

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Augusta IVAŠKĖ

***BACILLUS* GENTIES BAKTERIJŲ
GYVYBINGUMO POVEIKIS PLYŠIŲ
UŽSIVĖRIMUI BETONE**

DAKTARO DISERTACIJA

TECHNOLOGIJOS MOKSLAI,
MEDŽIAGŲ INŽINERIJA (T 008)

Vilnius, 2025

Disertacija rengta 2019–2025 metais Vilniaus Gedimino technikos universitete.

Vadovas

prof. dr. Jaunius URBONAVIČIUS (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Medžiagų inžinerija – T 008).

Vilniaus Gedimino technikos universiteto Medžiagų inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Pirmininkas

dr. Valentin ANTONOVIČ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Medžiagų inžinerija – T 008).

Nariai:

dr. Viktor KIZINIEVIČ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Medžiagų inžinerija – T 008),

doc. dr. Eglė LASTAUSKIENĖ (Vilniaus universitetas, Biologija – N 010),

dr. Ina PUNDIENĖ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Medžiagų inžinerija – T 008),

dr. Gonzalo SANZ-DIEZ DE ULZURRUM CASALS (Madrido politechnikos universitetas, Ispanija, Statybos inžinerija – T002).

Disertacija bus ginama viešame Medžiagų inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje **2025 m. vasario 7 d. 13 val.** Vilniaus Gedimino technikos universiteto *Aula Doctoralis* posėdžių salėje.

Adresas: Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius, Lietuva.

Tel.: (8 5) 274 4956; faksas (8 5) 270 0112; el. paštas doktor@vilniustech.lt

Pranešimai apie numatomą ginti disertaciją išsiųsti 2025 m. sausio 6 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Gedimino technikos universiteto talpykloje <https://etalpykla.vilniustech.lt> ir Vilniaus Gedimino technikos universiteto bibliotekoje (Saulėtekio al. 14, LT-10223 Vilnius, Lietuva).

Vilniaus Gedimino technikos universiteto 2025-004-M mokslo literatūros knyga
doi:10.20334/2025-004-M

© Vilniaus Gedimino technikos universitetas, 2025

© Augusta Ivaškė, 2025

augusta.ivaske@vilniustech.lt

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Augusta IVAŠKĖ

**INFLUENCE OF THE VIABILITY OF
BACILLUS GENUS BACTERIA ON THE
CRACK CLOSURE IN CONCRETE**

DOCTORAL DISSERTATION

TECHNOLOGICAL SCIENCES,
MATERIALS ENGINEERING (T 008)

Vilnius, 2025

The doctoral dissertation was prepared at Vilnius Gediminas Technical University in 2019–2025.

Supervisor

Prof. Dr Jaunius URBONAVIČIUS (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008).

The Dissertation Defence Council of the Scientific Field of Materials Engineering of Vilnius Gediminas Technical University:

Chairman

Dr Valentin ANTONOVIČ (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008).

Members:

Dr Viktor KIZINIEVIČ (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008),

Assoc. Prof. Dr Eglė LASTAUSKIENĖ (Vilnius University, Biology – N 010),

Dr Ina PUNDIENĖ (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008),

Dr Gonzalo SANZ-DIEZ DE ULZURRUM CASALS (Technical University of Madrid, Spain, Civil Engineering – T002).

The dissertation will be defended at the public meeting of the Dissertation Defence Council of the Scientific Field of Materials Engineering in the *Aula Doctoralis* Hall of Vilnius Gediminas Technical University at **1 p.m. on 7 February 2025**.

Address: Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius, Lithuania.

Tel.: +370 5 274 4956; fax +370 5 270 0112; e-mail: doktor@vilniustech.lt

A notification on the intended defence of the dissertation was sent on 6 January 2025. A copy of the doctoral dissertation is available for review at the Vilnius Gediminas Technical University repository <https://etalpykla.vilniustech.lt> and the Library of Vilnius Gediminas Technical University (Saulėtekio al. 14, LT-10223 Vilnius, Lithuania).

Reziumė

Disertacijoje nagrinėjamas į skirtingus nešiklius įmobilizuotų *Bacillus* genties bakterijų poveikis betonui ir jų gyvybingumas šarminėje aplinkoje. Disertacijos tikslas – parinkti biologinio betono sudėtį, kuri užtikrintų bakterijų gyvybingumą, bei ištirti plyšių užsivėrimą jame laboratorinėmis sąlygomis. Užtikrinus bakterijų gyvybingumą biologinio betono mišinyje, tokios konstrukcijos galėtų būti eksploatuojamos ilgesnį laiką ir būtų sumažintos jų priežiūros išlaidos.

Darbe sprendžiami keli uždaviniai, susiję su bakterijų gyvybingumu betone: ištirti cemento sudėties bei aplinkos poveikio įtaką skirtingų rūšių bakterijų gyvybingumui, parinkti bakterijų nešiklį biologiniame betone ir ištirti biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumą. Šie uždaviniai suformuluoti atsižvelgiant į tai, kad vienas iš didžiausių iššūkių, kuriant biologinį betoną, yra ilgalaikio į jį įterptų bakterijų gyvybingumo užtikrinimas.

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, naudotos literatūros šaltiniai, bendrosios išvados, autorės publikacijų disertacijos tema sąrašai, rekomendacijos ir santrauka anglų kalba.

Įvadiniamame skyriuje pristatoma tiriamoji problema, darbo aktualumas, aprašomas tyrimų objektas, formuluojamas darbo tikslas ir uždaviniai, aprašoma tyrimų metodika, darbo mokslinis naujumas, darbo rezultatų praktinė reikšmė, ginamieji teiginiai. Įvado pabaigoje pristatomos disertacijos tema autorės paskelbtos publikacijos, pranešimai konferencijose ir disertacijos struktūra.

Pirmasis skyrius skirtas literatūros apžvalgai. Šiame skyriuje aprašomi bakterinio CaCO_3 išsodinimo keliai, apžvelgiami nešikliai, kurie gali būti naudojami bakterijų apsaugai biologiniame betone, aptariamos bakterijų bei kitų mikroorganizmų panaudojimo biologiniame betone galimybės. Skyriaus pabaigoje formuluojamos išvados ir disertacijos uždaviniai.

Antrajame skyriuje pateiktos tyrimo metu naudotos medžiagos, aprašomi metodai, naudoti cemento pastų savybių, bakterijų gyvybingumo smulkiagrūdžiam betone ir savaiminio plyšių užsivėrimo tyrimams.

Trečiajame skyriuje aprašyti bakterijų gyvybingumo tyrimai biologiniame betone, naudojant skirtingas bakterijų rūšis ir nešiklius. Pateikta bakterijų gyvybingumo priklausomybė nuo cemento tipų, cemento hidratacijos temperatūros, aplinkos sąlygų. Taip pat ištirtas bakterijų gebėjimas užtaisyti atsivėrusius plyšius biologiniame betone.

Disertacijos tema paskelbti 5 moksliniai straipsniai: 4 – mokslo žurnaluose, įtrauktuose į *Web of Science* duomenų bazę, turinčiuose citavimo indeksą, 1 – recenzuojamame mokslo žurnale. Disertacijos tema skaityti 8 pranešimai Lietuvos ir tarptautinėse konferencijose.

Abstract

This dissertation investigates the effect of *Bacillus* genus bacteria immobilised in different carriers on concrete and their viability in alkaline environments. The dissertation aims to select the composition of biological concrete that ensures the viability of the bacteria and to investigate the closure of cracks in it under laboratory conditions. Ensuring bacterial viability in biological concrete could allow such structures to last longer and reduce maintenance costs.

The dissertation approaches several objectives, such as investigating the influence of cement composition and environmental factors on the viability of different types of bacteria in biological concrete, selecting the most suitable bacterial carrier, and investigating the crack closure ability of the concrete. These tasks are formulated considering that one of the significant challenges in developing biological concrete is ensuring the long-term viability of the incorporated bacteria.

The dissertation consists of an introduction, three chapters, General Conclusions, References, lists of publications on the topic of the dissertation, Recommendations, and Summary in English.

The introduction presents the problem under investigation, the relevance of the dissertation, and the research object. It formulates the purpose and tasks, research methodology, scientific novelty, the practical significance of results, and defended statements. The introduction ends by presenting the author's publications on the subject of the dissertation, information on presentations at scientific conferences, and describes the structure of the dissertation.

The first chapter revises the used literature. This chapter describes the pathways of bacterial CaCO_3 precipitation, reviews the carriers that can be used to protect bacteria in biological concrete, and discusses the possibilities of using bacteria and other microorganisms in biological concrete. At the end of the chapter, conclusions are drawn, and the dissertation's tasks are formulated.

The second chapter presents the materials used in the study and describes the methods used to investigate the properties of cement pastes, the viability of bacteria in concrete and the self-closing of cracks.

The third chapter presents bacterial viability studies in biological concrete using different bacterial species and carriers. It reveals the dependence of bacterial viability on cement types, cement hydration temperature, and environmental conditions. The efficiency of crack closure in biological concrete is also investigated.

Four articles on the dissertation topic were published in scientific journals included in the list of *Web of Science*, and one was published in another peer-reviewed journal. Eight presentations on the topic of the dissertation were made at national and international conferences.

Žymėjimai

Simboliai

H_c – plyšių užsivėrimo koeficientas (angl. *self-healing coefficient*);

w_i – pradinis plyšio plotis (angl. *initial width of the crack*);

w_t – plyšio plotis po užsivėrimo (angl. *width of the crack after closure*).

Santrumpos

BIM – biologiskai indukuota mineralizacija (angl. *biologically induced mineralization*);

BKM – biologiskai kontroliuojama mineralizacija (angl. *biologically controlled mineralization*);

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*);

KSV – kolonijas sudarantys vienetai (angl. *colony forming units*);

MICP – mikrobiologiškai indukuotas kalcito nusodinimas (angl. *microbiologically induced calcite precipitation*);

MIK – mažiausia inhibuojanti koncentracija (angl. *minimum inhibitory concentration*);

MKPC – kalio magnio fosfato cementas (angl. *potassium magnesium phosphate cement*).

Terminai ir apibrėžimai

Alkalifilinės bakterijos – tai bakterijos, kurių augimui yra reikalingas šarminis pH, o optimalus augimas vyksta esant pH 9 (angl. *Alkalophilic bacteria are bacteria that require an alkaline pH for growth They grow optimally at pH 9*).

Turinys

IVADAS	1
Problemos formulavimas.....	1
Darbo aktualumas.....	2
Tyrimų objektas.....	2
Darbo tikslas.....	3
Darbo uždaviniai	3
Tyrimų metodika	3
Darbo mokslinis naujumas	4
Darbo rezultatų praktinė reikšmė	4
Ginamieji teiginiai	4
Darbo rezultatų aprobavimas.....	4
Disertacijos struktūra.....	5
Padėka	5
1. BIOLOGINĖS MINERALIZACIJOS IR BAKTERIJŲ PANAUDOJIMO	
BIOLOGINIAME BETONE APŽVALGA	7
1.1. Biologinė mineralizacija	7
1.2. Metaboliniai kalcio karbonato išsodinimo keliai	9
1.2.1. Autotrofiniai bakterinio karbonato nusodinimo keliai.....	10
1.2.2. Heterotrofiniai bakterinio karbonato nusodinimo keliai	11
1.3. Bakterijų panaudojimas biologiniame betone.....	14
1.4. Nešiklių tipai ir pritaikymo galimybės	15

1.4.1. Užpildų panaudojimas bakterijų sporų imobilizavimui.....	16
1.4.2. Hidrogelių panaudojimas bakterijų sporų imobilizavimui.....	19
1.5. Grybų panaudojimas biologiniame betone.....	21
1.6. Pirmojo skyriaus išvados ir disertacijos uždavinių formulavimas.....	23
2. BAKTERIJŲ GYVYBINGUMO BIOLOGINIAME BETONE TYRIMŲ	
METODAI	25
2.1. Tyrimų metu naudoti bakterijų kamienai ir medžiagos.....	26
2.1.1. Bakterijų kamienai.....	26
2.1.2. Mikrobiologinės terpės.....	26
2.1.3. Cemento tipai.....	27
2.1.4. Užpildai.....	27
2.1.5. Vanduo.....	27
2.1.6. Metalų oksidų nanodalelės.....	27
2.2. Cemento savybių tyrimai.....	27
2.2.1. Cemento suspensijos pH ir elektrinio laidumo matavimas.....	28
2.2.2. Cheminės cementų sudėties nustatymas.....	28
2.2.3. Egzoterminės temperatūros matavimas.....	28
2.3. Užpildo savybių tyrimai skenuojančios elektroninės mikroskopijos metodu.....	28
2.4. Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tyrimai.....	29
2.5. Bakterijų gyvybingumo tyrimo metodai.....	29
2.5.1. Bakterijų kultūrų išsaugojimas.....	30
2.5.2. Bakterijų auginimas bei sporų ruošimas.....	30
2.5.3. Bakterijų sporų imobilizavimas į pūsto molio daleles.....	31
2.5.4. Pūsto molio dalelių apsauginio sluoksnio formavimas.....	31
2.5.5. Betono bandinių paruošimas su pūsto molio dalelėmis.....	32
2.5.6. Į pūstą molį imobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimas.....	36
2.5.7. Bakterijų įkapsuliuavimas į hidrogelį.....	37
2.5.8. Maistinių medžiagų, įkapsuliuotų į hidrogelį, pralaidumo nustatymas.....	38
2.5.9. Betono bandinių paruošimas su hidrogelio kapsulėmis.....	38
2.5.10. Į hidrogelį imobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai.....	39
2.6. Plyšių užsivėrimo biologiniame betone tyrimai.....	40
2.6.1. Plyšių atvėrimas biologinio betono bandiniuose.....	40
2.6.2. Biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumo tyrimas.....	41
2.6.3. Biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumo tyrimas imituojamomis lietaus sąlygomis.....	41
2.7. Metalų oksidų toksiškumo tyrimai.....	42
2.8. Antrojo skyriaus išvados.....	42
3. BAKTERIJŲ GYVYBINGUMO BETONE TYRIMAI	45
3.1. Cemento tešlos savybių kietėjimo metu apibūdinimas.....	46
3.1.1. Egzoterminės temperatūros matavimai.....	46
3.1.2. pH ir elektrinis laidumas.....	47
3.1.3. Cemento cheminė sudėtis.....	48
3.2. <i>Bacillus</i> genties bakterijų mineralizacijos aktyvumas.....	51

3.3. Į pūstą molį įterptų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai betone	52
3.3.1. Bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai betono bandiniuose su skirtingais cemento tipais.....	53
3.3.2. Betono kietėjimo temperatūros įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiam betone.....	56
3.3.3. Pūsto molio su įmobilizuotomis bakterijų sporomis apvaskalų įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiam betone.....	57
3.3.4. Betono kietėjimo sąlygų įtaka bakterijų gyvybingumui	62
3.3.5. Užšalimo-atšalimo ir šalčio ciklų įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiam betone.....	63
3.4. Į hidrogelį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai smulkiagrūdžiam betone	66
3.4.1. Kalcio alginato kapsulių charakterizavimas ir įkapsuliuavimo efektyvumo įvertinimas	67
3.4.2. Maisto medžiagų pralaidumo kalcio alginato kapsulėse vertinimas.....	68
3.4.3. Bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelį, gyvybingumo cementinėse medžiagose tyrimas	69
3.4.4. Betono kietėjimo temperatūros įtaka į hidrogelį įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumui betone	71
3.5. Biologinio betono plyšių užsivėrimo vertinimas	72
3.5.1. Bakterijų, impregnuotų į pūstą molį, gebėjimo užverti plyšius vertinimas	73
3.5.2. Bakterijų, impregnuotų į pūstą molį, gebėjimo užverti plyšius betone vertinimas imituojamomis lietaus sąlygomis	75
3.5.3. Bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelį, gebėjimo užverti plyšius betone vertinimas	77
3.6. Metalų oksidų antibakterinio aktyvumo tyrimai.....	81
3.7. Trečiojo skyriaus išvados	84
 BENDROSIOS IŠVADOS	 85
REKOMENDACIJOS	87
LITERATŪRA IR ŠALTINIAI.....	89
AUTORĖS MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	99
SUMMARY IN ENGLISH.....	101

Contents

INTRODUCTION	1
Problem formulation	1
Relevance of the dissertation	2
Research object	2
Aim of the dissertation	2
Objectives of the dissertation	3
Research methodology	3
The scientific novelty of the dissertation.....	3
The practical value of the research findings	4
Defended statements	4
Approval of the research findings	4
The structure of the dissertation	5
Acknowledgement.....	5
1. OVERVIEW OF BIOLOGICAL MINERALISATION AND THE USE OF BACTERIA IN BIOLOGICAL SELF-HEALING CONCRETE	7
1.1. Biological mineralisation.....	7
1.2. Metabolic pathways of carbonate precipitation	9
1.2.1. Autotrophic pathways of bacterial carbonate precipitation	10
1.2.2. Heterotrophic pathways of bacterial carbonate precipitation	11
1.3. Use of bacteria in biological concrete.....	14
1.4. Types and applications of carriers	15

1.4.1. Use of aggregates for immobilisation of bacterial spores.....	16
1.4.2. Use of hydrogels for immobilisation of bacterial spores	19
1.5. Use of fungi in biological concrete.....	21
1.6. Conclusion of the First Chapter and formulation of the research objectives.....	23
2. METHODS FOR THE INVESTIGATION OF BACTERIAL VIABILITY IN BIOLOGICAL CONCRETE	25
2.1. Bacterial strains and materials used in the tests.....	26
2.1.1. Bacterial strains	26
2.1.2. Microbiological media.....	26
2.1.3. Cement types	27
2.1.4. Fillers.....	27
2.1.5. Water	27
2.1.6. Metal oxide nanoparticles.....	27
2.2. Studies of the cement properties.....	27
2.2.1. Measurement of pH and electrical conductivity of cement	28
2.2.2. Determination of the chemical composition of cement	28
2.2.3. Measurement of exothermic temperature	28
2.3. Investigation of the properties of fillers by scanning electron microscopy	28
2.4. Studies of bacterial mineralisation	29
2.5. Methods for testing bacterial viability.....	29
2.5.1. Conservation of bacterial cultures	30
2.5.2. Cultivation of bacteria and preparation of spores	30
2.5.3. Immobilisation of bacterial spores in expanded clay particles	31
2.5.4. Formation of the protective layer of expanded clay particles.....	31
2.5.5. Preparation of concrete specimens with expanded clay particles	32
2.5.6. Viability test of bacterial spores immobilised in expanded clay particles	36
2.5.7. Encapsulation of bacteria in hydrogel	37
2.5.8. Determination of the permeability if nutrients encapsulated in hydrogel.....	38
2.5.9. Preparation of concrete specimens using hydrogel capsules	38
2.5.10. Viability tests of bacterial spores encapsulated in hydrogel.....	39
2.6. Crack closure studies in biological concrete	40
2.6.1. Opening of cracks in biological concrete specimens.....	40
2.6.2. Investigation of crack closure efficiency of biological concrete	41
2.6.3. Investigation of crack closure efficiency of biological concrete under the rain stimulation conditions	41
2.7. Toxicity studies on metal oxides	42
2.8. Conclusions of the Second Chapter.....	42
3. STUDIES ON BACTERIAL VIABILITY IN CONCRETE.....	45
3.1. Characterisation of properties of cement paste during hardening	46
3.1.1. Exothermic temperature measurements.....	46
3.1.2. pH and electrical conductivity.....	47

3.1.3. Chemical composition of cement	48
3.2. Mineralising activity of bacteria of the <i>Bacillus</i> genus	51
3.3. Viability studies of bacterial spores embedded in expanded clay in a concrete.....	52
3.3.1. Viability studies of bacterial spores in concrete samples with different types of cement.....	53
3.3.2. Effect of curing temperature on the viability of bacteria in the concrete.....	56
3.3.3. Influence of coatings of expanded clay with immobilised bacterial spores on bacterial viability in the concrete	57
3.3.4. Influence of concrete curing conditions on bacterial viability.....	62
3.3.5. Influence of freeze-thaw and cold cycles on bacterial viability in the concrete	63
3.4. Studies on the viability of bacterial spores encapsulated in the hydrogel in the concrete.....	66
3.4.1. Characterisation of calcium alginate capsules and evaluation of encapsulation efficiency.....	67
3.4.2. Evaluation of the nutrient permeability of calcium alginate capsules	68
3.4.3. Investigation of the viability of bacteria encapsulated in hydrogel in cementitious materials.....	69
3.4.4. Influence of concrete curing temperature on the viability of hydrogel-encapsulated bacteria in concrete	71
3.5. Evaluation of crack closure of biological concrete.....	72
3.5.1. Evaluation of the crack closure capacity of bacteria immobilised in expanded clay.....	73
3.5.2. Evaluation of the ability of bacteria immobilised in expanded clay to close the cracks under simulated rain conditions	75
3.5.3. Evaluation of ability of bacteria encapsulated in hydrogel to close cracks in concrete	77
3.6. Investigation of the antibacterial activity of metal oxides	81
3.7. Conclusions of the Third Chapter.....	84
 GENERAL CONCLUSIONS	 85
 RECOMMENDATIONS	 87
 REFERENCES	 89
 LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS BY THE AUTHOR ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION	 99
 SUMMARY IN ENGLISH.....	 101

Įvadas

Problemos formulavimas

Betoną veikia įvairūs fizikiniai, cheminiai ir biologiniai veiksniai, kurie lemia betono irimą ir pablogėjusias mechanines savybes. Atsivėrus plyšiams, per juos patenka agresyvios medžiagos, kurios ardo betono struktūrą ir sukelia armatūros koroziją. Įtrūkimų išvengti neįmanoma, tačiau susidariusius plyšius galima užtaisyti. Tam gali būti naudojamos sintetinės medžiagos, pavyzdžiui, epoksidai, tačiau jos yra brangios ir efektyvios tik trumpą laiką. Tuo tarpu bakterijų panaudojimas parinktoje betono sudėtyje yra aplinkai draugiškas metodas, kuris pasižymi greitu plyšių užpildymu ir turi ilgalaikio pritaikymo potencialą.

Vienas iš didžiausių iššūkių, kuriant biologinį betoną su įterptomis bakterijų sporomis, kurių metabolizmo metu susidaręs kalcio karbonatas užpildo susiformavusius plyšius, yra ilgalaikio bakterijų gyvybingumo užtikrinimas. Kad įvyktų plyšių užsivėrimas, bakterijų sporos turi išgyventi ne tik mechaninius poveikius betono maišymo metu, bet ir toleruoti ekstremalias pH sąlygas betono kietėjimo metu. Tačiau tai nėra vienintelės priežastys, lemiančios reikšmingą bakterijų kiekio sumažėjimą betone. Bakterijų sporų gyvybingumą taip pat gali lemti cemento sudėtis, betono kietėjimo temperatūra ir aplinkos sąlygos. Ištyrus šias priežastis,

būtų galima užtikrinti bakterijų gyvybingumą betono matricoje, o taip pat ir efektyvų plyšių užpildymą betone bakterijų metabolizmo metu susidariusiais produktais.

Pagrindinis reikalavimas, garantuojantis biologinio betono plyšių užsivėrimo pajėgumą, yra bakterijų gyvybingumo užtikrinimas. Siekiant sumažinti aplinkos poveikį bakterijų sporoms, šios gali būti įmobilizuotos į įvairius nešiklius, tokius kaip pūstas molis, pūstas perlitas, hidrogelis. Tačiau vien tokios apsaugos nepakanka, todėl, norint projektuoti biologinio betono mišinius, reikia parinkti bakterijų rūšį, cemento tipą ir nešiklį, kurie padėtų išsaugoti bakterijų gyvybingumą betono matricoje.

Pastaruoju metu pasaulyje yra plačiai vykdomi biologinio betono tyrimai. Tačiau, norint biologinį betoną pritaikyti naudojimui Lietuvoje, reikia ištirti sporų gebėjimą išgyventi betono matricoje, esant aplinkos sąlygoms, būdingoms šiaurinei Europos daliai. Todėl bakterijų gyvybingumas turi būti tiriamas esant žemai temperatūrai ir vykstant užšalimo-atšilimo ciklams. Lietuvoje yra vidutiniškai 120 dienų per metus, kai temperatūra nukrenta žemiau 0 °C.

Darbo aktualumas

Kai eksploatuojamuose biologinio betono bandiniuose atsiveria plyšys, yra pažeidžiamas nešiklis su įmobilizuotomis bakterijomis. Tuo metu į konstrukciją ima skverbtis vanduo ir deguonis, skatinantis bakterijų sporas virsti vegetatyvinėmis ląstelėmis ir vykdyti metabolizmo procesus. Bakterijos, naudodamos deguonį ir į nešiklį įterptas maistines medžiagas, į aplinką išskiria anglies dioksidą ir didelį kiekį kalcio karbonato, kuris virsta nuosėdomis ir užpildo atsivėrusius plyšius. Tokiu būdu yra blokuojamas tolimesnis vandens ir deguonies skverbimasis į konstrukcijas, taip apsaugant armatūrą nuo korozijos.

Tyrimų objektas

Darbo tyrimų objektas – biologinio betono mišiniai su į nešiklius įterptomis alkalifilinėmis sporas formuojančiomis *Bacillus* genties bakterijomis. Biologinis betonas suprantamas kaip betonas, kurio sudėtyje yra bakterijų sporų, kurių metabolizmo metu yra išsodinamas kalcio karbonatas, užveriantis susidariusius plyšius.

Darbo tikslas

Šio darbo tikslas – parinkti biologinio betono sudėtį, kuri užtikrintų bakterijų gyvybingumą, ir ištirti plyšių užsivėrimą jame laboratorinėmis sąlygomis.

Darbo uždaviniai

Darbo tikslui pasiekti sprendžiami šie uždaviniai:

1. Parinkti biologinio betono sudėtį, atsižvelgiant į bakterijų rūšį, jų gyvybingumą, ir cemento tipą, atsižvelgiant į jo sudėtyje esančių metalo oksidų koncentraciją.
2. Nustatyti papildomais apvaskalais padengtų pūsto molio dalelių ir kalcio alginato mikrokapsulių gebėjimą apsaugoti bakterijas biologiniame betone.
3. Ištirti aplinkos veiksnių (užšalimo ir atšilimo ciklą, drėgmės) ir Portlandcemenčio hidratacijos temperatūros įtaką bakterijų gyvybingumui.
4. Ištirti bakterijų gebėjimą užpildyti betone atsivėrusius plyšius laboratorinėmis sąlygomis.

Tyrimų metodika

Bakterijų gyvybingumas betone nustatomas serijinių skiedimų metodu, sėjant bakterijas ant šarminės agarizuotos terpės. Metalų oksidų minimalios slopinančios koncentracijos nustatomos išsėjant bakterijas ant šarminės agarizuotos terpės su metalų oksidų nanodalelėmis. Betono bandinių savaiminio gijimo efektyvumas tikrinamas įmerkus betono bandinius į vandenį ir matuojant plyšių plotį, nustatant plyšių užsivėrimo koeficientą.

Darbe taikyti šie medžiagotyros metodai: pH ir elektrinio laidumo nustatymas, egzoterminės temperatūros matavimas, cheminis sudėties nustatymas, mikrostruktūros analizė (šviesinė ir skenuojanti elektroninė mikroskopija).

Darbo mokslinis naujumas

Gauti šie moksliniu požiūriu nauji rezultatai:

1. Pagrindinių cemento tipų, naudojamų betono konstrukcijose, sudėtyje aptinkamos ZnO koncentracijos žudo bakterijas ir netinka panaudojimui biologiniame betone.
2. Pūsto molio su impregnuotomis bakterijų sporomis dalelių padengimas stireno-akrilato bei MgO apvaskalais bakterijų gyvybingumą biologiniame betone padidina iki 10 kartų, nes suformuoja netirpią plėvelę, kuri veikia kaip mechaninis barjeras, blokuojantis poras.

Darbo rezultatų praktinė reikšmė

Parinkta betono sudėtis, kuri užtikrina į jo sudėtį įterptų nešikliuose imobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumą ir paskatina susidariusių plyšių užsivėrimą. Taip gali būti sumažinamos konstrukcijų priežiūros išlaidos.

Ginamieji teiginiai

- Portlandcemenčio sudėtyje esantis ZnO, kai jo koncentracija yra didesnė nei 12,5 arba 25 $\mu\text{g/ml}$, priklausomai nuo *Bacillus* bakterijų rūšies, lemia jų žūtį biologiniame betone.
- Pūsto molio dalelių padengimas stireno-akrilato arba MgO pagrindo apvaskalu padidina bakterijų sporų gyvybingumą.
- Į pūstą molį ir hidrogelį imobilizuotos bakterijų sporos geba išgyventi betone veikiant nepalankioms aplinkos sąlygoms – esant šarminiam pH, vykstant užšalimo ir atšilimo ciklams.

Darbo rezultatų aprobavimas

Disertacijos tema publikuoti 5 moksliniai straipsniai, įtraukti į *Web of Science* duomenų bazę.

Tyrimų rezultatai pristatyti 8 tarptautinėse mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje:

- CBM 2023: 5th Congress of Baltic Microbiologists, 2023 spalio 11–13 d., Vilniuje, Lietuvoje.

- FEMS 2022: Conference on Microbiology, 2022 birželio 30 – liepos 2 d., nuotoliniu būdu.
- Mikrobiologija 2022, 2022 balandžio 28–29 d., Birštone, Lietuvoje.
- EYEC 2022: European Young Engineers Conference, 2022 gegužės 5–8 d., nuotoliniu būdu.
- World Microbe Forum, 2021 birželio 20–24 d., nuotoliniu būdu.
- Open Readings 2021: 64th International Conference for Physics and Natural Science, 2021 kovo 16–19 d., nuotoliniu būdu.
- 1st International Electronic Conference on Microbiology, 2020 lapkričio 2–30 d., nuotoliniu būdu.
- FEMS 2021: Online Conference of Microbiology, 2020 spalio 27–28 d., nuotoliniu būdu.

Disertacijos struktūra

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, bendrosios išvados, rekomendacijos, literatūros ir autoriaus mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas, santrauka anglų kalba.

Darbo apimtis yra 116 puslapių, tekste panaudotos 27 numeruotos formulės, 31 paveikslas ir 15 lentelių. Rašant disertaciją buvo panaudota 100 literatūros šaltinių.

Padėka

Disertacijos autorė dėkoja darbo vadovui prof. dr. Jauniui Urbonavičiui už pagalbą rengiant disertaciją. Taip pat dr. Ronaldui Jakubovskiui už bendradarbiavimą planuojant bei atliekant eksperimentus, analizuojant duomenis ir rengiant mokslines publikacijas. Už pagalbą rengiant disertaciją padėka prof. dr. Viktor Gribniak, VILNIUS TECH Statybinių medžiagų instituto darbuotojoms dr. Jurgitai Malaiškienei ir dr. Renatai Boris. Už palaikymą autorė dėkinga VILNIUS TECH Chemijos ir bioinžinerijos katedros kolegoms.

Autorė dėkoja šeimai – vyrui Mantui, sūnui Titui, tėvams – už besąlygišką palaikymą. Taip pat padėka skiriama a. a. seneliui ir močiutei, kurie visada skatino mokytis ir siekti geresnių rezultatų.

Biologinės mineralizacijos ir bakterijų panaudojimo biologiniame betone apžvalga

Skyriuje analizuojami mikrobiologinės mineralizacijos būdai, aptariami metaboliniai kalcio karbonato nusodinimo keliai, bakterijų gebėjimas išlikti gyvybingomis betone. Taip pat aptariami bakterijų sporų imobilizavimui naudojami skirtingi nešikliai ir jų pritaikymo galimybės, grybų panaudojimas biologinio betono gamybai.

Skyriaus tematika paskelbti 6 autorės straipsniai (Ivaškė (Jankutė) et al., 2020, 2021, 2022, 2023, 2024a, 2024b).

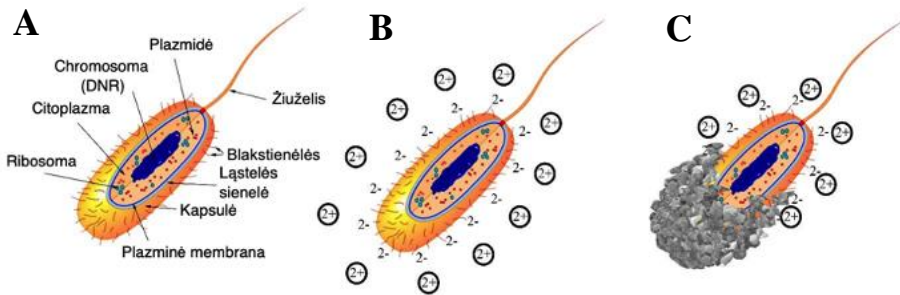
1.1. Biologinė mineralizacija

Biologinė mineralizacija – plačiai gamtoje paplitęs reiškinys, kurio metu dėl gyvų organizmų metabolizmo vyksta mineralų formavimasis (Seifan et al., 2016). Aplinkoje esantys įvairūs organizmai, pavyzdžiui, grybai, bakterijos ir dumbliai, dalyvauja mineralizacijos procese, tačiau bene didžiausias dėmesys tenka bakterijoms (Han et al., 2020). Biologinė mineralizacija yra skirstoma į dvi grupes –

biologiškai indukuota mineralizacija (BIM) ir biologiškai kontroliuojama mineralizacija (BKM).

