KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VI KHUẨN *Oceanobacillus* sp. ĐẾN VIỆC TẠO TỦA CALCITE VÀ KHẢ NĂNG KẾT DÍNH BÊ TÔNG

Phạm Anh Vũ[1,2*], Vũ Thị Tuyết Nhung[1,2], Nguyễn Hoàng Dũng[1], Trần Trung Kiên[1], Lê Quỳnh Loan[1], Huỳnh Thị Điệp[1], Trần Thị Mỹ Ngọc[1], Lê Tấn Hưng[3]

[1]*Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam*

[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam*

[3]*Công ty TNHH Sinh học Phương Nam*

*Email: *vupham12081995@gmail.com*

Ngày nhận bài: 15/7/2020; Ngày chấp nhận đăng: 18/3/2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành để khảo sát đơn yếu tố các điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. trong quá trình tạo tủa calcite và khảo sát khả năng tự làm liền vết nứt của thanh bê tông khi bổ sung dịch vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Khả năng tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được đánh giá thông qua việc định lượng tủa calcite trong môi trường urea được thay đổi các yếu tố riêng rẽ như các nguồn Ca^{2+} khác nhau và nồng độ $CaCl_2$. Kết quả khảo sát đơn yếu tố trên môi trường urea cho thấy nguồn calcium chloride tạo sản lượng tủa cao nhất, nồng độ $CaCl_2$ 50 g/L cho kết tủa $CaCO_3$ tối ưu với sản lượng đạt 52,05 mg/mL. Bên cạnh đó, thanh bê tông có bổ sung dịch vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. với mật độ 10^{10} CFU/mL có khả năng tự liền vết nứt sau 10 ngày ngâm trong nước. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. có tiềm năng ứng dụng trong việc kết dính bê tông thông qua sự hình thành tủa calcite, đặc biệt là trong lĩnh vực xây dựng để sản xuất bê tông sinh học.

Từ khóa: Vi khuẩn *Oceanobacillus* sp., tủa calcite, bê tông tự liền, bê tông sinh học.

1. GIỚI THIỆU

Ngày nay có rất nhiều công trình xây dựng bằng bê tông. Do đó, bê tông là một vật liệu không thể thiếu trên thế giới. Theo thời gian sử dụng, bê tông xuất hiện các vết nứt và các lỗ nhỏ trên bề mặt. Nguyên nhân gây ra hiện tượng này chủ yếu là do tác động từ điều kiện tự nhiên, do kết cấu bê tông thiếu khả năng chịu lực hoặc do sụt lún nền móng. Tác nhân tự nhiên như nước mưa và các tác nhân ăn mòn khác có thể thấm dần vào những kẽ nứt, làm rỉ sét lõi thép bên trong phá hủy toàn bộ khối cấu trúc. Việc sửa chữa các công trình bê tông đòi hỏi chi phí rất cao và tốn nhiều công lao động. Từ đó, các nhà khoa học đã nghĩ đến việc nghiên cứu ra một loại bê tông tự liền nhờ khả năng tạo calcite của vi sinh vật như một loại xi măng sinh học.

Trong tự nhiên, vi khuẩn tạo ra kết tủa calcite bằng nhiều cơ chế khác nhau bao gồm: quang hợp, thủy phân urea, khử sulfate, oxy hóa kỵ khí sulfide, oxy hóa methane, con đường tạo biofilm và các hợp chất polymer ngoại bào. Nhiều nghiên cứu đã tập trung vào con đường thủy phân urea và đại diện là vi khuẩn *Sprorosarcina pasteurii* (thường gọi là *Bacillus pasteurii*). Chủng vi khuẩn này được phân lập trong đất, chúng có đặc điểm là sản

