtruojamas panaudojant vakuuminę sistemą siekiant pašalinti perteklinį tirpalą. Ant filtrinio popieriaus likęs imobilizuotas sepiolitas džiovinamas 30 °C krosnelėje 5 – 7 dienas, kol paviršius pilnai išdžiūsta. Kontrolinė grupė paruošiama tuo pačiu principu, sepiolitas imobilizuojamas terpėje be ląstelių. Visas imobilizuoto sepiolito kiekis, reikalingas tolimesniuose darbuose, ruošiamas vienu metu.

2.2.7. Bakterijų skaičiaus sepiolite nustatymas

Imobilizavus ir išdžiovinus sepiolitą atliktas bakterijų kolonijų skaičiavimas, siekiant įvertinti bakterijų gyvybingumą ir galutinę jų koncentraciją. Žinant pradinę bakterijų koncentraciją imobilizavimo terpėje (10^8 KfV/ml) 1 g išdžiovinto sepiolito suspenduojamas 9 ml 10 mM Tris – HCl buferinio tirpalo (pH 9). Atliekami skiedimai: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe sėjama po 100 µl skiestos suspensijos turinčios 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Siekiant gauti statistiškai patikimą rezultatą, kiekvienas skiedimas persėjamas po 3 lėkšteles. Inkubuojama 30 °C temperatūroje, po 24 val. skaičiuojamas užaugusių kolonijų skaičius ir įvertinamas jų gyvybingumas pagal formulę (2).

$$\text{Bakterijų sporų gyvybingumas (KfV/ml)} = KfV \times SF \times 10 \quad (2)$$

čia:

KfV – kolonijas formuojančių vienetų lėkštelėse vidurkis;

SF – skiedimo faktorius;

10 – skiedimo faktorius sėjant į lėkštelę (išsėjama 0,1 ml bakterijų suspensijos, skiedimo faktorius - 10).

2.2.8. Betono mėginio ruošimas ir bakterijų gyvybingumo tikrinimas

Betono mėginiai ruošiami įvertinti ląstelių gyvybingumą betono matricoje. Ruošiama po tris betono bandinius su kiekvienos bakterijų kultūros imobilizuotu sepiolitu (7 lentelė).

7 lentelė. Betono bandinių sudėtis

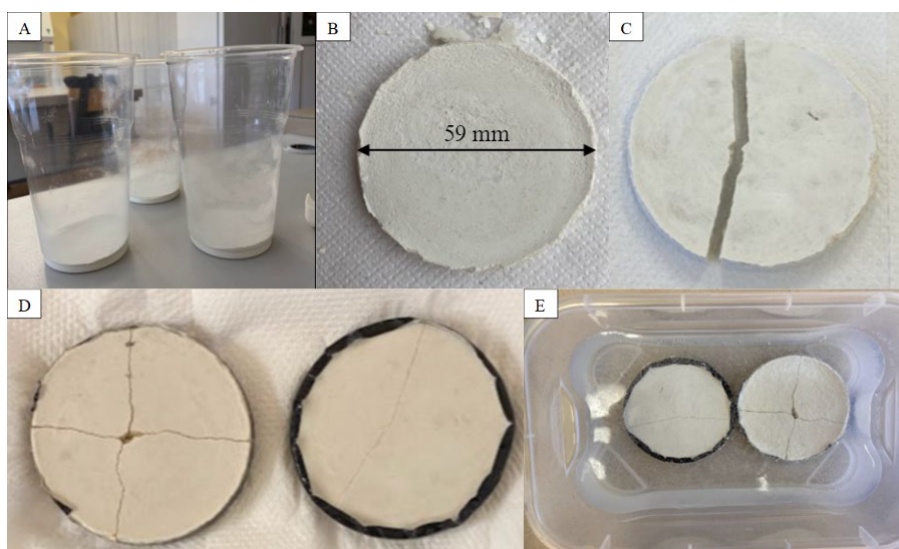
Cemento svoris (g)	Imobilizuoto sepiolito svoris(g)	Vandens svoris (g)
15	0,75	10
15	1,50	12

Masė gerai išmaišoma ir paliekama 3 dienas sukietėti. Po 3 dienų bandinys suskaldomas ir dalis sutrinama grūstuvėliu. 1 g betono miltelių suspenduojama 9 ml 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9). Atliekami skiedimai: 10^2 , 10^3 , 10^4 ir 10^5 bakterijų sporų/ml. Esant mažam bakterijų gyvybingumui betono bandiniuose atliekama mažiau skiedimų: 10^2 , 10^3 ir 10^4 bakterijų sporų/ml Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe sėjama po 100 µl paskutinių dviejų skiestų suspensijų. Siekiant gauti statistiškai patikimą rezultatą, kiekvienas

skiedimas persėjamas po 3 lėkšteles. Inkubuojama 30 °C temperatūroje, po 24 val. skaičiuojamas užaugusių kolonijų skaičius ir įvertinamas jų gyvybingumas pagal formulę (2).

2.2.9. Betono bandinių savaiminio gijimo stebėjimas vandenyje

Betono bandiniai savaiminio gijimo vertinimui ruošiami pagal 2.2.8. skyriuje aprašytą metodą. Bandiniai paliekami kietėti 7 dienas kambario sąlygomis. Bandiniams sukietėjus, jie perskeliami plaktuku. Gauti bandiniai suključuojami vandeniui atsparia lipnia juosta, kad susidaręs plyšys išliktų stabilus. Bandiniai patalpinami į vandentiekio vandens vonelę savaiminio gijimo procesui (3 pav.). Statistiškai patikimiems rezultatams gauti kiekvienam bandiniui ruošiami 3 pakartojimai.



3 pav. Betono bandinių paruošimas gijimo procesui: A) Betono bandiniai maišomi ir kietinami formose; B) Iš formos išimtas betono bandinys; C) D) Bandinys po plyšio paruošimo ir suključavimo; E) Bandinių paruošimas gydymui vandens vonelėje

$$H_c = \frac{p_i - p_t}{p_i} \quad (3)$$

čia:

H_c – plyšių gijimo koeficientas;

p_i – pradinis plyšio plotis;

p_t – plyšio plotis po gijimo.

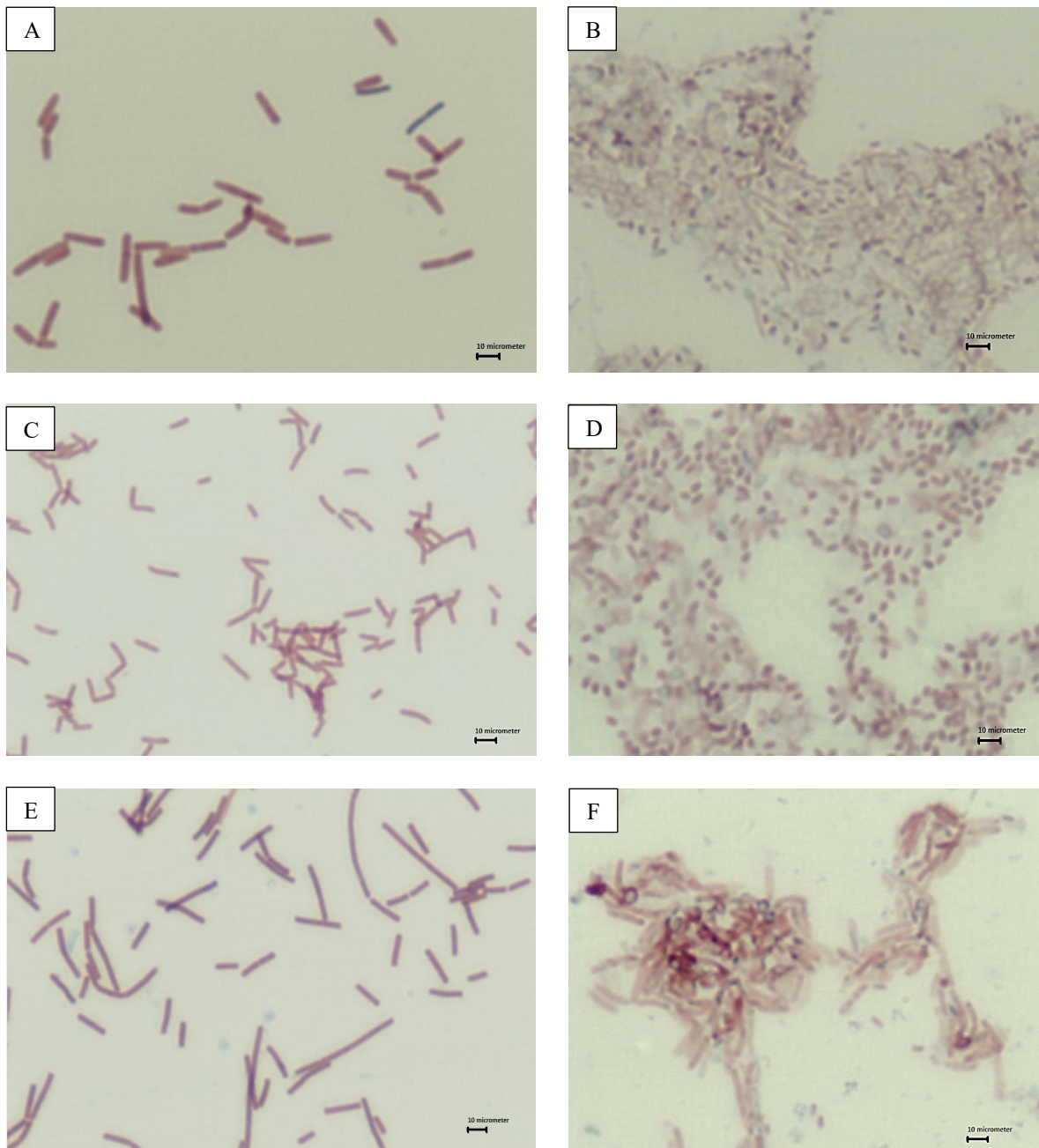
Plyšio gijimas įvertinamas skaitmeniniu mikroskopu su integruota kamera, didinant 10 – 300 x (DTX 90, Levenhuk, Tampa, FL, USA). Likus vienai parai iki vertinimo bandiniai išimami iš vandens ir džiovinami kambario temperatūroje, kad būtų išvengta šviesos

atspindžių nuo vandens. Pasirenkamos trys vietos, kuriose bus matuojamas plyšių gijimas, jos pažymimos žymekliu (Jakubovskis et al., 2021). Plyšių gijimo vertinimas atliekamas pirmąją dieną prieš pamerkiant bandiniu į vandenį ir po 7, 14, 21, 28 bei 35 dienų. Gauti matavimo rezultatai naudojami plyšių gijimo koeficientui (H_c) apskaičiuoti, pagal formulę (3).