BKM yra procesas, kai tam tikra ląstelių veikla tiesiogiai kontroliuoja mineralo branduolio susidarymą, augimą, morfologiją ir vietą (Han et al., 2020). Pagal makromolekulių gamybos vietą mineralizacija yra skirstoma į ekstraląstelinę, kai mineralai formuojasi už ląstelės ribų, viduląstelinę – kai mineralai randami vakuolėse arba pūslelėse, ir tarpląstelinę, kuri yra būdinga vienaląsčiams organizmams, gyvenantiems bendruomenėje, pavyzdžiui, dumbliams. BKM metu susidarę mineralai pasižymi tam tikrai mikroorganizmų rūšiai būdinga pastovia griežta struktūra ir siauru dydžio pasiskirstymu. Tai leidžia manyti, jog BKM yra metaboliškai ir genetiškai kontroliuojamas procesas, kuriam nebūdingas didelis jautrumas išorinės aplinkos veiksniams (Frankel, 2003).

BIM metu mineralai susidaro kaip medžiagų apykaitos produktai, mikroorganizmams sąveikaujant su juos supančia aplinka. Biomineralizacija vyksta dėl aplinkos, kurioje gyvuoja mikroorganizmai, cheminės pusiausvyros pokyčių ir medžiagų apykaitos produktų išsiskyrimo. Daugeliu atvejų organizmai išskiria vieną ar daugiau metabolizmo produktų, kuriems reaguojant su jonais ar tam tikrais junginiais, aplinkoje vyksta mineralų nusodinimas. Šis procesas nėra griežtai kontroliuojamas, todėl susidarę mineralai pasižymi dydžio ir kristalų morfologijos įvairove, taip pat dažnai būna asocijuoti su bakterijų ląstelių sienelėmis (Frankel, 2003; Seifan et al., 2016). Procesu metu mikroorganizmai atlieka du pagrindinius vaidmenis. Pirma, jie ardo organinius substratus, o tai lemia ekstraląstelinės aplinkos pokyčius, kurie skatina mineralų išsodinimą. Antra, mikroorganizmų ląstelės veikia kaip platformos mineralams susidaryti ir formuotis. Bakterijų struktūros, tokios kaip ląstelės sienelė, kuriai būdingas neigiamas krūvis, geba absorbuoti teigiamai įkrautus jonus, todėl vyksta mineralinių medžiagų išsodinimas (1.1 pav.). Dėl neigiamai įkrauto ląstelės paviršiaus, mineralizacijos procesas gali vykti tarpininkaujant net ir negyvoms ląstelėms. BIM dažnai stebima anaerobinėje arba oksinėje-anoksinėje aplinkoje. Yra žinoma, kad anaerobinėmis sąlygomis daugelis bakterijų kvėpavimo metu naudoja aplinkoje esantį sulfatą ir (arba) įvairius metalus, įskaitant geležį, kaip galutinius elektronų akceptorius, o metaboliniai produktai (redukuoti metalų jonai ir sulfidai) yra reaktyvūs ir dalyvauja tolesniame mineralų susidaryme (Frankel, 2003; Vijay et al., 2017). Pagrindiniai veiksniai, nuo kurių priklauso proceso efektyvumas, yra medžiagų prisijungimo vietos, ištirpusios neorganinės anglies koncentracija, pH, temperatūra ir Hartree energija (Seifan et al., 2016).



1.1 pav. Bakterijų struktūra ir CaCO_3 nusodinimo schema: A – bakterijų struktūra; B – teigiamai įkrauti jonai, esantys aplink neigiamai įkrautą ląstelės sienelę; C – mineralų formavimasis, kai teigiamai įkrauti jonai jungiasi prie ląstelės sienelės (pritaikyta iš Seifan et al., 2016)

Fig. 1.1. Bacterial structure and CaCO_3 precipitation scheme: A – bacterial structure; B – positively charged ions around a negatively charged cell wall; C – mineral formation when positively charged ions bind to the cell wall (adapted from Seifan et al., 2016)

BIM yra plačiai paplitęs biomineralizacijos procesas, kuris sulaukia ypatingo dėmesio dėl suderinamumo su betono kompozicijomis ir gebėjimo išsodinti CaCO_3 esant Ca^{2+} jonų šaltiniui aplinkoje. Tai lemia šio proceso pritaikymą betoninių konstrukcijų tarnavimo laikui prailginti, gamybos kaštams mažinti ir kitose svarbiose srityse (Seifan et al., 2016; Qin et al., 2020). Taigi, BIM yra plačiai tyrinėjamas dėl pritaikymo galimybių kuriant biologinį betoną, nes dėl šio proceso betone atsivėrę plyšiai gali būti savaime užverti, o tai gali prailginti betoninių konstrukcijų tarnavimo laiką ir sumažinti jų priežiūros kaštus.

1.2. Metaboliniai kalcio karbonato išsodinimo keliai

Dauguma bakterijų rūšių geba gaminti kalcio karbonatą naudojami tam tikrus metabolinius kelius. Biologiškai sukelta mineralizacija yra skirstoma į autotrofinę ir heterotrofinę. Autotrofinės bakterijos naudoja anglies dioksidą kaip anglies šaltinį, kad galėtų gaminti organines medžiagas ir karbonatus. Šiuo atveju organizmai dalį anglies vartoja iš organinės medžiagos tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis ir gamina karbonatus; karbonatams sąveikaujant su Ca^{2+} jonų pertekliumi aplinkoje, susidaro kalcio karbonatai. Dažniausiai karbonatai gamtoje susidaro heterotrofiniu būdu. Abiejų procesų medžiagų apykaitos keliai pateikti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Metaboliniai bakterijų keliai, kuriais yra nusodinimas kalcio karbonatas (pritaikyta iš Wang et al., 2016)

Table 1.1. Metabolic pathways of bacterial precipitation of calcium carbonate (adapted from Wang et al., 2016)

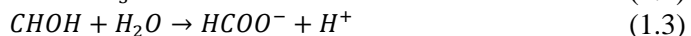
Autotrofiniai keliai	
Nemetilotrofinė metanogenezė	
Anoksigeninė fotosintezė	
Oksigeninė fotosintezė	
Heterotrofiniai keliai	
Azoto ciklas	Aminorūgščių amonifikacija
	Karbamido ir karbamo rūgšties skaidymas
	Disimiliacinė nitratų redukcija
Sieros ciklas	Disimiliacinis nitratų mažinimas
Organinės anglies skaidymas	

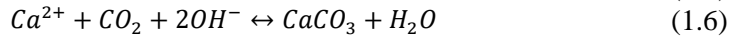
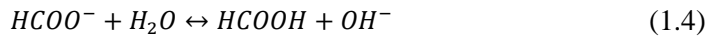
Taigi, bakterijos gali nusodinti kalcio karbonatą naudodamos autotrofinius ir heterotrofinius metabolinius kelius. Tolesniuose skyriuose yra aptariami šie kalcio karbonato susidarymo keliai.

1.2.1. Autotrofiniai bakterinio karbonato nusodinimo keliai

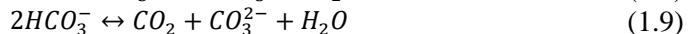
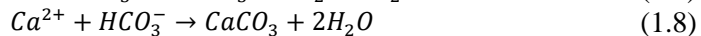
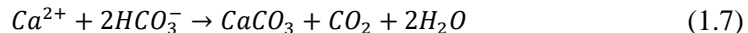
Kai aplinkoje yra anglies dioksido, mikroorganizmai geba nusodinti CaCO_3 autotrofiniu keliu. Trys keliai, kuriais mikroorganizmai anglies dioksidą paverčia karbonatu, yra nemetilotrofinė metanogenezė, kurią vykdo metanogeninės archėjos, oksigeninė fotosintezė, kurią vykdo cianobakterijos, ir anoksigeninė fotosintezė, kurią vykdo purpurinės bakterijos (Castanier et al., 1999).

Nemetilotrofinės metanogenezės metu anglies dioksidas ir vandenilis yra verčiami metanu. Jūrų ir gėlo vandens nuosėdose anglies dioksido koncentraciją daugiausia lemia metaną oksiduojančios bakterijos tiek aerobinėmis, tiek anaerobinėmis sąlygomis. Aerobinėmis sąlygomis šis procesas prasideda metanui virstant metanoliu, kai dalyvauja deguonis (1.1 lygtis). Ląstelės periplazmoje metanolis, kuris tarnauja kaip anglies šaltinis, yra verčiamas formiatu, vykstant keliems fermentiniams procesams. Vėliau, kai formiatas yra pusiausvyroje su skruzdžių rūgštimi, metano monooksigenazė oksiduoja skruzdžių rūgštį iki CO_2 , esant formiato dehidroksigenazės aktyvumui (1.2–1.5 lygtys). Susidaręs anglies dioksidas virsta CO_3^{2-} , o aplinkoje esant Ca^{2+} jonams, aplink ląsteles nusėda kalcio karbonatas (1.6 lygtis) (Castro-Alonso et al., 2019).





Dar vienas autotrofinis kelias, kuriuo galima nusodinti kalcio karbonatą aplinkoje esant kalcio jonų, yra fotosintezė. Pagrindiniai fotosintetinantys mikroorganizmai, atsakingi už mikrobiologiškai indukuotą kalcio karbonato nusodinimą, yra cianobakterijos ir mikrodumbliai. Fotosintetinantys mikroorganizmai kalcio karbonatą nusodina dėl HCO_3^- ir CO_3^{2-} mainų (1.7–1.8 lygtys). HCO_3^- difunduoja per membraną ir citozolyje disocijuojasi iki CO_2 ir OH^- jonų. Šią reakciją katalizuoja karboanhidrazė, todėl dėl susidarančių OH^- jonų padidėja pH, kuris kartu su aplinkoje esančiais kalcio jonais sukelia mikrobiologiškai indukuotą kalcio karbonato nusodinimą (1.9 lygtis) (Castro-Alonso et al., 2019).

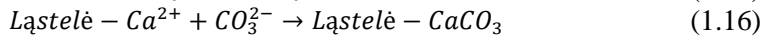
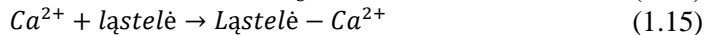
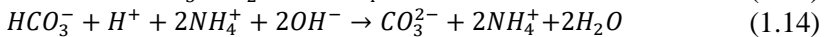
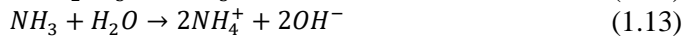
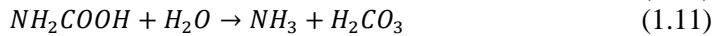
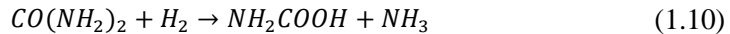


Fotosintetinantys mikroorganizmai gali būti naudojami tada, kai konstrukcijas veikia CO_2 ir saulės šviesa, kurie yra pagrindiniai fotosintezės proceso komponentai (Seifan et al., 2016). Atlikta analizė rodo, kad mikroorganizmai gali nusodinti kalcio karbonatą, naudojant natūraliai vykstančias reakcijas.

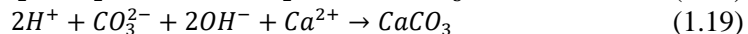
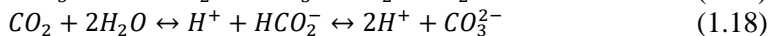
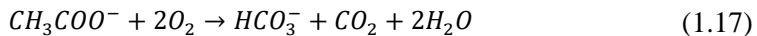
1.2.2. Heterotrofiniai bakterinio karbonato nusodinimo keliai

Vienas svarbiausių metabolinių $CaCO_3$ susidarymo kelių yra karbamido hidrolizė. Sudėtingų karbamido hidrolizės reakcijų seką lemia ureazės (EC 3.5.1.5) ir karboanhidrazės (EC 4.2.1.1.1) fermentai. Vieną molį karbamido ureazė hidrolizuoja iki vieno molio amoniako ir karbamato (1.10 lygtis), o karbamatas savaime hidrolizuoja, susidarant vienam moliui amoniako ir anglies dioksido (1.12 lygtis). Anglies rūgštis, veikiant karboanhidrazei, paverčiama bikarbonatu, o dėl amoniako hidrolizės susidaro du moliai amonio ir hidroksido jonų (1.13 lygtis). Todėl aplink ląstelę padidėja pH ir, aplinkoje esant Ca^{2+} jonų, nusėda kalcio karbonatas (1.14–1.16 lygtys). Esant nepalankioms sąlygoms, ląstelė išgyvena, leisdama patekti ir kauptis kalcio jonams, dėl to išsiskiria per daug protonų. Vėliau ląstelės aktyviai eksportuoja kalcio jonus ir kompensuoja protonų nuostolius. Karbonato jonų nusodinimui būtina maža H^+ ir didelė Ca^{2+} koncentracija mikroaplinkoje, o persotinimas karbonatu sukelia kalcio karbonato nusodinimą ląstelės paviršiuje (Castro-Alonso et al., 2019). Šiuo keliu susidariusio $CaCO_3$ kiekis yra didesnis, lyginant su kitais būdais. Svarbūs parametrai, kontroliuojantys karbonatų susida-

rymą, yra bakterinė ureazė, galutiniai medžiagų apykaitos produktai, supanti aplinka ir laisvų Ca^{2+} jonų buvimas. Šis metabolinis kelias gali būti efektyviai pritaikomas biologinio betono kūrime. Nepaisant to, keletas trūkumų apriboja karbamido hidrolizės proceso panaudojimą: hidrolizuojant karbamidą, susidaręs amoniakas gali virsti azoto oksidu išmetamu į atmosferą, arba azoto rūgštis druskomis, neigiamai veikiančiomis betono matricą (Saridhe & Selvaraj, 2020). Tipinės bakterijos, gebančios nusodinti kalcio karbonatą ureolitinu keliu, yra *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* ir *Sprosaricina pasteurii* (Seifan et al., 2016).

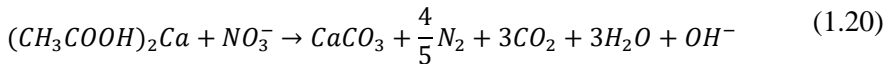


Bakterijų kamienai, skaidantys organinius junginius, taip pat geba nusodinti kalcio karbonato kristalus. Anglies dioksidas yra lengvai verčiamas į CO_3^{2-} jonus, kai aplinkos pH yra aukštas. Aplinkoje esant Ca^{2+} jonų, gali būti nusodinamas kalcio karbonatas. Heterotrofinis bakterijų augimas ant organinių rūgščių druskų sukelia mineralų formavimąsi. Šios bakterijos kaip energijos šaltinį naudoja organines rūgštis. Bakterijos gali augti ant acetato, laktato, citrato, sukcinato, oksalato, laktato ir glioksilato druskų. Priklausomai nuo terpėje esančių druskų ir anglies šaltinių, šios bakterijos gali gaminti įvairius kristalus, tokius kaip kalcio karbonatas ir magnio karbonatas (Seifan et al., 2016). Bakterijų kamienai, gebantys nusodinti kalcio karbonatą oksiduojant organinius junginius, yra *B. cohnii*, *B. pseudofirmus* ir *B. alkalinitrilicus*. Bendras procesas pateiktas 1.17, 1.18 ir 1.19 lygtyse (Wiktor & Jonkers, 2011).

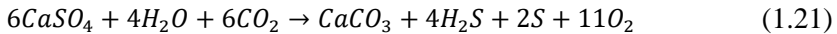


Denitrifikacijos proceso metu taip pat gali būti nusodinami kalcio karbonato kristalai. Jam vykstant yra oksiduojamos organinės medžiagos, kai galutinis elektronų akceptorius yra NO_3^- (1.20 lygtis). Tada nitratas (NO_3^-) yra verčiamas nitritu (NO_2^-), vėliau nitrito oksidu (NO) ir azoto dujomis (N_2). Denitrifikacijos procese dalyvauja fakultatyviniai anaerobai, pavyzdžiui, *Pseudomonas*, *Denitrobacillus*, *Thiobacillus*, *Alcaligenes*, *Spirillum*, *Achmobater* ir *Micrococcus*.

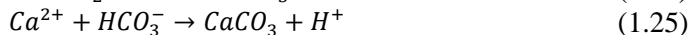
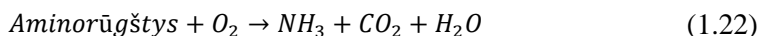
Nitratų redukcijos metu susidaro NO_2 , CO_2 ir OH^- jonai, kurie sukuria šarminę aplinką, sunaudodami H^+ kalcio jonų. Nors eksperimentų metu nustatyta, jog šis procesas yra mažiau efektyvus nei karbamido hidrolizė, nitratų redukcija turi tam tikrų privalumų: kai kuriais atvejais ji gali papildyti urelizę, taip pagerinant $CaCO_3$ išsodinimą, taip pat tai gera alternatyva tada, kai amonio jonų susidarymas yra nepageidaujamas.



Organinių medžiagų turtingoje anaerobinėje aplinkoje esant kalcio šaltiniui, sulfatą redukuojančios bakterijos (SRB) netiesiogiai formuoja kalcio karbonato mineralus dėl disimiliacinio sulfato redukcijos proceso (1.21 lygtis). Įrodyta, kad *Desulfovibrio sp.* geba nusodinti kalcio karbonatą šalindamos sulfatus iš gipso ($CaSO_4 \cdot H_2O$) trimis mechanizmais: tirpinimo, difuzijos ir kalcio karbonato nusodinimo. Kalcio jonai, išsiskiriantys tirpinant gipsą, reaguoja su anglies dioksidu šarminio pH mikroaplinkoje dėl sulfidų pašalinimo, todėl kalcio karbonatas nusėda (Castro-Alonso et al., 2019).



Aminorūgščių amonifikacijos metu vykstant aminorūgščių apykaitai, mikroorganizmų metabolizmo metu susidaro anglies dioksidas ir amoniakas. Amoniako hidrolizė generuoja hidroksido jonus aplink ląsteles, taip sukeldama vietinį persotinimą, o tai, savo ruožtu, skatina kalcio karbonato nusodinimą (1.22–1.25 lygtys).



Aminorūgščių amonifikacijos procese dalyvauja *Myxobacteria* genties bakterijos, pavyzdžiui, *Myxococcus xanthus* (Chekroun et al., 2004). Dar viena svarbi šių bakterijų savybė yra ta, kad kaip vienintelį energijos šaltinį jos geba naudoti aminorūgštis. Be to, *Myxococcus xanthus* naudoja šį mechanizmą augdamos skystoje ir kietoje terpėse, todėl susidaro skirtingos kalcio karbonato poliformos. Buvo nustatyta, kad *Myxococcus xanthus* nusodina uraną kaip meta-autunitą, o tai gali apsaugoti betono konstrukcijas, veikiamas radioaktyvių liekanų (Castro-Alonso et al., 2019). Taigi, nors karbamido hidrolizės kelias yra vienas efektyviausių kalcio karbonato susidarymo būdų dėl didelio karbonato nusodinimo kiekio, tačiau

susidarantis amoniakas gali neigiamai veikti betoną ir atmosferą, todėl geresnė alternatyva yra denitrifikacija arba organinių junginių skaidymas.

1.3. Bakterijų panaudojimas biologiniame betone

Vienas iš didžiausių iššūkių kuriant biologinį betoną yra užtikrinti į betoną įterptų bakterijų gyvybingumą. Kad vyktų plyšių užsivėrimas, bakterijų sporos turi ne tik išgyventi mechaninį poveikį maišant ir kietinant betoną, bet ir toleruoti ekstremalų pH, kuris gali siekti net 13 (Sharma et al., 2017; Van Tittelboom et al., 2010). Be to, nemažai metalų oksidų, esančių cemente priemaišų pavidalu, gali veikti kaip baktericidinės medžiagos. Todėl savaiminio plyšių užsivėrimo procesas įmanomas tik tuo atveju, jei bakterijų sporos yra ramybės būsenoje ir yra aktyvuojamos suveikus aplinkos dirgikliams, t. y. pro atsivėrusį plyšį pradėjus tekėti maistinėms medžiagoms. Nors bakterijų sporos yra atsparios daugeliui veiksnių, pavyzdžiui, aukštai temperatūrai, užšalimui, ultravioletiniams spinduliams, išdžiūvimui ar cheminėms dezinfekavimo priemonėms, tačiau betono aplinka yra pernelyg agresyvi (Nicholson et al., 2000; Nicholson & Galeano, 2003). Idealiu atveju, tiek bakterijų gyvybingumas, tiek savaiminio plyšių užsivėrimo gebėjimas turėtų išlikti visą įprastą konstrukcijos eksploatavimo laikotarpį, kuris paprastai siekia 50–100 metų. Deja, bakterijų gyvybingumas smarkiai sumažėja per pirmąsias kelias dienas po jų įterpimo į betono matricą. Tyrimai parodė, kad per pirmąją betono kietėjimo savaitę išgyvena tik 1–3 % nepažeistų bakterijų (Achal et al., 2011; Jonkers et al., 2010; Sharma et al., 2017). *Bacillus megaterium* rūšies bakterijų, tiesiogiai pridėtų į smulkiagrūdžio betono bandinius, gyvybingumas po 28 dienų siekė tik 0,1 % (Achal et al., 2011). Tiesiogiai į betoną pridėtų *Bacillus cohnii* bakterijų gyvybingumas sukietėjusiuose bandiniuose po 9 dienų buvo 1 %, o po 135 dienų bakterijos buvo nebeaptinkamos (Jonkers et al., 2010). Todėl bakterijų sporoms reikia papildomos dangos, kad išliktų gyvybingos. Vienas iš būdų apsaugoti bakterijų sporas nuo betono aplinkos yra jų įkapsuliavimas. Funkcinis nešiklis turi sudaryti apsauginį apvalkalą, netrukdyti bakterijų veiklai ir būti suderinamas su betonu (Gupta et al., 2017).

Žalingas užšalimo-atšilimo ciklų poveikis yra svarbus teritorijoms, esančios pakrančių regionuose, kuriose klimatas yra vidutiniškai šaltas (Kliukas et al., 2018). Betono konstrukcijos pažeidimai kaupiasi, kai aplinkos temperatūra peržengia 0 °C, t. y. įvyksta užšalimo-atšilimo ciklas, nes užšalęs vanduo plečiasi į atviras betono poras ir tuštumas. Kiekvieno atšilimo ciklo metu į atviras erdves prasiskverbia papildomas vanduo. Dėl užšalusio vandens išsiplėtimo porose atsiranda vidinis slėgis, kuris dar labiau ardo betono matricą. Neigiama temperatūra taip pat gali blokuoti biologinį savaiminio atsinaujinimo procesą. Ši problema yra

svarbi Šiaurės Europos regione, kur vidutinis metinis dienų skaičius, kai temperatūra peržengia 0 °C, skaičius yra 120 (Kliukas et al., 2018).

Chloro anijonų difuzija taip pat gali turėti neigiamos įtakos bakterijų išgyvenamumui betone. *Bacillus subtilis* bakterijų sporos gali sudygti esant labai didelei druskos koncentracijai, tačiau didėjanti NaCl koncentracija slopina sporų dygimą (Nagler et al., 2016). Didelis druskingumas sulėtina dygimo pradžią, mažina jo efektyvumą ir apsunkina augimo kinetiką. Metabolizmo pradžia po sporų sudygimo gali būti nustatoma esant druskos koncentracijai iki 4,8 M NaCl (Nagler et al., 2014).

Atlikta analizė rodo, kad kuriant biologinį betoną yra susiduriama su esminiu iššūkiu – užtikrinti bakterijų gyvybingumą agresyvioje betono aplinkoje, kurioje yra aukštas pH, mechaninis poveikis betono liejimo ir maišymo metu, taip pat cemento sudėtyje esantys metalų oksidai. Betono sąlygos lemia spartų bakterijų gyvybingumo mažėjimą per pirmąsias kelias dienas dėl aukščiau paminėtų priežasčių. Norint užtikrinti ilgalaikį savaiminio plyšių užsivėrimo efektyvumą, bakterijų sporoms reikalinga papildoma apsauga, pavyzdžiui, bakterijų imobilizavimas į nešiklius. Tik tinkama apsauga leidžia išlaikyti mikroorganizmų gyvybingumą ir užtikrina biologinio betono funkcionalumą per įprastą eksploataavimo laikotarpį.

1.4. Nešiklių tipai ir pritaikymo galimybės

Mikroorganizmų imobilizavimui skirtos medžiagos turi pasižymėti keletu svarbių savybių, pavyzdžiui, biologinis suderinamumas, didelė įkrovos talpa, stabili struktūra, masės pernašos efektyvumas, ilgas tarnavimo laikas, maža kaina ir patogus imobilizavimas (Dzionic et al., 2016; Weiser et al., 2016). Mikroorganizmų imobilizavimui ir panaudojimui biologiniame betone skirti nešikliai, pagal cheminę kilmę ir morfologiją yra skirstomos į keturias grupes: užpildus, silpnai šarminės cementinės medžiagos, organinės medžiagos ir mikrokapsules (Feng et al., 2022).

Autonominėje plyšių užvėrimo sistemoje populiariausios bakterijų apsaugos technologijos yra mikrokapsulių ir kapiliarų sistemos. Dažniausiai naudojamos apsauginės medžiagos – silikagelis, diatominė žemė, poliuretanas, hidrogelis ir kitos porėtos medžiagos (Saridhe & Selvaraj, 2020). 1.2 lentelėje yra pateikiami nešiklių tipai, jiems priskiriamos konkrečios medžiagos, naudojamos bakterijų apsaugojimui (Lee & Park, 2018).

1.2 lentelė. Savaiame atsinaujinančiame betone naudojami bakterijų nešiklių tipai (priraikyta iš Lee & Park, 2018)

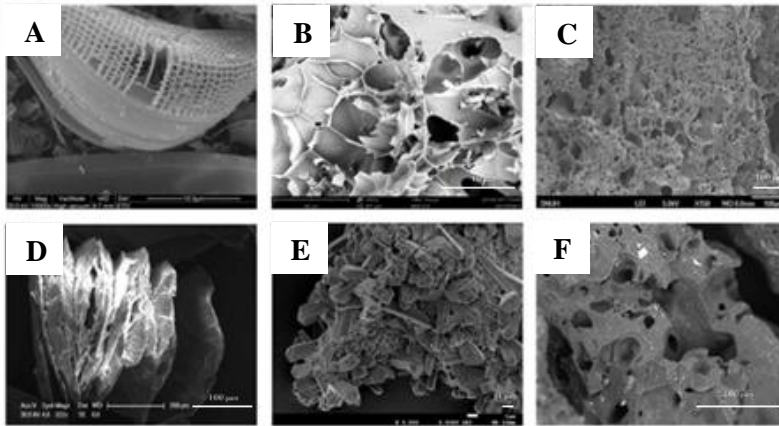
Table 1.2. Types of carriers used in self-healing concrete (modified from Lee & Park, 2018)

Nešiklio tipas	Sudedamosios dalys
Kapiliarai	Stiklas, keramika
Porėtos medžiagos	Diatominė žemė, silikagelis, poliuretanas, lengvieji užpildai
Mikrokapsulės	Metamino mikrokapsulės, grafito nanodalelės
Hidrogeliai	Kalcio alginatas, metakrilatu modifikuotas alginatas

Norit užtikrinti efektyvų plyšių užpildymo procesą, reikia optimizuoti ir įvertinti įvairius aspektus, tokius kaip nešiklių ir biologinių veiksnių biosuderinamumas su betonu, galima įtaka betono mechaninėms savybėms, nešiklių patvarumas betono maišymo ir gamybos proceso metu, plyšių užvėrimo efektyvumas (Gupta et al., 2017). Turi būti naudojami ne per stiprūs nešikliai, sugebantys išlaisvinti bakterijas bei maistines medžiagas, atsiradus įtrūkimams betone. Be to, nešikliai smulkiagrūdžiame betone turi pasiskirstyti tolygiai, kad, atsiradus plyšiams, būtų suardyti nepaisant jų erdvinės padėties. Todėl didelis dėmesys yra skiriamas apsauginių medžiagų dydžiui ir mechaninėms savybėms (Lee & Park, 2018), atliekami tyrimai su įvairiomis bakterijų apsaugos technologijomis, įskaitant stiklinius ar keramikinius vamzdelius, porėtas medžiagas, tam tikrų medžiagų pagrindu pagamintas mikrokapsules bei hidrogelius.

1.4.1. Užpildų panaudojimas bakterijų sporų įmobilizavimui

Užpildo tipo nešikliai paprastai pasižymi akytu paviršiumi bei gerai sugeria vandenį. Tokia mikroporų struktūra suteikia pakankamai vietos ir galimybių mikroorganizmų augimui ir metabolizmui. Taip pat pakankamai storas paviršinis sluoksnis gali sumažinti dideliu šarmingumu pasižyminčių medžiagų skvarbą ir taip padidinti bakterijų išgyvenamumą betone. Dažniausiai naudojami užpildo tipo nešikliai yra diatominė žemė, pūstas molis, pūstas perlitas, zeolitas, pūstas vermikulitas ir granuliuota aktyvuota anglis (Feng et al., 2022). Šios natūralios neorganinės medžiagos paprastai naudojamos kaip perspektyvios medžiagos biologiniam betonui tvarioje infrastruktūroje, nes jos pasižymi dideliu suderinamumu su betonu, didesniu bakterijų kiekio įmobilizavimu bei ekonomiškumu (Shen et al., 2021). Šių užpildų mikrostruktūros yra pateiktos 1.2 pav. Pūstas molis, pūstas perlitas ir granuliuota aktyvuota anglis pasižymi akyta struktūra, o jų paviršiuje yra gausu tuščiavidurių kanalų. Diatominė žemė yra tuščiavidurė dalelė, kurios paviršius yra panašus į tinklą. Zeolitas turi daug į išorę išsikišusių plokštelių pavidalo struktūrų, kurios suteikia didesnę absorbcijos plotą, taip pagerindamos jo, kaip nešiklio, efektyvumą.



1.2 pav. Skirtingų nešiklių mikrostruktūros nuotraukos: A – diatominė žemė; B – pūstas perlitas; C – pūstas molis; D – pūstas vermikulitas; E – zeolitas; F – granuliuota aktyvuota anglis (pritaikyta iš (Feng et al., 2022))

Fig. 1.2. The microstructure images of different carriers: A – diatomous earth; B – expanded perlite; C – expanded clay; D – expanded vermiculite; E – zeolite; F – granular activated carbon (adapted from (Feng et al., 2022))

Pūstas molis ir pūstas perlitas yra plačiai naudojami ir tiriama dėl galimybės juos panaudoti kaip bakterijų nešiklius (Han et al., 2020a; Khaliq & Ehsan, 2016; Tziviloglou et al., 2016a). Šios medžiagos yra nebrangios ir lengvos, o svarbiausias jų privalumas yra gebėjimas sudaryti tvirtą ryšį su betono matrica (Han et al., 2019a). Be to, tiek pūstas molis, tiek pūstas perlitas yra labai akytos medžiagos. Kalbant apie biologinį betoną, išskirtinis porėtumas yra labai naudingas, nes leidžia imobilizuoti bakterijų sporas dalelių viduje. Įrodyta, kad bakterijų sporos lengvai prasiskverbia ir prisitvirtina prie vidinių pūsto molio porų bei pasižymi puikiu išgyvenamumu (Han et al., 2019a). Ankstesni tyrimai parodė, kad lengvieji užpildai veiksmingai užtikrina ilgalaikę bakterijų sporų apsaugą, kuri išlaiko biologinio betono savaiminio plyšių užsivėrimo potencialą (Han et al., 2019a; Jiang, et al., 2020; Tziviloglou et al., 2016a; Wiktor & Jonkers, 2011). Taip pat nustatyta, kad tokių lengvųjų užpildų kaip bakterijų nešikliai panaudojimas sumažina betono gniuždomąjį stiprį iki 30–40 % (Tziviloglou et al., 2016a). Be to, porėti lengvieji užpildai taip pat gali padidinti atsparumą užšalimo-atšalimo ciklams (Youm et al., 2016) ir gerokai (20–50 %) sumažinti medžiagos svorį, kas su šiuolaikiškais armavimo sistemomis leidžia gaminti konstrukcinius elementus tinkamus tiltams, pastatų fasadams ir sienų plokštėms (Ahmad et al., 2019).