sinh ra lượng enzyme urease rất cao, không gây bệnh, sản sinh bào tử, và đặc biệt có khả năng tạo ra kết tủa calcite [1, 2]. Ngoài ra, một số nghiên cứu trên thế giới cũng đã phân lập được các chủng vi khuẩn tạo calcite như: *L. spharicus* CH5, *K. flava* CR1, *B. megaterium* SS3, *B. thuringiensis*, *Halomonas* sp. SR4, *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*. Đặc điểm chung của các chủng vi khuẩn này là khả năng sản xuất enzyme urease [3, 4]. Chủng vi khuẩn *Oceanobacillus profundus* được phân lập từ lõi trầm tích ở vùng biển phía Đông của Hàn Quốc [5]. Tuy nhiên, chủng này chưa được nghiên cứu sâu về khả năng tạo tủa calcite cũng như khả năng kết dính bê tông. Gần đây, vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được phân lập từ vùng núi đá vôi ở tỉnh Bình Phước, qua khảo sát sơ bộ ban đầu vi khuẩn này đặc biệt có khả năng sinh bào tử nên chúng có thể tồn tại trong môi trường tự nhiên một thời gian dài và có khả năng tạo tủa calcite ($CaCO_3$) cao (kết quả không được báo cáo). Trên thế giới đã có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng tạo kết tủa calcite từ các chủng vi sinh vật cũng như những ứng dụng tiềm năng của chúng. Một nhóm nghiên cứu sử dụng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ứng dụng vào việc cải thiện cường độ nén của bê tông. Kết quả cho thấy mẫu bê tông bổ sung vi khuẩn có cường độ nén cao xấp xỉ 30% so với mẫu đối chứng [6]. Năm 2015, một nhóm nghiên cứu thực hiện phân lập các vi khuẩn kết tủa calcite và kiểm tra sự phù hợp của các vi khuẩn này để sử dụng trong bê tông nhằm cải thiện cường độ nén của bê tông [7]. Một nhóm nghiên cứu đã gây đột biến thành công dòng *S. pasteurii* bằng cách chiếu tia cực tím. Chủng đột biến này hướng đến mục đích tạo ra nhiều urease hơn để sản xuất calcite tối đa và phát triển ở pH cao [8]. Nghiên cứu khác cho thấy việc sử dụng *Bacillus flexus* làm tăng 18% độ cứng của vữa xi măng [9]. Tuy nhiên, ở nước ta những nghiên cứu về vi khuẩn tạo tủa calcite chưa được thực hiện nhiều. Các nghiên cứu đã công bố chủ yếu tập trung vào việc nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn tạo khoáng để cải thiện các vết nứt trên vật liệu bê tông. Một nhóm nghiên cứu đã ứng dụng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 đến khả năng tự liền vết nứt của mẫu bê tông nhờ sự khoáng hóa của vi khuẩn [10], nhưng đây là chủng vi khuẩn có nguồn gốc từ nước ngoài. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu trong nước được tiến hành về việc ứng dụng vi khuẩn bản địa *Oceanobacillus* sp. đến việc tạo tủa calcite và kết dính bê tông. Chính vì vậy, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. đến việc tạo tủa calcite và khả năng kết dính bê tông để làm nền tảng cho việc tạo xi măng sinh học phục vụ các nhu cầu thực tiễn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được cung cấp từ Phòng Vi sinh ứng dụng, Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường urea với thành phần gồm: $CaCl_2$: 50 g/L, urea: 20 g/L, cao nấm men: 20 g/L (Merck - Đức), pH 6,8.

2.2. Khảo sát khả năng tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. trong các điều kiện môi trường khác nhau

Vi khuẩn được tăng sinh trên môi trường urea để làm môi trường nền cho thí nghiệm khảo sát đơn yếu tố các điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn trong quá trình tạo tủa calcite. Các yếu tố môi trường được khảo sát bao gồm: nguồn Ca^{2+} và nồng độ $CaCl_2$ được lựa chọn điều kiện nhiệt độ 35 °C, pH 6,8. Thành phần môi trường (g/L) khảo sát nguồn Ca^{2+} gồm: calcium chloride: 50, calcium acetate: 50, calcium lactate: 50, urea: 20, cao nấm men: 20. Thành phần môi trường (g/L) khảo sát nồng độ $CaCl_2$

gồm: urea: 20, cao nấm men: 20 và $CaCl_2$ từ 20 đến 60. Các nghiệm thức lặp lại 3 lần, sau đó định lượng kết tủa calcite.

2.3. Định lượng kết tủa calcite

Vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được tăng sinh trong môi trường urea điều kiện lắc 200 vòng/phút trong 24 giờ ở nhiệt độ 35 °C đến khi đạt mật độ 10^8 CFU/mL. Dịch nuôi cấy vi khuẩn (1 mL) được cho vào bình chứa 50 mL môi trường ở các nghiệm thức khác nhau và nuôi ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Dịch vi khuẩn nuôi cấy sau 7 ngày được ly tâm lạnh 4 °C ở 13000 vòng/phút trong 10 phút. Phần kết tủa calcite và sinh khối vi khuẩn được thu nhận và hòa tan trở lại trong 50 mL dung dịch đệm TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,5), sử dụng phương pháp siêu âm bằng máy VCX500 sonicator (Sonics and Materials - Mỹ) để phá vỡ màng tế bào. Tiếp đến lysozyme được bổ sung vào dung dịch huyền phù tế bào đến nồng độ cuối cùng đạt 1 mg/mL và ủ ở 37 °C trong 1 giờ cho đến khi tế bào được phân giải hoàn toàn. Dung dịch mảnh vỡ tế bào được loại bỏ hoàn toàn bằng phương pháp ly tâm. Phần tủa calcite còn lại được rửa với nước cất vô trùng, sau đó được lọc và sấy khô ở 45 °C đến trọng lượng không đổi. Khối lượng kết tủa được cân bằng cân phân tích 4 số (Mettler Toledo - Liên doanh Mỹ - Thụy Sỹ) và ghi nhận kết quả.