3.REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1.Sporų įvertinimas mikroskopu

Remiantis teorine medžiaga, žinoma, kad betoninėje aplinkoje naudojamos bakterijos turi būti alkalofilinės, idealiu atveju, formuojančios sporas, kad gebėtų išlikti nepalankiomis sąlygomis, kurios gali susidaryti per betono konstrukcijos eksploatavimo laiką (van der Bergh et al., 2021). Pereinant nuo proliferacinio gyvenimo būdo prie latentinės fazės, bakterijos riboja medžiagų apykaitos veiklą ir kaupia genetinę medžiagą sporose, kol vėl susidaro palankios sąlygos (Šovljanski et al., 2022). Į betono mišinį dedamos bakterijos turi atlaikyti mechaninius įtempius dėl maišymosi, taip pat gebėti išgyventi aerobinėje aplinkoje. Tokiomis savybėmis, kurios gebėtų išgyvent betono mišinyje pasižymi *Bacillus* genties bakterijos, todėl buvo atrinkta keli jų atstovai, siekiant patikrinti jų gydomųjų savybių pritaikymą betone (Zhu & Dittrich, 2016). Bandymuose naudota *B. pseudofirmus*, *B. cohnii*, *B. halodurans* bakterijų rūšys dėl didelio sporuliacijos intensyvumo ir gebėjimo išgyventi betono matricoje (Sharma et al., 2017). *B. pseudofirmus* bakterijų rūšis – tai alkalofilinis aerobas, išskirtas iš ežero dugno dirvožemio. Optimali augimo temperatūra 30 °C, pH apie 9,7, tačiau auga ir 7,5 – 11,5 pH verčių intervale (Fahimizadeh et al., 2020). Bakterijų kamienų mikroskopavimas prieš ir po sporuliacijos atliktas įvertinti išvaizdos ir sporų kultūros pokyčius (H.-J. Chen et al., 2019). Sporuliaciją patvirtina mikroskopiniu būdu gauti vaizdai pateikti 4 paveiksle, susidariusios endosporos nusidažiusios žaliai mėlyna spalva. Bakterijų paviršius prieš sporuliaciją (4 pav. A, C ir E) atrodo lygus ir tvarkingos lazdelės formos, po sporuliacijos nuotraukose pastebima sumažėjusios, susitelkusios į sankaupas bakterijos ir susidariusios jų sporos (4 pav. B, D ir F). Eksperimentiškai nustatyta, kad bakterijų kiekis prieš sporuliaciją būna didesnis nei po sporuliacijos. Spėjama, kad bakterijos reaguodamos į nepalankias sąlygas, į sporas supakuoja savo DNR ir pačios miršta. Remiantis stebimomis nuotraukomis, galima daryti išvadą, kad sporuliacijos metodas yra tinkamas, aukštoje 80 °C temperatūroje sunaikinama dalis vegetatyvinių ląstelių ir bakterijos geba formuoti endosporas nepalankiomis sąlygomis (H.-J. Chen et al., 2019).



4 pav. Bakterijų nuotraukos naudojant šviesinio mikroskopo 1000 kartų didinimą, žaliai mėlyna spalva nusidažiusios - bakterijų sporos, rožine – vegetatyvinės ląstelės. A) C) E) bakterijos prieš sporuliaciją po vienos paros šarminėje mitybinėje terpėje (nuotraukose matyti mėlynos spalvos dažų artefaktai) (*A. pseudofirmus*, *S. cohnii*, *H. halodurans*); B) D) F) bakterijos po 4 dienų sporuliacijos galutinėje paruoštoje suspensijoje (*A. pseudofirmus*, *S. cohnii*, *H. halodurans*)

3.2. Bakterijų sporų suspensijos gyvybingumo tikrinimas

Įvertinti bakterijų sporų gyvybingumą paruoštoje suspensijoje, išmatuotas optinis tankis spektrofotometru ir atliktas sporų kiekio suspensijoje nustatymas serijiniu skiedimo - sėjimo metodu (2.3.3). Vidutinės bakterijų kultūrų sporų koncentracijos po sporuliacijos pateikta lentelėje 8 apačioje:

8 lentelė. Bakterijų sporų suspensijos koncentracijos nustatytos skiedimo – sėjimo metodu

Bakterijų kultūra	Sporų koncentracija (bakterijų sporų/ml)
<i>A. pseudofirmus</i>	$(6,82 \pm 1,49) \times 10^{10}$
<i>H. halodurans</i>	$(4,77 \pm 0,91) \times 10^{10}$
<i>S. cohnii</i>	$(6,54 \pm 0,96) \times 10^{11}$

Paruoštos suspensijos toliau buvo imobilizuojamos ant sepiolito dalelių kartu su mitybinėmis medžiagomis, gauti rezultatai aprašomi tolimesniuose skyriuose.

3.3. Bakterijų sporų suspensijos imobilizavimo mineraluose vertinimas

Tyrimo metu pagal metodinės dalies aprašymą bakterijos pirmiausia sporuliuojamos, o siekiant apsaugoti padermę, biologinės rūšys fiksuojamos porėtame lengvajame užpilde ir tik tada įdedamos į betono mišinį. Tokiu būdu aktytas lengvas užpildas ne tik yra papildomas užpildas betone, bet ir tarnauja kaip apsauginė bakterijų sporų talpykla. Keliama hipotezė, kad tokia sistema gali labiau pagerinti bakterijų mineralizacijos betone įgyvendinimą ir sėkmės rodiklį (H.-J. Chen et al., 2019). Sepiolitas dėl savo struktūros ypatumų pasižymi geromis sugerties ir reologinėmis savybėmis (Tian et al., 2019), struktūriškai sudarytas iš centrinių oktaedrinų magnio sluoksnio blokų, tarp dviejų tetraedrinio silicio dioksido sluoksnių, kurie tarpusavį susijungdami sudaro tunelius. Blokų ir tunelių vientisa struktūra auga pluošto kryptimi, todėl susidariusi sistema primena adatos formą (Biddeci et al., 2023). Poliniame arba vandeniniame tirpale, sepiolito dalelės sugeria didelį kiekį dalelių sudarydamos labai klampią suspensiją (Tian et al., 2019), eksperimentiškai apskaičiuota 80 % sepiolito vandens sugėrimo geba (Sandalci et al., 2021). Atsižvelgiant į platų medžiagos panaudojimą, jos mechaninės savybės labai svarbios, kad struktūra nebūtų sugniuždyta ar sunaikinta išorinių jėgų. Pagrindinės porėtos medžiagos mechaninės savybės yra tvirtumas, stipris lenkiant ir gniuždant (Tian et al., 2019). Bakterijų sporų tiesioginis įterpimas į betono mišinį nėra efektyvus, todėl jos imobilizuojamos sepiolite apsaugant nuo tiesioginio kontakto su matrica (Sandalci et al., 2021). Tiriant MICP efektą bakterijose, nustatyta, kad bakterijų

koncentracija ir pradinis maistinių medžiagų kiekis turi didelės reikšmės kalcio karbonato nusodinimui. Lyginant mišinius, kuriuose skyrėsi bakterijų koncentracija, o pradinis maistinių medžiagų kiekis buvo vienodas, efektyvesnis kalcio nusodinimas stebėtas mėginiuose su didesne, 10^8 bakterijų sporų/ml, koncentracija (Okwadha & Li, 2010).

Siekiant optimizuoti imobilizavimo sąlygas, atlikti eksperimentai keičiant pradinę bakterijų koncentraciją ir sepiolito kiekį galutiniame mišinyje. Gauti rezultatai imobilizuotame sepiolite lyginami su teoriniais rezultatais, remiantis naudota pradine sporų koncentracija imobilizavimo terpėje. Atliekant bakterijų sporų optimalaus kiekio imobilizavimo eksperimentus buvo pasirinkta pradinę suspensiją skiesti 10 000 ir 100 000 kartų. Po 24 val. sepiolito imobilizacijos galutinė gyvybingų bakterijų koncentracija tikrinta skiedimų – sėjimo metodu. Pastebėta tendencija, kad bakterijų koncentracija po 24 val. imobilizuotame sepiolite padidėjo 100 ar 1000 kartų lyginant su pradine teorine koncentracija galutinėje imobilizavimo terpėje (9 lentelė). Eksperimentas kartotas tris kartus patvirtino tendenciją, kad imobilizuotame sepiolite per 24 val. bakterijų sporų koncentracija padidėja 1000 kartų. Tokie rezultatai patvirtino, kad bakterijų sporų pakartotinis kultivavimas lengvuose agregatuose atkuria jų aktyvumą (H.-J. Chen et al., 2019).