Nors gali atrodyti, kad bakterijų apsauga, imobilizuojant jas vien tik į pūstą molį arba pūstą perlitą, turėtų būti pakankama, tačiau bakterijų gyvybingumas

smarkiai sumažėja ankstyvuoju betono kietėjimo laikotarpiu (Han et al., 2019a). Šiai problemai spręsti siūloma padengti pūsto molio arba pūsto perlito daleles papildomais apvalkalais (Han et al., 2020b; Jiang, et al., 2020a; Jiang, et al., 2020b; Zhang et al., 2017). Buvo ištirtos kelios skirtingos pūsto perlito dalelių dangos. Apvalkalai, pagaminti iš mažai šarminių medžiagų, pavyzdžiui, magnio kalio fosfato cemento arba rūgštinio sulfoaluminato cemento, gerokai padidino savaiminio plyšių užsivėrimo efektyvumą, sumažindami vandens pralaidumą arba net visiškai užpildydami plyšius betono bandiniuose. Tuo tarpu didelio šarmingumo dangos, pavyzdžiui, paprastas portlandcementis arba geopolimeras, yra neveiksmingi, nes savaiminis plyšių užsivėrimas yra panašus į savaiminį plyšių užsivėrimą su į pūstą perlitą imobilizuotomis bakterijų sporomis be papildomo apvalkalo (Jiang et al., 2020). Pūsto perlito apvalkalai, sudaryti iš tirpių silikatų, metakaulino, stireno-akrilato emulsijos ir vandens, vandens įgeriamumą sumažina 16 kartų, palyginti su nepadengtu užpildu. Šis apvalkalas apsaugo imobilizuotas bakterijas ir padidina plyšių užsivėrimo efektyvumą betono bandiniuose (Jiang et al., 2020). Nepaisant to, duomenų apie įvairių apsauginių dangų poveikį bakterijų gyvybingumui trūkumas neleidžia plėstis dangomis pagrįstam plyšių užpildymo metodui.

Nustatyta, kad diatominės žemės dalelės, kurios pasižymi akyta struktūra, turi apsauginį poveikį aukšto pH cemento aplinkoje. Dėl didelio savitojo paviršiaus ploto diatominės žemės dalelės stipriai sorbuoja bakterijų ląsteles ant paviršių ir suteikia naują mikroaplinką aplink bakterijas, leidžiančią bakterijoms toliau skaidyti karbamidą. Imobilizuotos į DE daleles, *B. sphaericus* bakterijos gebėjo užpildyti 0,15–0,17 mm pločio plyšius (Wang et al., 2012). Kitų tyrimų metu nustatyta, kad mikroorganizmai, imobilizuoti į DE daleles, užpildė trūkius, kurių plotis siekia 1,8 mm (Huynh et al., 2017). Bakterijų įterpimas į DE daleles ne tik apsaugo ląsteles nuo šarminės betono aplinkos, bet ir teigiamai veikia MICP procesą, padidinant išsodinamo CaCO_3 kiekį. Tai leidžia sėkmingai užpildyti betono konstrukcijų įtrūkimus (Spencer & Sass, 2019).

Be ankščiau minėtų užpildų, kitas perspektyvus nešiklis yra perdirbti betono užpildai (angl. *recycled concrete aggregates (RCAs)*), kurie gaminant biologinį betoną gali pakeisti gamtinius išteklius (Wang et al., 2022). Pagrindinės šio užpildo dalys yra natūralūs užpildai ir apleistuose pastatuose esantys cemento hidratacijos produktai. Pridėtas senas smulkiagrūdis betonas lemia didesnę jo porėtumą ir vandens įgeriamumą nei natūralių užpildų. Didelis kiekis prie perdirbtų agregatų paviršiaus prikibusio seno smulkiagrūdžio betono ilgą laiką karbonizuoja, todėl sumažėja perdirbtų agregatų paviršiaus pH, dėl ko ši aplinka tampa palanki mikroorganizmams (Feng et al., 2022; Liu et al., 2020). Palyginus kelis bakterijų įterpimo į betono matricą metodus – tiesioginį įterpimą ir bakterijų imobilizavimą į diatominę žemę, pūstą perlitą ir perdirbtus betono užpildus, buvo

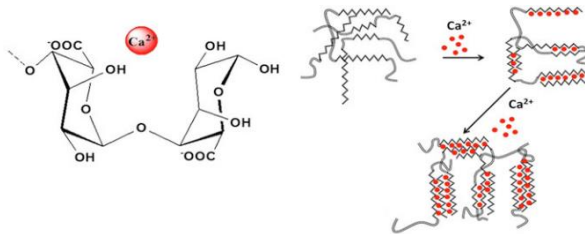
nustatyta, kad po 28 dienų bandiniuose su perdirbto betono užpilde įmobilizuotomis bakterijomis, užpildyto plyšio plotis buvo didžiausias. Tai rodo, kad perdirbtų betono užpildų paviršius ir mažas šarmingumas yra reikšmingi, apsaugant bakterijas ir gerinant jų mineralizacijos aktyvumą (Liu et al., 2020).

Taip pat parodyta, kad komercinės orą sulaikančios priemonės yra veiksminga alternatyvi endosporų apsauga. Maišymo metu orą sulaikančios priemonės į betono matricą įterpia mikroburbuliukus. Šios tuštumos didina betono patvarumą užšalimo-atšalimo ciklų metu bei gerina jo apdirbamumą. Orą sulaikančios priemonės sudaro paviršinio aktyvumo medžiagų grupę, kuriai būdinga hidrofobinės uodegėlės ir įkrautos hidrofiliinės galvutės, kurios pagal krūvį skirstomos į amfoterines, katjonines, anijonines bei nejonines. Anijoninės paviršinio aktyvumo medžiagos, pavyzdžiui, sulfonintos angliavandeniliuose tirpstančios druskos, lignino sulfonatas bei natrio oleatas, yra dažniausiai naudojamos betono pramonėje. Kaip nešiklių naudojant orą sulaikančias priemaišas, *B. cohnii* bakterijos išliko gyvybingos 9 mėnesius (Justo-Reinoso et al., 2022). Atlikta analizė rodo, kad užpildo tipo nešikliai, turintys akytą struktūrą, yra tinkami bakterijų įmobilizavimui ir panaudojimui biologiniame betone, tačiau norint užtikrinti bakterijų gyvybingumą, šios medžiagos turi būti dengiamos papildomais apvalkalais.

1.4.2. Hidrogelių panaudojimas bakterijų sporų įmobiliazavimui

Atsižvelgiant į biosuderinamumą su betonu, mikroorganizmų įkapsuliuvimui yra tinkamos organinės medžiagos, pavyzdžiui, melaminas, alginatas, chitozanas, polikarbamidai. Hidrogelis yra dar vienas perspektyvus nešiklis, naudojamas bakterijų apsaugai biologiniame betone. Šiam tikslui gali būti naudojamas natūralus polisacharidas alginatas, komerciškai gaunamas iš rudųjų dumblių ir plačiai naudojamas medicinoje (Wang et al., 2019; Wang et al., 2015; Xu et al., 2020). Alginatas yra hidrofobinė ir biologiškai suyranči ilga molekulė, turinti neigiamą krūvį. Ji sudaryta iš β -D-manurono rūgšties (M) ir α -L-gulurono rūgšties (G) liekanų, sujungtų glikozidiniais ryšiais. Alginato monomerai sudaro homopolimerų (MM) ir heteropolimerų (MG) blokus. Gelio susidarymo reakcijos metu teigiamai įkrauti natrio jonai (Na^+) išsiskiria iš tirpalo ir atsiskiria nuo alginato. Tuomet teigiamai įkrauti kalcio jonai (Ca^{2+}) gali surišti dvi skirtingas alginato grandines, sudarydami akytą kalcio alginato matricą, dėl ko tirpalas tampa klampesnis (1.3 pav.) (Soysal et al., 2020). Komerciškai prieinami alginatai, pavyzdžiui, kalcio alginatas, gali smarkiai skirtis MM, GG ir MG blokų proporcijomis, todėl ir fizikinėmis bei cheminėmis savybėmis. Yra žinoma, kad formuojantis chelatiniam ryšiui su Ca^{2+} jonais, lengviausiai susijungia GG blokai, o po jų – MG blokai. Taigi, MM blokai atlieka mažiau svarbų vaidmenį kalcio alginato formavimosi metu (Meng

et al., 2015). Svarbūs veiksniai joninės geliacijos procese yra temperatūra, alginato koncentracija, katjonų tipas ir koncentracija (Joye & McClements, 2014). Vienas iš alginato naudojimo privalumų yra tai, kad geliacijos procesas vyksta švelniais sąlygomis (Gu et al., 2004). Šiai reakcijai nereikalinga aukšta temperatūra ir cheminės chelatinio ryšio medžiagos (Soysal et al., 2020). Kalcio alginato organinis-neorganinis tinklas gali absorbuoti vandens tirpalus, daug kartų viršijančius jų svorį. Dėl šios priežasties kalcio alginatas yra priskiriamas superabsorbentinių polimerų klasei.



1.3 pav. Kalcio alginato geliacijos reakcija (pritaikyta pagal Dumitru et al., 2015)

Fig. 1.3. Gelation reaction of calcium alginate (adapted from Dumitru et al., 2015)

Naudojamas kalcio alginato mikrokapsulių su įkapsuliuotomis bakterijų sporomis kiekis dažniausiai svyruoja tarp 1 ir 5 % nuo cemento masės (Wang et al., 2014; Wang et al., 2021; Liu et al., 2023). Per maža mikrokapsulių koncentracija gali būti nepakankama įtrūkimams užpildyti, o per didelis jų kiekis gali pabloginti betono mechanines savybes. Imobilizavus *B. subtilis* bakterijas natrio alginato kapsulėse, betono gniuždymo stipris po 28 dienų padidėjo 16 % (Xu et al., 2018). Metakrilatu modifikuoto alginato pagrindu sukurtas hidrogelis buvo suderinamas su *Bacillus sphaericus* bakterijomis ir betonu (Wang et al., 2015). Tradicines hidrogelio mikrokapsules, naudojamas biologiniame betone, galima pagerinti pasitelkus chitozaną. Į kalcio alginato mikrokapsules pridėjus 1 % chitozano, gniuždymo stipris padidėjo 10 %, o lenkimo stipris – 14 %, palyginti su kontroliniais bandiniais be chitozano (Gao et al., 2020). Tačiau toks nežymus mechaninių savybių pagerėjimas yra antrinis poveikis. Priešingai, geresnis įtrūkusios betono struktūros vientisumas nuo agresyvaus cheminio poveikio yra pagrindinis savaiminio atsinaujinimo proceso tikslas. Nustatyta, kad *Bacillus* genties bakterijų imobilizavimas į polimerinę kalcio alginato matricą neturi įtakos susidariusių CaCO_3 kristalų morfologijai (Seifan et al., 2017). Apibendrinant galima teigti, kad kalcio alginato mikrokapsulės yra tinkamas nešiklis bakterijų įkapsuliuojimui ir panaudojimui biologiniame betone. Šis nešiklis padeda išlaikyti geresnę betono struktūros vientisumą ir skatina savaiminio plyšių užsivėrimo procesus.

1.5. Grybų panaudojimas biologiniame betone

Nepaisant sėkmingo bakterijų panaudojimo plyšių užpildymui biologiniame betone, jų taikymas dar nėra labai platus. Tačiau kiti mikroorganizmai taip pat turi gebėjimą sukelti kalcio karbonato nusodinimą. Lyginant su bakterijomis, pelėsinų grybų vaidmuo, susijęs su apsauginės dangos formavimu, nėra plačiai ištirtas. Tačiau, atsižvelgiant į pelėsinų grybų savybes, jie gali būti laikomi perspektyviais kandidatais panaudojimui biologiniame betone. Daugelio grybų mitybos poreikiai nėra sudėtingi, juos yra lengva auginti ir manipuluoti, taip pat galima lengvai paruošti sporų inokuliantus. Taip pat grybai turi gebėjimą kolonizuoti ir augti ant uolių, mineralų bei mineralinių statybinių medžiagų, taip pat tarpininkauti biomineralizacijos procesuose. Grybai gerai toleruoja metalus, o tai sustiprina jų, kaip skirtų betono paviršių apsaugai, bioagentų tinkamumą. Metalai yra reikalingi grybų augimui ir medžiagų apykaitai, tačiau didelėmis koncentracijomis jie yra toksiški. Tačiau kitaip nei kitos mikroorganizmų grupės, daugelis grybų rūšių gali išgyventi ir vykdyti metabolinę veiklą labai metalais užterštuose regionuose. Metalų mineralų nusodinimas ant hifų yra laikomas vienu iš svarbiausių mechanizmų, paaiškinančių grybų išskirtinį atsparumą metalams (Menon et al., 2019).

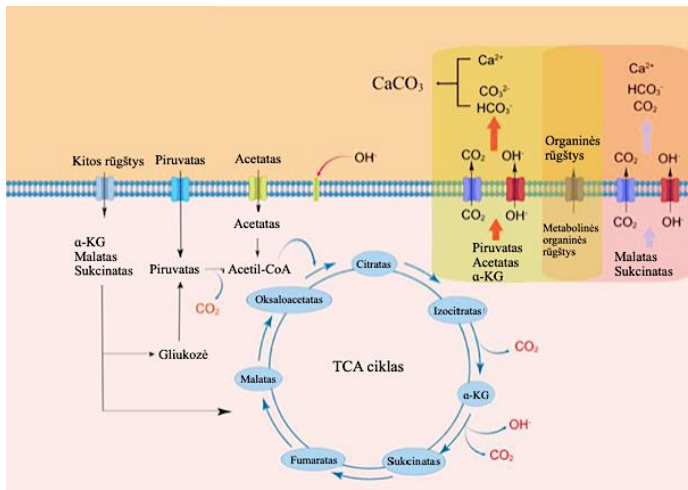
Filamentinių grybų ląstelės auga kaip siūlinės struktūros ir yra vadinamos hifais. Jos turi daug branduolių ir auga viršūnėmis, o naujos viršūnės atsiranda iš šoninių šakų, sudarančių susipynusį trimatį tinklą, vadinamą miceliu. Viena iš filamentinių grybų savybių, kurią galima panaudoti įvairiose mineralizacija grindžiamose technologijose, yra didelis paviršiaus ploto ir tūrio santykis, todėl jie turi daugiau organinių substratų, kurie gali būti naudojami mineralinėms nuosėdoms susidaryti (Menon et al., 2019). Nors grybų filamentų kalcifikacija nėra iki galo ištirtas procesas, tačiau yra žinomi du esminiai veiksniai, lemiantys CaCO_3 nuosėdų susidarymo kiekį, karbonatų šarmingumas ir Ca^{2+} jonų koncentraciją. Metabolinė filamentinių grybų veikla, galinti padidinti karbonato šarmingumą, paprastai apima vandens suvartojimą, fizikocheminį CO_2 išskirimą dėl grybų kvėpavimo, taip pat organinių rūgščių oksidaciją, nitratų disimiliaciją ir karbamido hidrolizę (Bindschedler et al., 2016).

Bakterijos skatina mineralų nusodinimą tik per indukuotos biomineralizacijos procesus, o grybai tai geba atlikti per indukuotos biomineralizacijos ir organomineralizacijos procesus. Daugelio grybų ląstelių sienelėse yra chitino, kuris yra N-acetilgliukozamino polimeras. Yra žinoma, kad chitinas geba surišti Ca^{2+} jonus, nes sudaro substratą, kuris gali gerokai sumažinti branduolių susidarymui reikalingas aktyvavimo energijas, todėl tarpfazinė energija tarp grybo ir mineralinio kristalo tampa gerokai mažesnė nei tarp mineralinio kristalo ir tirpalo (Menon et al., 2019). Taigi, tiek gyva, tiek negyva grybų biomasė gali surišti jonus ant savo ląstelių sienelių. Dėl to vyksta mineralinių fazių užuomazgų susidarymas ir

nusodinimas (Takey et al., 2014). Tada surišti Ca^{2+} jonai gali sąveikauti su ištirpusiu karbonatu, o ant grybo hifų nusėda CaCO_3 nuosėdos.

Ureazę turintis filamentinis grybas *Neurospora crassa* geba nusodinti kalcio karbonatą ant smulkiagrūdžio betono MICP būdu ir sudaryti apsauginę dangą ant porėtų statybinių medžiagų, pavyzdžiui, smulkiagrūdžio betono ir cemento. *N. crassa* geba augti ir kolonizuoti betono paviršių, kuriame dėl karbamido hidrolizės yra nusodinamas kalcio karbonatas. Tankus hidrofobinis micelinis tinklas sudaro fizinį barjerą vandens infiltracijai, o kalcio karbonato nuosėdos veikia kaip biocementas, užpildantis poras ir trūkius (Zhao et al., 2022). Yra žinoma, kad pH gebantys reguliuoti *Aspergillus nidulans* mutantai (MAD1445) gali augti ant betono plokščių (Menon et al., 2019).

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* taip pat gali sukelti kalcio karbonato nusodinimą. Tai yra fakultatyvinis anaerobinis grybas, plačiai naudojamas alaus ir maisto gamyboje. Organinės rūgštys, pavyzdžiui, acto rūgštis, piruvo rūgštis, α -ketoglutaratas ir pradinis rūgštinis pH yra veiksniai, skatinantys CaCO_3 nuosėdų susidarymą. Tačiau pagrindinis mechanizmas, paskatinantis mielių sukeltą CaCO_3 susidarymą, yra trikarboksirūgščių ciklas (1.4 pav.). Organinių rūgščių oksidacija vyksta tarpląstelinio būdu, o proceso metu susidariusio CaCO_3 išėiga yra susijusi su CO_2 kiekiu, susidarantiu vykstant organinių rūgščių metabolizmui (Li et al., 2023a; Li & Li, 2022). Taigi, mielės *S. cerevisiae* gali būti naudojamos kaip alternatyvus mikroorganizmas MICP pritaikymams.



1.4 pav. Mielių *S. cerevisiae* sukulto kalcio karbonato išsodinimo mechanizmas (pagal Li et al., 2023)

Fig. 1.4. Mechanism of calcium carbonate precipitation induced by the yeast *S. cerevisiae* (adapted from Li et al., 2023)

Atlikta analizė rodo, kad ne tik bakterijos, tačiau ir pelėsiniai grybai ir mielės gali būti panaudoti biologinio betono gamybai. Tai leistų plėsti mikroorganizmų pritaikymo sritis statybų sektoriuje.

1.6. Pirmojo skyriaus išvados ir disertacijos uždavinių formulavimas

1. Bakterijos geba išsodinti kalcio karbonatą autotrofiniais arba heterotrofiniais keliais, todėl gali būti taikomos skirtingiems biotechnologiniams procesams.
2. Ureolitinės bakterijos, išsodindamos kalcio karbonatą kaip antrinį produktą, išskiria amoniaką, kuris yra aplinkos taršos šaltinis ir gali sukelti armatūros koroziją, todėl jų panaudojimas turi būti atidžiai kontroliuojamas.
3. Tiesiogiai į betoną įterptų bakterijų gyvybingumas yra labai ribotas, todėl būtina ieškoti efektyvesnių jų įterpimo ir apsaugos priemonių.
4. Pūstas molis, pūstas perlitas, diatominė žemė ir kitos medžiagos gali būti sėkmingai taikomos kaip nešikliai, pagerinantys bakterijų išgyvenamumą ir veiksmingumą betone.
5. Pelėsiniai grybai bei mielės turi potencialą būti panaudoti biologiniame betone, o tai suteikia galimybę plėsti mikroorganizmų taikymo sritis statybos sektoriuje.

Remiantis literatūros apžvalga ir analize, suformuluoti darbo uždaviniai:

1. Parinkti biologinio betono sudėtį, atsižvelgiant į bakterijų rūšį, jų gyvybingumą ir vietines žaliavas.
2. Nustatyti nešiklių gebėjimą apsaugoti bakterijas biologiniame betone.
3. Ištirti aplinkos veiksnių (užšalimo ir atšilimo ciklą, drėgmės, temperatūros) įtaką bakterijų gyvybingumui.
4. Ištirti bakterijų gebėjimą užpildyti betone atsivėrusius plyšius laboratorinėmis sąlygomis.

Bakterijų gyvybingumo biologiniame betone tyrimų metodai

Šiame skyriuje aprašomi fizikiniai ir klasikiniai mikrobiologiniai metodai, taikyti tyrimo metu. Taip pat pateikiamos tyrimams naudotos medžiagos ir bakterijų kamienai.

Tyrimų metu iš išaugintų bakterijų kultūrų buvo ruošiamos bakterijų sporos, kurių susidarymas vertintas mikroskopiškai. Gautos bakterijų sporos buvo įkapsuliuotos į dviejų rūšių nešiklius – pūstą molį ir kalcio alginato mikrokapsules, ir toliau ruošiami betono bandiniai. Buvo tiriamas minėtų nešiklių tinkamumas apsaugoti bakterijas betono matricoje. Taip pat pūstas molis buvo dengiamas įvairiais polimeriniais apvalkalais, siekiant pagerinti bakterijų gyvybingumą. Tirta cemento pH, elektrinio laidumo ir cheminės sudėties įtaka bakterijų išgyvenamumui. Nustačius cemento sudėtį, buvo vertinamos jame esančių metalų oksidų minimalios slopinančios koncentracijos tiriamoms bakterijų rūšims. Taip pat buvo tiriama aplinkos sąlygų įtaka bakterijų išgyvenamumui betone. Buvo vertinama cemento hidratacijos temperatūros, užšalimo-atšilimo ciklų, betono kietinimo sąlygų ir drėgmės įtaka bakterijų išgyvenamumui betono matricoje ir savaiminio plyšių užsivėrimo efektyvumui.

Skyriaus tematika paskelbti 5 autorės straipsniai (Ivaškė (Jankutė) su bendraautoriais, 2021, 2022, 2023, 2024a, 2024b).

2.1. Tyrimų metu naudoti bakterijų kamienai ir medžiagos

Šiame skyriuje aprašomi tyrimo metu naudoti bakterijų kamienai, skystosios ir standžiosios mikrobiologinės terpės, skirtos jų auginimui. Taip pat pateiktos naudotos medžiagos: cemento tipai, užpildai, metalų oksidų nanodalelės. Tyrimo metu buvo naudojami penkti įprasti Portlandcemenčio tipai iš skirtingų Europos gamintojų. Kaip užpildas buvo naudojamas pūstas molis arba kalcio alginato mikrokapsulės. Metalų oksidų nanodalelės buvo naudojamos minimalių slopinančių koncentracijų nustatymui tirtamoms bakterijų rūšims.

2.1.1. Bakterijų kamienai

Tyrimo metu buvo naudojami neureolitiniai bakterijų kamienai. Šie kamienai pasirinkti todėl, kad naudojant ureolitines bakterijas, kalcio karbonato išsodinimo metu susidaro amonio jonai, kurie kenkia žmonių sveikatai ir sukelia armatūros koroziją.

Tyrimo metu buvo naudojami sporas formuojantys bei alkalifiliniai bakterijų kamienai *Bacillus pseudofirmus* (*Alkalihalophilus pseudofirmus*) (DSM 8715), *Bacillus cohnii* (*Sutcliffeiella cohnii*) (DSM 6307) ir *Bacillus halodurans* (*Halalkalibacterium halodurans*) (DSM 497). Bakterijų kamienai buvo gauti iš Vokietijos mikroorganizmų ir ląstelių kultūrų kolekcijos (Braunšveigas, Vokietija).

2.1.2. Mikrobiologinės terpės

Tyrimų metu mikroorganizmai buvo auginami skystose mitybinėse terpėse ir ant standžiųjų mitybinių terpių.

Tyrimų metu naudotos skystosios mitybinės terpės:

- šarminė mitybinė terpė: 5 g/l peptono, 3 g/l mielių ekstrakto, 4,2 g/l NaHCO_3 , 5,3 g/l Na_2CO_3 , 1 l distiliuoto vandens;
- sporuliacijos terpė: 3,5 g/l cukrozės, 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 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4,2 g/l Na_2CO_3 , 5,3 g/l NaHCO_3 , 1 l distiliuoto vandens.

Tyrimų metu naudotos standžiosios mitybinės terpės:

- agarizuota šarminė mitybinė terpė: 5 g/l peptono, 3 g/l mielių ekstrakto, 4,2 g/l NaHCO_3 , 5,3 g/l Na_2CO_3 , 20 g/l agaro, 1 l distiliuoto vandens.

2.1.3. Cemento tipai

Tyrimų metu naudoti penki įprasto Portlandcemenčio tipai iš skirtingų Europos gamintojų:

1. CEM-I 42,5 R, Akmenės cementas, Lietuva.
2. CEM-II/A-LL 42,5 N, Akmenės cementas, Lietuva.
3. CEM-I 42,5 R „Rocket“, HeidelbergCement Group, Švedija.
4. CEM-I 42,5 N „Enci“, HeidelbergCement Group, Nyderlandai.
5. Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.

Visų rūšių cementas atitiko EN 197-1 standartą.

2.1.4. Užpildai

Tyrimo metu naudoti du betono užpildai:

1. Pūstas molis (4–8 mm, Liaporas, Vokietija).
2. Hidrogelis (kalcio alginato mikrokapsulės).

2.1.5. Vanduo

Tyrimų metu cemento tešlos ir smulkiagrūdžio betono bandiniams pagaminti buvo naudojamas geriamasis vanduo.

2.1.6. Metalų oksidų nanodalelės

Metalų oksidų nanodalelės buvo gautos iš „Sigma Aldrich“ (Merck grupė, Vokietija).

Naudotų nanodalelių grynumas:

1. Al_2O_3 – 98,2 %;
2. Fe_2O_3 – 99,7 %;
3. MgO – 94,7 %;
4. TiO_2 – 99,4 %;
5. ZnO – >98,5 %;
6. CuO – 99,2 %.

2.2. Cemento savybių tyrimai

Šiame poskyryje pateikta cemento savybių tyrimo metodika: cemento suspensijos pH ir elektrinio laidumo matavimai, cheminės cementų sudėties nustatymo ir egzoterminės temperatūros matavimo metodika.

2.2.1. Cemento suspensijos pH ir elektrinio laidumo matavimas

Cemento suspensijų pH ir elektriniam laidumui nustatyti buvo naudojamas „Mettler-Toledo MPC 227“ prietaisas, pH elektrodo „InLab 410“ matavimo tikslumas 0,01; elektrodo „InLab 730“ matavimo diapazonas 0–1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Matavimai atlikti 20 ± 1 °C temperatūroje. Cemento ir vandens santykis suspensijoje siekė 1:5. Pirmas matavimas buvo atliktas 5 min. po cemento sumaišymo su vandeniu, iki 90 minutės buvo matuojama kas 10 min., po to – po 2, 3, 5 ir 6 valandų.

2.2.2. Cheminės cementų sudėties nustatymas

Cheminė skirtingos rūšies cemento sudėtis nustatyta bangos ilgio dispersija pagrįstu rentgeno spindulių fluorescenciniu analizatoriumi (XRF) „Rigaku ZSX Primus IV“. Generatoriaus įtampa – 60 kV, srovė 150 mA. Rentgeno vamzdžio anodo medžiaga – Rh, rentgeno vamzdžio galia – 4 kW. Bandiniai šiam bandymui paruošti formuojant 37 mm diametro tabletes, suspaudžiant jas su hidrauliniu „Herzog TP20“ (200kN) presu. Matavimai buvo atliekami $36,6$ °C temperatūroje, vakuume. Skenavimas buvo nustatytas taip, kad būtų aptikti visi elementai, kurių kiekis didesnis nei 0,01 %.

2.2.3. Egzoterminės temperatūros matavimas

Portlandcemenčio tešlos hidratacijos šiluma buvo matuojama pusiau adiabatiniėmis sąlygomis. Paruoštos skirtingo tipo cementų tešlos (1900 g, $v/c=0,4$) buvo supilstytos į $100\times 100\times 100$ mm formeles. Temperatūros kilimui stebėti kiekvieno mėginio viduryje buvo įdėta termopora stikliniame vamzdyje. Forma buvo dėdama į indą, izoliuotą polistireniniu putplasčiu (storis – 50 mm, šilumos laidumo koeficientas – $0,043$ W/(mK)) iš vidaus. Eksperimentai buvo atliekami esant 20 ± 1 °C temperatūrai, kuri buvo registruojama 70 valandų nepertraukiamai. Tešlos pagaminimui naudojamų žaliavų ir vandens temperatūros buvo identiškos, t. y. 20 ± 1 °C.

2.3. Užpildo savybių tyrimai skenuojančios elektroninės mikroskopijos metodu

Bakterijų įmobilizavimo ant pūsto molio dalelių įvertinimui buvo naudojama skenuojančios elektroninės mikroskopijos analizė. Šis metodas taip pat buvo taikomas siekiant įvertinti pūsto molio dalelių padengimą papildomais apvaskalais.

Bakterijomis įmobilizuotų pūsto molio dalelių paviršius buvo tiriamas naudojant „JEOL JSM-7600F“ skenuojantį elektroninį mikroskopą (SEM), kurio greitėjimo įtampa yra 10 kV. Atstumas tarp SEM ir bandinio paviršiaus buvo 7–11 mm. Paviršiaus topografijai atkurti buvo naudojamas vaizdas su antriniais elektronų detektoriais (SEI ir LEI). Mėginiai buvo visiškai išdžiovinti krosnelėje 60 ± 5 °C temperatūroje per 72 val. Išdžiovinti mėginiai buvo padengti elektra laidžiu plonu aukso sluoksniu vakuume garinant auksinį elektrodą, naudojant „Quorum Q150R ES“ prietaisą (Quorum, Lotonas, UK).

2.4. Bakterijų mineralizacijos aktyvumo tyrimai

Siekiant nustatyti tiriamų bakterijų rūšių gebėjimą vykdyti CaCO_3 išsodinimą, buvo atliekamas mineralizacijos aktyvumo tyrimas skystoje terpėje. Sporų sudygimui į terpę (5 ml NaCl, 5 ml 0,1 M inozino, 0,15 g peptone ir 0,15 g mėsos ekstrakto (pH 9,7)) buvo įpilama 40 ml Tris-HCl buferinio tirpalo (pH 9,7), turinčio 10^7 tiriamų bakterijų sporų/ml. Kaip kontrolinė grupė buvo tiriama terpė be bakterijų sporų. Paruošti mišiniai buvo inkubuojami 90 min. 30 °C temperatūroje (140 rpm). Tuomet mineralizacijos aktyvumui tirti į mišinį buvo pilama 20 mM kalcio laktato tirpalo ir inkubuojama tomis pačiomis sąlygomis. Kalcio jonų koncentracija tiriamosiose grupėse buvo matuojama po 1, 3 ir 7 dienų, naudojant kalcio kolorimetrinės analizės rinkinį. Šiuo rinkiniu kalcio jonų koncentracija buvo nustatoma dėl chromogeninio komplekso, nužadančio reakcijos mišinį violetine spalva, kuris susiformuoja tarp Ca^{2+} jonų ir o-krezolftaleino. Chromogeninio komplekso kiekis, kuris yra proporcingas esančių kalcio jonų koncentracijai, buvo įvertinamas spektrofotometriškai 575 nm bangos ilgyje. Tiksliesniems rezultatams gauti eksperimentas buvo atliekamas 3 kartus.

2.5. Bakterijų gyvybingumo tyrimo metodai

Šiame poskyryje yra pateikta bakterijų gyvybingumo betone tyrimo metodika. Aprašomi bakterijų augimui ir sporų paruošimui taikyti metodai. Tyrimų metu iš išaugintų bakterijų kultūrų buvo ruošiama bakterijų suspensija, sporų susidarymas buvo vertintas mikroskopiškai. Gautos bakterijų sporos buvo įmobilizuotos į dviejų rūšių nešiklius – pūstą molį ir kalcio alginato mikrokapsules. Šiame poskyryje taip pat pateikiama bakterijų sporų gyvybingumo betone tyrimo metodika. Bakterijų sporų gyvybingumas betone buvo vertinamas klasikiniu mikrobiologiniu skiedimo-sėjimo metodu.

2.5.1. Bakterijų kultūrų išsaugojimas

Bakterijos *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* pagal gamintojo rekomendacijas buvo auginamos šarminėje mitybinėje terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant (150 rpm) per naktį. Ląstelės buvo surinktos centrifuguojant (5000 g, 8 min.) ir suspenduotos 1 ml tos pačios mitybinės terpės 50 % glicerolio tirpalo, išpilstytos po 100 µl ir saugomos užšaldytos –80 °C temperatūroje.

2.5.2. Bakterijų auginimas bei sporų ruošimas

Bakterijos *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* pagal gamintojo rekomendacijas buvo auginamos šarminėje mitybinėje terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant (150 rpm) per naktį. Bakterijos buvo persėtos į sporuliacijos terpę ir auginamos 30 °C temperatūroje aeruojant (150 rpm) 4 paras, kol susiformuoja sporos. Sporų formavimosi įvertinimui bakterijų kultūra buvo dažoma Šeferio-Fultono metodu ir stebima mikroskopiškai.