2.4. Khảo sát khả năng kết dính bê tông của chủng vi khuẩn *Oceanobacillus* sp.

2.4.1. Chuẩn bị mẫu bê tông sinh học

Các nguyên liệu chế tạo vữa bê tông được lựa chọn đáp ứng theo yêu cầu tiêu chuẩn Việt Nam [10]. Các thành phần vữa bê tông bao gồm: xi măng Vicem Hà Tiên, cát xây dựng với kích thước hạt < 2 mm, diatomite Celatom (VMC Group Sài Gòn), nước sinh hoạt phòng thí nghiệm. Vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được nuôi cấy trên môi trường urea điều kiện lắc 24 giờ ở nhiệt độ 35 °C đến khi đạt mật độ 10^{10} CFU/mL tiến hành đổ mẫu bê tông. Thí nghiệm kết dính thanh bê tông được tiến hành với 2 nghiệm thức (nghiệm thức 1 và nghiệm thức 2) và 1 mẫu đối chứng không bổ sung dịch vi khuẩn. Nghiệm thức 1 được bố trí như sau: đổ mẫu vữa bê tông kích thước 20 × 5 × 3 cm bao gồm 450 g cát, 150 g xi măng, 150 mL dịch vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. (3 : 1 : 1). Nghiệm thức 2 cũng tiến hành đổ mẫu vữa bê tông kích thước 20 × 5 × 3 cm nhưng thành phần nguyên liệu và tỷ lệ phối trộn có sự thay đổi. Thành phần nguyên liệu nghiệm thức 2 bao gồm 450 g cát, 75 g xi măng, 75 mL dịch vi khuẩn, 75 g diatomite. Mẫu đối chứng được thực hiện bằng cách đổ mẫu vữa bê tông kích thước 20 × 5 × 3 cm nguyên liệu bao gồm: 450 g cát, 150 g xi măng, 150 mL nước sinh hoạt trong phòng thí nghiệm. Thanh bê tông đã cứng sau 24 giờ được tạo vết đứt gãy nhân tạo ở vị trí giữa thanh, cố định thanh bê tông bằng dây thun và ngâm trong nước sinh hoạt. Thanh bê tông ngâm trong nước sau 10 ngày, 20 ngày và 30 ngày được lấy ra để quan sát sự hiện diện của kết tủa calcite trên bề mặt, bên trong vết đứt gãy và kiểm tra sự kết dính của 2 mảnh bê tông bằng cách tháo dây cố định, sau đó ghi nhận lại kết quả tự liền của mẫu thanh bê tông. Tiếp theo mẫu kết tủa khoáng do vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. tạo ra trên bề mặt vết đứt gãy của thanh bê tông sinh học được thu nhận để phân tích thành phần khoáng $CaCO_3$ và một số nguyên tố: K, Na, Mg, Al, Si và Fe bằng phương pháp Scanning Electron Microscope (SEM) kết hợp phương pháp Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) (Kính hiển vi điện tử quét kết hợp phổ phân tích tán xạ năng lượng tia X). Tinh thể khoáng tạo thành được xác định ở dạng aragonite, vaterite hay là dạng calcite bằng phương pháp X-Ray diffraction (XRD) (Phổ phân tích nhiễu xạ bột tia X). Một mẫu tinh thể calcite ($CaCO_3$) tinh khiết (Merck - Đức) cũng được phân tích thành phần hóa học và dạng tinh thể để làm mẫu đối chứng.

2.4.2. Định lượng mật độ vi khuẩn Oceanobacillus sp. bằng phương pháp pha loãng tới hạn (MPN)

Sử dụng các mẫu bê tông sinh học ở nghiệm thức 1 và nghiệm thức 2 đã thực hiện ở nội dung 2.4.1 để định lượng mật độ vi khuẩn, các mẫu được ngâm trong nước sinh hoạt trong thời gian 35 ngày. Tiếp theo, trong mỗi tuần mẫu bê tông được lấy ra để định lượng mật độ vi khuẩn bằng phương pháp MPN hệ thống 15 ống. Quy trình định lượng mật độ vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được thực hiện như sau: Các ống nghiệm được chuẩn bị với môi trường gồm: 9 mL nước cất và 9 mL môi trường urea. Các mẫu bê tông được nghiền nhỏ và cân 10 g mẫu cho vào 90 mL nước cất và định mức đến 100 mL, vortex đều mẫu và pha loãng thành các dãy nồng độ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. Dịch pha loãng các nồng độ (1 mL) được cho vào 5 ống nghiệm chứa 9 mL môi trường urea, đem ủ ở 35 °C trong 7 ngày. Số lượng ống nghiệm có khả năng tạo tủa calcite trên bề mặt môi trường, trên thành ống nghiệm, dưới đáy ống nghiệm được ghi nhận và tra bảng MPN để xác định mật độ tế bào tương ứng.

2.5. Xử lý số liệu

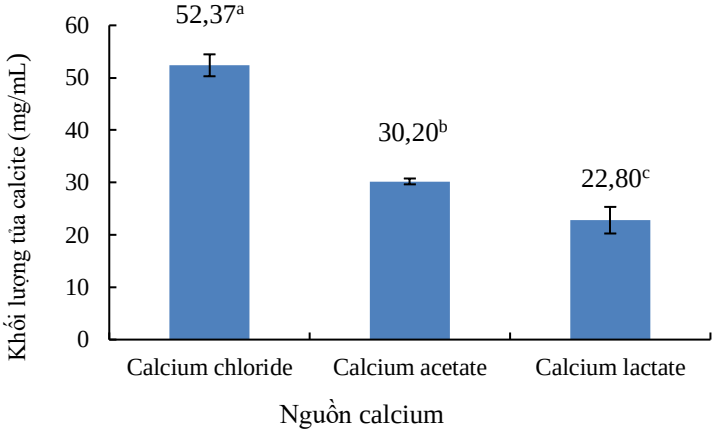
Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được ghi nhận, xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và được biểu thị ở giá trị trung bình. Các phương pháp thống kê, phân tích phương sai ANOVA được thực hiện bằng phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát khả năng tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. trong các điều kiện môi trường khác nhau

3.1.1. Ảnh hưởng của nguồn Ca^{2+} lên khả năng tạo tủa calcite

Bên cạnh các yếu tố dinh dưỡng thì nguồn ion Ca^{2+} là một trong những thành phần không thể thiếu trong việc tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Các nguồn Ca^{2+} ảnh hưởng rõ rệt đến khối lượng tủa calcite tạo thành và được trình bày ở Hình 1.