9 lentelė. Bakterijų sporų imobilizavimo mineraluose vertinimas

Bakterijų kultūra	Pradinė koncentracija (bakterijų sporų/ml)	Koncentracija po imobilizavimo (bakterijų sporų/ml)
<i>A. pseudofirmus</i>	10^6	$(7,95 \pm 2,19) \times 10^8$
	10^5	$(1,60 \pm 0,28) \times 10^8$
	10^8	$(5,77 \pm 0,99) \times 10^{11}$
<i>H. halodurans</i>	10^8	$(6,64 \pm 1,56) \times 10^{11}$
<i>S. cohnii</i>	10^8	$(8,73 \pm 2,77) \times 10^{11}$

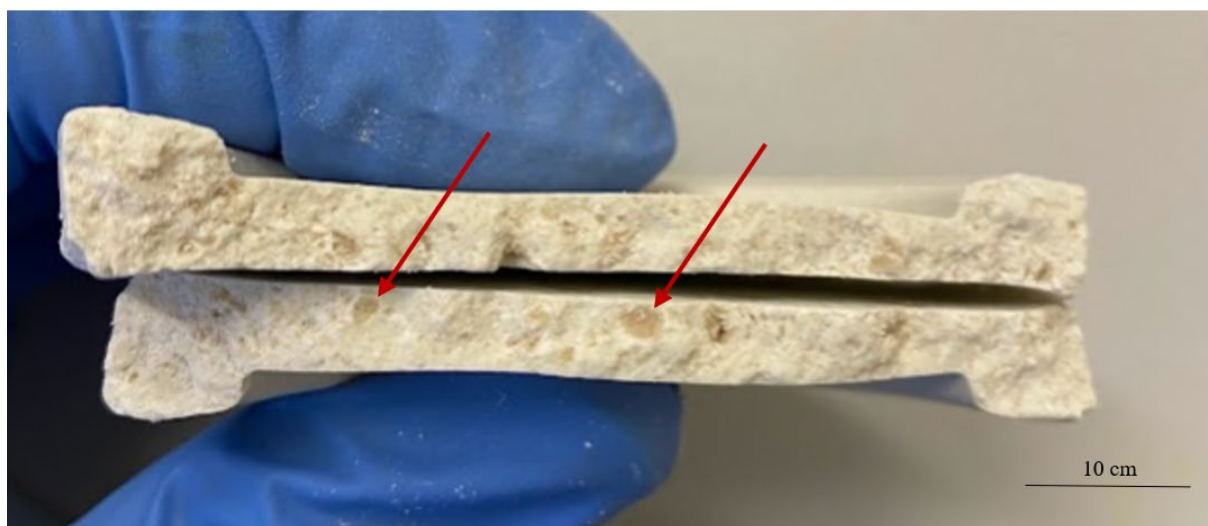
Tolimesnių tyrimų metu vertinant bakterijų gyvybingumą betono bandiniuose po 3, 7 ir 14 dienų pastebėtas mažas bakterijų išgyvenamumas, todėl siekiant išlaikyti gyvybingų bakterijų sporų kiekį mineralizacijos procesui, pasirinkta koreguoti imobilizavimo schemą. Pakartojus eksperimentus sepiolite imobilizuotos bakterijų kamienų *A. pseudofirmus*, *H. halodurans* ir *S. cohnii*, teorinės koncentracijos buvo 10^8 bakterijų sporų/ml, po 24 val. fiksuota 1000 kartų didesnė koncentracija visų kamienų bandiniuose.

Atliktų eksperimentų duomenys įrodo, kad bakterijų koncentracija turi reikšmės efektyviam gijimo procesui ir mažesnė nei 10^8 bakterijų sporų/ml bakterijų koncentracija imobilizuotame sepiolite neįvykdo savaiminio betono gijimo proceso ir ląstelės neišlieka

gyvybingos. Pradiniais duomenimis nustatyta, jog efektyvus bakterijų gyvybingumas pastebėtas, kai sepiolite imobilizuojama bent 100 kartų didesnė koncentracija, t.y 10^{10} bakterijų sporų/ml.

3.4. Bakterijų sporų gyvybingumo betono matricoje vertinimas

Pirmiausia reikėjo įsitikinti, kaip bakterijos imobilizuotos sepiolite geba išgyventi betono matricoje. Šiam tikslui įgyvendinti pagal 6 lentelėje pateiktą schemą buvo paruošti betono mėginiai. Pirmieji bandiniai buvo ruošti naudojant 15 g cemento, 0,75 g imobilizuoto sepiolito su galutine bakterijų koncentracija 10^8 bakterijų sporų/ml ir 10 g vandens. Paruošta masė išmaišyta ir palikta kietėti 3 dienas. Po 3 dienų bandinys suskaldytas ir dalis sugrūsta grūstuvėliu, kad būtų gauti milteliai. Kaip matoma iš 5 paveikslo, raudonomis rodyklėmis pažymėta imobilizuoto sepiolito dalelės, kurių pasiskirstymas betono bandinyje nėra tolygus, dalelės yra skirtingo dydžio ir formos.

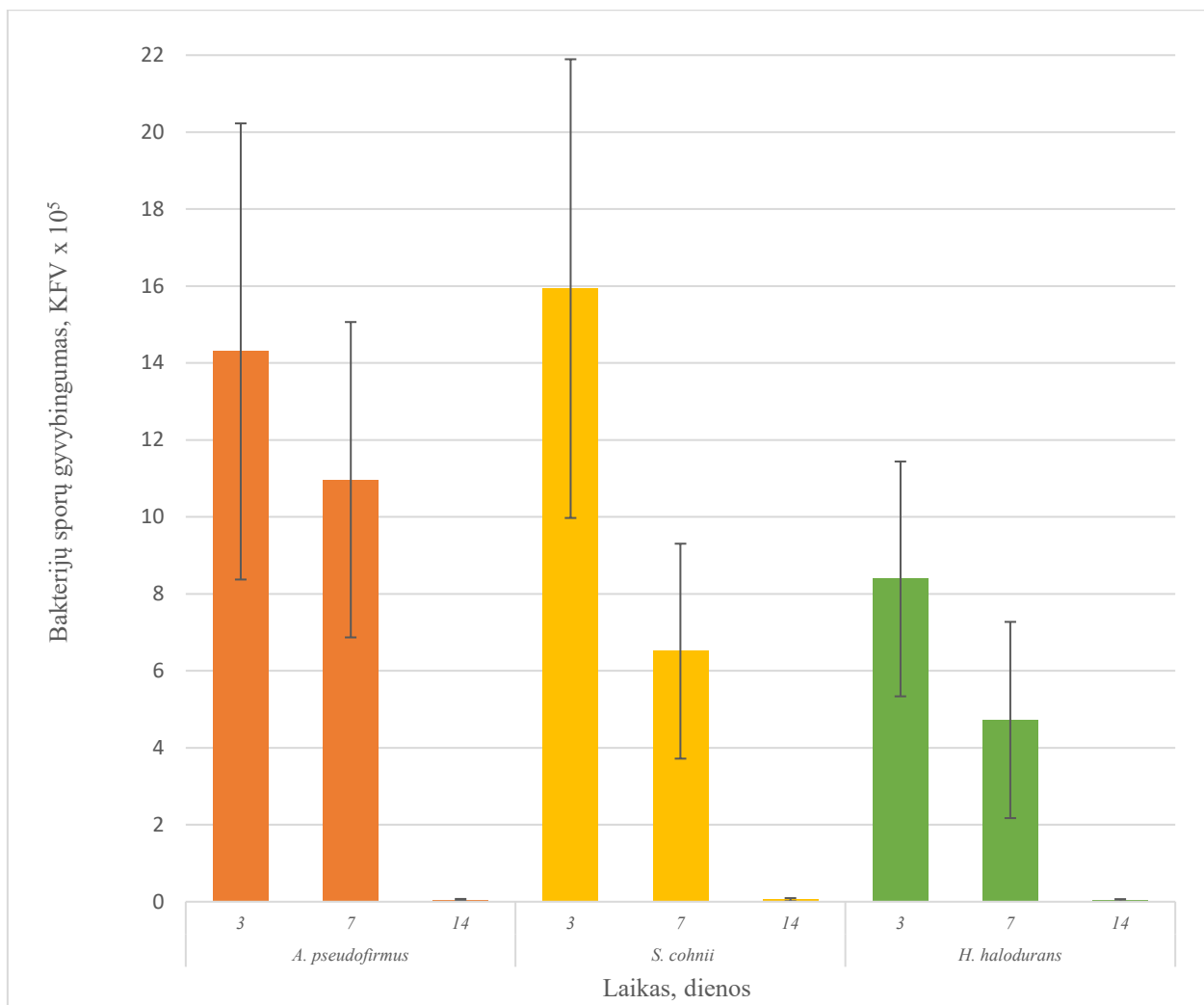


5 pav. Betono bandinys po 3 dienų kietėjimo su jame matomomis imobilizuoto sepiolito dalelėmis (raudonos rodyklės)