Bakterijų sporų susidarymo stebėjimui Šeferio-Fultono metodu bakterijų kultūra buvo užlašinta ant objekcinio stiklelio, išdžiovinta ore ir fiksuota karščiu. Ant paruoštos bakterijų kultūros buvo užlašinta 0,5 % vandeninio malachito žaliojo tirpalo, 5 min. laikoma virš verdančio vandens garų ir stebima, kad dažai neišdžiūtų. Stikliukas gerai nuplautas distiliuotu vandeniu. Kultūra 30 sek. buvo dažoma safranino tirpalu. Stikliukas vėl gerai nuplautas distiliuotu vandeniu ir nusausintas filtriniu popieriumi. Nusidažiusios ląstelės buvo stebimos šviesiniu mikroskopu. Susidariusios endosporos nusidažė žalia spalva, o vegetatyvinės ląstelės – raudona.

Iš bakterijų kultūros, išaugintos šarminėje sporuliacijos mitybinėje terpėje, surenkamos sporos. Tai atliekama kultūrą centrifuguojant (5000 g, 10 min.). Sporų nuosėdos buvo tris kartus plaunamos atšaldytu 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9). Gauta suspensija 30 min. buvo kaitinama 80 °C temperatūroje, kad būtų sunaikintos vegetatyvinės ląstelės. Vėliau bakterijų kultūra vėl tris kartus plauta 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 9). Sporų formavimosi įvertinimui sporų pavyzdžiai buvo dažomi Šeferio-Fultono metodu ir stebimi mikroskopiškai. Sporų kiekis suspensijoje nustatomas sėjimo-skiedimo metodu. Sporų suspensija saugoma 4 °C temperatūroje.

Sporų kiekio suspensijoje nustatymui sėjimo-skiedimo metodu, pirmiausiai buvo išmatuotas bakterijų suspensijos optinis tankis. Atlikti skiedimai, gaunant 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Į lėkšteles su agarizuota šarminė mitybine terpe buvo sėjama po 100 µl suspensijos, turinčios 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Norint gauti statistiškai patikimą vidurkį, kiekvieno skiedimo buvo pasėjama po 3 lėkšteles. Bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje per

nakį. Kitą dieną suskaičiuojamas išaugusių kolonijų skaičius. Apskaičiuojamas sporų skaičius suspensijoje KSV/ml, pagal formulę:

$$M = A \cdot 10^n \cdot 10, \quad (2.1)$$

čia M – gyvų ląstelių skaičius 1 ml; A – kolonijų skaičiaus lėkštelėse vidurkis; 10^n – skiedimo koeficientas; 10 – perskaičiavimo koeficientas, nes buvo išsėta 0,1 ml.

2.5.3. Bakterijų sporų įmobilizavimas į pūsto molio daleles

Kaip lengvasis užpildas buvo naudojamas pūstas molis (4–8 mm, Liaporas, Vokietija), kuris buvo impregnuotas vakuume esant 0,1 MPa slėgiui. Pūsto molio dalelės impregnuotos 80 g/l kalcio laktato, 1 g/l mielių ekstrakto ir 10^8 KSV/ml sporų suspensijos tirpalu. Vėliau pūsto molio dalelės buvo džiovinamos kambario temperatūroje 72 val. iki pastovios masės.

Į pūstą molį įterptų bakterijų sporų kiekis nustatytas jam išdžiūvus iki pastovios masės. Tai buvo atlikta taikant skiedimo-sėjimo metodą. Grūstuvėje pūsto molio dalelės kruopščiai sutrintos į miltelius, pasverta 1 g sutrinto pūsto molio ir užpilta 9 ml 10 mM Tris-HCl buferinio tirpalo (pH 9). Mišinys homogenizuotas naudojant sūkurinį kratytuvą. Atlikti skiedimai, gaunant 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe buvo sėjama po 100 μ l suspensijos, turinčios 10^3 ir 10^2 bakterijų sporų/ml. Norint gauti statistškai patikimą vidurkį, kiekvieno skiedimo pasėta po 3 lėkšteles. Bakterijos augintos 30 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną suskaičiuotas išaugusių kolonijų skaičius. Apskaičiuojamas sporų skaičius pūsto molio dalelėse (KSV/1 g pūsto molio) pagal 2.1 formulę.

2.5.4. Pūsto molio dalelių apsauginio sluoksnio formavimas

Buvo tiriami aštuoni skirtingi apvalkalai, skirti sukurti apsauginį sluoksnį ant bakterijomis įmobilizuotų pūsto molio dalelių. Visų apsauginių sluoksnių sudėtis yra pateikta 2.1 lentelėje. MKPC apvalkalas buvo pagamintas iš 45 g vandens, 22,5 g KH_2PO_4 , 7,5 g MgO ir 3 g stireno-akrilato emulsijos. Šios dangos cheminė sudėtis yra labai panaši į fosfatcemenčio, naudojamo kaip alternatyva tradiciniam portlandcemenčiui, sudėčiai (Wu et al., 2020). A1 ir A2 apvalkalai buvo pagaminti atitinkamai iš vieno arba dviejų stireno-akrilato emulsijos sluoksnių (Weberfloor 4716, Saint-Gobain, Paryžius, Prancūzija). Tai vandens pagrindo emulsija, naudojama kaip porų sandariklis betoniniuose paviršiuose. P1 ir P2 apvalkalai buvo pagaminti atitinkamai iš vieno arba dviejų lateksinių akrilinių dažų (Optiva 3

Ceramic, Tikkurila, Vanda, Suomija) sluoksnių. MgO apvaskalas buvo pagamintas iš 5 g MgO, kuris yra vidutiniškai reaktyvus, ir 10 g vandens. Ši suspensija buvo maišoma 10 min. kambario temperatūroje, todėl dalinis MgO hidratacijos santykis gali būti apie 10–30 % (Xing et al., 2018). Trumpas vandens poveikis užtikrina, kad MgO sudaro didžiausią MgO apvaskalo dalį. Tai savo ruožtu užtikrina, kad MgO toliau reaguos su vandeniu, esančiu betone, sudarydamas apsauginį MgO sluoksnį. AM1 ir AM2 apvaskalai buvo paruošti maišant stireno-akrilato emulsiją (Weberfloor 4716, Saint-Gobain, Paryžius, Prancūzija) ir MgO atitinkamai santykiniais 10:1 ir 30:1.

2.1 lentelė. Tyrimo metu naudoti apsauginiai pūsto molio sluoksniai

Table 2.1. Protective layers of expanded clay used in this study

Nr.	Apvaskalas	Sudėtis
1	MKPC	kalio magnio fosfato cementas
2	A1	vienas stireno-akrilato emulsijos sluoksnis
3	A2	du stireno-akrilato emulsijos sluoksniai
4	P1	vienas sluoksnis vandens, latekso, akrilo kompozicinių dažų
5	P2	du sluoksniai vandens, latekso, akrilo kompozicinių dažų
6	MgO	magnio oksidas ir magnio hidroksidas
7	AM1	stireno-akrilato ir magnio oksido tirpalas
8	AM2	stireno-akrilato ir magnio oksido tirpalas
9	C	be apvaskalo
10	CC	be apvaskalo ir be bakterijų

C bandinys nebuvo dengiamas apsauginiu apvaskalu ir buvo naudojamas kaip kontrolinis bandinys. CC bandinys buvo naudojamas kaip dvigubos neigiamos kontrolės bandinys, nes buvo paruoštas be apvaskalo ir bakterijų. Norint tolygiai paskirstyti apvaskalo medžiagą, pūsto molio dalelės buvo panardintos į iš anksto paruoštus apsauginių apvaskalų tirpalus. Apdengtos pūsto molio dalelės buvo džiovinamos kambario temperatūroje 48 val.

2.5.5. Betono bandinių paruošimas su pūsto molio dalelėmis

Tyrimams buvo ruošiami smulkiagrūdžio betono bandiniai su pūsto molio užpildu. Cilindro formos bandiniai ($\varnothing 55 \times 15$ mm) buvo pagaminti naudojant šiuos komponentus: smėlį (0/4 mm), cementą, vandenį ir pūsto molio daleles su įmobilizuotomis bakterijų sporomis. Betono mišinio proporcijos yra pateiktos 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Betono mišinio sudėtis 1 m³ betono (pritaikyta iš Tziviloglou et al., 2016)
Table 2.2. Concrete mix composition for 1 m³ of concrete (adapted from Tziviloglou et al., 2016)

Medžiaga	Sudėtis, kg	Kiekis viename bandinyje, g/bandiniui
Cementas	463	16,2
Smėlis, 0/4 mm	855	30
Pūstas molis, 4-8 mm	280	9,8
Vanduo	231,5	8,1

Biologinio betono bandiniai su į pūstą molį imobilizuotomis bakterijų sporomis buvo ruošiami šiems tyrimams:

1. Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybės nuo cemento tipo nustatymui.
2. Skirtingų rūšių bakterijų sporų gyvybingumo betono matricoje nustatymui.
3. Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybės nuo betono bandinių hidratacijos temperatūros nustatymui.
4. Pūsto molio apvalkalų įtakos bakterijų gyvybingumui betono matricoje nustatymui.
5. Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybės nuo betono kietinimo sąlygų nustatymui.
6. Bakterijų sporų gyvybingumo, vykstant žemos temperatūros bei užšalimo-atšilimo ciklams, tyrimams.

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo cemento tyrimams betono bandiniai buvo gaminami atskiruose plastikiniuose induose, uždengiami ir paliekami kietėti atitinkamai 3 dienas. Praėjus šiam laikui, bandiniai buvo išimami iš plastikinių indų ir tolesniems tyrimams saugomi kambario (20 °C) temperatūroje su 55 ± 5 % santykine oro drėgme. Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo cemento tipo tyrimai leido identifikuoti cemento tipą, kurį naudojant bakterijų gyvybingumas yra didžiausias. Šis atrinktas cemento tipas toliau buvo naudojamas kitose gyvybingumo tyrimuose. Tyrimo planas pateiktas 2.3 lentelėje. Kiekvienam gyvybingumo tyrimui buvo gaminami 4–6 betono bandiniai.

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo bakterijų rūšies tyrimams betono bandiniai buvo gaminami naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą atskiruose plastikiniuose induose, uždengiami ir paliekami kietėti atitinkamai 7 paras. Praėjus šiam laikui, bandiniai buvo išimami iš plastikinių indų ir tolesniems tyrimams saugomi kambario temperatūroje su 55 ± 5 % santykine oro drėgme.

2.3 lentelė. Bakterijų sporų gyvybingumo biologiniame betone tyrimų programa
Table 2.3. Investigation programme of bacterial spores' viability in biological concrete

Bakterijų gyvybingumo priklausomybė nuo cemento tipo			
Cemento tipas	Bakterijų rūšis	Kietinimo temperatūra	Bandinių skaičius
CEM-I 42,5 R, Akmenės cementas, Lietuva.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	6
CEM-II/A-LL 42.5 N, Akmenės cementas, Lietuva.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	6
CEM-I 42.5 R „Rocket“, HeidelbergCement Group, Švedija.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	6
CEM-I 42,5 N „Enci“, HeidelbergCement Group, Nyderlandai.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	6
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	6
Bakterijų gyvybingumo priklausomybė nuo bakterijų rūšies			
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	4
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. cohnii</i>	20 °C	4
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. halodurans</i>	20 °C	4
Bakterijų gyvybingumo priklausomybė nuo betono kietinimo temperatūros			
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. pseudofirmus</i>	20 °C	4
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. pseudofirmus</i>	40 °C	4
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, „Aalborg White“, Danija.	<i>B. pseudofirmus</i>	80 °C	4

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo betono kietinimo temperatūros tyrimams betono bandiniai buvo gaminami naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą atskiruose plastikiniuose induose, uždengiami ir paliekami kietėti 24 valandas. Praėjus šiam laikui, indai buvo papildomi vandeniu ir laikomi džiovykloje prie skirtingų temperatūrų (20, 40 ir 80 °C) 3 paras. Po to, plastikiniai indai buvo pašalinami ir betono bandiniai laikomi kambario (20 °C) temperatūroje su 55 ± 5 % santykinė drėgme.

Pūsto molio apvaskalų įtakos bakterijų gyvybingumui betono matricoje tyrimai ir betono savaiminio atsinaujinimo tyrimai buvo atliekami su *B. pseudofirmus* bakterijomis. Betono bandiniai buvo gaminami naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą pagal 2.2 lentelėje pateiktas proporcijas. Šie kiekiai buvo naudojami pagaminti betono bandinius su padengtomis ir nepadengtomis pūsto molio dalelėmis. Norint užtikrinti, kad visuose bandiniuose būtų pūsto

molio su įmobilizuotomis bakterijomis kiekis, pūsto molio dalelės buvo pasveriamos prieš padengimo procedūrą. Taip galutinis pūsto molio svoris su įkapsuliuotomis bakterijomis ir maistinėmis medžiagomis išlieka vienodas visuose betono bandiniuose, nors kiekvienas apdangalas prideda papildomo svorio prie bakterijomis įmobilizuoto pūsto molio dalelių. Kiekvienam 2.1 lentelėje nurodytam pūsto molio apdangalui buvo gaminami 3 bandiniai gyvybingumo tyrimams ir 3 bandiniai betono savaiminio atsinaujinimo tyrimams.

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo betono kietinimo sąlygų tyrimai buvo atliekami su *B. pseudofirmus* bakterijomis. Betono mišiniui paruošti buvo naudojamas bakterijomis impregnuotas pūsto molio dalelės, padengtos stireno-akrilato emulsija (Weberfloor 4716, Saint-Gobain, Paryžius, Prancūzija). Betono bandiniai buvo gaminami naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą pagal 2.2 lentelėje pateiktas proporcijas atskiruose plastikiniuose induose, uždengiami ir paliekami kietėti 24 valandas. Tada pusė pagamintų bandinių buvo įmerkiami į vandenį, o kita pusė – paliekami kietėti kambario temperatūroje (20 °C). Kiekvienam nurodytam atvejui buvo gaminami 3 bandiniai.

Bakterijų gyvybingumo tyrimai, vykstant užšalimo-atšalimo ciklams, ir savaiminio atsinaujinimo tyrimai, imituojamomis lietaus sąlygomis, buvo atliekami su *B. pseudofirmus* bakterijomis. B1–B4 smulkiagrūdžio betono bandiniai buvo paruošti identišškai ir veikiami šalčio arba užšalimo-atšilimo ciklą, tuo tarpu kontroliniai K1–K4 bandiniai nebuvo veikiami šalčio arba užšalimo-atšilimo ciklą. Buvo gaminami 40×40×150 mm betono bandiniai. Betono mišinio proporcijos pateikiamos 2.4 lentelėje. Betono mišiniui paruošti buvo naudojamos bakterijomis impregnuotos pūsto molio dalelės, padengtos stireno-akrilato emulsija (Weberfloor 4716, Saint-Gobain, Paryžius, Prancūzija) ir baltas CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementas. Iš pradžių sausi komponentai buvo sudėti į rotacinę maišyklę (Zyklos ZZ 75 HE, Pemat, Freisbachas, Vokietija) ir maišyti vieną minutę. Tada buvo įpiltas vandens ir betono mišinys, maišytas dar dvi minutes. Buvo liejami sustiprinti (armuoti) arba paprasti betono bandiniai. Sustiprinti bandiniai buvo naudojami savaiminio atsinaujinimo metu vykstančio plyšių užpildymo proceso matavimui, o paprasti betono bandiniai – bakterijų gyvybingumo tyrimams. Kontroliniams bandiniams pagaminti buvo naudotos 2.4 lentelėje nurodytos betono mišinio proporcijos ir pūstas molis be impregnuotų bakterijų sporų.

2.4 lentelė. Betono mišinio sudėtis 1 m³ betono

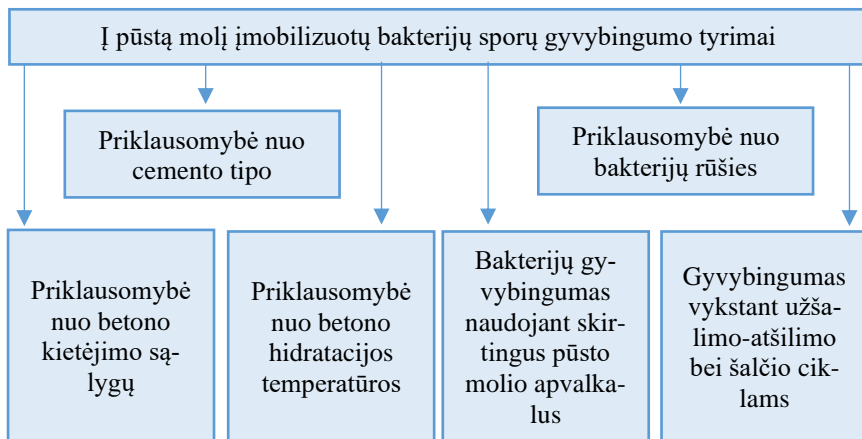
Table 2.4. Concrete mix composition for 1 m³ of concrete

Medžiaga	Sudėtis, kg	Masės procentai, %
Cementas	463	49
Smėlis, 0/4 mm	855	26
Pūstas molis, dengtas apsauginiu sluoksniu	280	10
Vanduo	231,5	15

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo šalčio ciklų bei užšalimo-atšilimo ciklų tyrimui buvo ruošiami 40×40×150 mm betono bandiniai. Bandiniai, kuriems buvo taikyti užšalimo-atšilimo ciklai, buvo panardinti į vandenį, tuo tarpu bandiniai, kuriems buvo taikyti šalčio ciklai, buvo laikomi ore. Kiekvienam tyrimui buvo naudojama po keturis bandinius. Visiems bandiniams buvo pakartotinai taikomi užšalimo-atšilimo ciklai. Vieną ciklą sudarė 2–4 dienos šaldymo – 20 °C temperatūroje, po to 1 diena atšildymo 20 °C temperatūroje. Per 78 dienas buvo atlikti 20 užšalimo-atšilimo ciklų. Kaip kontrolė buvo naudojami bandiniai, laikomi pastovioje 20 °C temperatūroje vandenyje arba ore.

2.5.6. Į pūstą molį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimas

Paruošti smulkiagrūdžio betono bandiniai su pūsto molio užpildu ir įmobilizuotomis bakterijų sporomis toliau buvo naudojami bakterijų gyvybingumui betone tirti. Į pūstą molį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimo planas pateiktas 2.1 pav.



2.1 pav. Į pūstą molį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimų planas (sudaryta autorės)

Fig. 2.1. Research plan for testing the viability of bacterial spores immobilised in expanded clay (created by the author)

Bakterijų sporų išgyvenamumo priklausomybė nuo cemento tipo betone buvo nustatoma praėjus 3, 7, 14, 21, 30 ir 60 dienų po betono bandinių paruošimo. Skirtingų bakterijų rūšių gyvybingumas betone ir bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo betono kietėjimo temperatūros buvo nustatomos praėjus 7, 14, 21 ir 28

dienoms po betono bandinių paruošimo. Atliekant kiekvieną gyvybingumo tyrimą, 6,53 g betono bandinio buvo sutrinami iki miltelių. Šiame kiekyje bandinio yra apie 1 g bakterijomis įmobilizuotų pūsto molio dalelių. Gauti betono milteliai buvo suspenduojami steriliame 10 mM Tris-HCl buferiniame tirpale (pH 9) ir homogenizuojami, naudojant sukurinį kratytuvą. Tada buvo atliekami serijiniai skiedimai. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe buvo sėjama po 100 μ l suspensijos su dviem atitinkamais skiedimais. Norint gauti statistiškai patikimą vidurkį, kiekvieno praskiedimo buvo pasėjama po 3 lėkšteles. Bakterijos buvo auginamos 30 °C temperatūroje per naktį, o kitą dieną suskaičiuojamas išaugusių kolonijų skaičius. Sporų skaičius bandinyje apskaičiuotas pagal 2.1 formulę.

Į pūstą molį su apsauginiais apdangalais įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumas betono bandiniuose buvo tiriamas praėjus 7, 14, 21, 35 ir 56 dienoms po betono bandinių paruošimo. Gyvybingumo tikrinamas atliekamas pagal anksčiau aprašytą procedūrą.

Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybė nuo betono kietėjimo sąlygų buvo nustatoma praėjus 1, 7, 14 ir 28 dienoms po betono bandinių paruošimo. Bakterijų sporų gyvybingumas vykstant užšalimo-atšilimo ciklams buvo nustatomas praėjus 1, 3, 5, 10, 15 ir 20 užšalimo-atšilimo ciklų. Gyvybingumo tikrinamas atliekamas pagal aukščiau aprašytą procedūrą.

2.5.7. Bakterijų įkapsuliavimas į hidrogelį

Įkapsuliavimo procedūra buvo atliekama norint gauti mikrokapsules, kurių sudėtyje būtų bakterijų sporos ir mitybinės medžiagos, reikalingos biologinio betono plyšių užsivėrimui. Tyrimo metu naudojama įkapsuliavimo technika yra pagrįsta natrio alginato geliacija, kurios metu Na^+ jonai yra pakeičiami Ca^{2+} jonais. Į paruoštą sterilų įkapsuliavimo mišinį, sudarytą iš 2 % natrio alginato ir ištirpintų mitybinių medžiagų (5 g/l peptono ir 3 g/l mėsos ekstrakto), buvo įdedama bakterijų sporų suspensija. Sporų suspensija sudarė 2,5 % bendro mišinio tūrio, o galutinė bakterijų sporų koncentracija įkapsuliavimo mišinyje buvo 10^7 bakterijų sporų/ml. Kapsulės su mitybinėmis medžiagomis be bakterijų sporų buvo naudojamos kaip kontrolė.

Įkapsuliavimo mišinys su maistinėmis medžiagomis ir bakterijų sporomis buvo lašinamas į sterilų 0,2 M kalcio laktato tirpalą nuolat maišant. Sulašinus visą mišinį, gautos kapsulės buvo paliktos maišytis 30 min., kad įvyktų visiškas geliacijos procesas. Po to kapsulės buvo atskiriamos nuo kalcio laktato tirpalo, filtruojant per sterilų filtrą, ir plaunamos steriliu vandeniu. Paruoštos kapsulės buvo džiovinamos 55 °C temperatūroje iki visiško išdžiūvimo. Visas įkapsuliavimo procesas buvo atliekamas laminarinio oro srauto bokse.

Siekiant įvertinti įkapsuliuotų bakterijų sporų skaičių hidrogelio kapsulėse, jos buvo suardytos citratiniu buferiniu tirpalu, sudarytu iš 55 mM trinatrio citrato,

30 mM EDTA ir 150 mM NaCl (pH 8). Į hidrogelį įkapsuliuotų bakterijų sporų gyvybingumas buvo nustatomas penkias kapsules ištirpinus 5 ml sterilaus citratinio buferinio tirpalo ir inkubuojant 30 °C temperatūroje. Tada buvo atliekami serijiniai skiedimai. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe buvo sėjama po 100 µl suspensijos su atitinkamais skiedimais. Norint gauti statistiškai patikimą vidurkį, po kiekvieno praskiedimo pasėjama po 3 lėkšteles. Bakterijos auginamos 30 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną suskaičiuojamas išaugusių kolonijų skaičius (KSV).

2.5.8. Maistinių medžiagų, įkapsuliuotų į hidrogelį, pralaidumo nustatymas

Maistinių medžiagų pralaidumo tyrimas buvo atliekamas naudojant skirtingos koncentracijos (1, 1,5 ir 2 %) kalcio alginato kapsules su vienodu įkapsuliuotų maistinių medžiagų kiekiu (5 g/l peptono ir 3 g/l mėsos ekstrakto). Kapsulės be maistinių medžiagų buvo naudojamos kaip kontrolė. Atitinkamas kiekis hidrogelio kapsulių (150 vnt.) buvo suspenduotos 15 ml 10 % cemento filtrato tirpale ir inkubuojamos kambario temperatūroje. Po 3, 7 ir 14 dienų mėginiai buvo analizuojami spektrofotometriškai 280 nm bangos ilgyje, remiantis aromatinių aminorūgščių UV sugertimi. Norint gauti statistiškai patikimus rezultatus, eksperimentas buvo kartojamas 3 kartus.

2.5.9. Betono bandinių paruošimas su hidrogelio kapsulėmis

Tyrimams buvo ruošiami cemento tešlos ir smulkiagrūdžio betono bandiniai su hidrogelio kapsulėmis. Cilindro formos (ø45 × 30 mm) bandiniai buvo ruošiami naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo Portlando cementą, smėlį (0/4 mm), vandenį ir pagamintas hidrogelio kapsules. Cemento tešlos ir betono mišinio proporcijos yra pateiktos 2.5 lentelėje. Kontroliniai bandiniai buvo gaminami naudojant hidrogelio kapsules su mitybinėmis medžiagomis be bakterijų sporų.

2.5 lentelė. Cemento tešlos ir cemento smulkiagrūdžio betono bandinių sudėtis (pritaikyta iš Fahimizadeh et al., 2020)

Table 2.5. Composition of cement paste and cement mortar samples (adapted from Fahimizadeh et al., 2020)

Medžiaga	Smulkiagrūdis betonas		Cemento tešla	
	Be kapsulių	Be kapsulių	Be kapsulių	Su kapsulėmis
Kapsulės	–	–	–	0,8 g
Cementas	30 g	15 g	15 g	30 g
Smėlis	–	15 g	15 g	–
Vanduo	8 g	6 g	6 g	8 g

Biologinio betono bandiniai su į kalcio alginato mikrokapsules įkapsuliuotomis bakterijų sporomis buvo ruošiami šiems tyrimams:

1. Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybės nuo bakterijų rūšies cemento tešloje ir betone nustatymui.
2. Bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybės nuo betono bandinių kietinimo temperatūros nustatymui.

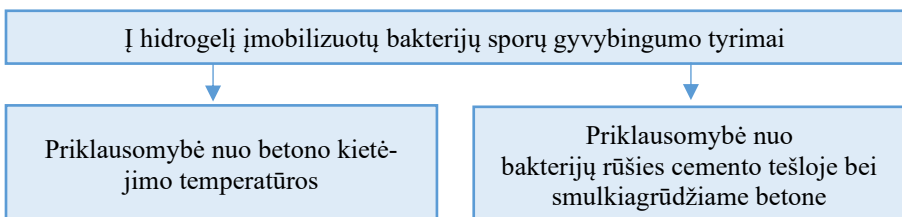
Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo bakterijų rūšies cemento tešloje ir smulkiagrūdžiam betone tyrimams betono bandiniai buvo gaminami atskiruose plastikiniuose induose pagal 2.5 lentelėje pateiktas proporcijas, uždengiami ir paliekami kietėti 7 paras. Praėjus šiam laikui, bandiniai buvo išimami iš plastikinių indų ir tolesniems tyrimams saugomi kambario temperatūroje su 55 ± 5 % santykine oro drėgme.

Bakterijų gyvybingumo priklausomybės nuo betono kietinimo temperatūros tyrimai buvo atliekami su *B. pseudofirmus* bakterijų sporomis. Betono bandiniai buvo gaminami atskiruose plastikiniuose induose pagal 2.5 lentelėje pateiktas proporcijas, uždengiami ir paliekami kietėti 24 valandas. Praėjus šiam laikui, indai buvo pripildomi vandeniu ir laikomi džiovykloje prie skirtingų temperatūrų (20, 40 ir 80 °C) 3 paras. Po kaitinimo, plastikiniai indai buvo pašalinami ir betono bandiniai buvo laikomi kambario temperatūroje su 55 ± 5 % santykine drėgme.

Plyšių užpildymo efektyvumo tyrimams smulkiagrūdžio betono bandiniai buvo gaminami pagal 2.5 lentelėje pateiktas proporcijas ir paliekami kietėti 7 paras kambario temperatūroje su 55 ± 5 % santykine drėgme.

2.5.10. Į hidrogelį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai

Paruošti betono bandiniai su į hidrogelį įmobilizuotomis bakterijų sporomis toliau buvo naudojami bakterijų gyvybingumui tirti. Į hidrogelį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimo kryptys pateiktos 2.2 pav.



2.2 pav. Į hidrogelį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimų planas (sudaryta autorės)

Fig. 2.2. Research plan for testing the viability of bacterial spores encapsulated in hydrogel (created by the author)

Įkapsuliuotų bakterijų sporų gyvybingumo priklausomybė nuo bakterijų rūšies ir betono kietėjimo temperatūros buvo tiriama praėjus 7, 14, 21 ir 28 dienoms po bandinių paruošimo. Skirtingų bakterijų rūšių sporų gyvybingumas buvo nustatomas cemento tešlos ir betono bandiniuose, tiriama po 3 bandinius. Atliekant kiekvieną tyrimą, dalis cemento tešlos ir betono bandinio buvo sutrinama plaktuku, kad hidrogelio kapsulės būtų išskirtos iš bandinio. Kiekvienam gyvybingumo testui, penkios kapsulės iš cemento tešlos ir smulkiagrūdžio betono bandinių buvo inkubuojamos 5 ml sterilaus citratinio buferinio tirpalo, sudaryto iš 55 mM trinario citrato, 30 mM bevandenio EDTA ir 150 mM NaCl (pH 8), 30 °C temperatūroje. Tada buvo atliekami serijiniai skiedimai. Į lėkšteles su agarizuota šarmine mitybine terpe buvo sėjama po 100 µl suspensijos su atitinkamais skiedimais. Norint gauti statistiškai patikimą vidurkį, kiekvieno praskiedimo pasėjama po 3 lėkšteles. Bakterijos auginamos 30 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną suskaičiuojamas išaugusių kolonijų skaičius (KSV).

2.6. Plyšių užsivėrimo biologiniame betone tyrimai

Šiame poskyryje pateikiama plyšių užsivėrimo biologiniame betone tyrimų metodika. Plyšių užsivėrimas buvo tiriamas betono bandiniuose, kuriuose bakterijos buvo įmobilizuotos į pūsto molio daleles arba hidrogelį. Plyšių užsivėrimas buvo vertinamas laboratorinėmis ir lietuvių imituojančiomis sąlygomis.

2.6.1. Plyšių atvėrimas biologinio betono bandiniuose

Po kietėjimo periodo betono bandiniai su bakterijomis įmobilizuotu pūstu moliu arba hidrogeliu buvo perskelti naudojant plaktuką. Radialinis tempimo plyšys padalija bandinį į dvi dalis. Kad atskirtos dalys laikytųsi kartu, padalyti betono bandiniai buvo sutvirtinti vandeniui atsparia lipnia juosta. Kiekviename bandinyje buvo pasirinktos dvi arba trys matavimo sritys ir pažymėtos vandeniui atspariais žymekliais.

Armuotuose betono bandiniuose, skirtuose betono savaiminio atsinaujinimo efektyvumo tyrimui, imituojamomis lietaus sąlygomis, po 28 dienų kietėjimo vandenyje buvo atveriami plyšiai. Tai buvo atliekama taikant trijų taškų apkrovos schemą. Atliekant bandymus su *B. pseudofirmus* bakterijomis, kad būtų išvengta šlyties trūkimo, gelžbetoniniai bandiniai buvo papildomai sutvirtinti anglies pluošto lakštais. Vidutiniškai prizmių apačioje susidarė keturi matomi įtrūkimai. Platesni nei 50 µm įtrūkimai buvo atrinkti tolesnei apžiūrai. Pradinis įtrūkimų plotis matuotas naudojant stereomikroskopą (Stemi 305, Zeiss, Oberkochenas, Vokietija) su 5,0 megapikselių skaitmenine kamera (AxioCam ERc 5s, Zeiss, Oberkochenas, Vokietija). Kiekvienam įtrūkimui buvo pažymėti 8–10 matavimo vietų,

vengiant lygiagrečių įtrūkimų, trūkstamų agregatų ir kitų nelygumų. Kiekvienoje vietoje įtrūkimo plotis buvo matuojamas trijuose taškuose.

2.6.2. Biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumo tyrimas

Pagaminti bandiniai su atvertais plyšiais buvo panardinti į vandenį. Viso inkubacijos laikotarpio metu periodiškai buvo matuojamas vandens pH.

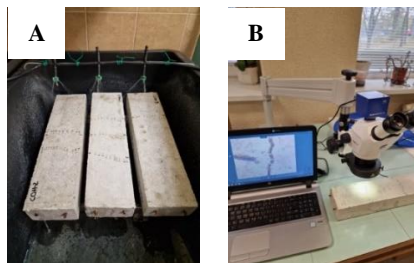
Biologinio betono plyšių užpildymo efektyvumas buvo vertinamas po 7, 14, 28, 35 ir 56 dienų nuo inkubavimo pradžios. Bandiniai buvo išimti iš vandens ir išdžiovinti vieną dieną prieš matavimą. Plyšių vaizdai buvo daromi skaitmeniniu mikroskopu su kamera (DTX 90, Levenhuk, Tampa, Florida, JAV). Gauti rezultatai buvo naudojami plyšių užsivėrimo koeficientui apskaičiuoti pagal 2.2 formulę (Wiktor & Jonkers, 2011):

$$H_c = \frac{w_i - w_t}{w_i}, \quad (2.2)$$

kur H_c – plyšių užsivėrimo koeficientas; w_i – pradinis plyšio plotis; w_t – plyšio plotis po atsikūrimo.

2.6.3. Biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumo tyrimas imituojamomis lietaus sąlygomis

Geležbetonio bandiniai su atvertais plyšiais buvo perkelti į specialiai suprojektuotus lietu imituojančius baseinus ilgalaikiam plyšių užsivėrimo laikotarpiui (2.3 pav.).