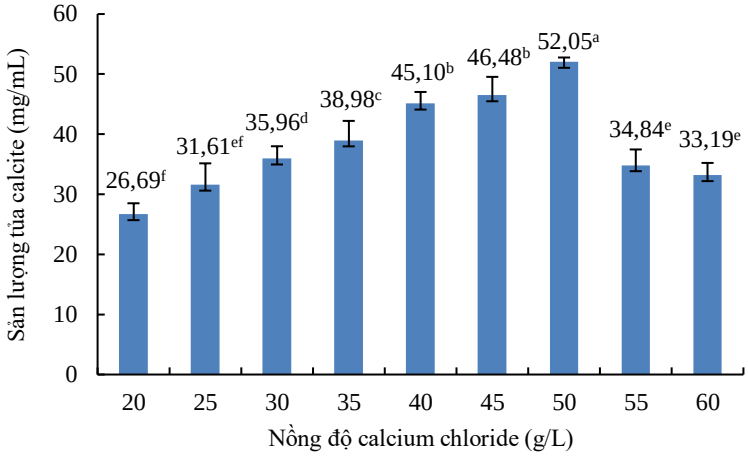
Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn Ca^{2+} lên khả năng tạo tủa calcite
Các ký tự ^{abc} là giá trị trung bình cột, thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Theo kết quả Hình 1 thì cả 3 nguồn calcium được khảo sát đều tạo tủa calcite của vi khuẩn *Ocenobacillus* sp. Kết tủa calcite được thu nhận lại và được cân bằng cân phân tích 4 số. Trong đó, khối lượng kết tủa calcite từ nguồn calcium chloride ($CaCl_2$) đạt cao nhất

52,37 mg/mL, tiếp đến là khối lượng kết tủa từ nguồn calcium acetate đạt 30,20 mg/mL, cuối cùng khối lượng tủa từ nguồn calcium lactate là thấp nhất đạt 22,80 mg/mL. Theo quan sát trong quá trình thu kết tủa thì nguồn calcium chloride bám dính vào thành bình chặt hơn nguồn calcium acetate và nguồn calcium lactate. So sánh với nghiên cứu trước đây khi sử dụng vi khuẩn *Bacillus* sp. CR2 để khảo sát khả năng tạo tủa calcite đối với các nguồn calcium khác nhau. Kết quả cho thấy các nguồn calcium có ảnh hưởng đến việc tạo tủa calcite. Trong đó nguồn calcium chloride thích hợp nhất để tạo kết tủa calcite khi đạt 2,32 mg (trọng lượng khô calcite/khối lượng khô tế bào) [11]. Do đó, nguồn calcium là yếu tố quan trọng đối với sự kết tủa $CaCO_3$.

3.1.2. Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ lên khả năng tạo tủa calcite

Ion Ca^{2+} là một trong những nguyên tố quan trọng trong thành phần tủa calcite. Do đó, nồng độ ion Ca^{2+} có ảnh hưởng rất lớn đến sự tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ lên khả năng tạo tủa calcite được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ lên khả năng tạo tủa calcite
Các ký tự ^{abcdef} là giá trị trung bình cột, thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Ảnh hưởng của nồng độ $CaCl_2$ lên khả năng tạo tủa calcite được thực hiện ở các nồng độ từ 20 g/L tới 60 g/L. Kết quả ở Hình 2 cho thấy vi khuẩn tạo ra kết tủa calcite ở tất cả các nồng độ, khi nồng độ $CaCl_2$ tăng từ 20 g/L tới 60 g/L thì khối lượng tủa cũng tăng theo, trong đó nồng độ $CaCl_2$ ở 50 g/L cho lượng kết tủa đạt ngưỡng cao nhất 52,05 mg/mL. Sau khi đạt tới ngưỡng tủa cao nhất với nồng độ $CaCl_2$ là 50 g/L nếu tăng nồng độ $CaCl_2$ thêm nữa thì khối lượng tủa sẽ giảm dần, với nồng độ $CaCl_2$ tăng từ 55 g/L đến 60 g/L thì khối lượng tủa calcite lại giảm từ 34,84 mg/mL xuống còn 33,19 mg/mL. Kết quả thí nghiệm này phù hợp với nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng khi nồng độ $CaCl_2$ tăng từ 25 mM lên 250 mM thì sẽ tăng khả năng tạo tủa calcite [12], nhưng nếu nồng độ $CaCl_2$ tăng quá mức thì sẽ gây độc cho vi khuẩn vì vi khuẩn chỉ cần một lượng $CaCl_2$ nhất định [13].