1 g betono miltelių suspenduojamas 9 ml 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9) ir maišomas 15 min, kad bakterijų sporos galėtų išsilaisvinti į tirpalą. Atlikus bakterijų gyvybingumo tikrinimą pagal 2.2.8. skyriuje aprašytą metodą galutinė suspensija buvo praskiesta 10^4 ir 10^5 kartų, tačiau bakterijų gyvybingumo nebuvo pastebėtas. Atsižvelgus į neigiamus rezultatus, kitą dieną serijiniu skiedimo-sėjimo metodu pakartotas gyvybingumo tikrinimas, suspensija skiesta mažiau – 10^3 ir 10^2 kartų, tačiau po 24 valandų bakterijų gyvybingumas nebuvo fiksuotas. Dėl mažo bakterijų gyvybingumo eksperimentas buvo pakartotas į betono mėginį įdedant 2 kartus daugiau sepiolito (7 lentelė, antrosios sąlygos). Gyvybingumo tikrinimas atliktas su mažais skiedimais: 10^3 ir 10^2 kartų, tačiau bakterijų

gyvybingumas taip pat nebuvo užfiksuotas. Remiantis mažu bakterijų gyvybingumu ankstesniuose eksperimentuose, bandymas kartotas sepiolite imobilizuojant 1000 kartų didesnę pradinę bakterijų koncentraciją. Bakterijų gyvybingumas tikrintas po 3, 7, 14 ir 21 dienos (6 pav). Analizuojant duomenis pateiktus grafike, galima pastebėti, kad bakterijų gyvybingumas bandiniuose nėra tolygus, standartiniai nuokrypiai pagal imtį, nėra statistiškai patikimi ir pabrėžia didelį kintamumą tarp skirtingų bandinių. Toks pasiskirstymas galimas dėl nevienodo sepiolito smulkinimo lygio ir pasiskirstymo betono bandiniuose (5 pav.) bei bakterijų gyvybingumo mažėjimo dėl cemento sąveikos. Po 14 dienų bakterijų gyvybingumo tikrinimo pastebėtas gyvybingumo sumažėjimas 1000 kartų lyginant su pirmuoju tikrinimu (po 3 dienų bandinio kietėjimo), o po 21 dienos bakterijų gyvybingumas nebuvo fiksuotas. Gyvybingų ląstelių skaičius iš esmės sumažėjo didėjant mėginio amžiui, o tai rodo, kad su laiku mažėjo į cementą įtrauktų sporų gyvybingumas (Lee & Park, 2018). Įvertinus gautus rezultatus ir atlikus literatūrinę analizę, taip pat galima daryti prielaidą, kad bakterijų gyvybingumo testas nebuvo atliktas naudojant tinkamą metodiką, dalis bakterijų nesugebėjo atsiskirti iš betono mišinio. Tolimesniuose tyrimuose rekomenduojama palyginti bakterijų gyvybingumo vertinimą naudojant ir kitą metodiką: mėgintuvėlius palikti inkubatoriuje 30 °C temperatūroje 30 minučių, su purtymu. Po to panardinti į vandens ultragarso vonią 20 minučių, 30 °C temperatūroje, kad bakterijos būtų atskirtos nuo matricos (Sandalci et al., 2021).

Mažas bakterijų išgyvenamumas gali būti siejamas su netinkama imobilizavimo metodika. Straipsniuose galima rasti informacijos, kad bakterijų sporos įkapsuliuotos į alginato hidrogelio kapsules išliko gyvybingos po kapsuliavimo ir betono maišymo procesų iki 56 dienų (Fahimizadeh et al., 2020; Wang et al., 2014). Nors naudojant per daug tuščiavidurių kapsulių ar pluoštų tai gali neigiamai paveikti betono konstrukcijos stiprumo savybes (Amran et al., 2022), tačiau tyrimuose naudojant kapsuliavimo sistemas pastebimas plyšio užsandarinimas ir efektyvesnis bakterijų išgyvenamumas (Castro-Alonso et al., 2019).



6 pav. Į sepiolitą įkapsuliuotų *A. pseudofirmus*, *S. cohnii*, *H. halodurans* bakterijų gyvybingumas cemento matricoje po 3, 7 ir 14 dienų

3.5. Betono bandinių savaiminio gijimo stebėjimas vandenyje

Betono bandiniai, paruošti savaiminio gijimo stebėjimui pagal metodinės dalies aprašymą, buvo kietinami kambario sąlygomis 7 dienas, vėliau patalpinti į vandentiekio vandens vonelę. Kaip aprašyta metodinėje dalyje (žiūr. 2.2.9) pirmąją dieną prieš pamerkiant į vandenį, vėliau kas 7 dienas, t.y 7, 14, 21, 28 ir 35 dieną skaitmeniniu mikroskopu buvo matuojamas plyšio plotis. Plyšių užpildymo efektyvumo įvertinimui kiekviename bandinyje markeriu pažymėta 3 vietos, leidžiančios kiekvieną kartą fotografuoti tą pačią bandinio vietą. Prieš gijimo procesą apskaičiuotas vidutinis plyšių plotis betono bandiniuose su skirtingomis bakterijų kultūromis pateiktas lentelėje 10.

10 lentelė. Prieš gijimo procesą vidutiniškai apskaičiuotas plyšių plotis

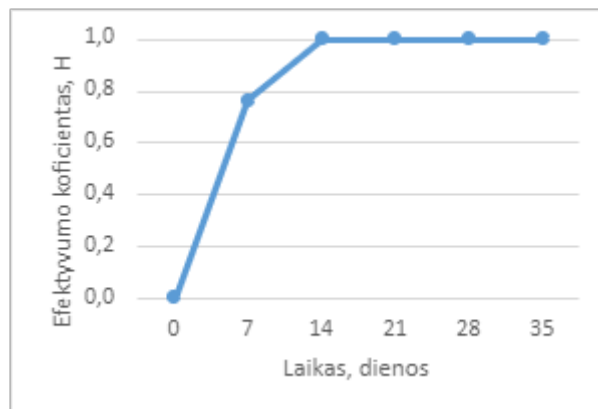
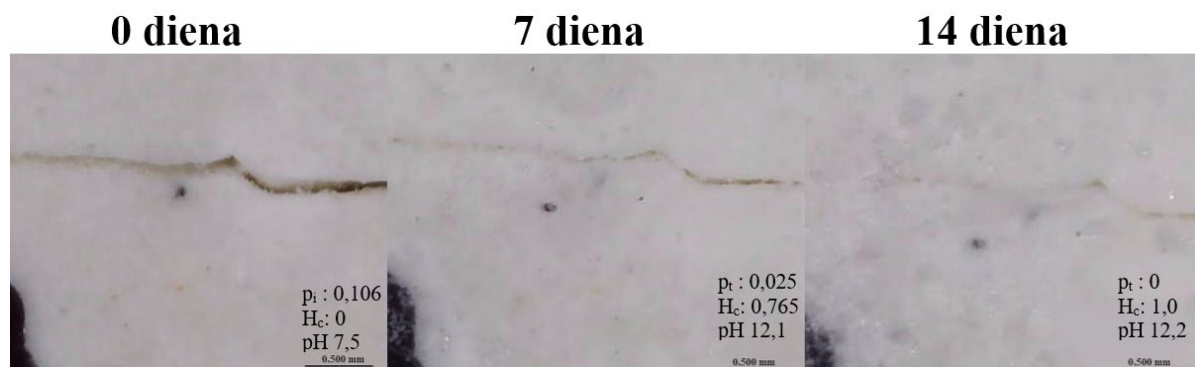
Bakterijų kultūra	Plyšio plotis (mm)
<i>A. pseudofirmus</i>	0,140 ± 0,032 mm
<i>H. halodurans</i>	0,211 ± 0,121 mm
<i>S. cohnii</i>	0,103 ± 0,029 mm

Toliau aptariamie rezultatai apibūdina bandinių gebėjimą gydyti susidariusius plyšius, rezultatų lyginimui pasitelkiamas apskaičiuotas plyšio gijimo koeficientas, kurio reikšmės svyruoja nuo 0 (negyja, $p_i = p_i$) iki 1 (visiškas gijimas, $p_i = 0$). Verta paminėti, kad šis koeficientas apima tik plyšio paviršiuje matomą užsandarinimą, o vidinio plyšio sandarinimo, kuris taip pat lemia medžiagos eksploatavimo savybių atkūrimą, įvertinimas galimas pasitelkiant tik kitus metodus (pavyzdžiui, rentgeno arba neutroninė radiografija ir tomografija) (Ferrara, 2017).

Didžiausiu savaiminio gijimo efektyvumu pasižymėjo bandiniai su sepiolite imobilizuotomis *H. halodurans* bakterijų sporomis (11 lentelė, 7 pav.). Tolygiai per 35 dienas buvo pastebėtas pilnas plyšių užsandarinimas ($H_c = 1,0$) bandiniuose su *H. halodurans* bakterijomis, bei bandinio su *A. pseudofirmus* bakterijomis (žiūr. 11 lentelė, 8 pav. A, B ir C atitinkamai).