2.3 pav. Biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumo tyrimo schema: A – betono bandiniai, suprojektuotame lietu imituojančiame baseine; B – plyšių pločio matavimas biologinio betono bandiniuose

Fig. 2.3. Scheme for the investigation of the crack-healing performance in biological concrete: A – concrete specimens in a designed rain-simulated basin; B – measurement of crack width in biological concrete specimens

Ant bandinių du kartus per dieną po 30 min. automatiškai buvo purškiamas vanduo. Po kiekvieno sauso ciklo vanduo lėtai tekėjo nuo apatinės bandinių pusės. Likusį laiką bandiniai buvo laikomi ore, kuriame santykinė drėgmė svyravo nuo 40 % iki 50 %. Įtrūkimų plotis išmatuotas po 28 ir 98 dienų inkubavimo laikotarpio.

2.7. Metalų oksidų toksiškumo tyrimai

Bakterijos *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* pagal gamintojo rekomendacijas buvo auginamos šarminėje mitybinėje terpėje 30 °C temperatūroje aeruojant (150 rpm) per naktį, kol jų koncentracija pasiekė 10^8 vegetatyvinių ląstelių/ml. Išmatuotas bakterijų suspensijos optinis tankis. Atlikti skiedimai, gaunant 10^2 ląstelių/ml.

2.6 lentelė. Metalų oksidų nanodalelių koncentracijos

Table 2.6. Concentrations of metal oxide nanoparticles

Nr.	Metalo oksidas	Koncentracija, $\mu\text{g/ml}$
1	AlO_3	250–2000
2	Fe_2O_3	25–6000
3	MgO	250–5000
4	TiO_2	250–2000
5	ZnO	6,25–200
6	CuO	6,25–2000

Metalų oksidų slopinamasis poveikis bakterijų augimui buvo nustatomas taikant skiedimo-sėjimo metodą. Buvo paruoštos Petri lėkštelės su šarminė mitybine terpe ir skirtingomis metalų oksidų nanodalelių koncentracijomis (2.6 lentelė). Į lėkšteles su agarizuota šarminė mitybine terpe buvo sėjama po 100 μl bakterijų suspensijos, turinčios 10^2 ląstelių/ml. Bakterijos augintos 30 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną stebėta, ar išaugo bakterijų kolonijos.

2.8. Antrojo skyriaus išvados

1. Taikyti mikrobiologiniai tyrimai bakterijų gyvybingumo nustatymui, charakterizuojant cementines medžiagas ir jose vykstančių procesų įtaką bakterijų gyvybingumui.
2. Bakterijų gyvybingumui nustatyti pasirinktas klasikinis mikrobiologinis skiedimo-sėjimo metodas, kuris leidžia paprastai įvertinti išgyvenusius

ląstelių kiekį biologiniame betone. Betono hidratacijos temperatūros, kietinimo sąlygų ir aplinkos poveikis (užšalimo-atšilimo ciklą, šalčio ciklą) taip pat buvo nustatomas taikant šį metodą.

3. Siekiant nustatyti skirtingų cemento tipų fizikines-chemines savybes, buvo pasirinkti metodai, leidžiantys įvertinti cemento cheminę sudėtį, pH ir elektrinį laidumą, hidratacijos temperatūrą kietėjimo metu. Potencialiai toksiškų metalo oksidų įtaka gyvybingumui buvo įvertinta serijinių bakterijų kultūrų skiedimų ant agarizuotos terpės su šiomis medžiagomis būdu.
4. Norint įvertinti bakterijų sporų formavimąsi, buvo naudojama šviesinė mikroskopija, o bakterijų sporų imobilizavimo ant nešiklių ir papildomų pūsto molio dangų susiformavimo įvertinimui – skenuojanti elektroninė mikroskopija.
5. Biologinio betono plyšių užpildymo vertinimas buvo atliekamas laboratorinėse (pamerkus į vandenį) ir lietu imituojančiose sąlygose, pagaminus betono bandinius ir sudarant juose plyšius. Savaiminio plyšių užsivėrimo greitis buvo įvertintas analizuojant šviesinės mikroskopijos būdu gautus vaizdus ir apskaičiuojant plyšių užsivėrimo koeficientą.

3

Bakterijų gyvybingumo betone tyrimai

Šiame skyriuje pateikiami rezultatai ir jų vertinimas: ištirtas dažniausiai betono konstrukcijoms naudojamų cemento tipų pH, elektrinis laidumas, egzoterminės temperatūros. Ištirta bakterijų sporų, impregnuotų į pūsto molio daleles, gyvybingumo smulkiagrūdžiame betone priklausomybė nuo cemento tipo, jo sudėtyje esančių metalų oksidų poveikis bakterijų gyvybingumui, taip pat skirtingų pūsto molio dalelių apvalkalų gebėjimas apsaugoti bakterijų sporas betone. Ištirta betono kietėjimo temperatūros ir aplinkos sąlygų (užšalimo-atšilimo, šalčio ciklą, betono kietinimo sąlygų, drėgmės) įtaka bakterijų gyvybingumui betone ir savaiminio plyšių užsivėrimo efektyvumui. Taip pat ištirtas bakterijų įkapsuliuotų į hidrogelį gyvybingumas cemento tešloje ir smulkiagrūdžiame betone, įvertintas savaiminis plyšių užsivėrimo efektyvumas.

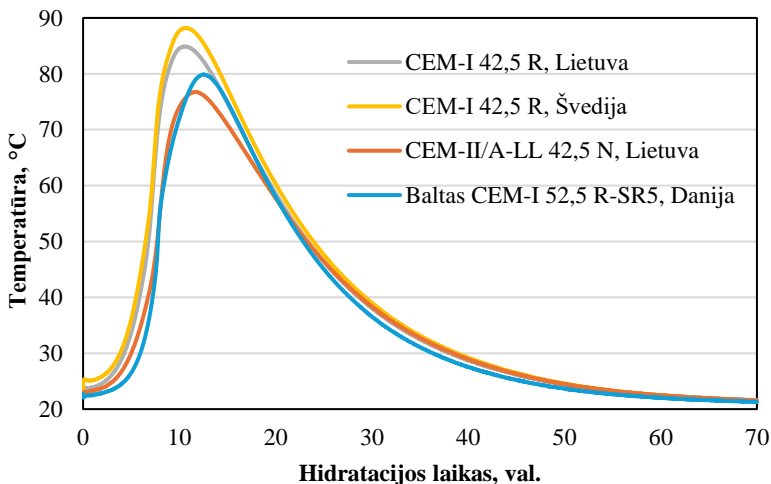
Skyriaus tematika paskelbti 5 autorės straipsniai (Ivaškė (Jankutė) et al., 2021, 2022, 2023, 2024a, 2024b).

3.1. Cemento tešlos savybių kietėjimo metu apibūdinimas

Šiame poskyryje yra pateikiami cementinių tešlų, pagamintų su skirtingais cemento tipais, egzoterminės temperatūros, pH ir elektrinio laidumo matavimo tyrimų rezultatai. Taip pat pateikiama naudotų cemento tipų cheminės sudėties analizė.

3.1.1. Egzoterminės temperatūros matavimai

Portlandcemenčio hidratacijos reakcijos yra egzoterminės, todėl gali ženkliai padidinti betono temperatūrą (Fairbairn & Azenha, 2019), o tai gali daryti įtaką bakterijų gyvybingumui. Temperatūros pokytis, užfiksuotas cemento tešloje per pirmąsias 70 hidratacijos valandų, pavaizduotas 3.1 pav.



3.1 pav. Cementinės tešlos egzotermijos temperatūros priklausomybė nuo cemento tipo

Fig. 3.1. Exothermic temperature variation of cementitious paste depending on cement type

Aukščiausios temperatūros svyravo nuo 76,7 iki 88,1 °C, priklausomai nuo cemento tipo. Aukščiausia temperatūra buvo nustatyta CEM-I 42,5 R (Švedija) cemento tipui. Žemiausia temperatūra nustatyta CEM-II/A-LL 42,5 N (Lietuva) ir baltam CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) cemento tipams. Dėl šilumos perdavimo savybių smulkiąjam ir stambiajam užpildui betoninių konstrukcijų vidinės temperatūros paprastai būna daug žemesnės (Jędrzejewska et al., 2020). Vidutinio dy-

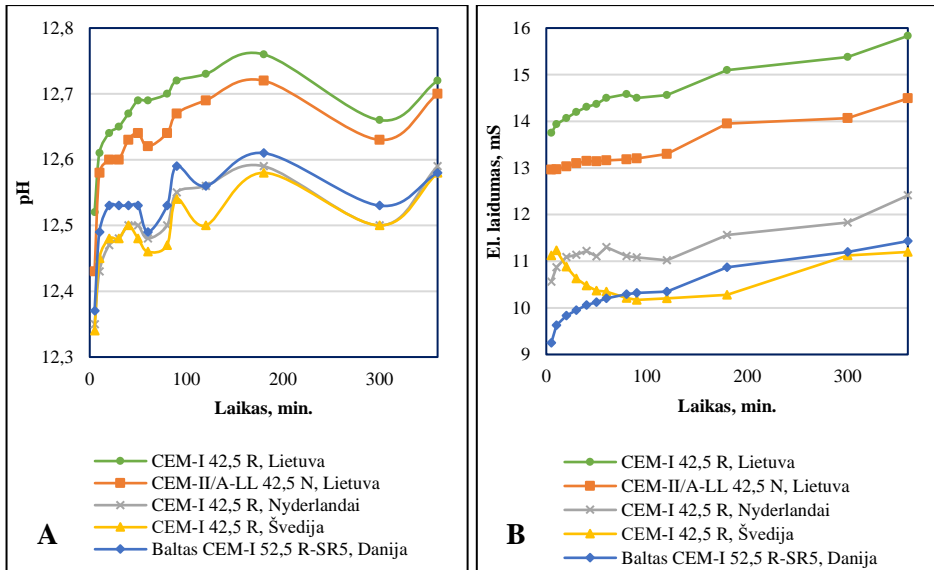
džio betono konstrukcijų viršutine riba paprastai laikoma 40 °C temperatūra. Tačiau jeigu viso atviro paviršiaus ploto santykis su betono tūriu yra mažesnis nei 2 m⁻¹ (pavyzdžiui, masyviuose betono elementuose), tada vidinė temperatūra gali siekti net iki 65–80 °C (Kanavaris et al., 2021). Nustatytos betono hidratacijos temperatūros gali daryti įtaką bakterijų gyvybingumui, todėl šie aspektai toliau tiriama tolesniuose skyriuose.

3.1.2. pH ir elektrinis laidumas

Šviežio betono pH gali svyruoti nuo 12 iki 13 dėl didelės Ca(OH)₂ koncentracijos betone. Nepaisant to, kad Ca(OH)₂ tik šiek tiek tirpsta vandenyje, jis išskiria hidroksido jonus į vandeninę aplinką ir taip padidina pH iki ypač aukšto lygio. Kietėjimo metu dalis šių hidroksido jonų reaguoja su atmosferoje esančiu anglies dioksidu ir susidaro kalcio karbonatas. Dėl to laikui bėgant betono pH palaipsniui mažėja. Senesnio betono pH paprastai svyruoja nuo 9 iki 11, priklausomai nuo atstumo nuo paviršiaus (Heng & Murata, 2004).

Nors optimalios alkalifilinių bakterijų augimo pH vertės svyruoja nuo 8,5 iki 10 (Jiang et al., 2020), šios bakterijos gali išgyventi ypač šarminėje aplinkoje, kurios pH ≥ 11. Nepaisant to, pH padidėjimas kietėjant betono mišiniui paprastai laikomas mirtinu. Norint, kad sendintame betone sudygtų bakterijų sporos, jos pirmiausia turi išgyventi pradinį pH padidėjimą. Žinoma, kad plyšių užsivėrimo procesas gali būti stipriai susijęs su pH pokyčiais betone, nes įtrūkimai užpildomi tik tada, kai betono pH nukrenta žemiau 11 (Mors & Jonkers, 2017). Tai reiškia, kad bakterijų sporų žuvimui betone įtakos turėti gali ankstyvojo amžiaus betono savybės, kurių pagrindinė yra pH.

Atsižvelgiant į anksčiau paminėtus aspektus, buvo išmatuotas tiriamųjų cementų suspensijų pH (3.2 pav., A). Galima pastebėti, kad visų cemento tipų pH yra tarp 12,4 ir 12,8. Didžiausiomis pH reikšmėmis pasižymėjo CEM-I 42,5 R ir CEM-II/A-LL 42,5 N tipų cementai, pagaminti Lietuvoje. Alternatyvus būdas įvertinti cemento tešlos pH yra elektrinio laidumo matavimas (Sallehi, 2015). Hidroksido jonai, esantys šviežio cemento porų tirpale, tarnauja kaip pagrindinis elektros laidininkas. Didesnė hidroksido jonų koncentracija ne tik padidina pH, bet ir daro porų tirpalą laidesnį elektrai. Taigi, galima nustatyti beveik tiesioginį ryšį tarp šių dviejų parametrų (Han et al., 2019a). 3.2 pav. B pavaizduotas išbandytų cemento rūšių elektrinis laidumas. Abiejų tipų cementai, kurių pH yra didžiausias (CEM-I 42,5 R (Lietuva) ir CEM-II/A-LL 42,5 N (Lietuva)), taip pat parodė didžiausią elektrinį laidumą. Visų kitų cemento tipų elektrinio laidumo vertės buvo gana panašios, o tai koreliuoja su pH matavimais.



3.2 pav. Cemento suspensijos savybės: A – pH svyravimai per pirmąsias šešias cemento kietėjimo valandas; B – elektrinio laidumo svyravimai per pirmąsias šešias cemento kietėjimo valandas

Fig. 3.2. Properties of the fresh cement suspension: A – a variation of pH during the first six hours of cement curing; B – a variation of electrical conductivity during the first six hours of cement curing

Gauti rezultatai rodo, kad tirtų cementų pH ir elektrinio laidumo reikšmės skyrėsi nežymiai, todėl bakterijų išgyvenimui betone gali būti svarbūs kiti veiksniai, tokie kaip cemento cheminė sudėtis. Kitame skyriuje nagrinėjama tirtų cementų cheminė sudėtis, ypatingą dėmesį skiriant metalų oksidams, kurie gali turėti stiprų slopinamąjį poveikį bakterijoms.

3.1.3. Cemento cheminė sudėtis

3.1 lentelėje nurodyta cementų oksidinė sudėtis, kurių masės procentinė dalis viršija 0,01 %. Gauti duomenys rodo, kad kalcio ir silicio oksidai sudaro pagrindinę visų išbandytų cemento tipų dalį, kurios masės procentai svyravo nuo 80 iki 90 %. Kitos aptiktos sudedamosios dalys buvo skirtingi metalo oksidai, daugiausia Al_2O_3 , Fe_2O_3 ir MgO . Tarp aptiktų metalo oksidų buvo keli pasižymintys antimikrobinu aktyvumu. Šie metalo oksidai yra MgO , Al_2O_3 , TiO_2 , Fe_2O_3 , ZnO ir CuO (Snyder et al., 2003; Sallehi, 2015; Khatamnejad et al., 2015a; He et al., 2016a; Jiang et al., 2020; Mors & Jonkers, 2017). Šie metalų oksidai toliau buvo naudojami išsamiam tyrimui. Kad lyginamoji analizė būtų nešališka, metalų oksidai

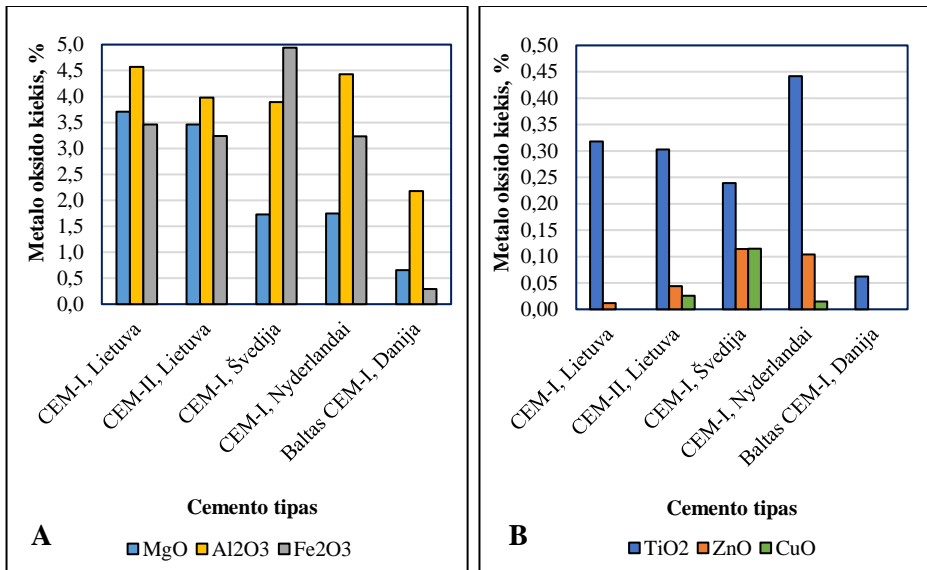
buvo padalyti į dvi grupes, atsižvelgiant į jų koncentraciją tiriamose cemento rūšyse. Pagrindinis skiriamasis bruožas yra masės procentas cimente, atitinkamai 0,29–4,94 % bendrųjų ir 0,01–0,44 % retųjų metalo oksidų grupei.

3.1 lentelė. Cheminė cemento sudėtis

Table 3.1. Chemical composition of cement

Cheminiai elementai	Masės procentai				
	CEM-I 42,5 R, Lietuva	CEM-II/A-LL 42,5 N, Lietuva	CEM-I 42.5 R, Švedija	CEM-I 42,5 N, Nyderlandai	Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, Danija
CaO	63,40	66,20	63,70	64,1	70,40
SiO ₂	18,00	16,49	19,70	19,60	22,80
SO ₃	4,73	4,64	3,73	4,60	2,67
Al ₂ O ₃	4,57	3,98	3,89	4,43	2,18
Fe ₂ O ₃	3,46	3,24	4,94	3,23	0,29
MgO	3,71	3,46	1,73	1,75	0,65
K ₂ O	1,30	1,16	0,56	0,74	0,07
Na ₂ O	0,14	0,19	0,39	0,30	0,20
NiO	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
P ₂ O ₅	0,13	0,07	0,08	0,34	0,28
SrO	0,10	0,09	0,08	0,14	0,17
MnO	0,06	0,06	0,48	0,08	0,02
TiO ₂	0,32	0,30	0,24	0,44	0,06
ZnO	0,01	0,04	0,11	0,10	–
CuO	–	0,03	0,12	0,02	–
ZrO ₂	0,01	0,02	0,01	0,01	–
BaO	0,06	–	0,11	0,06	–
Cr ₂ O ₃	–	0,01	0,03	–	–
MoO ₃	–	–	0,02	–	–
PbO	–	–	0,02	–	–

Pirmajai grupei buvo priskirti magnio, aliuminio ir geležies oksidai. Kaip matyti iš 3.3 pav. A, visose cemento rūšyse, išskyrus baltą CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) cementą, buvo palyginti panašus bendrų metalų oksidų kiekis. Šiuose cemento tipuose Al_2O_3 kiekis siekė 3,89–4,57 %, MgO – 1,73–3,71 %, o Fe_2O_3 – 3,23–4,94 %. Priešingai, daugiau skirtumų tarp cemento rūšių buvo galima pastebėti naudojant retuosius metalų oksidus (3.3 pav., B). Antrajai grupei buvo priskirti cinko, vario ir titano oksidai. Šiuose cemento tipuose TiO_2 kiekis siekė 0,24–0,44 %, ZnO – 0,01–0,11 %, o CuO – 0,02–0,12 %. Įdomu tai, kad baltame CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) tipo cimente buvo gerokai mažesnis tiek pirmosios, tiek antrosios grupės metalų oksidų kiekis, o ZnO ir CuO šiame cemento tipe iš viso nebuvo aptikta.



3.3. pav. Įvairiuose cemento tipuose aptikti metalų oksidai, priskirti:

A – pirmajai grupei; B – antrajai grupei

Fig. 3.3. Metal oxides detected in the cement types and classified into

A – the first group; B – the second group

Buvo įvertintos pasirinktų metalo oksidų koncentracijos smulkiagrūdžiam betone, o ne cimente. Tai buvo padaryta metalo oksidų masės procentą cimente perskaičiuojant į masės procentą betone. Apytiksliai, cemento dalis betono masėje buvo 25,3 %. Pavyzdžiui, nustatyta Al_2O_3 procentinė masės dalis CEM-I 45,5 R (Lietuva) tipo cimente buvo 4,57 %. Kadangi cementas sudaro 25,3 % betono masės, apytikslis Al_2O_3 procentinis kiekis betone bus 1,1562 % (arba 11,562 $\mu\text{g/g}$). Metalų oksidų koncentracijos betone ($\mu\text{g/ml}$) pateiktos 3.2 lentelėje. Ma-

žiausias visų tirtų metalų oksidų kiekis buvo smulkiagrūdžiame betone, pagamintame naudojant CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą, o ZnO ir CuO nebuvo aptikta iš viso.

3.2 lentelė. Skirtingų metalų oksidų koncentracijos smulkiagrūdžiame betone

Table 3.2. Concentrations of different metal oxides in mortar

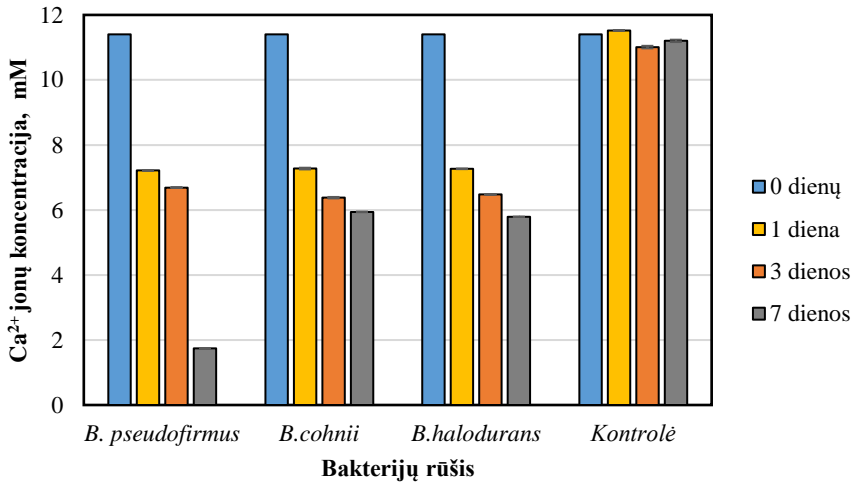
Cemento tipas	Koncentracija betone, µg/g					
	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MgO	TiO ₂	ZnO	CuO
CEM-I 42,5 R, Lietuva	11562	8754	9386	805	30	0
CEM-II/A-LL 42,5 N, Lietuva	10069	8197	8754	767	111	65
CEM-I 42,5 R, Švedija	9842	12498	4377	605	288	291
CEM-I 42,5 N, Nyderlandai	11208	8172	4428	1118	263	38
Baltas CEM-I 52,5 R-SR5, Danija	5515	731	1655	157	0	0

Pažymėtina, kad pasirinktų metalo oksidų koncentracijos svyravo plačiame diapazone. Kitame skyriuje nagrinėjama, ar šios koncentracijos gali būti mirtinos bakterijoms.

3.2. *Bacillus genties* bakterijų mineralizacijos aktyvumas

Bakterijų gebėjimas nusodinti kalcio karbonato kristalus yra esminis procesas, apibūdinantis plyšių užpildymą. Dėl šios priežasties buvo tiriamas *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* bei *B. halodurans* bakterijų rūšių mineralizacijos aktyvumas. Bakterijų sporos buvo aktyvuotos ir auginamos mitybinėje terpėje, kurios sudėtyje yra kalcio laktato. Po vienos, trijų ir septynių dienų mėginiai buvo tiriami siekiant nustatyti Ca²⁺ jonų koncentraciją mitybinėje terpėje. Gauti rezultatai parodė, kad visos tirtos bakterijų rūšys geba išsodinti kalcio karbonatą, kai aplinkoje yra Ca²⁺ jonų šaltinis. Praėjus vienai dienai nuo inkubacijos pradžios, kalcio jonų koncentracija sumažėjo maždaug 1,6 karto visoms tirtoms bakterijų rūšims, lyginant su kontroline grupe, kurioje nėra bakterijų (3.4 pav.). Tai rodo,

kad bakterijų sporos po sudrygimo turi mineralizacijos aktyvumą ir tai atitinka literatūroje fiksuotus duomenis (Jiang et al., 2020).



3.4 pav. Skirtingų *Bacillus* rūšies bakterijų mineralizacijos aktyvumas

Fig. 3.4. Mineralisation activity of different *Bacillus* species

Nebuvo pastebėtas reikšmingas skirtumas tarp *B. cohnii* ir *B. halodurans* bakterijų mineralizacijos aktyvumo. Po septynių dienų Ca^{2+} jonų koncentracija mitybinėse terpėse su *B. cohnii* ir *B. halodurans* bakterijomis buvo atitinkamai $5,941 \pm 0,009$ mM ir $5,789 \pm 0,001$ mM, tuo tarpu Ca^{2+} jonų koncentracija kontrolinėje grupėje be bakterijų sporų buvo $11,20 \pm 0,036$ mM. *B. pseudofirmus* bakterijos pasižymėjo geriausiu mineralizacijos aktyvumu. Po septynių dienų, laisvų Ca^{2+} jonų koncentracija mitybinėje terpėje buvo $1,742 \pm 0,001$ mM. Laisvų kalcio jonų koncentracijos sumažėjimas parodo, kad kalcio karbonatas yra išsodinamas. Šis gebėjimas leidžia jį veiksmingai taikyti kuriant biologinį savaime atsinaujinantį betoną.

3.3. Į pūstą molį įterptų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai betone

Šiame poskyryje pateikiami bakterijų, impregnuotų į pūsto molio daleles, gyvybingumo rezultatai smulkiagrūdžiame betone. Bakterijų gyvybingumas betone buvo tiriamas priklausomai nuo cemento tipo, bakterijų rūšies, betono hidratacijos temperatūros ir betono kietėjimo sąlygų, taip pat aplinkos sąlygų (vyk-

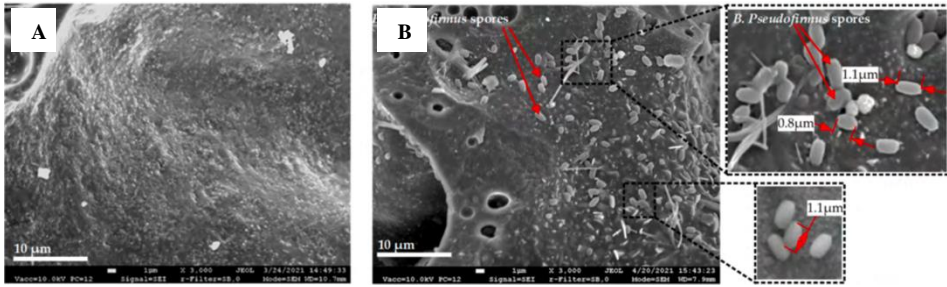
stant užšalimo-atšalimo / žemos temperatūros ciklams). Taip pat pateikiami bakterijų gyvybingumo betone rezultatai, kai pūsto molio dalelės buvo dengiamos papildomais apvalkalais.

3.3.1. Bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai betono bandiniuose su skirtingais cemento tipais

Išdžiovintų pūsto molio dalelių skenuojančios elektroninės mikroskopijos (SEM) vaizdai parodė, kad apie 1 μm dydžio bakterijų sporos buvo sėkmingai įterptos į pūsto molio daleles ir prisitvirtino prie jo paviršiaus (3.5 pav.). Šiame skyriuje nagrinėjamas bakterijų gyvybingumas smulkiagrūdžiam betone su pūsto molio užpildu, impregnuotu bakterijų sporomis. Tiriant bakterijų gyvybingumą betone su skirtingais cemento tipais, bakterijų *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* sporų vidutinė koncentracija sausose pūsto molio dalelėse buvo atitinkamai $(3,53 \pm 0,47) \cdot 10^7$ KSV/1 g pūsto molio, $(4,45 \pm 0,69) \cdot 10^7$ KSV/1 g pūsto molio ir $(4,68 \pm 0,78) \cdot 10^7$ KSV/1 g pūsto molio. Buvo pasirinktos penkios komerciškai prieinamos portlandcemenčio rūšys ir įvertintas vienos dažniausiai savaiminiam plyšių užsivėrimui betone naudojamų *Bacillus pseudofirmus* bakterijų gyvybingumas betono matricoje, naudojant skirtingus cemento tipus. Bakterijų gyvybingumas su skirtingais cemento tipais pagaminto betono bandiniuose pateiktas 3.6 pav. Galima pastebėti, kad staigus gyvybingų bakterijų sporų kiekio kritimas buvo būdingas bandiniams su visais cementų tipais. Tikėtina, kad šis poveikis yra susijęs su paviršiuje prisitvirtinusių bakterijų sporų tiesioginiu sąlyčiu su cemento matrica. Šviežiame betone cemento tešla per poras gali laisvai difunduoti į pūsto molio daleles, taip padidindama pH. Be to, hidroksido jonai, esantys cemento tešloje, yra žinomi dėl savo antibakterinio aktyvumo, kuris taip pat gali prisidėti prie gyvybingumo sumažėjimo sukietėjus betonui (Barbosa et al., 1997). Panašūs ankstyvojo gyvybingumo sumažėjimo rezultatai buvo pateikti ir ankstesniuose tyrimuose (Han et al., 2020a).

Gauti duomenys rodo, kad didžiausias pradinis (3–7 dienų) bakterijų išgyvenamumas buvo nustatytas tuose betono bandiniuose, kurie pagaminti naudojant CEM-II/A-LL 42,5 N (Lietuva) tipo cementą (3.6 pav., A). Panašu, kad šio tipo cimente esantis kalkakmenio priedas (15 % masės) galėjo iš dalies užpildyti porėtą pūsto molio paviršių, apsaugantį bakterijas nuo hidroksido jonų. Unikaliuos kalkakmenio mikroporų užpildymo galimybės buvo plačiai aptartos ankstesniuose tyrimuose (Cao et al., 2019; Wang et al., 2018). Be to, dar vienas skiriamasis CEM-II/A-LL 42,5 N (Lietuva) tipo cemento bruožas yra didelis CaO masės procentas. Taigi, CaO gali reaguoti su bakterijų išskiriamu anglies dioksidu, prisidedančiu prie CaCO_3 susidarymo bakterijų sienelių paviršiuje. Nepaisant to, didesnis bakterijų išgyvenamumas CEM-II A-LL 42,5 N (Lietuva) tipo cimente

pastebėtas tik trumpalaikių (3–7 dienų) bandymų metu. Po savaitės bakterijų gyvybingumas pradėjo palaipsniui mažėti (7–60 dienų), o 60 dieną buvo pasiektos beveik nebeaptinkamos vertės.