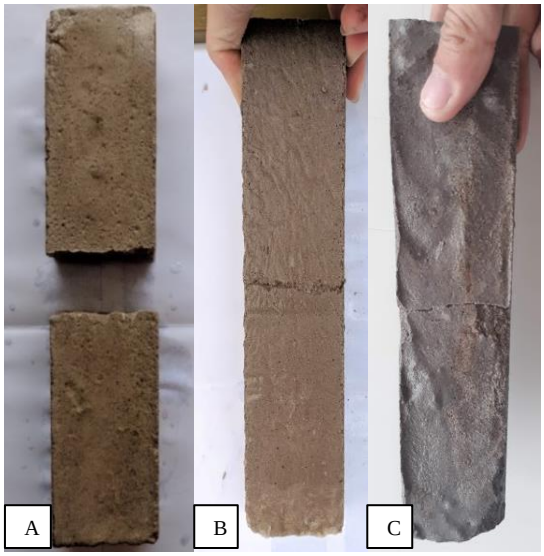
3.2. Khảo sát khả năng kết dính bê tông và định lượng mật độ vi khuẩn trong bê tông

3.2.1. Khảo sát khả năng kết dính bê tông của vi khuẩn

Khả năng kết dính thanh bê tông được thực hiện dựa trên sự tạo kết tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Kết quả khảo sát khả năng kết dính bê tông được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tỷ lệ % bê tông tự liền sau khi ngâm nước

Mẫu bê tông	Tỷ lệ % bê tông tự liền sau khi ngâm nước		
	Ngày 10	Ngày 20	Ngày 30
Đối chứng	0	0	0
Nghiệm thức 1	52	72	80
Nghiệm thức 2	28	48	64



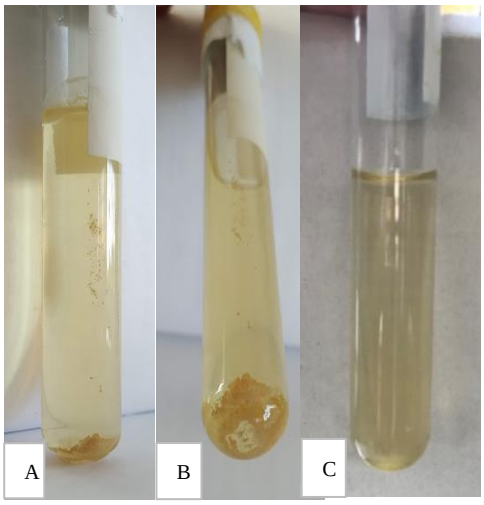
Hình 3. Thanh bê tông sau 30 ngày ngâm trong nước: (A) Thanh đối chứng, (B) Thanh bê tông nghiệm thức 1, (C) Thanh bê tông nghiệm thức 2.

Kết quả ở Bảng 1 và Hình 3 cho thấy khi bổ sung dịch vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. vào bê tông thì thanh bê tông có khả năng liền lại sau khi được cố định và ngâm trong nước sinh hoạt. Qua quá trình thí nghiệm khảo sát khả năng kết dính bê tông bằng chủng vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. thì tỷ lệ % bê tông tự liền ở nghiệm thức 1 cao hơn nghiệm thức 2. Trong 10 ngày đầu khảo sát thì tỷ lệ % bê tông tự liền ở nghiệm thức 1 đạt 52%, trong khi đó ở nghiệm thức 2 chỉ đạt 28%. Sang đến 20 ngày và 30 ngày thì tỷ lệ % bê tông tự liền ở 2 nghiệm thức đều tăng lên, đến ngày thứ 30 thì tỉ lệ % bê tông tự liền ở nghiệm thức 1 đạt 80% và nghiệm thức 2 đạt 64%. Thanh bê tông được bổ sung dịch vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. giúp mẫu bê tông có khả năng tự liền các vết nứt sau 10 ngày. Trong đó, mẫu bê tông có sử dụng vi khuẩn phối trộn với diatomite cho khả năng làm liền vết nứt chậm hơn so với mẫu bổ sung dung dịch vi khuẩn. Bởi vì diatomite là một chất trơ được dùng để giữ vi khuẩn tạo tủa calcite cho nên khả năng tiếp xúc với môi trường ngoài không thuận lợi bằng vi khuẩn tự do. So sánh với kết quả nghiên cứu trước đây, sử dụng diatomite cố định vi khuẩn *Bacillus subtilis* HU58 cho bê tông tự liền vết nứt thì vết nứt đã tự liền từ 3 đến 28 ngày, nghiên cứu của chúng tôi sử dụng dịch vi khuẩn tươi và dịch vi khuẩn phối trộn với diatomite thì vết nứt cũng đã tự liền từ 10 đến 30 ngày khảo sát [10].

3.2.2. Định lượng mật độ vi khuẩn Oceanobacillus sp. trong mẫu vữa bê tông

Mật độ vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. trong mẫu vữa bê tông được định lượng bằng phương pháp MPN với các độ pha loãng mẫu khác nhau nhằm đánh giá số lượng vi sinh vật hiện diện trong một thể tích mẫu. Kết quả hiện tượng phản ứng tạo tủa calcite do vi khuẩn

Oceanobacillus sp. tạo ra trên thành ống nghiệm và dưới đáy ống nghiệm được thể hiện ở Hình 4 và số ống nghiệm dương tính được trình bày ở Bảng 2.