11 lentelė. Pradiniai plyšių pločiai ir gijimo koeficientai skirtingų bakterijų kultūrų mėginiuose

Bakterijų kultūra	Pradinis plyšio plotis (mm)	Užpildymo koeficientas
<i>H. halodurans</i>	0,106 ± 0,030 mm	1,000
	0,118 ± 0,012 mm	1,000
	0,085 ± 0,005 mm	1,000
	0,415 ± 0,022 mm	0,117
<i>A. pseudofirmus</i>	0,128 ± 0,019 mm	1,000
	0,109 ± 0,005 mm	0,176
<i>S. cohnii</i>	0,105 ± 0,009 mm	0,505
Kontrolė	0,101 ± 0,009 mm	0,674



7 pav. Betono bandinių su imobilizuotomis *H. halodurans* bakterijomis savaiminio gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,106 mm. Matavimai atlikti prieš eksperimentą (0 diena), po 7 ir 14 dienų, apačioje pateiktas plyšių gijimo efektyvumo (H_c) grafikas su priklausomybe nuo laiko

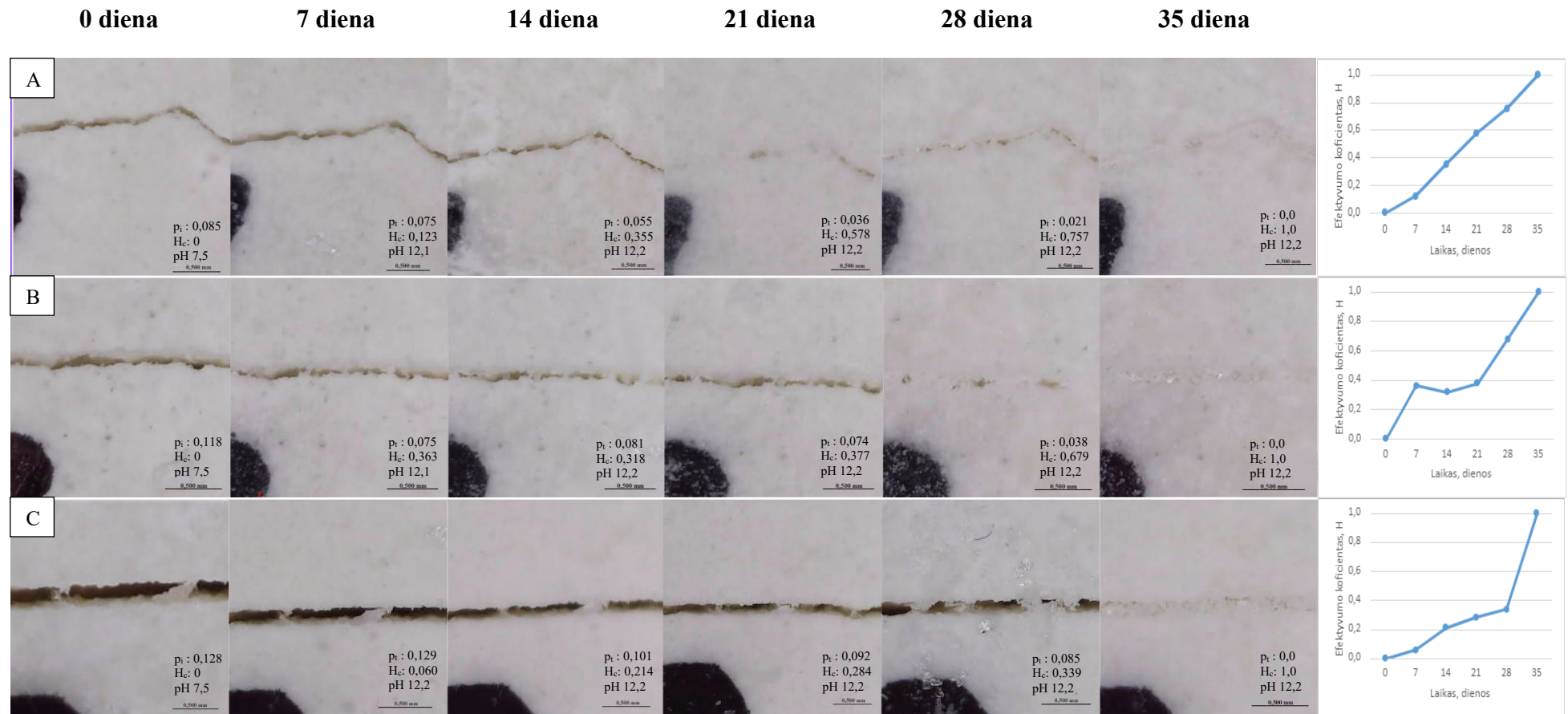
Kontroliniai betono mėginiai, kuriuose nėra bakterijų, taip pat parodė tam tikrą įtrūkimų gijimą. Kaip matyti iš 9 paveikslo, neigiamos kontrolės bandinio plyšio gijimo koeficientas po 35 dienų buvo $H_c = 0,674$, stebimas plyšio sumažėjimas nuo 0,101 iki 0,033 mm. Toks autogeninis kontrolinių mėginių savigydos procesas aprašytas literatūroje ir patikrintas eksperimentiškai, gauti duomenys, kad plyšiai iki 0,180 mm geba užsisandarinti (Wiktor & Jonkers, 2011). Plyšio sandarinimas kontroliniuose mėginiuose gali būti siejamas su daugeliu priežasčių. Tai gali būti nenutrūkstamo cemento dalelių hidratacijos proceso rezultatas dėl nepilno hidratacijos proceso ankstyvame periode ir kalcio karbonato kristalų nusodinimo dėl kalcio hidroksido karbonizavimo, toks procesas gali visiškai užpildyti įtrūkimą, jei plyšys yra mažesnio pločio (Khaliq & Ehsan, 2016).

Bandymų rezultatai yra blogesni, nei tikėtasi, bakterijų imobilizuotų į sepiolitą išgyvenamumas ir savaiminio gijimo procesas nebuvo efektyvus. Toliau iš 10 paveiksle pateikto pavyzdžio, matyti, jog betono bandinys su *S. cohnii* bakterijų sporomis didžiausias plyšio užpildymo efektyvumas 0,505. Didesnių plyšių užpildymas bandiniuose su

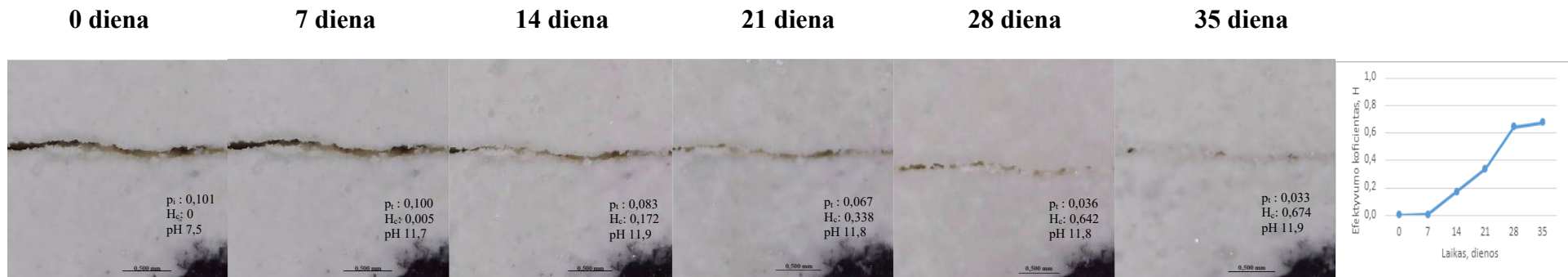
H. halodurans bakterijomis taip pat nebuvo efektyvus, pavyzdys pateiktas priede A, 0,415 mm pločio plyšys sumažėjo iki 0,367 mm, gijimo efektyvumas buvo 0,117. Daugiau pavyzdžių pateikta priede A.

Įvertinus betono bandinių nuotraukas ir apskaičiavus plyšio pločio gijimo efektyvumą per visą stebėjimo laikotarpį, pastebėta tendencija, kad bakterijos gamindamos kalcio karbonatą nevisada tolygiai užsandarina plyšį mažindamos jo spindį. Tolimesniuose darbuose, pagal Luo ir kolegų moksliniame straipsnyje aprašytą bandymą, rekomenduojama išbandyti matuoti ne plyšio plotį skirtingose bandinio vietose, o įvertinti plyšio erdvės kintamumą (ploto mažėjimą) naudojant Image – J programinę įrangą ir išmatuojant tris pasirinktus plyšių plotus (Luo et al., 2022). Gijimo efektyvumo koeficientui apskaičiuoti, galima naudoti tą pačią formulę (3), kaip ir plyšių matavimo atveju, tačiau pakeisti ploto vienetais apskaičiuotais Image – J kompiuterine programa.