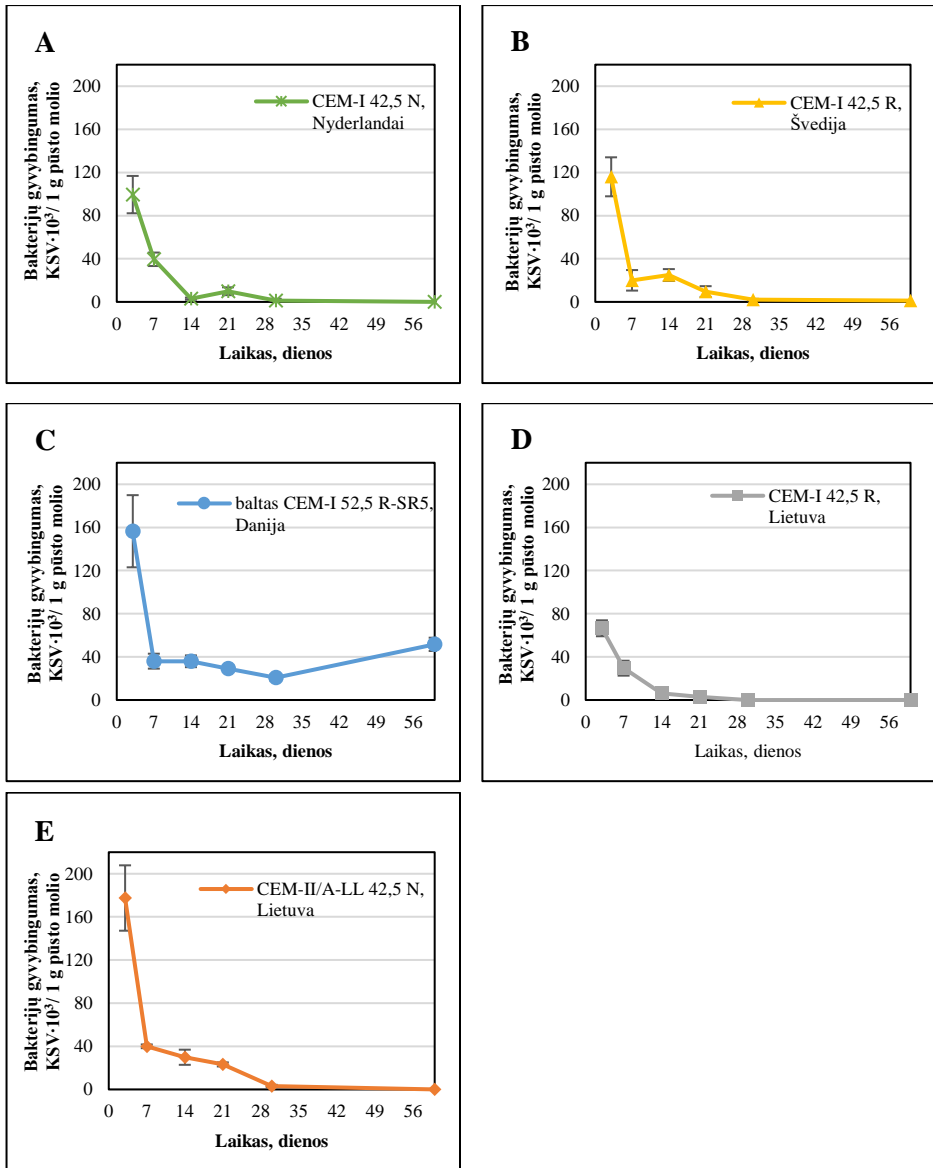
3.5 pav. Pūsto molio dalelių paviršiaus skenuojančios elektroninės mikroskopijos nuotraukos: A – kontrolinis mėginys; B – mėginys su imobilizuotomis *B. pseudofirmus* sporomis

Fig. 3.5. Scanning electron microscopy images of expanded clay particles: A – without bacteria; B – with immobilised *B. pseudofirmus* bacteria

Panaši ilgalaikio (7–60 dienų) gyvybingumo tendencija buvo pastebėta ir naudojant kitus tiriamus cemento tipus, išskyrus baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą (Danija) (3.6 pav., C). Apskaičiuotas bakterijų kolonijas sudarančių vietų skaičius betone, kurio sudėtyje yra baltojo CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cemento (Danija), nuo 7 iki 60 dienos išliko beveik pastovus ($\sim 4 \cdot 10^4$ KSV/1 g pūsto molio). Priešingai, tiriamuosiuose bandiniuose, kuriuose buvo naudojami kitų rūšių cementai, KSV skaičius svyravo nuo $5 \cdot 10^1$ – $3 \cdot 10^3$ KSV/1 g pūsto molio po 30 dienų nuo bandinių paruošimo ir beveik nebuvo nustatytas po 60 dienų.

Visi išbandyti cemento tipai parodė gana išsibarsčiusius rezultatus. Tai gali būti dėl atsitiktinio sporų pasiskirstymo pūsto molio dalelėse arba dėl netolygaus pačių pūsto molio dalelių pasiskirstymo betone. Be to, gyvybingumo tyrimo ir mėginio paruošimo duomenys priklauso nuo paimto užpildo su bakterijų sporomis ir maistinėmis medžiagomis kiekio, surinkto iš 6,53 g betono bandinio. Didesnis surinktų pūsto molio dalelių kiekis laikui bėgant gali parodyti vis didesnę kolonijas formuojančių vietų skaičių. Panaši duomenų sklaida taip pat buvo aprašyta keliuose ankstesniuose bakterijų gyvybingumo pūsto molio dalelėse tyrimuose (Han et al., 2019).

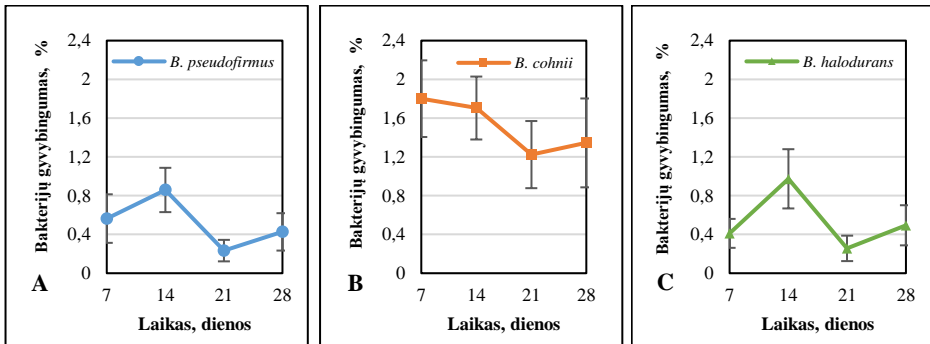
Nepaisant duomenų išsibarsčystimo, gauti rezultatai atskleidžia, kad ilgalaikis *B. pseudofirmus* bakterijų gyvybingumas baltame CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cimente (Danija) yra beveik 100 kartų didesnis, palyginti su kitais tirtais cementų tipais. Baltas CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementas (Danija) buvo pasirinktas kaip tinkamiausias ir naudojamas tolesniuose tyrimuose.



3.6 pav. Bakterijų *B. pseudofirmus* gyvybingumo priklausomybė nuo cemento tipo: A – CEM-I 42,5 N, Nyderlandai; B – CEM-I 42,5 R, Švedija; C – baltas CEM-I 52,5 R-SR5, Danija; D – CEM-I 42,5 R, Lietuva; E – CEM-II/A-LL 42,5 N, Lietuva

Fig. 3.6. Dependence of the viability of *B. pseudofirmus* on cement type: A – CEM-I 42,5 N, Netherlands; B – CEM-I 42,5 R, Sweden; C – white CEM-I 52,5 R-SR5, Denmark; D – CEM-I 42,5 R, Lithuania; E – CEM-II/A-LL 42,5 N, Lithuania

Ne tik *B. pseudofirmus*, bet ir kitų rūšių bakterijos taip pat išliko gyvybingos, naudojant baltą CEM-I 52,5 R-SR5 tipo cementą (Danija). *B. cohnii* bakterijų rūšis pasižymėjo beveik du kartus didesniu išgyvenamumu, palyginti su *B. pseudofirmus* ir *B. halodurans* bakterijų rūšimis (3.7 pav.). Tai rodo, kad *B. cohnii* gali lemti geresnius plyšių užsivėrimo rodiklius, palyginti su kitomis bakterijų rūšimis.



3.7 pav. Skirtingų bakterijų rūšių gyvybingumas betono matricoje:

A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*

Fig. 3.7. Viability of different bacterial strains in the concrete:

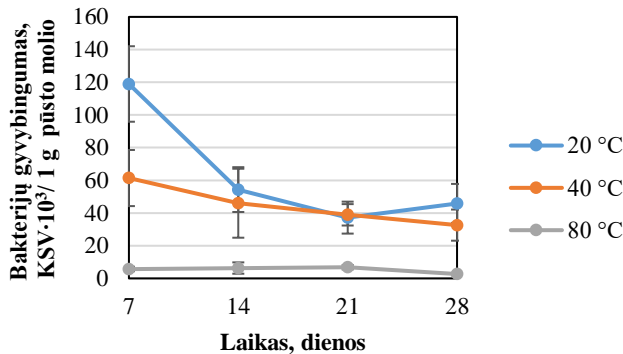
A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*

Bakterijų gyvybingumo tyrimai parodė stiprų ryšį tarp bakterijų išgyvenamumo ir cemento tipo. Šis poveikis gali būti priskirtas skirtingai šilumai, išskiriami hidratacijos metu, cemento pH kitimams ir specifinei skirtingų cementų cheminei sudėčiai. Šie rezultatai atskleidžia nedidelius pH skirtumus tarp skirtingų tipų cementų. Šiuo atveju pH poveikis buvo nereikšmingas, atsižvelgiant į bakterijų gyvybingumą. Nebuvo pastebėta aiški priežastis, kodėl bakterijų gyvybingumas yra didesnis betone su tų tipų cementais, kurių ankstyvojo amžiaus pH yra žemesnis. Tai rodo, kad kiti veiksniai, pavyzdžiui, cheminė cemento sudėtis, gali būti lemiami bakterijų išgyvenamumui betone.

3.3.2. Betono kietėjimo temperatūros įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiame betone

Skirtingi cementų tipai betono hidratacijos metu į aplinką gali išskirti skirtingą šilumos kiekį. Buvo tiriamas bakterijų *B. pseudofirmus* gyvybingumas 20, 40 ir 80 °C temperatūroje. Aukščiausia 80 °C temperatūra buvo pasirinkta atsižvelgiant į cemento hidratacijos temperatūros pokyčio tyrimo rezultatus, kur priklausomai nuo cemento tipo, aukščiausios temperatūros svyravo nuo 76,7 iki 88,1 °C. Vidutine temperatūra buvo pasirinkti 40 °C, laikomi vidutinio dydžio betono konst-

rukcijų viršutine riba, o 20 °C – kaip kontrolinė kambario temperatūra (Jędrzejewska et al., 2020). Tyrimo rezultatai parodė, kad *B. pseudofirmus* bakterijų sporos išlieka gyvybingos iki 40 °C temperatūros (3.8 pav.). Tačiau 80 °C temperatūroje gyvybingų bakterijų skaičius sumažėja daugiau nei 10 kartų. Tai rodo, kad bakterijų sporos yra pažeidžiamos betono kietėjimo metu.



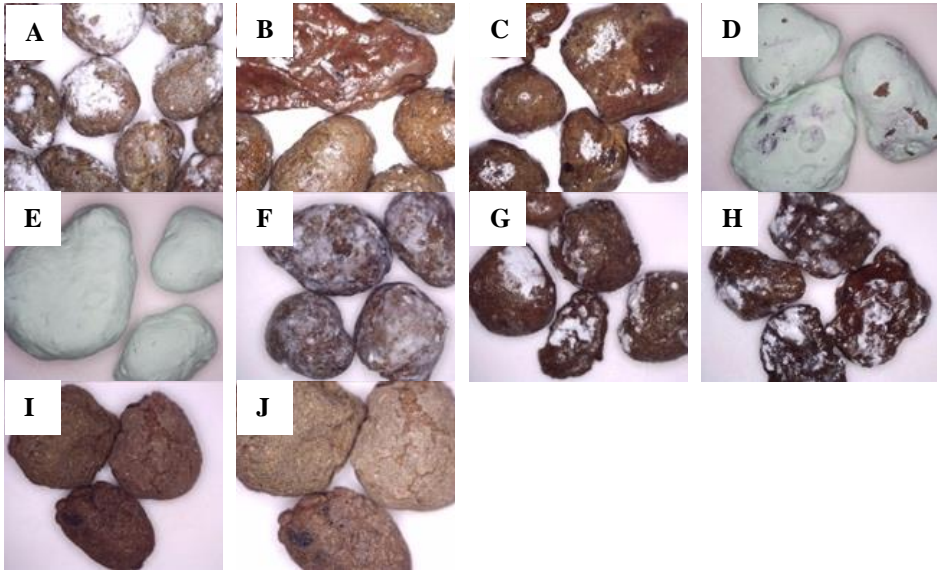
3.8 pav. Bakterijų *B. pseudofirmus* gyvybingumo priklausomybė nuo betono kietėjimo temperatūros

Fig. 3.8. Dependence of the viability of *B. pseudofirmus* on the curing temperature of concrete

Tikėtina, kad bakterijų sporų gyvybingumas vidutinio dydžio betono konstrukcijose nesumažėja, tačiau norint panaudoti biologinį savaime atsinaujinantį betoną masyviuose elementuose, būtina imtis šilumos kontrolės priemonių. Taip pat galima teigti, kad atskirų cemento rūšių šilumos išsiskyrimo skirtumai greičiausiai neturėjo įtakos bakterijų gyvybingumui betono mėginiuose dėl santykinai mažo bandinių dydžio.

3.3.3. Pūsto molio su įmobilizuotomis bakterijų sporomis apvalkalų įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiame betone

Atlikti bakterijų gyvybingumo betono matricoje tyrimo rezultatai parodė, kad bakterijų gyvybingumas reikšmingai sumažėja anksti, praėjus iki 7 dienų po jų įterpimo į smulkiagrūdį betoną. Praėjus šiam laikotarpiui, bakterijų gyvybingumas stabilizuojasi. Tačiau, kad jis būtų išsaugotas, pūsto molio daleles būtina dengti papildomais apdangalais. Buvo tiriamas ilgalaikis skirtingų apvalkalų apsaugos efektyvumas, gyvybingumo tyrimai buvo pradėti vykdyti nuo 7 dienos po bakterijų patalpinimo į betoną. Visi tirti pūsto molio dalelių vaizdai po padengimo pateikti 3.9 pav.



3.9 pav. Pūsto molio dalelės, padengtos: A – kalio magnio fostato cemento apvaskalu; B ir C – atitinkamai vienu arba dviem stireno-akrilato emulsijos sluoksniais; D ir E – atitinkamai vienu arba dviem vandeninių, lateksinių ir akrilinių kompozicinių dažų sluoksniais; F – magnio oksido ir magnio hidroksido apvaskalu; G ir H – stireno-akrilato ir magnio oksido tirpalu, paruoštu santykiu atitinkamai 10:1 arba 30:1; I – nedengtos pūsto molio dalelės (kontrolė); J – bakterijomis neimpregnuotos ir apvaskalais nedengtos pūsto molio dalelės (dviguba kontrolė)

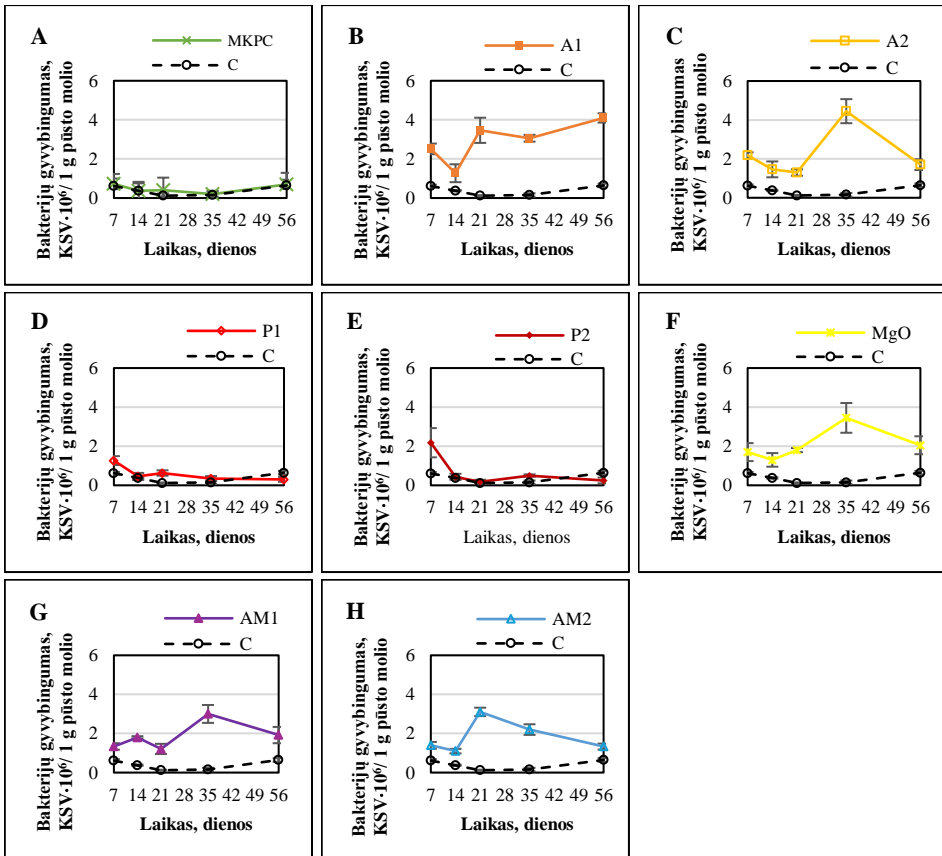
Fig. 3.9. Particles of expanded clay, coated with A – a potassium magnesium phosphate cement shell; B and C – one or two layers of styrene-acrylate emulsion, respectively; D and E – one or two layers of waterborne, latex and acrylic-composite paints, respectively; F – magnesium oxide and magnesium hydroxide shell; G and H – styrene-acrylate and magnesium hydroxide solution, prepared at a rate of 10:1 or 30:1, respectively; I – uncoated expanded clay particles (control); J – uncoated expanded clay particles not impregnated with bacteria and not coated with sheathing materials (double control)

Bakterijų gyvybingumo tyrimas smulkiagrūdžio betono bandiniuose su pūsto molio užpildu, padengtu skirtingais apvaskalais, buvo atliekamas su *B. pseudofirmus* bakterijomis. Pradinis bakterijų sporų skaičius visuose bandiniuose buvo vienodas ir siekė $2,2 \cdot 10^7$ KSV/1 g pūsto molio. Kalio magnio fosfato cemento (MKPC) apvaskalas neturėjo didelės įtakos bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiame betone (3.10 pav., A). Anksčiau gauti duomenys rodo, kad MKPC didina bakterijų gyvybingumą betone (Jiang, et al., 2020). Pagrindinis technologinis skirtumas buvo tas, kad šiame tyrime naudotas panardinimo metodas, o ne purškimo technologija. Būtent tai galėjo turėti įtakos tam, kad nebuvo

gautas apsauginis efektas. Panašiai vandens pagrindu pagamintos latekso-akrilato kompozicinės dangos (P1 ir P2) turėjo palyginti nedidelį apsauginį poveikį bakterijoms; KSV skaičius buvo nedaug didesnis, palyginus su kontroliniais bandiniais (3.10 pav., D ir E). Šio kompozito apvalkalas galėjo ištirpti drėgnoje aplinkoje, prarasdamas apsaugines poras užpildančias savybes iš karto po to, kai pūsto molio dalelės buvo įmaišytos į šviežią smulkiagrūdį betoną. Įdomu tai, kad du latekso-akrilato kompozito (P2) sluoksniai padidino bakterijų gyvybingumą mažiau per pirmąsias 7–14 dienų. Nepaisant to, nuo 14 dienos apskaičiuotas KSV skaičius abiem atvejais buvo panašus (P1 ir P2). Tai rodo, kad reikia papildomo laiko, kad būtų galima suardyti antrąjį apsauginį P2 apdangalo sluoksnį.

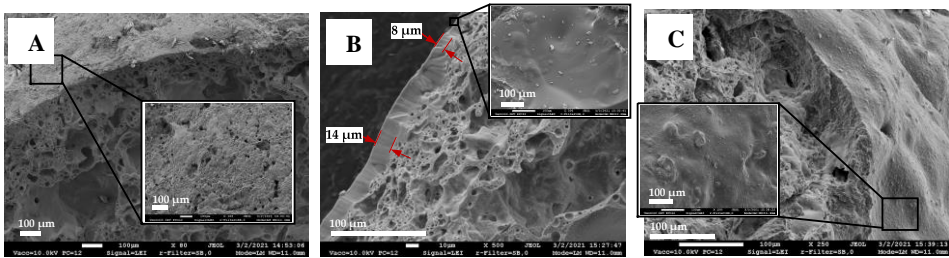
Likusieji penki apsauginiai sluoksniai (A1, A2, MgO, AM1 ir AM2) parodė neabejotinai gerą apsauginį efektą (3.10 pav., B, C, F, G, H). Bakterijų išgyvenamumas buvo padidintas beveik 10 kartų. Stireno-akrilato emulsija suformavo matomą blizgančią plėvelę ant pūsto molio dalelių paviršiaus. Šios apsauginės dangos storis svyravo nuo 8 iki 14 μm (3.11 pav.). Labai nežymus skirtumas yra ar vienas, ar du stireno-akrilato emulsijos sluoksniai dengė bakterijomis impregnuotas pūsto molio daleles, nes gyvybingumo rezultatai buvo gana panašūs (3.10 pav., B ir C). Tai rodo, pūsto molio dalelių paviršiaus porų mechaninis užblokavimas leidžia apsaugoti bakterijų sporas.

Geromis apsauginėmis charakteristikomis taip pat pasižymėjo MgO turintys apvalkalai. Ruošiant šią dangą nebuvo pastebėtas tolygus apvalkalas, kaip ir stireno-akrilato emulsijos atveju. Kadangi ruošiant MgO turintį apvalkalą suspensija buvo maišoma 10 min. kambario temperatūroje, tikėtina, kad MgO iš dalies hidratavosi apie 10–30 % (Xing et al., 2018). Taigi, šiame apvalkale yra šiek tiek nesureagavusio magnio oksido. Sumaišytas su šviežiu betonu, magnio oksidas reaguoja su vandeniu ir sudaro stabilią apsauginę magnio hidroksido dangą (Mo et al., 2012). Susiformavę hidroksidai, kurie iš esmės netirpsta, galėtų veiksmingai uždaryti pūsto molio poras, išsaugodami bakterijų sporas. Be to, kadangi MgO hidratacija yra lėta ir plintanti reakcija, tai gali pratęsti ilgalaikę bakterijų sporų apsaugą. MgO turinčių apvalkalų SEM analizė patvirtina, kad pūsto molio paviršiaus poros yra uždaromos (3.11 pav., C). Kadangi tiek stireno-akrilato emulsijos, tiek MgO turintys apvalkalai geba uždaryti pūsto molio paviršiaus poras, buvo siekiama įvertinti šių dviejų medžiagų mišinio poveikį apvalkalo susidarymui (AM1 ir AM2). Nors šie naujai sukurti apvalkalai parodė didelę apsaugą (3.1 pav., G ir H), bakterijų išgyvenamumas buvo panašus į apvalkalų, pagamintų vien iš stireno-akrilato emulsijos arba vien iš magnio oksido. Gyvybingumo tyrimų metu šių dviejų medžiagų papildomas efektas nebuvo pastebėtas.



3.10 pav. Bakterijų sporų gyvybingumas smulkiagrūdžio betono bandiniuose su pūsto molio dalelėmis, dengtomis: A – kalio magnio fosfato cemento apvalkalu; B – vienu stireno-akrilato emulsijos sluoksniu; C – dviem stireno-akrilato emulsijos sluoksniais; D ir E – atitinkamai vienu arba dviem vandeninių, lateksinių ir akrilinių kompozicinių dažų sluoksniais; F – magnio oksido ir magnio hidroksido apvalkalu; G ir H – stireno-akrilato ir magnio oksido tirpalu, paruoštu santykiu atitinkamai 10:1 arba 30:1. Kaip kontrolė yra naudojamos nedengtos pūsto molio dalelės su impregnuotomis bakterijų sporomis

Fig. 3.10. Bacterial viability in concrete produced with expanded clay particles coated with A – a potassium magnesium phosphate cement shell, B – one layer of styrene-acrylate emulsion, C – two layers of styrene-acrylate emulsion, D – one layer of waterborne, latex and acrylic-composite paints, E – two layers of waterborne, latex and acrylic-composite paints, F – magnesium oxide and magnesium hydroxide shell, G – styrene-acrylate and magnesium hydroxide solution, prepared at a rate of 10:1, H – styrene-acrylate and magnesium hydroxide solution, prepared at a rate of 30:1. Control sample is uncoated expanded clay particles impregnated with bacterial spores



3.11 pav. Pūsto molio dalelių skenuojančios elektroninės mikroskopijos nuotraukos:

- A – pūsto molio dalelė be apvalkalo, kurio paviršiuje yra daug atvirų porų;
- B – stireno-akrilatu padengta pūsto molio dalelė; C – MgO turinčiu apvalkalu padengta pūsto molio dalelė

Fig. 3.11. Scanning electron microscopy images of expanded clay particles:

- A – an uncoated expanded clay particle with many open pores on its surface;
- B – an expanded clay particle with styrene acrylate coating; C – an expanded clay particle with MgO-based coating

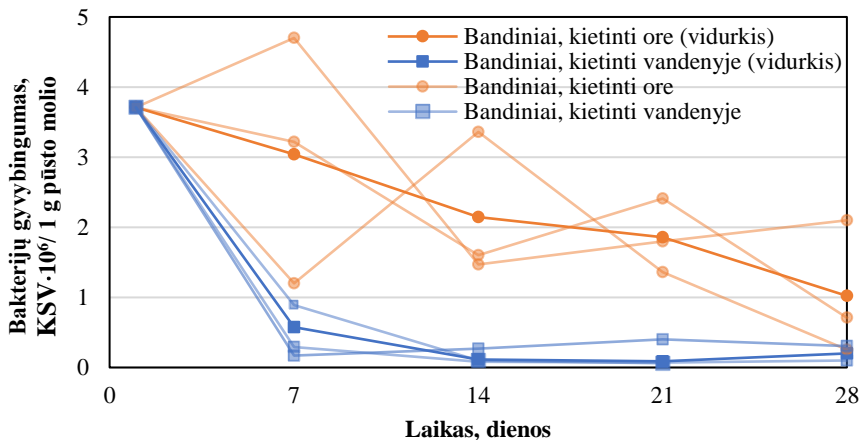
Nors šio gyvybingumo tyrimo rezultatai gana išsibarstę, visų bandytų apvalkalų medžiagas galima suskirstyti į dvi grupes: dangos, pasižyminčios maža apsauga, ir labai apsaugančios dangos. Pirmajai grupei priskiriamos tos dangos, kurių atsparumas buvo panašus į kontrolinių bandinių atsparumą: vieno ir dviejų vandeninių, lateksinių ir akrilinių kompozicinių dažų sluoksnių apvalkalas, kalio magnio cemento apvalkalas. Antrajai grupei priskiriami apvalkalai, pasižymintys gerokai didesniu bakterijų apsaugos pajėgumu, kuris buvo bent 10 kartų didesnis, palyginti su kontroliniais bandiniais. Šiai grupei priskiriami vieno ir dviejų sluoksnių stireno-akrilato emulsijos apvalkalai, magnio oksido ir magnio hidroksido apvalkalas, stireno-akrilato ir magnio oksido apvalkalai, paruošti santykiais 10:1 ir 30:1.

Visos penkios antrosios grupės dangos užtikrino bakterijų apsaugą betono aplinkoje, o didžiausią apsaugą suteikė vieno stireno-akrilato emulsijos apvalkas. Naudojant šį apvalkalą, gyvybingų bakterijų skaičius buvo didžiausias. Tačiau norint padaryti galutines išvadas, reikia daugiau duomenų, įskaitant skirtingų bakterijų rūšių, betono mišinio ir kietėjimo sąlygų, taip pat mėginio amžiaus ir dydžio poveikį. Gauti rezultatai priklauso gyvybingumo tyrimams skirto mėginio paruošimui. Dėl didesnio surinkto pūsto molio dalelių kiekio, laikui bėgant KSV skaičius gali padidėti. Kalbant apie technines detales, lengviausia buvo paruošti ir apdoroti vieną stireno-akrilato emulsijos ir magnio oksido turinčio apvalkalo sluoksnį. Magnio oksidas pagerina plyšių autogeninio užsivėrimo gebą, nes ekspansinis produktas MgO gali papildomai užpildyti įtrūkimus (Qureshi et al., 2018; Qureshi & Al-Tabbaa, 2016). Gali būti, kad MgO pagrindo danga ne tik apsaugo bakterijas, bet ir tiesiogiai prisideda prie paties įtrūkimų užsivėrimo proceso. Šis poveikis buvo tiriamas mikroskopu ir aptiriamas kitame skyriuje.

3.3.4. Betono kietėjimo sąlygų įtaka bakterijų gyvybingumui

Bakterijų išgyvenamumui ankstyvojo amžiaus betone įtakos turėti gali kietėjimo ir karbonizacijos procesai. Vanduo atlieka esminį vaidmenį ankstyvojo amžiaus karbonatų nusodinime, nes jis reikalingas tiek betono kietėjimui, tiek bakterijų sporų atgaivinimui. Jis atneša ištirpusius mineralinius pirmtakus ir bakterijų sporų sudygimui reikalingas medžiagas, kad ramybės būsenoje esančios bakterijų sporos būtų paverstos gyvomis vegetatyvinėmis ląstelėmis (Jiang et al., 2020). Dėl greito betono mechaninių savybių, porų dydžio, pH lygio ir vandens kiekio pasikeitimo, gyvybingų sporų skaičius betone gali gerokai sumažėti per pirmąsias kelias dienas po bandinių paruošimo. Vadinasi, betono kietėjimo sąlygos gali būti labai svarbios bakterijų išgyvenamumui ankstyvojo amžiaus betone.

Buvo tiriama dviejų dažniausiai pasitaikančių kietėjimo sąlygų poveikis bakterijų gyvybingumui ankstyvojo amžiaus smulkiagrūdžiame betone su pūsto molio užpildu, impregnuotu bakterijų sporomis. Betono bandiniai buvo kietinami ore ir vandenyje. Bandiniai nuo 1 dienos buvo suskirstyti į dvi grupes: trys bandiniai buvo laikomi vandenyje ir trys – atvirame ore. Gauti rezultatai parodė, kad po 7 dienų bakterijų gyvybingumas vandenyje laikytuose bandiniuose buvo beveik penkis kartus mažesnis, palyginti su bandiniais, laikytais ore (3.11 pav.). Po dviejų savaičių bakterijų gyvybingumas vandenyje ir ore skyrėsi daugiau nei dešimt kartų ir išliko toks pat iki 28 kietėjimo dienų.



3.11 pav. Bakterijų gyvybingumas ankstyvojo amžiaus smulkiagrūdžiame betone, kai betono bandiniai buvo kietinami ore ir vandenyje

Fig. 3.11. Bacterial viability in early-age concrete when specimens were cured in air and water

Rezultatai aiškiai rodo, kad bakterijų išgyvenamumas vandenyje panardintuose bandiniuose yra daug mažesnis, palyginti su bandiniais, laikomais atvirame

ore. Gali būti, kad didelė dalis bakterijų sporų sudygsta į aktyvias ląsteles praėjus kelioms dienoms po betono liejimo, nes vandenyje ištirpusios maistinės ir bakterijų sporų sudygimui reikalingos medžiagos tapo prieinamos vandenyje laikomuose bandiniuose. Tačiau, jei trūksta deguonies, vegetatyvinės ląstelės negali daugintis, ir dauguma jų gali žūti (Zheng et al., 2021). Priešingai, aplinkos sąlygos ore laikomuose bandiniuose nebuvo tinkamos ankstyvam bakterijų sporų sudygimui ir dauguma iš pradžių į pūstą molį įmobilizuotų sporų liko neaktyvios. Priešingai, anksčiau atlikti tyrimai parodė, kad bandiniai, inkubuoti esant 60 % ir 95 % santykinei oro drėgmei, neturėjo savaiminio atsinaujinimo efektyvumo, o tai rodo, kad tokio drėgmės kiekio nepakanka bakterijų veiklai palaikyti (Wang et al., 2014). Taigi, vanduo turi dvejopą įtaką biologinio betono elementų plyšių užsivėrimui. Inkubavimo laikotarpiu vanduo yra būtinas bakterijų dygimui, medžiagų apykaitai ir kalcio karbonato nusodinimui į plyšį (Zheng et al., 2021). Vanduo taip pat gali skatinti ankstyvą bakterijų sporų dygimą vandenyje kietinamuose bandiniuose. Kadangi pastaruoju atveju betonas lieka nesutrūkinėjęs, didelė dalis vegetatyvinių ląstelių gali žūti, todėl sumažėja betono savaiminio gijimo gebėjimas.