Hình 4. Ống nghiệm dương tính với vi khuẩn *Oceanobacillus* sp.
(A) kết tủa calcite trên thành ống nghiệm, (B) kết tủa calcite dưới đáy ống nghiệm,
(C) ống nghiệm đối chứng

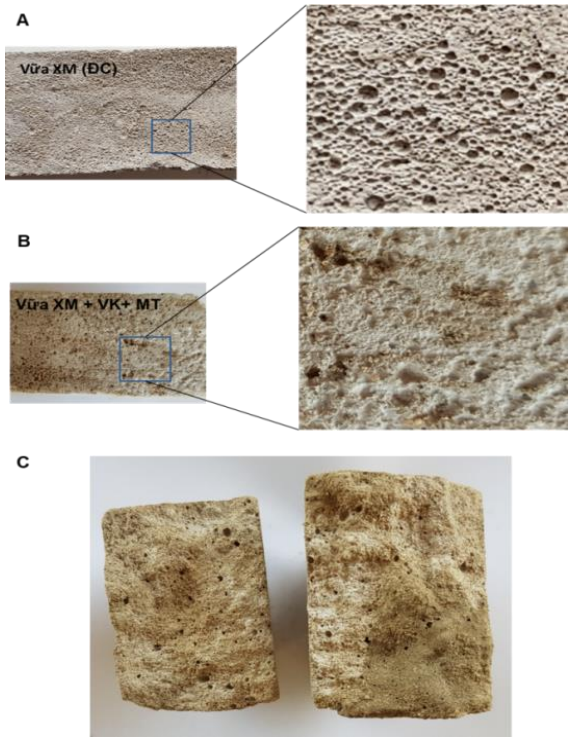
Bảng 2. Kết quả định lượng mật độ vi khuẩn *Oceanobacilllus* sp. ở nghiệm thức 1 và nghiệm thức 2

Thời gian cấy (ngày)	MPN ở nghiệm thức 1 (MPN/100 mL)	MPN ở nghiệm thức 2 (MPN/100 mL)
7	9,2 ± 0,8	33,6 ± 1,1
14	7,4 ± 1,1	25,8 ± 0,8
21	9,6 ± 0,5	9 ± 1,6
28	9,6 ± 1,1	6,8 ± 0,8
35	6,8 ± 0,8	5 ± 0,7

Kết quả thí nghiệm ở Hình 4 và Bảng 2 cho thấy vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. có khả năng phát triển trong bê tông. Điều này cho thấy, tiềm năng ứng dụng *Oceanobacillus* sp. trong công nghiệp vật liệu xây dựng để sản xuất xi măng sinh học hoặc gia cố đất cát bằng quá trình khoáng hóa sinh học. Nhìn chung, diatomite có khả năng giữ vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. tồn tại trong bê tông lâu hơn. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu trước đây đã cho thấy rằng diatomite bảo vệ được vi khuẩn khỏi môi trường khắc nghiệt bên ngoài trong thời gian dài từ đó phát huy được khả năng tạo khoáng sinh học, giúp gia tăng cường độ chịu nén và tạo hiệu ứng tự liền vết nứt [10]. Tuy nhiên, theo kết quả thí nghiệm với vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. thì diatomite cho thấy không có hiệu quả cao trong việc bảo quản vi khuẩn cũng như trong thí nghiệm đánh giá khả năng làm liền vết nứt (Bảng 1 và 2).

3.3. Thành phần khoáng do vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. tạo thành

Theo ghi nhận khi thực hiện thí nghiệm, các thanh bê tông sinh học bổ sung vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. có sự khác biệt với thanh bê tông đối chứng (Hình 5).

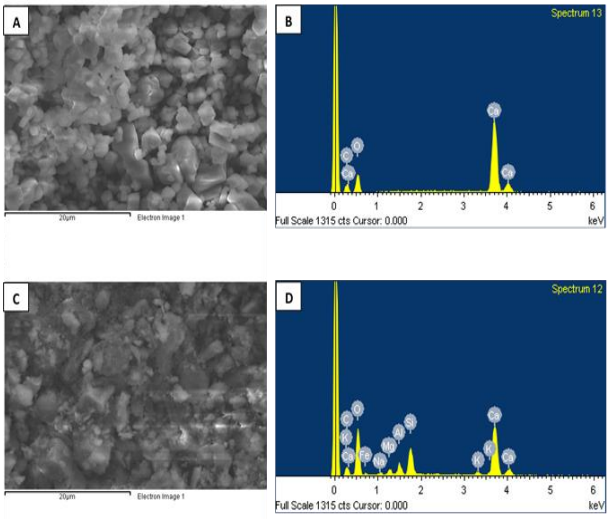


Hình 5. Bề mặt các mẫu bê tông
(A) mẫu đối chứng: Vữa xi măng; (B) mẫu bê tông sinh học: Vữa xi măng bổ sung vi khuẩn và thành phần môi trường; (C) bề mặt vết đứt gãy của mẫu bê tông sinh học.
(Bề mặt các mẫu bê tông được chụp bằng máy ảnh Canon EOS 70D, độ phóng đại 0,19 x)