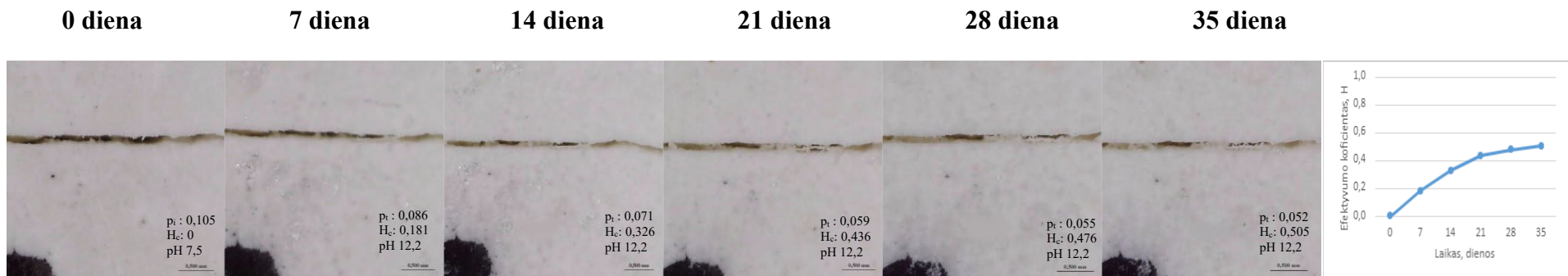
Viena iš priežasčių, kodėl savaiminio gijimo efektyvumas galėjo būti mažesnis nei tikėtasi, tai kad buvo pasirinktas trumpesnis betono bandinių kietėjimo laikas. Literatūros duomenimis standartinėmis sąlygomis po 28 dienų betono matricoje hidratacijos procesai būna baigti ir tokiam mėginyje nebevyksta savaiminiai cemento dalelių pokyčiai. Ankstyvas bandinių naudojimas gali sukelti cemento dalelių pakartotinę hidrataciją, kai šios sureaguoja su vandeniu (Ferrara et al., 2018).



8 pav. Betono bandinių plyšių nuotraukos: A) B) bandinių su sepiolite imobilizuotomis *H. halodurans* bakterijomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,085 ir 0,118 mm. C) bandinio su sepiolite imobilizuotomis *A. pseudofirmus* bakterijomis gijimo mikroskopinis stebėjimo rezultatas, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,128 mm. Dešinėje pateiktas plyšių gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų stebėtas pilnas plyšio užsandarinimas ($H_c = 1$)



9 pav. Kontrolinio betono bandinio su maistinėmis medžiagomis imobilizuotu sepiolitu be bakterijų sporų gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,101 mm. Dešinėje pateiktas plyšio gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų stebėtas dalinis plyšio užsandarinimas ($H_c = 0,674$)



10 pav. Betono bandinio su sepiolite imobilizuotomis *S. cohnii* bakterijų sporomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, kai pradinis plyšio plotis (p_i) buvo 0,105 mm. Dešinėje pateiktas plyšio gijimo efektyvumo grafikas su priklausomybe nuo laiko, po 35 dienų plyšio užpildymo efektyvumas buvo 0,505

Išanalizavus literatūrą ir kitų mokslininkų eksperimentus, toliau pateikiamos rekomendacijos tyrimo tobulinimui tolimesniuose darbuose. Van der Bergh su kolegomis eksperimentiškai nustatė, kad į betono mišinį įmaišius papildomai nebiologinių komponentų, jų atveju smėlio, betono savybių stiprumas pagerėja 32 %. Pastebėtas stiprumo pagerėjimas gali būti paaiškintas cheminiu ryšiu tarp bakterijų nusodinto kalcio karbonato ir konsolidacijos, kurią skatina smėlio dalelės, užpildydamos plyšius. Geriausi gydymo rezultatai buvo gauti mišinio maišymo fazėje sujungus biologinius ir nebiologinius komponentus, kai tuo tarpu naudojant tik bakterijų suspensiją efektyvumas buvo 19 % (van der Bergh et al., 2021). Betono savybės taip pat pagerėjo ir kituose eksperimentuose naudojant smėlį ir bakterijų kultūrą savaiminiam betono gijimui (Achal et al., 2013). Efektyvesnis plyšių gijimas pastebėtas ir tuomet, kai į betono mišinį papildomai yra įmaišoma maistinių medžiagų arba gydymas vyksta maistinėje terpėje, o ne vandenyje (Sandalci et al., 2021). Remiantis šių eksperimentų duomenimis, galima daryti prielaidą, kad į betono mišinį, kartu su cementu, įmaišius papildomų nebiologinių ir/ar maistinių medžiagų, gijimo efektyvumas galėtų padidėti.

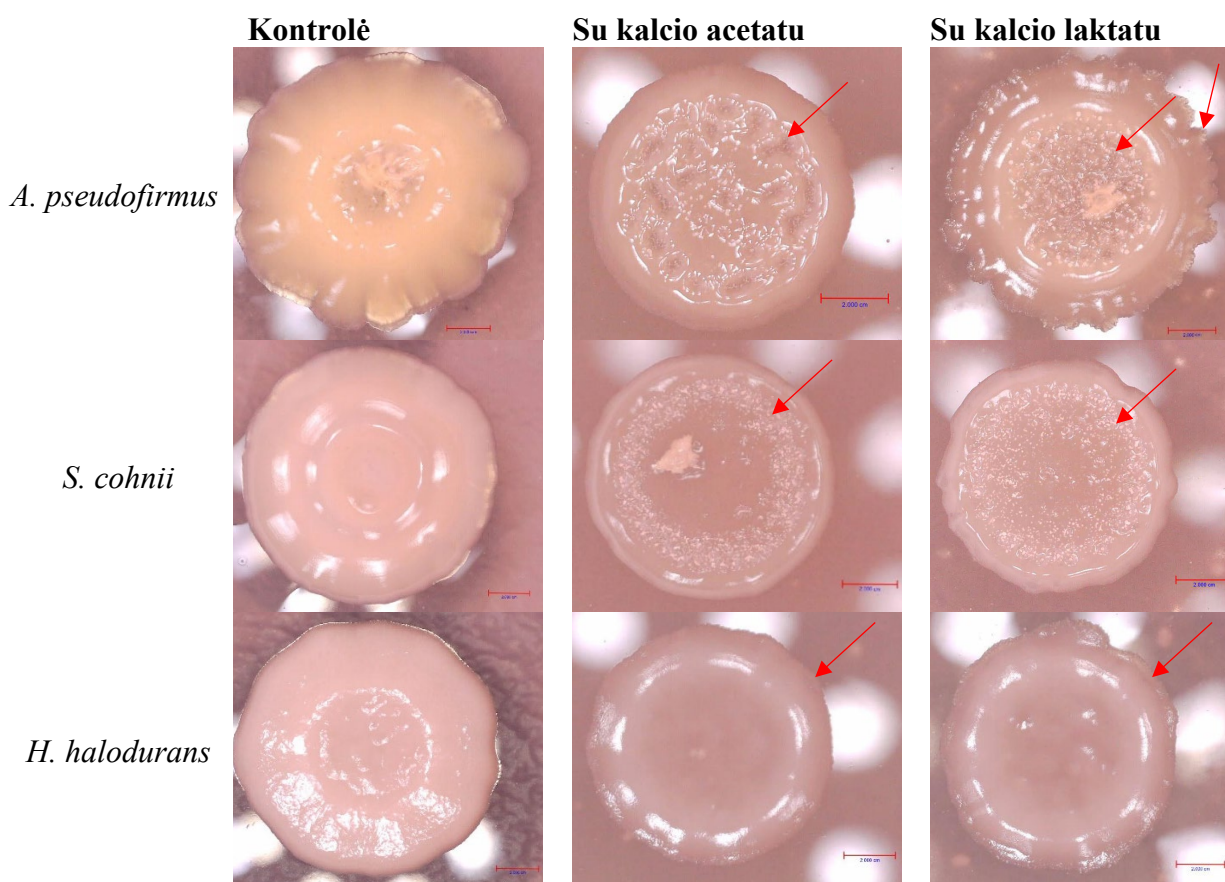
Kita vertus, jokie papildomi kiekybiniai pralaidumo ar savybių atkūrimo testai nebuvo atlikti įvertinti, koks savaiminio gijimo efektyvumas pasiektas, kai mikroskopiškai stebėtas pilnas plyšio užsandarinimas. Vizualinis vertinimas yra viena pagrindinių priemonių įvertinti biologinio betono gijimo procesą, tačiau literatūroje pateikiamos rekomendacijos atlikti skysčių ar dujų pralaidumo tyrimus (Ferrara et al., 2018). Įtrūkusių ir sugijusių betono bandinių pralaidumui vertinti galima išmatuoti per bandinį pratekėjusį vandens kiekį per tam tikrą laiką. Pro plyšį prasiskverbiantčio vandens kiekis mažėja, didėjant plyšio užsandarinimui (Van Tittelboom et al., 2010).

Rekomenduojama tobulinti biologinio betono mišinio sudėtį, optimizuoti mikroorganizmų rūšis ir išgyvenamumą betono matricoje. Mišrios bakterijos turi atkaklesnį išgyvenamumą ir gali geriau atlikti užduotį, todėl galima naudoti du ar daugiau mikroorganizmų, sumaišytų tam tikra proporcija. Bakterijų nešiklis yra svarbus veiksnys, turintis poveikį savaiminiam betono gijimo efektyvumui, todėl verta atlikti daugiau tyrimų ar nešiklio sistema yra tinkama, nes nustatyti optimalų mikroorganizmų pasiskirstymo tankį yra ganėtinai sunku (Shen et al., 2021).

3.6. Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tikrinimas

Betono konstrukcijose pradėjus naudoti MICP bakterijų rūšis, pastebėta, kad pagerėjo gniuždymo jėga, sumažėjo vandens pralaidumas, pailgėjo medžiagos ilgaamžiškumas, padidėja betoninių sijų patvarumas. Vandens absorbcijos greičio sumažėjimas padidina medžiagos atsparumą skilimo procesams. Dėl aukštos pH reikšmės betono bandiniuose, ne visos bakterijų

rūšys geba gaminti kalcio karbonato kristalus. Specifinės bakterijų rūšys, kurios auga šarminėje aplinkoje pasirinktos ir šiame tyrime. Bakterijų gebėjimas formuoti kalcio karbonato kristalus įvertintas ant B4 terpės, pH apie 9, išsėjant bakterijų kultūras ir auginant 3 paras (Zhu & Dittrich, 2016). Po trijų parų šviesiniu skaitmeniniu mikroskopu gautos nuotraukos paveiktos 11 paveiksle. Kontroliniuose mėginiuose, kurių sudėtyje nebuvo kalcito pirmtakų bakterijų kultūros užaugo tolygiai lygiais kraštais, o lėkštelėse, kuriose buvo kalcito pirmtakų: kalcio acetato arba kalcio laktato, stebimas pakitęs vaizdas ir matomi nedideli susidarę kristalai bakterijų kultūros viduryje ir/arba kraštuose.