3.3.5. Užšalimo-atšilimo ir šalčio ciklų įtaka bakterijų gyvybingumui smulkiagrūdžiame betone

Biologinio betono gebėjimas savaime užpildyti susidariusius įtrūkimus tiesiogiai priklauso nuo nusodinto kalcio karbonato, kuris yra bakterijų medžiagų apykaitos produktas, kiekio. Skirtingai nuo kitų savaiminio plyšių užpildymo būdų, pavyzdžiui, mineralinių priemaišų, biologinio betono plyšių užsivėrimo efektyvumas ypač priklauso nuo aplinkos sąlygų, todėl toliau buvo tiriamas aplinkos sąlygų poveikis bakterijų gyvybingumui. Aplinkos sąlygų poveikis bakterijų gyvybingumui buvo tiriamas smulkiagrūdžiame betone su pūsto molio užpildu, impregnuotu bakterijų sporomis. B1–B4 smulkiagrūdžio betono bandiniai buvo paruošti identišškai ir veikti šalčio ciklų, o kontroliniai K1–K4 bandiniai buvo laikomi ore jų neveikiant šalčio ciklais. Gauti rezultatai pateikiami 3.3 lentelėje, o 3.12 pav. pateikiamas vidutinių bakterijų sporų gyvybingumo reikšmių kitimas vykstant šalčio ciklams. Pradinis bakterijų skaičius žemos temperatūros paveiktuose bandiniuose po kelių pradinių ciklų sumažėjo apie 50–60 %. Vėliau gyvybingų ląstelių skaičius stabilizavosi ir buvo beveik pastovus iki 20-ojo ciklo. Šie rezultatai sutampa su anksčiau atliktais tyrimais, kuriuose tirtas dirvožemio bakterijų gyvybingumas žemoje temperatūroje (Morley et al., 1983; Shen et al., 2005). Apskritai gyvybingų bakterijų skaičius tiek kontroliniuose, tiek žema temperatūra paveiktuose bandiniuose buvo panašus. Tai rodo, kad į betoną įterptose pūsto molio dalelėse įmobilizuotos bakterijos gali išgyventi pakartotinį neigiamas

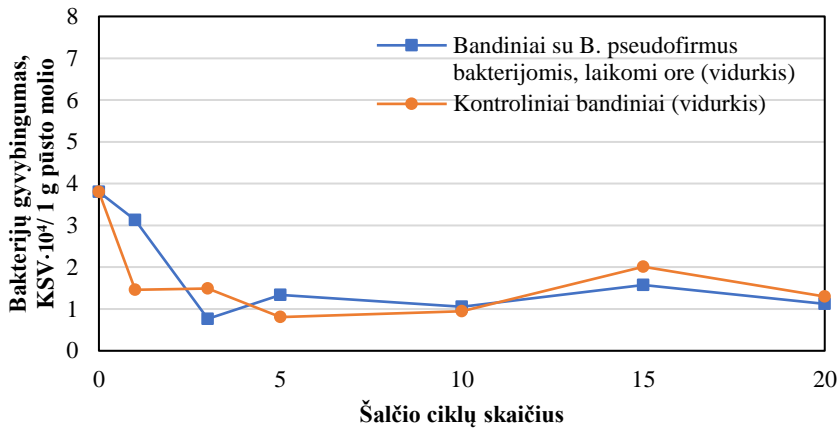
temperatūros poveikį. Vadinasi, biologinio betono konstrukcija išlaikytų savaiminio atsinaujinimo gebėjimą net ir esant žemų temperatūrų klimato sąlygoms. Tačiau, plečiantis užšalščiam vandeniui prisotintame betone, gali susidaryti papildomas vidinis slėgis, pažeidžiantis bakterijų ląsteles ir slopinantis bakterijų gyvybingumą.

3.3 lentelė. Bakterijų sporų gyvybingumas biologinio betono bandiniuose (KFV/1 g pūsto molio) vykstant šalčio ciklams

Table 3.3. Viability of bacterial spores (CFU/1 g of expanded clay) in biological concrete specimens under cold cycles

Bandinio Nr.	Ciklų skaičius						
	0	1	3	5	10	15	20
Biologinio betono bandiniai, kuriems buvo taikyti šalčio ciklai							
B1	$3,8 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	$0,74 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,27 \cdot 10^4$	$1,27 \cdot 10^4$
B2	$3,8 \cdot 10^4$	$2,01 \cdot 10^4$	$0,78 \cdot 10^4$	$0,88 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,28 \cdot 10^4$	$1,44 \cdot 10^4$
B3	$3,8 \cdot 10^4$	$2,45 \cdot 10^4$	$0,7 \cdot 10^4$	$0,6 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	$0,98 \cdot 10^4$	$1,28 \cdot 10^4$
B4	$3,8 \cdot 10^4$	$4,76 \cdot 10^4$	$0,84 \cdot 10^4$	$1,46 \cdot 10^4$	$1,11 \cdot 10^4$	$2,78 \cdot 10^4$	$0,51 \cdot 10^4$
Kontroliniai biologinio betono bandiniai, kuriems nebuvo taikyti šalčio ciklai							
K1	$3,8 \cdot 10^4$	$0,72 \cdot 10^4$	$1,09 \cdot 10^4$	$0,8 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$0,42 \cdot 10^4$
K2	$3,8 \cdot 10^4$	$2,68 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	$0,6 \cdot 10^4$	$0,71 \cdot 10^4$	$2,55 \cdot 10^4$	$1,89 \cdot 10^4$
K3	$3,8 \cdot 10^4$	$0,99 \cdot 10^4$	$2,49 \cdot 10^4$	$1,02 \cdot 10^4$	$1,14 \cdot 10^4$	$1,89 \cdot 10^4$	$1,58 \cdot 10^4$

Bakterijų gyvybingumo rezultatai bandiniuose, kuriems buvo taikomi užšalimo-atšilimo ciklai, pateikti 3.4 lentelėje. B1–B4 smulkiagrūdžio betono bandiniai buvo paruošti identišškai ir veikti užšalimo-atšilimo ciklų, tuo tarpu kontroliniai K1–K4 bandiniai buvo laikomi ore jų neveikiant užšalimo-atšilimo ciklais. Panašiai kaip ir šalčio ciklų paveiktų bandinių atveju, po kelių pirmųjų užšalimo-atšilimo ciklų pradinis gyvybingų bakterijų kiekis sumažėjo apie 50 % ir išliko stabilus iki 20-ojo ciklo (3.13 pav.). Tokia tendencija pastebėta ir vandenyje laikomuose bandiniuose (kontroliniai bandiniai), ir bandiniuose, kuriems buvo taikomi užšalimo-atšilimo ciklai, o tai rodo, kad gyvybingų sporų sumažėjimą veikia lėmė betono senėjimas, o ne užšalimo ir atšilimo poveikis.



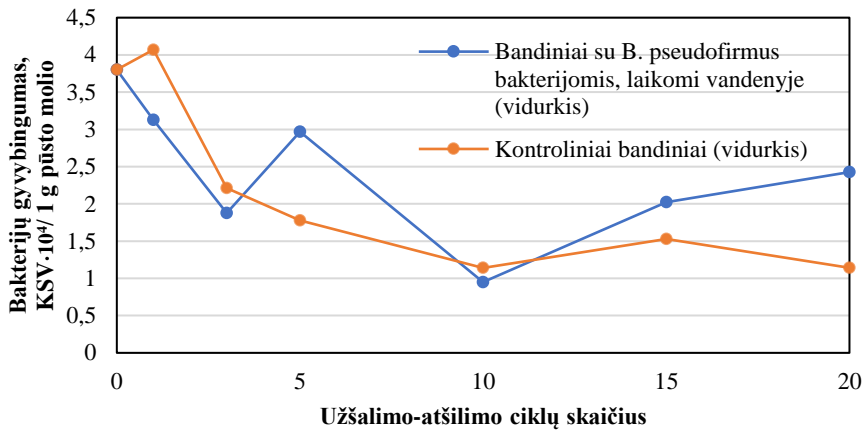
3.12 pav. *B. pseudofirmus* bakterijų gyvybingumas vykstat šalčio ciklams
Fig. 3.12. Viability of *B. pseudofirmus* bacteria during low-temperature cycles

3.4 lentelė. Bakterijų sporų gyvybingumas biologinio betono bandiniuose (KFV/1 g pūsto molio) vykstant užšalimo-atšilimo ciklams

Table 3.4. Viability of bacterial spores (CFU/1 g of expanded clay) in biological concrete specimens under freeze–thaw cycles

Bandinio Nr.	Ciklų skaičius						
	0	1	3	5	10	15	20
Biologinio betono bandiniai, kuriems taikyti užšalimo-atšilimo ciklai							
B1	$3,8 \cdot 10^4$	$3,84 \cdot 10^4$	$2,71 \cdot 10^4$	$2,75 \cdot 10^4$	$2,02 \cdot 10^4$	$1,48 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$
B2	$3,8 \cdot 10^4$	$3,35 \cdot 10^4$	$1,02 \cdot 10^4$	$3,04 \cdot 10^4$	$0,39 \cdot 10^4$	$1,83 \cdot 10^4$	$0,34 \cdot 10^4$
B3	$3,8 \cdot 10^4$	$1,94 \cdot 10^4$	$0,85 \cdot 10^4$	$4,25 \cdot 10^4$	$0,43 \cdot 10^4$	$1,32 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$
B4	$3,8 \cdot 10^4$	$3,38 \cdot 10^4$	$2,92 \cdot 10^4$	$1,83 \cdot 10^4$	$0,96 \cdot 10^4$	$3,46 \cdot 10^4$	$1,56 \cdot 10^4$
Kontroliniai biologinio betono bandiniai kuriems nebuvo taikyti užšalimo-atšilimo ciklai							
K1	$3,8 \cdot 10^4$	$1,78 \cdot 10^4$	$4,43 \cdot 10^4$	$2,66 \cdot 10^4$	$0,74 \cdot 10^4$	$1,11 \cdot 10^4$	$0,43 \cdot 10^4$
K2	$3,8 \cdot 10^4$	$7,53 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^4$	$1,21 \cdot 10^4$	$1,65 \cdot 10^4$	$2,25 \cdot 10^4$	$2,31 \cdot 10^4$
K3	$3,8 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	$0,96 \cdot 10^4$	$1,46 \cdot 10^4$	$1,03 \cdot 10^4$	$1,23 \cdot 10^4$	$0,69 \cdot 10^4$

Bakterijų gyvybingumas tiek žemoje temperatūroje, tiek užšalimo-atšilimo ciklų paveiktuose bandiniuose buvo gana nevienodas. Kai kuriais atvejais apskaičiuotas gyvybingų bakterijų skaičius laikui bėgant netgi didėjo. Panašūs svyravimai pastebėti ankstesniuose tyrimuose (Morley et al., 1983), kur gyvybingų bakterijų sporų padidėjimas buvo siejamas su lėtu bakterijų augimu tarp užšalimo ciklų. Tačiau šiuo atveju labiau tikėtina, kad gyvybingų bakterijų skaičiaus svyravimus galima paaiškinti netolygiu bakterijų imobilizuotų keramzito dalelių pasiskirstymu betone. Nepaisant to, reikšmingi skirtumai tarp apskaičiuotų gyvybingų bakterijų skaičiaus nebuvo pastebėti nė vieno eksperimento metu.



3.13 pav. *B. pseudofirmus* bakterijų gyvybingumas vykstat užšalimo-atšilimo ciklams
Fig. 3.13. Viability of *B. pseudofirmus* bacteria during freeze–thaw cycles

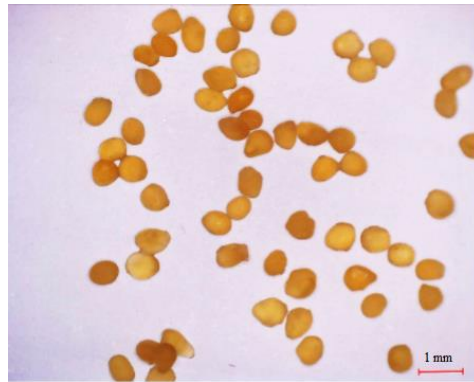
Žemos temperatūros ir užšalimo-atšilimo ciklų paveiktuose, o ir kontroliuose bandiniuose gyvybingų bakterijų skaičiaus pokyčiai laikui bėgant buvo panašūs. Šie rezultatai patvirtina, kad biologinio betono elementai gali būti naudojami šalto klimato regionuose, išlaikant gyvybingas bakterijų sporas betono viduje.

3.4. Į hidrogelį imobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumo tyrimai smulkiagrūdžiam betone

Šiame poskyryje pateikiami bakterijų, įkapsuliuotų į kalcio alginato mikrokapsules, gyvybingumo rezultatai cemento tešloje ir smulkiagrūdžiam betone. Taip pat pateikta įvertinta bakterijų gyvybingumo priklausomybė nuo betono kietėjimo temperatūros.

3.4.1. Kalcio alginato kapsulių charakterizavimas ir įkapsuliavimo efektyvumo įvertinimas

Suformuotos 2 % kalcio alginato mikrokapsulės pasižymėjo netaisyklinga sferine forma, raukšlėtu ir šiurkščiu paviršiumi, susidariusiu dėl drėgmės netekimo džiūvimo metu (3.14 pav.). Gautų kapsulių dydis svyravo nuo 0,45 mm iki 0,70 mm, o vidutinis dydis buvo $0,57 \pm 0,06$ mm. Tai rodo, kad įkapsuliavimo metodas yra veiksmingas gaminant nedidelio dydžio nešiklius ir leidžia gauti kapsules su nedideliu dydžio pasiskirstymu. Įkapsuliavimo efektyvumas gali priklausyti nuo įkapsuliavimui naudojamo natrio alginato tirpalo klampumo ir tirpalo lašinimo metodo, įskaitant švirkšto aukščio, lašinimo greičio ir naudojamos adatos skersmens (Lee et al., 2013).



3.14 pav. Kalcio alginato mikrokapsulių su įkapsuliuotomis bakterijų sporomis vaizdas
Fig. 3.14. Microscopic image of calcium alginate microcapsules containing encapsulated bacterial spores

3.5 lentelė. Teorinė ir nustatyta bakterijų sporų koncentracija kalcio alginato mikrokapsulėse

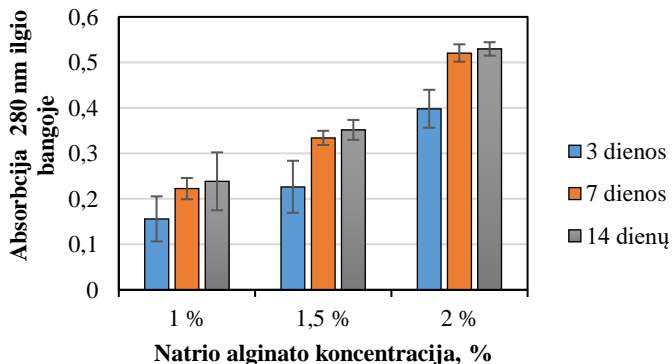
Table 3.5. Theoretical and measured concentrations of bacterial spores in calcium alginate microcapsules

Bakterijų rūšis	Teorinė bakterijų sporų koncentracija kapsulėje (KSV/kapsulėje)	Nustatyta bakterijų sporų koncentracija kapsulėje (KSV/kapsulėje)
<i>B. pseudofirmus</i>	$(4,55 \pm 0,71) \cdot 10^7$	$(2,14 \pm 0,91) \cdot 10^7$
<i>B. cohnii</i>	$(3,30 \pm 0,89) \cdot 10^7$	$(1,00 \pm 0,22) \cdot 10^7$
<i>B. halodurans</i>	$(1,67 \pm 0,07) \cdot 10^7$	$(3,17 \pm 0,23) \cdot 10^6$

Vienas iš svarbiausių parametru, užtikrinantis nešiklio tinkamumą bakterijoms įkapsuliuoti, yra įkapsuliuojimo efektyvumas. Tyrimo metu buvo vertinamas bakterijų gyvybingumas prieš ir po įkapsuliuojimo į kalcio alginato kapsules (3.3 lentelė). Gauti rezultatai atskleidė, kad bakterijų kiekis po įkapsuliuojimo į kalcio alginato kapsules yra didesnis nei prieš kapsuliuojimą. Taip yra todėl, kad kapsulėse bakterijų sporos yra pasiskirsčiusios tolygiau nei suspensijoje (Pungrasmi et al., 2019). Gauti rezultatai parodė, kad hidrogelis yra tinkamas nešiklis bakterijų įkapsuliuojimui ir pritaikymui savaime atsinaujinančiame betone, kadangi įkapsuliuojimo procesas neturėjo įtakos bakterijų gyvybingumui.

3.4.2. Maisto medžiagų pralaidumo kalcio alginato kapsulėse vertinimas

Bakterijų sukeltas kalcio karbonato nusodinimas formuojantis plyšiams priklauso nuo daugelio veiksnių. Bakterijoms suaktyvinti cemente reikalingos maistinės medžiagos, kurių šioje nepalankioje šarminėje aplinkoje nėra daug. Dėl to į įkapsuliuojimo mišinį su bakterijų sporomis yra pridėdama papildomų maistinių medžiagų, pavyzdžiui, mielių ekstrakto ir peptono. Norint sumažinti maistinių medžiagų išsiplovimo iš kapsulės matricos tikimybę, labai svarbu parinkti tinkamą medžiagą, į kurią įkapsuliuojama, koncentraciją. Kapsulės su skirtinga natrio alginato koncentracija (1 %, 1,5 % ir 2 %) buvo laikomos cemento filtravimo tirpale ir analizuotos, matuojant šviesos absorbciją esant 280 nm bangos ilgiui, ją palyginant su kontroliniu mėginiu be maistinių medžiagų (3.15 pav.).



3.15 pav. Maistinių medžiagų pralaidumo priklausomybė nuo natrio alginato koncentracijos

Fig. 3.15. Nutrient permeability depending on sodium alginate concentration

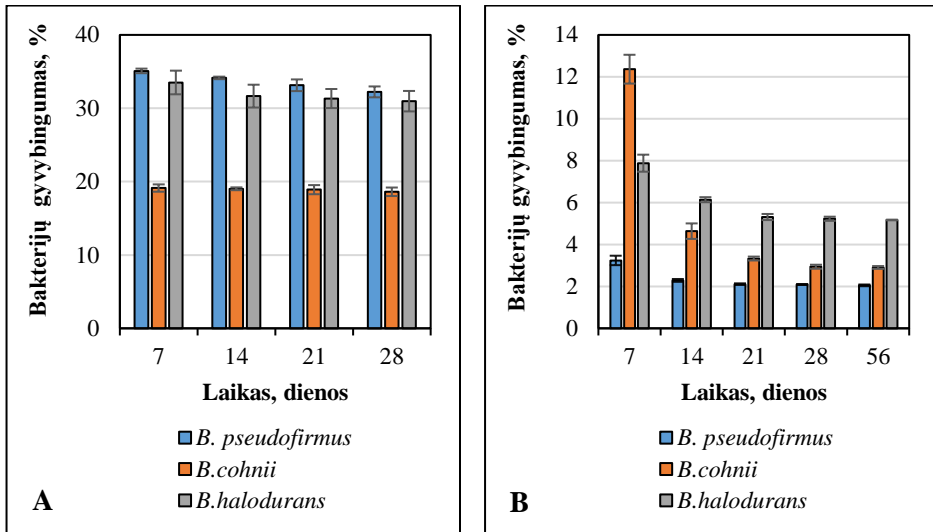
Tyrimas atskleidė, kad kuo didesnė natrio alginato koncentracija, tuo daugiau maistinių medžiagų yra paleidžiama į aplinką. Didžiausias maistinių medžiagų difuzijos greitis buvo kapsulėse, kuriose natrio alginato koncentracija buvo 2 %, o mažiausias – kai natrio alginato koncentracija buvo 1 %. Visose tiriamose grupėse didžiausias į cemento filtrato tirpalą paleistų medžiagų kiekis buvo rastas po 3 dienų. Po 7 dienų buvo pastebėtas difuzijos greičio iš kapsulių sumažėjimas, kuris beveik stabilizavosi po 14 dienų nuo eksperimento pradžios. Tai rodo, kad iš nešiklių išsiskiriančių medžiagų kiekis pasiekia pusiausvyrą, kas atitinka literatūroje fiksuotus duomenis (Fahimizadeh et al., 2020).

Kai natrio alginato koncentracija padidėja, Ca^{2+} jonai gali surišti daugiau alginato molekulių. Tai lemia gelio membranos kompaktiškumą ir porų struktūros tobulumą. Dėl to norima medžiaga gali būti įterpta į polimero matricą (Fahimizadeh et al., 2020). Nors bandymų rezultatai rodo, kad esant didesnei natrio alginato koncentracijai į tirpalą difunduoja daugiau maistinių medžiagų, difuzija gali būti susijusi su didesniu natrio alginato kiekiu. Todėl didesnė natrio alginato tirpalo koncentracija yra tinkamesnė tolesniam darbui.

3.4.3. Bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelį, gyvybingumo cementinėse medžiagose tyrimas

Šiame skyriuje nagrinėjamas bakterijų gyvybingumas cemento tešloje ir smulkiagrūdžiame betone su hidrogelio kapsulėmis, kuriose yra įmobilizuotos bakterijų sporos. Skirtingų rūšių bakterijų gyvybingumas buvo nustatomas cemento tešlos bandiniuose su bakterijų sporomis bei maistinėmis medžiagomis, įkapsuliuotomis į 2 % kalcio alginato mikrokapsules. Į cemento tešlos bandinius įterptų, į hidrogelį įmobilizuotų bakterijų sporų gyvybingumas eksperimento pradžioje visose tiriamosiose grupėse ženkliai sumažėjo (3.16 pav., A). Siekiant patikrinti bakterijų gyvybingumą, kiekvienam bandiniui buvo pagaminti du skirtingi skiedimai, o kiekvienas jų išsėtas trijose Petri lėkštelėse. *B. pseudofirmus* ir *B. halodurans* bakterijų gyvybingumas po 28 dienų išliko santykinai pastovus – atitinkamai $32 \pm 0,74$ % ir $31 \pm 1,40$ %. Mažiausias į cemento tešlą įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas nustatytas *B. cohnii* bakterijoms. Tyrimo metu jis nekito ir sudarė apie 19 % pradinio sporų gyvybingumo. Kontrolinėse grupėse be bakterijų sporų augimas nebuvo pastebėtas. Vėliau kapsulės su bakterijų sporomis buvo įterptos į smulkiagrūdį betoną. Didžiausias neigiamas poveikis pastebėtas *B. pseudofirmus* bakterijoms, kurių gyvybingumas po 7 dienų siekė $3,24 \pm 0,23$ %. Po 14 dienų kietėjimo, bakterijų gyvybingumas siekė $2,29 \pm 0,07$ % ir išliko stabilus viso eksperimento metu (3.16 pav., B). Kiekvienam bandiniui buvo atlikta po du skiedimus, kiekvienas skiedimas buvo išsėtas ant trijų Petri lėkštelių. Nors *B. cohnii* bakterijos turėjo didžiausią gyvybingumo procentą eksperimento pradžioje ($12,36 \pm 0,69$ %), tačiau po 56 dienų jis nukrito iki $2,9 \pm 0,07$ %. *B. halodurans*

bakterijų gyvybingumas neperžengė 5 % ribos viso eksperimento metu. Joks bakterijų augimas nebuvo pastebėtas kontrolinėse grupėse. Cementas eksperimento metu nebuvo sterilizuotas, jo pH siekė 10–12, o tai yra nepalanki aplinka bakterijoms. Tik šarminę aplinką toleruojančios bakterijos, įkapsuliuotos į nešiklius, gali išgyventi tokiomis sąlygomis.



3.16 pav. *Bacillus* rūšies bakterijų gyvybingumas: A – cemento tešloje; B – smulkiagrūdžiame betone

Fig. 3.16. Viability of *Bacillus* species in A – cement paste; B – mortar

Tyrimo metu buvo nustatomas *Bacillus* genties bakterijų gyvybingumas cemento tešloje ir smulkiagrūdžiame betone. *Bacillus* genties bakterijos toleruoja šarminę aplinką, todėl tinkamos naudoti biologiniame betone. Tyrimas parodė, kad *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* sporų skaičius nesumažėja jas įkapsuliuavus į kalcio alginato mikrokapsules. Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad *B. lichemiformis* bakterijas įkapsuliuavus į kalcio alginatą, jų gyvybingumas po įkapsuliuavimo siekė 99 % (Vega-Carranza et al., 2021). Taigi, kalcio alginato kapsulės yra tinkamas nešiklis bakterijoms įkapsuluoti ir įterpti į biologinį betoną. Smulkiagrūdžiame betone, kurio struktūra yra daug standesnė nei cemento tešlos, bakterijų mirtingumas buvo ženkliai didesnis. Vadinasi, kapsulės veikė didesnis slėgis. Be to, bandinių kietėjimo metu jos buvo veikiamos šarminės aplinkos, kuri daro neigiamą ir kenksmingą poveikį. Tyrimas taip pat parodė, kad bakterijų sporų įkapsuliuavimas į 2 % natrio alginatą sumažina jų pradinį gyvybingumą nuo 10 iki 100 kartų. Taip gali būti dėl per mažos natrio alginato arba naudojamų bakterijų

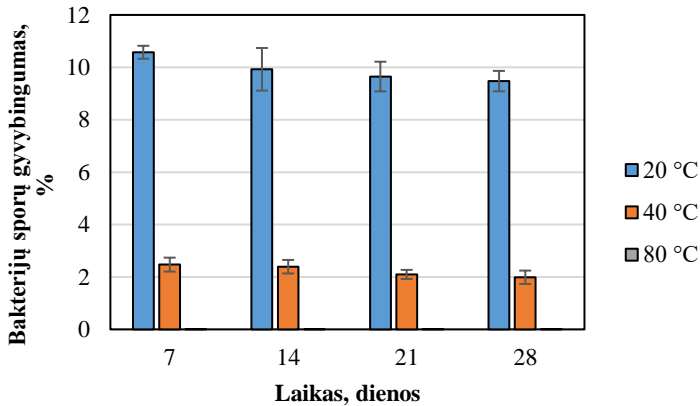
koncentracijos. Nepaisant to, tiesiogiai į smulkiagrūdį betoną įterptų bakterijų išgyvenamumas ir išgyvenimo trukmė yra didesni. Šie rezultatai sutampa su biologinio betono tyrimu (Fahimizadeh et al., 2020), kuris parodė, kad *B. pseudofirmus* bakterijos, įkapsuliuotos į kalcio alginato mikrokapsules, išliko gyvybingos po betono maišymo. Daugumoje tyrimų biologinio betono plyšių užsivėrimo savybės buvo tiriamos neatsižvelgiant į bakterijų gyvybingumą betone. Juose vertintos mechaninės betono savybės, pavyzdžiui, gniuždymo stipris ir vandens pralaidumas po savaiminio gijimo. Taigi, šiame tyrime daugiausia dėmesio skiriama bakterijų gyvybingumui betone.

Tyrimo bakterijų gyvybingumas nustatytas skaičiuojant ant kietos mitybinės terpės išaugusių kolonijų skaičių. Tuo tarpu ureolitinių bakterijų gyvybingumą buvo galima nustatyti netiesiogiai, matuojant fermento ureazės aktyvumą, kai aplinkoje keičiasi įkapsuliuotų bakterijų išskiriamo NH_3 koncentracija. Šis metodas taikomas tik tokioms bakterijoms ir negali būti naudojamas ne ureolitinių bakterijų gyvybingumui cemento matricoje nustatyti. Neureolitinių bakterijų gyvybingumas nustatomas tiesioginio skiedimo-įskiepijimo metodu, kai bakterijos paskleidžiamos Petri lėkštelėse ir skaičiuojamos išaugusios kolonijos. Gyvybingumą galima nustatyti tiksliai, nes iš betono mėginio paimamas reikiamas kapsulių skaičius, ir jos ištirpinamos Na-citrato ir EDTA mišinyje. Pridėjus šių medžiagų, kalcio alginatas suskystėja, sukurdamas kalcio jonų ir alginato skaidulų chelatinį ryšį. Nustatyta, kad šių medžiagų derinys neturi įtakos bakterijų sporų gyvybingumui (Fahimizadeh et al., 2020). Tačiau tiesioginio praskiedimo-sėjimo metodo apribojimas yra tas, kad kai kurios bakterijų ląstelės gali būti metaboliškai aktyvios, bet negali dalytis. Tiesiogiai nustatyti bakterijų gyvybingumą, naudojant pūstas medžiagas, vargu ar įmanoma. Šiuo atveju betono mėginiai yra sudaužomi ir susmulkinami, todėl bakterijų skaičiui įtakos turi tai, kiek kietinimo medžiagų patenka į tiriamąjį mėginį.

3.4.4. Betono kietėjimo temperatūros įtaka į hidrogelį įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumui betone

Smulkiagrūdžio betono gamybos metu, vykstant cemento hidratacijos procesams, susidaro aukšta temperatūra. Todėl šio tyrimo metu buvo vertinama betono bandinių kietėjimo temperatūros įtaka *B. pseudofirmus* bakterijų sporų gyvybingumui. Ši bakterijų rūšis pasirinkta dėl jos stabilaus gyvybingumo betono bandiniuose. Gyvybingumas buvo tiriamas 20, 40 ir 80 °C temperatūroje. Rezultatai parodė, kad 2,1 % ($1,51 \cdot 10^5$ KSV/kapsulėje) įkapsuliuotų bakterijų sporų išliko gyvybingos 28 dienas, bandinius kietinant 40 °C temperatūroje, lyginant su kontroliniais bandiniais, kietintais 20 °C temperatūroje (3.17 pav.). Tačiau bakterijų gyvybingumas reikšmingai sumažėjo betono bandiniuose, kurie kietėjo

80 °C temperatūroje. Po 7 dienų gyvybingų bakterijų skaičius tapo nebeįstatomas.



3.17 pav. Į kalcio alginato mikroapsules įkapsuliuotų *B. pseudofirmus* bakterijų sporų gyvybingumo smulkiagrūdžio betono bandiniuose priklausomybė nuo hidratacijos temperatūros

Fig. 3.17. Dependence of the viability of *B. pseudofirmus* spores encapsulated in calcium alginate microcapsules on the hydration temperature in mortar specimens

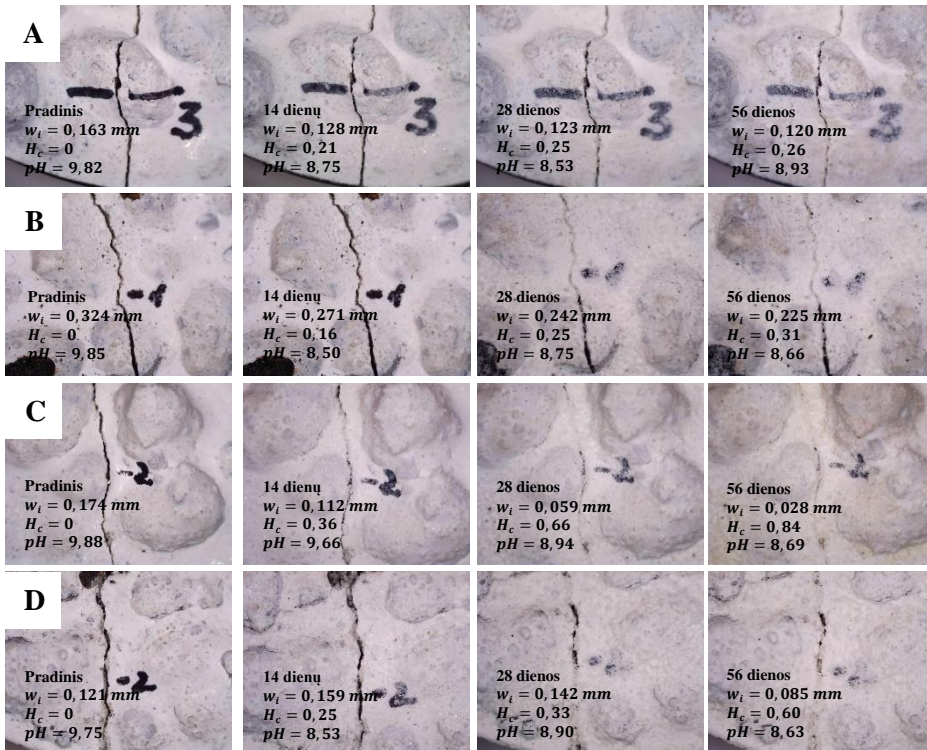
Bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelio kapsules, gyvybingumo sumažėjimo rezultatai, smulkiagrūdžio betono bandinius kietinant 80 °C temperatūroje, sutampa su ankstesniais duomenimis apie bakterijų sporų, įmobilizuotų į pūstą molį, gyvybingumą, ir rodo, kad įkapsuliuojimas į hidrogelį negali apsaugoti bakterijų nuo aukštos temperatūros poveikio. Dėl to reikia papildomų priemonių cemento hidratacijos sukeltai temperatūrai sumažinti. Tinkamai apsaugant į kalcio alginatą įkapsuliuotas bakterijų sporas nuo aukštų temperatūrų poveikio, galima padidinti jų gyvybingumą, pagreitinti kalcio karbonato kristalų susidarymą ir pagerinti jų kokybę (Schwantes-Cezario et al., 2020).

3.5. Biologinio betono plyšių užsivėrimo vertinimas

Šiame poskyryje pateikiami biologinio betono savaiminio plyšių užsivėrimo rezultatai laboratorinėmis ir lietuvių imituojančiomis sąlygomis, kai betono bandiniams paruošti buvo naudojamos bakterijos, impregnuotos į pūsto molio daleles. Taip pat pateikiamas bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelį, gebėjimo užverti plyšius biologiniame betone, vertinimas.