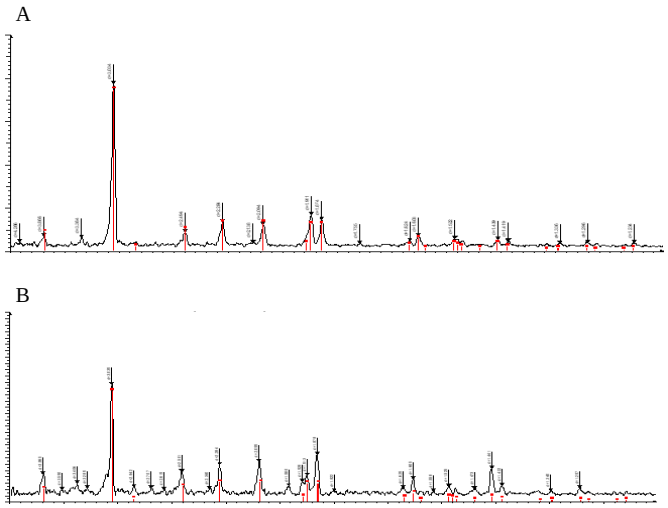
Hình 5 cho thấy trên bề mặt các mẫu bê tông đối chứng chỉ gồm vữa xi măng: cát: nước thì có xuất hiện các lỗ nhỏ li ti (Hình 5A). Trên bề mặt mẫu bê tông có bổ sung vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. cho thấy có một lớp tinh thể khoáng màu trắng, ở một số vị trí các tinh thể khoáng này lấp đầy vào các lỗ nhỏ trên bề mặt bê tông (Hình 5B). Đồng thời, tại vị trí vết đứt gãy của bê tông cũng có xuất hiện tinh thể trắng (Hình 5C). Điều này chứng minh, vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. đã thực hiện khả năng tạo khoáng hình thành các tinh thể $CaCO_3$ và lấp vào các lỗ nhỏ trên bề mặt và tại vị trí nứt gãy của bê tông, giúp bê tông có khả năng tự liền.

Kết tủa khoáng màu trắng hình thành trên bề mặt vết đứt gãy của thanh bê tông được thu nhận lại, phân tích chụp SEM - EDS và phân tích phổ XRD để xác định thành phần hóa học, song song với đó, mẫu bột $CaCO_3$ tinh khiết cũng được phân tích để làm đối chứng, kết quả phân tích dạng tinh thể và thành phần hóa học được trình bày ở Hình 6.

Kết quả ở Hình 6 cho thấy, khoáng do vi khuẩn tạo ra trên bề mặt bê tông có hình dạng tinh thể lập phương (trigonal) (như hộp thoi, lăng trụ hoặc tam giác lệch) tương tự tinh thể $CaCO_3$. Phân tích phổ EDS cho thấy, thành phần chính của mẫu khoáng do vi khuẩn tạo thành tại vết đứt gãy có sự hiện diện của các peak chính tương tự như tinh thể $CaCO_3$. Ngoài ra, trong mẫu còn có sự hiện diện của các ion kim loại khác như K, Fe, Mg, Al và Si. Đây là các thành phần phụ gia trong vữa xi măng bị lẫn vào trong quá trình thu mẫu. Mẫu cũng được tiếp tục phân tích phổ XRD để xác định dạng đa hình tinh thể, kết quả phân tích phổ XRD được trình bày ở Hình 7.



Hình 6. Kết quả chụp SEM và phổ EDS của mẫu khoáng.
(A) Kết quả chụp SEM, (B) Kết quả phổ EDS của mẫu khoáng $CaCO_3$ tinh khiết;
(C) Kết quả chụp SEM, (D)Kết quả phổ EDS của mẫu khoáng thu tại vết đứt gãy bê tông.



Hình 7. Kết quả phân tích phổ XRD của mẫu khoáng: (A) kết quả XRD của mẫu khoáng $CaCO_3$ tinh khiết; (B) kết quả XRD của mẫu khoáng thu tại vết đứt gãy của bê tông.

Kết quả phân tích thể hiện ở Hình 7 cho thấy mẫu khoáng do vi khuẩn tạo thành tại vị trí đứt gãy có 100% là dạng tinh thể calcite. Đây là dạng bền nhất trong các dạng tinh thể của $CaCO_3$ (gồm có calcite, agaronite và vaterite). Như vậy, có thể kết luận chủng vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. có khả năng tạo ra các tinh thể $CaCO_3$ dạng calcite màu trắng để lấp đầy các lỗ li ti trên bề mặt mẫu vữa và tại vị trí đứt gãy của bê tông, giúp bê tông có khả năng tự liền vết nứt sau 10 ngày.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tiến hành khảo sát đơn yếu tố các điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn trong quá trình tạo tủa calcite của vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Trong đó, các yếu tố môi trường được khảo sát như nguồn Ca^{2+}, nồng độ