11 pav. *A. pseudofirmus*, *S. cohnii* ir *H. halodurans* bakterijų mineralizacijos vykdymo tyrimas. Terpėse su kalcio acetatu ir kalcio laktatu bakterijos nusodino kalcio karbonato kristalus (kristalų susidarymo vieta pažymėta rodyklėmis), lyginant su kontrolinėmis grupėmis, kuriose kristalai nesusidarė

Mineralizacijos aktyvumo tyrimas patvirtina, kad tyrime naudotos *A. pseudofirmus*, *S. cohnii* ir *H. halodurans* bakterijų rūšys geba aktyviai vykdyti MICP, kai pH yra šarminis ir aplinkoje yra kalcio karbonato prekursorių (kalcio acetato arba kalcio laktato), todėl yra tinkamos atlikti tolimesnius eksperimentus, kuriant savaime atsikuriantį biologinį betoną.

IŠVADOS

1. Atliktų eksperimentų duomenys įrodo, kad bakterijų koncentracija turi reikšmės efektyviam gijimo procesui, bakterijų gyvybingumas pastebėtas, kai sepiolite imobilizuojama bent 10^{10} bakterijų sporų/ml.
2. Gyvybingų *A. pseudofirmus*, *S. cohnii* ir *H. halodurans* bakterijų sporų skaičius betono bandiniuose po 14 dienų sumažėjo 1000 kartų, o po 21 dienos nebuvo fiksuotas. Šie rezultatai, parodo, kad sepiolitas, kaip nešiklis, nėra efektyvus ir tinkamas apsaugoti bakterijų sporas nuo kontakto su betono matrica.
3. Bakterijų mineralizacijos tyrimas patvirtino, kad *A. pseudofirmus*, *S. cohnii* ir *H. halodurans* bakterijų kamienai, šarminėje terpėje, geba nusodinti kalcio karbonato kristalus.
4. Geriausiu plyšių gijimo efektyvumu pasižymėjo betono bandiniai su *H. halodurans* bakterijų sporomis, greičiausiai užpildytas plyšys buvo per 14 dienų. Kitų betono bandinių su *H. halodurans*, *A. pseudofirmus* ir *S. cohnii* bakterijų sporomis plyšiai buvo užgydyti per 35 dienas arba nepasiekė visiško užpildymo per stebėtą laiką.
5. Rekomenduojama tobulinti biologinio betono mišinio sudėtį, optimizuoti mikroorganizmų rūšis ir kiekius, jų išgyvenamumą betono matricoje, apsvarstyti bakterijų sporų kapsuliavimo galimybę, įvertinti optimalų mikroorganizmų pasiskirstymo tankį.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Achal, V., Mukerjee, A., & Sudhakara Reddy, M. (2013). Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. *Construction and Building Materials*, 48, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.CONBUILDMAT.2013.06.061>
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., & Reddy, M. S. (2009). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 981–988. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0578-z>
- Achal, V., & Pan, X. (2011). Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*, 62(3), 894–902. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9801-4>
- Achal, V., Pan, X., & Özyurt, N. (2011). Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation. *Ecological Engineering*, 37(4), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.11.009>
- Alazhari, M., Sharma, T., Heath, A., Cooper, R., & Paine, K. (2018). Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. *Construction and Building Materials*, 160, 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.11.086>
- Amran, M., Onaizi, A. M., Fediuk, R., Vatin, N. I., Muhammad Rashid, R. S., Abdelgader, H., & Ozbakkaloglu, T. (2022). Self-Healing Concrete as a Prospective Construction Material: A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(9), 1–46. <https://doi.org/10.3390/ma15093214>
- Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. In *SpringerPlus* (Vol. 5, Issue 1, pp. 1–26). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Basaran Bundur, Z., Kirisits, M. J., & Ferron, R. D. (2015). Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. *Cement and Concrete Research*, 67, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2014.10.002>

- Biddeci, G., Spinelli, G., Colomba, P., & Di Blasi, F. (2023). Halloysite Nanotubes and Sepiolite for Health Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms24054801>
- Burne, R. A., & Chen, Y. Y. M. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection*, 2(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00312-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00312-9)
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. In *Frontiers in Materials* (Vol. 6, pp. 1–15). <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>
- Chen, H., Qian, C., & Huang, H. (2016). Self-healing cementitious materials based on bacteria and nutrients immobilized respectively. *Construction and Building Materials*, 126, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.09.023>
- Chen, H.-J., Peng, C.-F., Tang, C.-W., & Chen, Y.-T. (2019). Self-Healing Concrete by Biological Substrate. *Materials*, 12(24), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma12244099>
- Connolly, J., Kaufman, M., Rothman, A., Gupta, R., Redden, G., Schuster, M., Colwell, F., & Gerlach, R. (2013). Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.028>
- de Belie, N., Wang, J., Bundur, Z. B., & Paine, K. (2018). Bacteria-based concrete. *Eco-Efficient Repair and Rehabilitation of Concrete Infrastructures*, 531–567. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102181-1.00019-8>
- Erşan, Y. Ç., de Belie, N., & Boon, N. (2015). Microbially induced CaCO₃ precipitation through denitrification: An optimization study in minimal nutrient environment. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 108–118. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2015.05.006>
- Esaker, M., Hamza, O., Souid, A., & Elliott, D. (2021). Self-healing of bio-cementitious mortar incubated within neutral and acidic soil. *Materials and Structures*, 54(2), 1–16. <https://doi.org/10.1617/s11527-021-01690-1>

- Fahimizadeh, M., Abeyratne, A. D., Mae, L. S., Raman Singh, R. K., & Pasbakhsh, P. (2020). Biological self-healing of cement paste and mortar by non-ureolytic bacteria encapsulated in alginate hydrogel capsules. *Materials*, 13(17), 1–28. <https://doi.org/10.3390/MA13173711>
- Ferrara, L. (2017). An overview on the research on self-healing concrete at Politecnico di Milano. *MATEC Web of Conferences*, 120, 1–7. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201712002001>
- Ferrara, L., Van Mullem, T., Alonso, M. C., Antonaci, P., Borg, R. P., Cuenca, E., Jefferson, A., Ng, P. L., Peled, A., Roig-Flores, M., Sanchez, M., Schroefl, C., Serna, P., Snoeck, D., Tulliani, J. M., & De Belie, N. (2018). Experimental characterization of the self-healing capacity of cement based materials and its effects on the material performance: A state of the art report by COST Action SARCOS WG2. In *Construction and Building Materials* (Vol. 167, pp. 115–142). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.01.143>
- Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W., & Siciliano, S. D. (2003). Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4901–4909. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003>
- Hoffmann, T. D., Reeksting, B. J., & Gebhard, S. (2021). Bacteria-induced mineral precipitation: A mechanistic review. *Microbiology (United Kingdom)*, 167(4), 1–13. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001049>
- Huang, H., & Ye, G. (2015). Self-healing of cracks in cement paste affected by additional Ca²⁺ ions in the healing agent. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 26(3), 309–320. <https://doi.org/10.1177/1045389X14525490>
- Iqbal, D. M., Wong, L. S., & Kong, S. Y. (2021). Bio-Cementation in Construction Materials: A Review. *Materials*, 14(9), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ma14092175>
- Ivanov, V., Stabnikov, V., Stabnikova, O., & Kawasaki, S. (2019). Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2598-9>
- Jain, S., Fang, C., & Achal, V. (2021). A critical review on microbial carbonate precipitation via denitrification process in building materials. In *Bioengineered* (Vol. 12, Issue 1, pp. 7529–7551). <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1979862>