$CaCl_2$ đều có ảnh hưởng đến quá trình tạo tủa $CaCO_3$. Việc thử nghiệm phối trộn các mẫu vữa bê tông có bổ sung vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. được thực hiện ở 2 dạng vi khuẩn tươi và phối trộn vi khuẩn với diatomite. Kết quả bước đầu ghi nhận cả 2 hình thức trên đều có khả năng phục hồi vết đứt gãy của mẫu bê tông sau 10 ngày ngâm dưỡng hộ trong nước. Mặt khác nhóm nghiên cứu đang tiến hành thí nghiệm với chất mang khác nhằm tìm ra loại chất mang phù hợp hơn cho các ứng dụng với vi khuẩn *Oceanobacillus* sp. Phần kết tủa khoáng do vi khuẩn tạo thành trên bề mặt vết nứt của thanh bê tông được phân tích SEM-EDS và thành phần phổ XRD đều chứng minh $CaCO_3$ ở dạng calcite. Nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng cao trong việc sản xuất xi măng sinh học phục vụ cho lĩnh vực xây dựng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dhami N.K., Reddy M.S., Mukherjee A. - Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization, Applied Biochemistry Biotechnology **172** (2014) 2552-2561.
2. Dejong J.T., Mortensen B.M., Martinez B.C., Nelson D.C. - Bio-mediated soil improvement, Ecological Engineering **36** (2) (2010) 197-210.
3. Ferris F.G., Stehmeier L.G., Kantzas A., Mourits F.M. - Bacteriogenic mineral plugging, Journal of Canadian Petroleum Technology **35** (1996) 56-61.
4. Ferris F.G., Phoenix V., Fujita Y., Smith R.W. - Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20°C in artificial groundwater, Geochimica et Cosmochimica Acta **68** (8) (2004) 1701-1710.
5. Kim Y.G., Choi D.H., Hyun S., Cho B.C. - *Oceanobacillus profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea sediment core, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **57** (2007) 409-413.
6. Hamid Kalhori, Raheb Bagherpour - Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete, Construction and Building Materials **148** (2017) 249-260.
7. Krishnapriya S., Venkatesh Babu D.L., Prince Arulraj G. - Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete, Microbiological Research **174** (2015) 48-55.
8. Achal V., Mukherjee A., Basu P.C., Reddy M.S. - Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36** (7) (2009) 981-988.
9. Jagadeesha Kumar B.G., Prabhakara R., Pushpa H. - Effect of bacterial calcite precipitation on compressive strength of mortar cubes, International Journal of Engineering and Advanced Technology **2** (2013) 2249-8958.
10. Nguyễn Ngọc Trí Huỳnh, Phạm Văn Hùng, Nghị Mai Phương và Nguyễn Khánh Sơn - Sử dụng diatomite cố định vi khuẩn *Bacillus subtilis* Hu58 cho bê tông tự liền vết nứt, Tạp chí Khoa học Đại học Thủ Dầu Một **32** (2017) 75-81.
11. Achal V., Pan X. - Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2, Applied Biochemistry and Biotechnology **173** (1) (2014) 307-317.
12. Okwadha G.D.O., Li J. - Optimum conditions for microbial carbonate precipitation, Chemosphere **81** (9) (2010) 1143-1148.

13. Xuejiao Zhu, Jianyun Wang, Nele De Belie, Nico Boon. - Complementing urea hydrolysis and nitrate reduction for improved microbially induced calcium carbonate precipitation, Applied Microbiology and Biotechnology **103** (21-22) (2019) 8825-8838.

ABSTRACT

INVESTIGATE INFLUENCE OF SOME CULTURE CONDITIONS OF *Oceanobacillus* sp. ON CALCITE PRECIPITATION AND CONCRETE BINDING ABILITY

Pham Anh Vu[1,2*], Vu Thi Tuyet Nhung[1,2], Nguyen Hoang Dung[1], Tran Trung Kien[1], Le Quynh Loan[1], Huynh Thi Diep[1], Tran Thi My Ngoc[1], Le Tan Hung[3]

[1]*Institute of Tropical Biology, VAST*

[2]*Graduate University of Science anh Technology, VAST*

[3]*Phuong Nam Biology Company Limited*

*Email: *vupham12081995@gmail.com*

This study was conducted to determine the effect of the environmental factors on calcium carbonate precipitation of *Oceanobacillus* sp. and their self-healing ability on cracked concrete. The ability to precipitate calcite of *Oceanobacillus* sp. was assessed through the $CaCO_3$ quantification in the improved urea medium with individual factors changing such as Ca^{2+} sources and concentration of Ca^{2+}. The results showed that $CaCl_2$ was the best Ca^{2+} source for calcite precipitation, the order environmental factors of 50 g/L $CaCl_2$ was suitable condition for calcite precipitation with the highest $CaCO_3$ concentration of 52,05 mg/mL determined in the production medium. In another experiment, the cracked concrete bar samples that were supplemented with 10^{10} CFU/mL *Oceanobacillus* sp. bacteria showed the self-healing capability after 10 days immersed in water. These results provided the exciting possibility that *Oceanobacillus* sp. could be applied in many fields due to their ability of inducing calcite precipitation, especially in the field of building materials and biological concrete.

Keywords: Oceanobacillus sp., calcite precipitation, self-healing, bio-concrete.