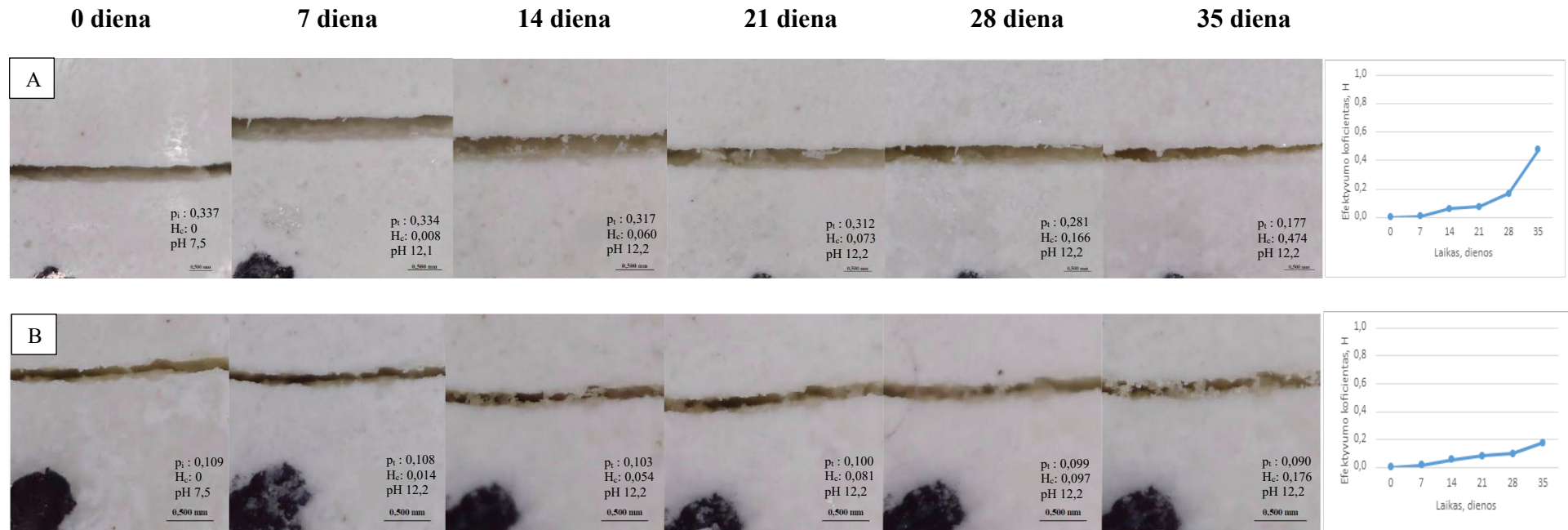
- Jakubovskis, R., Jankutė, A., Guobuzaitė, S., Boris, R., & Urbonavičius, J. (2021). Prolonging bacterial viability in biological concrete: Coated expanded clay particles. *Materials*, 14(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ma14112719>
- Jang, I., Son, D., Son, Y., Min, J., & Yi, C. (2021). Use of methylcellulose-based pellet to enhance the bacterial self-healing of cement composite. *Materials*, 14(20), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma14206113>
- Jiang, L., Jia, G., Jiang, C., & Li, Z. (2020). Sugar-coated expanded perlite as a bacterial carrier for crack-healing concrete applications. *Construction and Building Materials*, 232, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117222>
- Jiang, L., Jia, G., Wang, Y., & Li, Z. (2020). Optimization of Sporulation and Germination Conditions of Functional Bacteria for Concrete Crack-Healing and Evaluation of their Repair Capacity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 12(9), 10938–10948. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21465>
- Khaliq, W., & Ehsan, M. B. (2016). Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. *Construction and Building Materials*, 102, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.11.006>
- Lee, Y. S., & Park, W. (2018). Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3059–3070. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8830-y>
- Lucas, S. S., von Tapavicza, M., Schmidt, A. M., Bertling, J., & Nellesen, A. (2016). Study of quantification methods in self-healing ceramics, polymers and concrete: A route towards standardization. *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 27(19), 2577–2598. <https://doi.org/10.1177/1045389X16641205>
- Luo, M., Liu, Y., Li, X., & Dai, J. (2022). Crack Self-Healing of Cement Mortar Containing Ureolytic Bacteria Immobilized in Artificial Functional Carrier under Different Exposure Environments. *Buildings* 2022, Vol. 12, Page 1348, 12(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/BUILDINGS12091348>
- Marvasi, M., Gallagher, K. L., Martinez, L. C., Molina Pagan, W. C., Rodríguez Santiago, R. E., Castilloveitia Vega, G., & Visscher, P. T. (2012). Importance of B4 Medium in

- Determining Organomineralization Potential of Bacterial Environmental Isolates. *Geomicrobiology Journal*, 29(10), 916–924. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.636145>
- Mechtcherine, V., Wyrzykowski, M., Schröfl, C., Snoeck, D., Lura, P., De Belie, N., Mignon, A., Van Vlierberghe, S., Klemm, A. J., Almeida, F. C. R., Tenório Filho, J. R., Boshoff, W. P., Reinhardt, H. W., & Igarashi, S. I. (2021). Application of super absorbent polymers (SAP) in concrete construction—update of RILEM state-of-the-art report. *Materials and Structures/Materiaux et Constructions*, 54(2), 1–20. <https://doi.org/10.1617/s11527-021-01668-z>
- Mormak, D. A., & Casida, L. E. (1985). Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1356–1360. <https://doi.org/10.1128/aem.49.6.1356-1360.1985>
- Nielsen, S. D., Koren, K., Löbmann, K., Hinge, M., Scoma, A., Kjeldsen, K. U., & Røy, H. (2020). Constraints on CaCO₃ precipitation in superabsorbent polymer by aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 365–375. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10215-4>
- Okwadha, G. D. O., & Li, J. (2010). Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. *Chemosphere*, 81(9), 1143–1148. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.09.066>
- Paine, K. (2016). Bacteria-Based Self-Healing of Concrete: Effects of Environment, Exposure and Crack Size. *Proceedings of the RILEM Conference on Microorganisms-Cementitious Materials Interactions*, 1, 1–15.
- Pungrasmi, W., Intarasoontron, J., Jongvivatsakul, P., & Likitlersuang, S. (2019). Evaluation of Microencapsulation Techniques for MICP Bacterial Spores Applied in Self-Healing Concrete. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49002-6>
- Riad, I. M., Elshami, A. A., & Elshikh, M. M. Y. (2022). Influence of concentration and proportion prepared bacteria on properties of self-healing concrete in sulfate environment. *Innovative Infrastructure Solutions*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s41062-021-00670-2>
- Sandalci, I., Tezer, M. M., & Basaran Bundur, Z. (2021). Immobilization of Bacterial Cells on Natural Minerals for Self-Healing Cement-Based Materials. *Frontiers in Built Environment*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbuil.2021.655935>

- Sharma, T. K., Alazhari, M., Heath, A., Paine, K., & Cooper, R. M. (2017). Alkaliphilic *Bacillus* species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1233–1244. <https://doi.org/10.1111/jam.13421>
- Shen, L., Yu, W., Li, L., Zhang, T., Abshir, I. Y., Luo, P., & Liu, Z. (2021). Microorganism, carriers, and immobilization methods of the microbial self-healing cement-based composites: A review. In *Materials* (Vol. 14, Issue 17, pp. 1–27). <https://doi.org/10.3390/ma14175116>
- Snoeck, D., & De Belie, N. (2019). Autogenous healing in strain-hardening cementitious materials with and without superabsorbent polymers: An 8-year study. *Frontiers in Materials*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00048>
- Šovljanski, O., Pezo, L., Tomić, A., Ranitović, A., Cvetković, D., & Markov, S. (2021). Contribution of bacterial cells as nucleation centers in microbiologically induced CaCO_3 precipitation—A mathematical modeling approach. *Journal of Basic Microbiology*, 61(9), 835–848. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100275>
- Šovljanski, O., Tomić, A., & Markov, S. (2022). Relationship between Bacterial Contribution and Self-Healing Effect of Cement-Based Materials. *Microorganisms*, 10(7), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071399>
- Tian, L., Wang, L., Wang, K., Zhang, Y., & Liang, J. (2019). The Preparation and Properties of Porous Sepiolite Ceramics. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-43918-9>
- van der Bergh, J. M., Miljević, B., Vučetić, S., Šovljanski, O., Markov, S., Riley, M., Ranogajec, J., & Bras, A. (2021). Comparison of Microbially Induced Healing Solutions for Crack Repairs of Cement-Based Infrastructure. *Sustainability*, 13(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/su13084287>
- van Tittelboom, K., & de Belie, N. (2013). Self-Healing in Cementitious Materials—A Review. *Materials*, 6(6), 2182–2217. <https://doi.org/10.3390/ma6062182>
- Van Tittelboom, K., De Belie, N., De Muynck, W., & Verstraete, W. (2010). Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research*, 40(1), 157–166. <https://doi.org/10.1016/J.CEMCONRES.2009.08.025>

- Wang, J. Y., Snoeck, D., Van Vlierberghe, S., Verstraete, W., & De Belie, N. (2014). Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Construction and Building Materials*, 68, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2014.06.018>
- Wegmann, U., Carvalho, A. L., Stocks, M., & Carding, S. R. (2017). Use of genetically modified bacteria for drug delivery in humans: Revisiting the safety aspect. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02591-6>
- Wiktor, V., & Jonkers, H. M. (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. *Cement and Concrete Composites*, 33(7), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012>
- Zhang, J., Liu, Y., Feng, T., Zhou, M., Zhao, L., Zhou, A., & Li, Z. (2017). Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. *Construction and Building Materials*, 148, 619–617. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.05.021>
- Zhang, Weng, Ding, & Qian. (2019). Use of Genetically Modified Bacteria to Repair Cracks in Concrete. *Materials*, 12(23), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ma12233912>
- Zhu, T., & Dittrich, M. (2016). Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(JAN), 1–21. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2016.00004/BIBTEX>

A Priedas



12 pav. Betono bandinių plyšių nuotraukos: A) bandinių su sepiolite imobilizuotomis *H. halodurans* bakterijomis gijimo mikroskopiniai stebėjimo rezultatai, pradinis plyšio plotis (p_i) sumažėjo nuo 0,337 mm iki 0,177 mm, gijimo efektyvumo koeficientas po 35 dienų – 0,474; B) bandinio su sepiolite imobilizuotomis *A. pseudofirmus* bakterijomis gijimo mikroskopinis stebėjimo rezultatas, pradinis plyšio plotis (p_i) nuo 0,109 mm sumažėjo iki 0,090 mm, gijimo efektyvumo koeficientas – 0,176