3.5.1. Bakterijų, impregnuotų į pūstą molį, gebėjimo užverti plyšius vertinimas

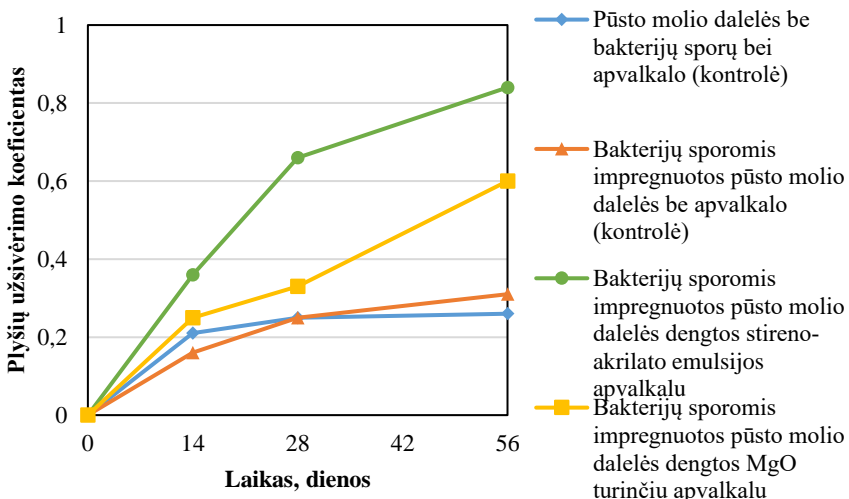
Atlikus bakterijų gyvybingumo tyrimus buvo optiškai įvertintas bakterijų gebėjimas užpildyti įtrūkimus biologinio betono bandiniuose su pūsto molio dalelėmis, padengtomis skirtingais apvaskalais. Plyšių užsivėrimo rezultatai pateikti 3.18 pav. Jo efektyvumui įvertinti buvo naudojamas plyšių užsivėrimo koeficientas H_c (Wiktor & Jonkers, 2011). H_c gali svyruoti nuo 0, kai plyšiai neužsiveria, ir iki 1, kai įvyksta visiškas plyšių užsivėrimas.



3.18 pav. Smulkiagrūdžio betono bandinių su dengtomis pūsto molio dalelėmis plyšių užsivėrimo matavimas: A – bandinys be apvaskalo ir bakterijų (kontrolė); B – bandinys su įterptomis bakterijomis, nedengtos apvaskalu (kontrolė); C – bandinys su pūsto molio dalelėmis, dengtomis vienu stireno-akrilato emulsijos sluoksniu; D – bandinys su pūsto molio dalelėmis, dengtomis MgO turinčiu apvaskalu

Fig. 3.18. Measurement of crack healing of concrete specimens with coated expanded clay particles: A – negative control specimen without coating and bacteria; B – negative control specimen with embedded bacteria, without coating; C – specimen with expanded clay particles coated with a single layer of a styrene-acrylate emulsion; D – specimen with expanded clay particles coated with a MgO-based coating

Plyšių užpildymo efektyvumas buvo stebimas praėjus 14, 28 ir 56 dienoms po smulkiagrūdžio betono bandinių su pūsto molio užpildu paruošimo ir panardinimo į vandenį Tiriant į su skirtingais apvaskalais padengtų pūsto molio dalelių impregnuotomis bakterijų sporomis gebėjimą užverti plyšius, buvo naudojami du kontroliniai bandiniai: bandinys, kuriame pūsto molio dalelės nebuvo impregnuotos bakterijų sporomis ir padengtos papildomu apvaskalu, ir bandinys, kuriame pūsto molio dalelės buvo impregnuotos bakterijų sporomis, tačiau nebuvo padengtos papildomu apvaskalu. Kontroliniame bandinyje, kurio sudėtyje nėra impregnuotų bakterijų ir maisto medžiagų, plyšių užsivėrimo koeficientas po 56 dienų buvo 0,26 (3.19 pav.). Šie rezultatai patvirtina, kad betonai tam tikru mastu geba užpildyti plyšius savarankiškai be jokių aktyvių medžiagų. Didesnis savaiminio atsinaujinimo koeficientas buvo pastebėtas kitame kontroliniame bandinyje, kuriame į pūstą molį yra įterptos bakterijų sporos ir maistinės medžiagos, tačiau pūsto molio dalelės nėra apvilktos apsauginiu apvaskalu. Plyšių užsivėrimo koeficientas šiuose bandiniuose siekė 0,31 (3.18 pav.). Gyvybingų bakterijų skaičius šiame bandinyje svyravo apie $2-4 \cdot 10^5$ KSV/1 g pūsto molio. Inkubacijos metu vandens pH svyravo nuo 8,5 iki 9. Šios palankios vandens aplinkos sąlygos skatino bakterijų aktyvumą ir CaCO_3 nusodinimą. Tai, savo ruožtu, užtikrino didesnę plyšių užsivėrimo koeficientą, palyginus su kontroliniu bandiniu be imobilizuotų bakterijų sporų.



3.19 pav. Plyšių užsivėrimo koeficientai smulkiagrūdžio betono bandiniuose su bakterijomis impregnuotomis pūsto molio dalelėmis

Fig. 3.19. Self-healing coefficients in concrete specimens with bacteria-impregnated expanded clay particles

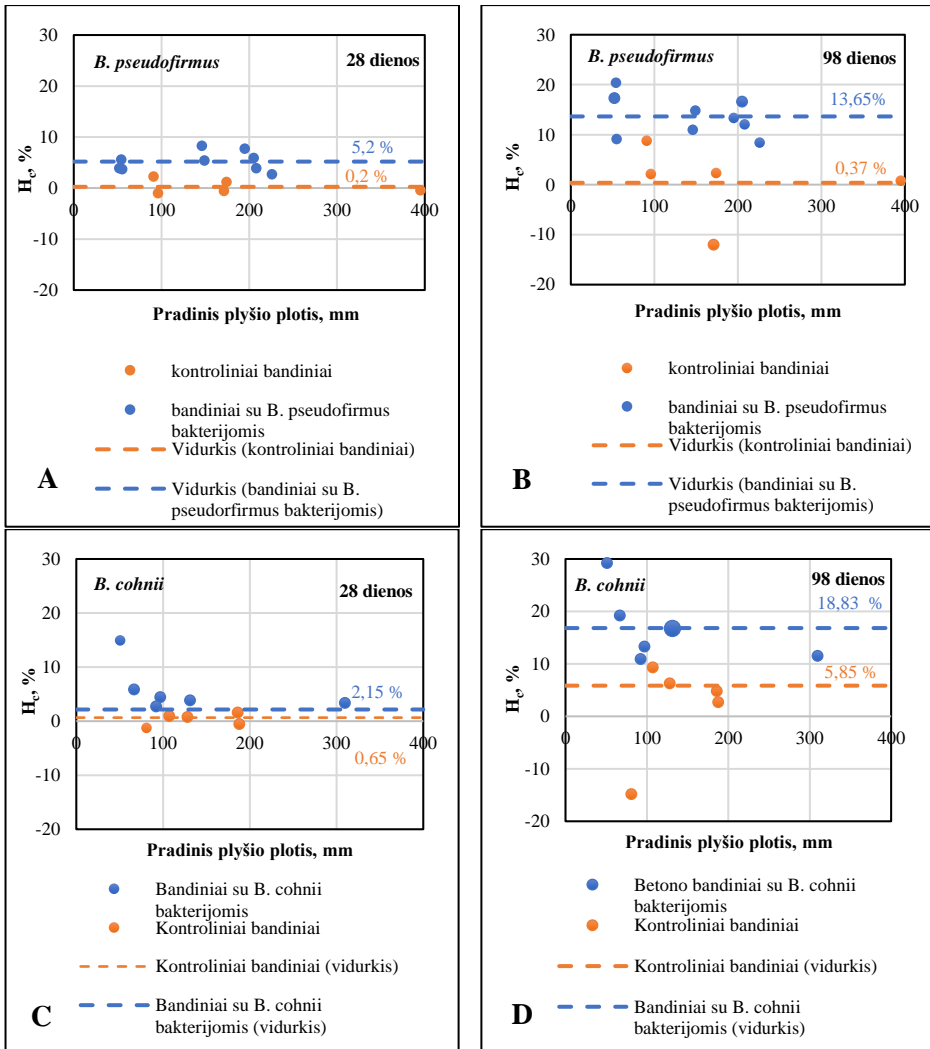
Plyšių užsivėrimo koeficientas betono bandiniuose su dengtomis pūsto dalelėmis buvo gerokai didesnis. 3.18 pav. C ir D pavaizduotas bandinių su pūsto molio dalelėmis, dengtomis stireno-akrilato emulsija ir MgO pagrįstu apvaskalu, savaiminis įtrūkimų užpildymas. Šiuose bandiniuose buvo didesnis gyvybingų bakterijų skaičius, palyginus su neigiama kontrole, ir po 56 dienų plyšių užsivėrimo koeficientas siekė 0,84 bandiniuose su stireno-akrilato emulsijos danga, o 0,60 bandiniuose su MgO pagrįstu apvaskalu (3.19 pav.). Tai sustiprino CaCO_3 formavimą. Pūsto molio daleles padengus MgO pagrįstu apvaskalu, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ susidarymas gali pagerinti ilgalaikį autogeninį įtrūkimų užpildymą. Šiam poveikiui patvirtinti būtina išsamesnė ilgalaikė statistinė analizė su didesniu mėginių skaičiumi ir įvairove.

Vis dėlto, gauti rezultatai rodo, kad biologinio betono bandinių plyšių užsivėrimo efektyvumas yra glaudžiai susijęs su jame esančių gyvybingų bakterijų skaičiumi. Biologinio betono bandiniai, kuriuose buvo didesnis gyvybingų bakterijų skaičius, pasižymėjo didesniu plyšių užsivėrimo koeficientu. Todėl, norint padidinti bakterijų gyvybingumą betono matricoje ir taip pagerinti atsivėrusių plyšių užpildymą, pūsto molio daleles būtina dengti papildomais apvaskalais.

3.5.2. Bakterijų, impregnuotų į pūstą molį, gebėjimo užverti plyšius betone vertinimas imituojamomis lietaus sąlygomis

Eksperimentai, skirti savaiminiam plyšių užpildymui biologinio betono elementuose, buvo specialiai suprojektuoti taip, kad būtų galima panaudoti plyšių užsivėrimo sąlygas, panašias į realias konstrukcijų eksploataavimo sąlygas. Armatūros strypai buvo išdėstyti prizmių apatinėje dalyje, taip imituojant sijų konstrukcinę armatūrą. Taigi, armatūra perdavė įtempius apkrovos metu, o tai leido susidaryti daugybiniams įtrūkimams. Pritaikyta eksperimentinė sąranga taip pat leido atkurti įvairaus pločio įtrūkimus, panašiai kaip ir konstrukcinėse sijose. Be to, įtrūkimų užsivėrimui buvo naudojamos specialios sąlygos, imituojančios lietų. Manoma, kad tokios plyšių užsivėrimo sąlygos yra reprezentatyvesnės, palyginti su įprastiniu plyšių užsivėrimu panardinus į vandenį arba 100 % santykinės drėgmės patalpose (Alazhari et al., 2018; Wang et al., 2014; Zheng et al., 2021). Siekiant įvertinti įtrūkimų užsivėrimą per tam tikrą laiką, pagrindiniu efektyvumo rodikliu buvo pasirinktas plyšių užsivėrimo koeficientas. Šiuo atveju 100 % reiškia visišką pradinio įtrūkimo užpildymą.

Tyrimai buvo atliekami su *B. pseudofirmus* ir *B. cohnii* bakterijomis, atsižvelgiant į jų gyvybingumą ir mineralizacijos efektyvumą. Gautos bandinių plyšių užsivėrimo koeficiento vertės bandiniuose su *B. pseudofirmus* ir *B. cohnii* bakterijomis pateiktos 3.20 pav. Čia kiekvienas grafiko taškas rodo vidutinę įtrūkimo pločio vertę, apskaičiuotą kaip vidurkį iš 10 vietų ir 30 matavimo taškų.



3.20 pav. Plyšių užsivėrimo koeficientų kitimas bandiniuose su *B. pseudofirmus* ir *B. cohnii* bakterijų sporomis liėtų imituojančiomis sąlygomis: A – bandiniai su *B. pseudofirmus* bakterijomis po 28 dienų; B – bandiniai su *B. pseudofirmus* bakterijomis po 98 dienų; C – bandiniai su *B. cohnii* bakterijomis po 28 dienų; D – bandiniai su *B. cohnii* bakterijomis po 98 dienų

Fig. 3.20. Variation of self-healing coefficients in specimens with *B. pseudofirmus* and *B. cohnii* bacterial spores under stimulated rain conditions: A – specimens with *B. pseudofirmus* bacteria after 28 days, B – specimens with *B. pseudofirmus* bacteria after 98 days, C – specimens with *B. cohnii* bacteria after 28 days, D – specimens with *B. cohnii* bacteria after 98 days

Bandymų su abejomis bakterijų rūšimis metu kontroliniai bandiniai pasižymėjo nežymiu plyšių užpildymo efektyvumu, o galutinis plyšių užsivėrimo koeficientas po 98 dienų svyravo nuo 0,37 iki 5,98 %. Priešingai, bakterijų, turinčių bandinių plyšių, užsivėrimo koeficientai buvo kelis kartus didesni. Galutinis plyšių užsivėrimo koeficientas po 98 dienų buvo 13,65 ir 18,83 % prizmėse, atitinkamai su *B. pseudofirmus* ir *B. cohnii* bakterijų sporomis. Tačiau abiejų bandymų plyšių užsivėrimo gebėjimas buvo gerokai mažesnis, palyginti su aukščiau aprašytų tyrimų rezultatais, kai plyšių užsivėrimo koeficientas siekė 80 %. Greičiausiai tokie reikšmingi skirtumai susiję su skirtingomis gijimo sąlygomis. Aukščiau aprašyto tyrimo metu plyšių užsivėrimas vyko vandenyje, o šiame tyrime buvo naudojama lietuvių imituojanti aplinka. Tekantis vanduo galėjo išplauti naujai susidariusias bakterijų nuosėdas ir kalcio karbonatą, todėl padidėjo išmatuotas plyšio plotis. Panašus efektas pastebėtas ir ankstesniuose tyrimuose, kur biologinis betonas turėjo sąlytį su prisotintu gruntu (Zhang & Qian, 2020). Dėl vandens slėgio iš plyšio ištekėjo daug baltų nuosėdų. Todėl galima daryti išvadą, kad tekantis vanduo gali sumažinti biologinio betono elementų plyšių užsivėrimo efektyvumą.

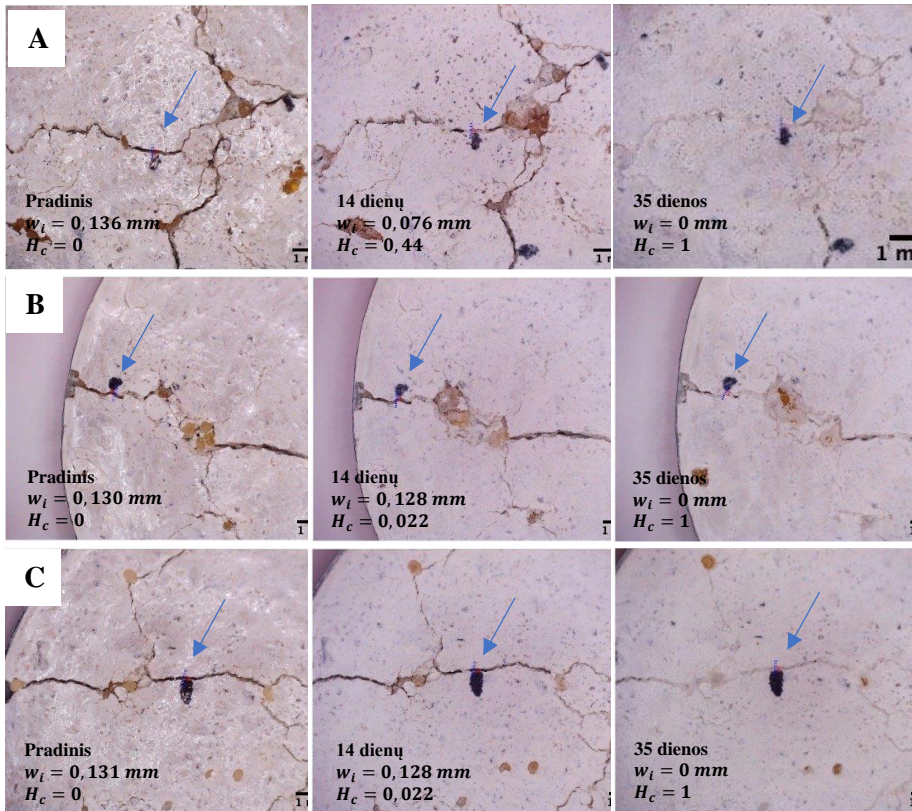
Šiame tyrime gauti eksperimentiniai duomenys rodo, kad inkubavimo metodas turi didelę įtaką biologinio betono bandinių plyšių užsivėrimo rodikliams. Todėl atvirų konstrukcijų savaiminio plyšių užsivėrimo gebėjimas gali būti prastesis, palyginti su plyšių užsivėrimu idealiomis laboratorinėmis sąlygomis, kai biologinio betono bandiniai yra panardinami į vandenį. Naudojant biologinį betoną konstrukcijoms, būtina atsižvelgti į galimą naujai susidariusių nuosėdų išplaunamąjį poveikį.

3.5.3. Bakterijų, įkapsuliuotų į hidrogelį, gebėjimo užverti plyšius betone vertinimas

Norint įvertinti į hidrogelį įkapsuliuotų bakterijų *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* gebėjimą užpildyti plyšius betono konstrukcijose, skirtingo pločio plyšiai buvo atverti praėjus 28 dienoms po smulkiagrūdžio betono bandinių paruošimo. Plyšių užpildymo efektyvumui įvertinti buvo naudojamas plyšių užsivėrimo koeficientas H_c . Aukščiau aprašyti tyrimai atskleidė, kad bėgant laikui bakterijų gyvybingumas betone reikšmingai sumažėja. Tai daro įtaką savaiminiam plyšių užpildymui, todėl, norint įvertinti jų užpildymo efektyvumą, kai bakterijos yra vis dar gyvybingos, buvo pasirinkta tai padaryti praėjus 7 dienoms po mėginių pagaminimo, o ne laukti, kol mėginiai visiškai sukietės praėjus 28 dienoms.

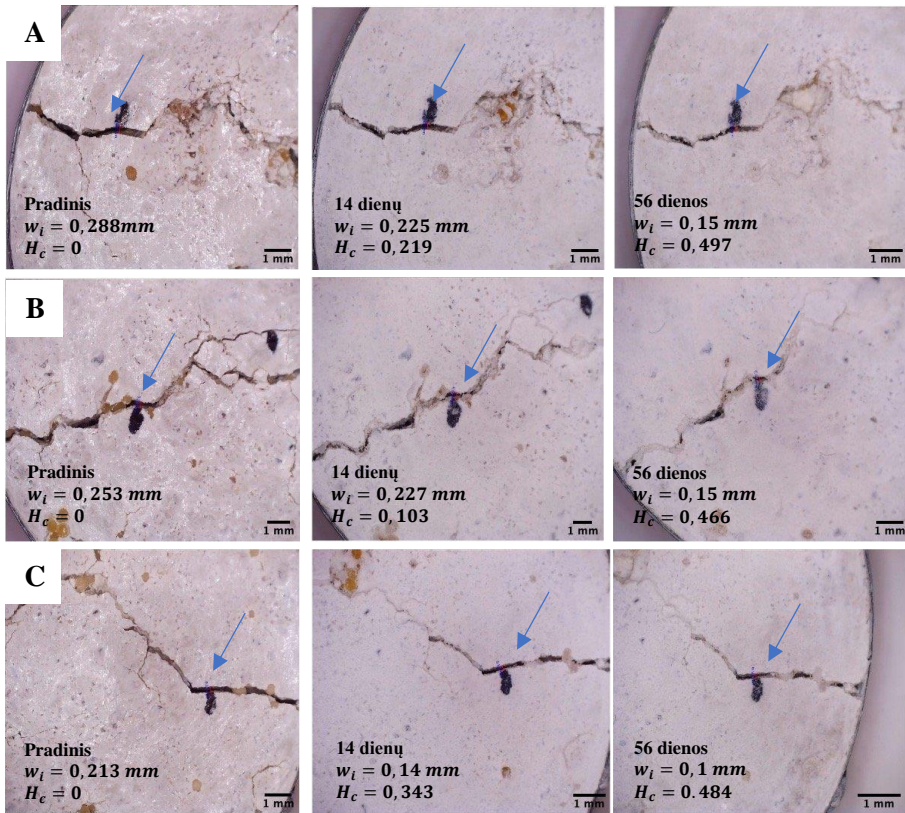
Atlikta savaiminio plyšių užpildymo analizė parodė, kad 0,130–0,136 mm pločio plyšiai buvo greičiausiai užpildyti betono bandiniuose su įkapsuliuotomis *B. cohnii* ir *B. halodurans* bakterijų sporomis (3.21 pav.). Nedideli įtrūkimai buvo

visiškai užpildyti per 14 dienų. Šis pastebėjimas sutampa su rezultatais, kurie parodė *B. pseudofirmus* bakterijų, įkapsuliuotų į kalcio alginatą, gyvybingumą ir jų gebėjimą užtaisyti palyginti nedidelius defektus per 56 dienas (Fahimizadeh et al., 2020). Betono bandiniuose, kuriuose plyšio plotis siekė 0,213–0,288 mm, plyšiai nebuvo visiškai užpildyti viso tyrimo metu (3.22 pav.). Po 56 dienų plyšių užsivėrimo koeficientas visoms bakterijų rūšims buvo labai panašus ir siekė 0,497, 0,466 ir 0,484, atitinkamai *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* ir *B. halodurans* bakterijoms. Pastebėta, kad *B. pseudofirmus* bakterijos, įkapsuliuotos į kalcio alginatą su chitozanu, užpildė 1 mm įtrūkimus (Gao et al., 2020).



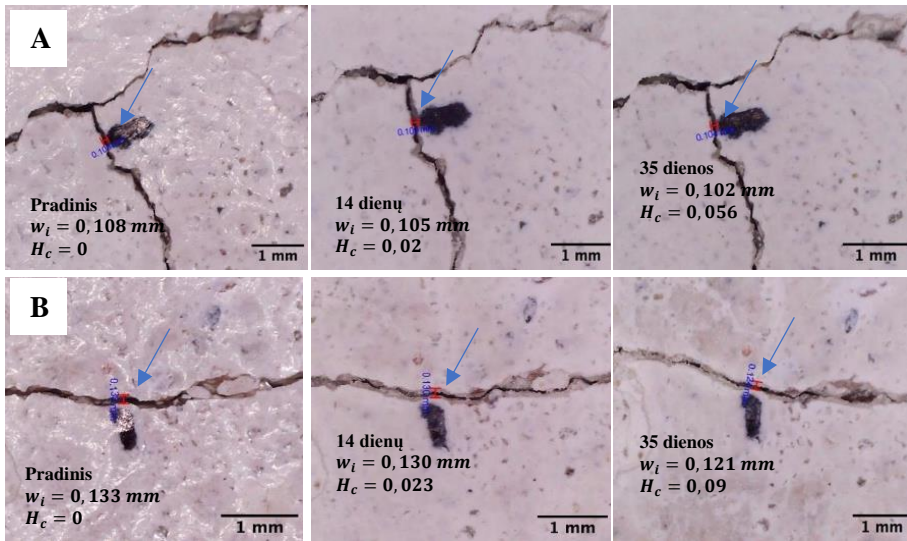
3.21 pav. Smulkiagrūdžio betono bandinių, kurių plyšio plotis yra 0,130–0,136 mm, plyšių užsivėrimo vaizdai, naudojant kalcio alginato mikroapsules su įkapsuliuotomis skirtingų rūšių bakterijomis: A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*

Fig. 3.21. Images of self-healing of mortar specimens with a crack of 0.130–0.136 mm using microcapsules with different bacterial species: A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*



3.22 pav. Smulkiagrūdžio bandinių, kurių plyšio plotis yra 0,213–0,288 mm, plyšių užsivėrimo vaizdai, naudojant kalcio alginato mikrokapsules su įkapsuliuotomis skirtingų rūšių bakterijomis: A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*
Fig. 3.22. Images of self-healing of mortar specimens with a crack of 0.213–0.288 mm using microcapsules with different bacterial species: A – *B. pseudofirmus*; B – *B. cohnii*; C – *B. halodurans*

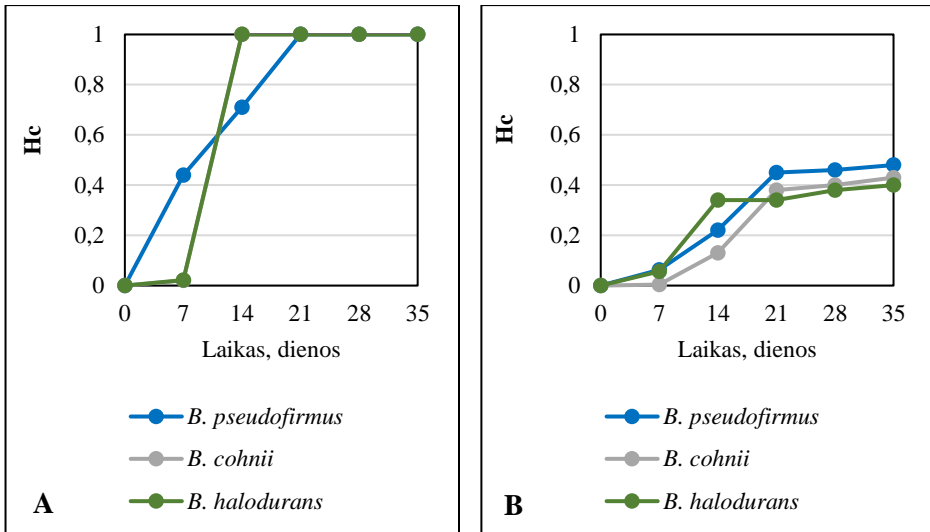
Tyrimo metu buvo naudojami du kontroliniai smulkiagrūdžio betono bandiniai: bandinys be kalcio alginato kapsulių ir bandinys su kalcio alginato kapsulėmis be bakterijų sporų (tik su įkapsuliuotomis maistinėmis medžiagomis). Abiejų grupių bandiniuose plyšiai nebuvo užpildyti (3.23 pav.). Plyšių užsivėrimo koeficientas visuose kontroliniuose bandiniuose neviršijo 0,2. Šis rezultatas patvirtina autogeninę betono savaiminio atsinaujinimo savybę, pasireiškiančią gebėjimu užpildyti mažus įtrūkimus, nepriedant papildomų medžiagų.



3.23 pav. Kontrolinių smulkiagrūdžio betono bandinių plyšių užsivėrimo vaizdai: A – smulkiagrūdžio bandiniai be mikrokapsulių; B – smulkiagrūdžio betono bandiniai su mikrokapsulėmis, kurių sudėtyje yra maistinių medžiagų, tačiau nėra bakterijų

Fig. 3.23 Self-healing images of control mortar samples: A – mortar samples without microcapsules; B – mortar samples with microcapsules containing nutrients without bacteria

3.24 pav. pateiktas plyšių užsivėrimo rezultatų apibendrinimas. Platesnių plyšių, kurių plotis siekia 0,288 mm, atveju plyšių užsivėrimas yra beveik vienodas visoms tirtoms bakterijų rūšims. Tačiau *B. pseudofirmus* bakterijos parodė didžiausią gebėjimo užverti plyšius greitį. Nepilnas ir netolygus plyšių užsivėrimas gali atsirasti dėl nepakankamo bakterijų gyvybingumo ir nepakankamos polimerinės dangos apsaugos, mažesnio nešiklio su imobilizuotomis bakterijų sporomis ir maistinėmis medžiagomis kiekio, netolygaus pasiskirstymo mėginiuose. Norint padidinti bakterijų sporų gyvybingumą betone ir užpildyti platesnius įtrūkimus, reikėtų koreguoti mikrokapsulių sudėtį, didinant bakterijų koncentraciją ir maistinių medžiagų kiekį. Be to, dangos galėtų apsaugoti mikrokapsules nuo šarminės aplinkos ir padidėjusios cemento hidratacijos temperatūros. Pastebėtas įtrūkimų užsidarymas yra tik netiesioginis bakterijų aktyvumo įrodymas. Taigi, bakterijų identifikavimas ir kiekybinis nustatymas realiomis aplinkos sąlygomis gali būti tolesnių mokslinių tyrimų objektas.



3.24 pav. Plyšių užsivėrimo koeficiento priklausomybė nuo laiko smulkiagrūdžio betono bandiniuose, kuriuose naudojamos skirtingų rūšių bakterijos: A – kai plyšio plotis yra 0,130–0,136 mm; B – kai plyšio plotis yra 0,213–0,288 mm

Fig. 3.24. Self-healing coefficient variation with time in mortar samples with different bacteria species: A – with crack width 0.130–0.136 mm; B – with crack width 0.213–0.288 mm

Viso tyrimo metu smulkiagrūdžio betono bandiniai buvo laikomi vandenyje. Vandens pH buvo vertinamas kas savaitę ir svyravo nuo 8,4 iki 9,7. Tai užtikrino palankią ir vienodą aplinką bakterijų aktyvumui ir CaCO_3 formavimui.

3.6. Metalų oksidų antibakterinio aktyvumo tyrimai

Remiantis literatūros duomenimis, tipinė metalų oksidų minimali slopinanti koncentracija svyruoja nuo 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iki 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, priklausomai nuo konkrečios bakterijų rūšies ir metalo (3.6 lentelė). 3.1 lentelėje vertės nurodytos $\mu\text{g}/\text{ml}$, o 3.2 lentelėje metalų oksidų koncentracija apskaičiuota $\mu\text{g}/\text{g}$ betono. Nepaisant to, 3.1 ir 3.2 lentelėse pateiktos vertės gali būti naudojamos kaip apytikslės palyginimo tikslais. Pagal gautus duomenis matyti, kad visi metalų oksidai, išskyrus CuO , viršijo tipines minimalios slopinančios koncentracijos vertes (3.4 lentelė). Pavyzdžiui, 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Al_2O_3 slopina *E. coli* augimą (Ansari et al., 2014a), o tyrimo metu nustatyta, kad visose tirtose cemento rūšyse šio metalo oksido koncentracija buvo bent kelis kartus didesnė (3.3 lentelė). Panašiai MgO koncentracija

buvo beveik 10 kartų didesnė už minimalias slopinančias koncentracijas *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ir *Salmonella enteritidis* bakterijų rūšims (He et al., 2016b). Betone esantis metalų oksidų mišinys ilgainiui difunduoja į bakterijomis įmobilizuotas pūsto molio daleles ir palaipsniui mažina bakterijų gyvybingumą betono matricoje.

3.6 lentelė. Anksčiau ištirtos metalo oksidų nanodalelių minimalios slopinančios koncentracijos

Table 3.6. Previously studied MICs of metal oxide nanoparticles

Metalo oksidas	Bakterijų rūšis	MIC, $\mu\text{g/ml}$	Literatūros šaltinis
Al_2O_3	<i>E. coli</i>	1600	Ansari et al., 2014b
Fe_2O_3	<i>P. aeruginosa</i>	160	Khataminejad et al., 2015
MgO	<i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. enteritidis</i>	500-1000	He et al., 2016
TiO_2	<i>P. aeruginosa</i>	350	Arora et al., 2015
ZnO	<i>C. jejuni</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i>	30-980	Xie et al., 2011
CuO	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. vulgaris</i>	30-250	Ahamed et al., 2014)

Siekiant apibūdinti metalų oksidų slopinamąjį poveikį *Bacillus* genties bakterijoms, minimalios slopinančios koncentracijos vertės buvo tiriamos kiekvienam metalo oksidui ir bakterijų rūšiai atskirai. Gauti rezultatai apibendrinti 3.7 lentelėje. Nustatyta, kad Fe_2O_3 , MgO , Al_2O_3 ir TiO_2 nėra toksiški tirtoms bakterijų rūšims, nes nepastebėtas joks slopinantis poveikis, kai šių metalų oksidų koncentracija siekė 2000–6000 $\mu\text{g/ml}$. Didesnių šių metalų oksidų koncentracijų tirti nebuvo galima, nes šie stipriai drumstė bakterijų augimo terpę ir trukdė apskaičiuoti kolonijas sudarančius vienetus Petri lėkštelėje. Priešingai, buvo nustatyta, kad kiti metalų oksidai yra toksiški. Priklausomai nuo bakterijų rūšies, vario oksido minimalios slopinančios koncentracijos vertės svyravo nuo 1500 $\mu\text{g/ml}$ iki 2000 $\mu\text{g/ml}$, o cinko oksido – nuo 12,5 $\mu\text{g/ml}$ iki 25 $\mu\text{g/ml}$.

Gauti rezultatai atskleidė, kad bakterijų gyvybingumo skirtumai buvo glaudžiai susiję su skirtingų metalų oksidų kiekiu cemente ir minimalių slopinančių koncentracijų vertėmis. Kaip jau buvo aptarta anksčiau, bakterijų gyvybingumas baltame CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) tipo cemente buvo gerokai didesnis, palyginti su visais kitais tirtais cemento tipais. Cheminė analizė atskleidė, kad baltame CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) tipo cemente aptinkama daug mažesnė Al_2O_3 , Fe_2O_3 , MgO ir TiO_2 koncentracija, o ZnO ir CuO nebuvo visai. Metalų oksidų antibakterinio aktyvumo tyrimas parodė, kad Fe_2O_3 , MgO , Al_2O_3 ir TiO_2 nėra toksiški *B. pseudofirmus*, *B. cohnii* bei *B. halodurans* bakterijų rūšims. Tik ZnO arba CuO

buvimas cemento sudėtyje galėjo lemti tirtų bakterijų rūšių gyvybingumo sumažėjimą betono bandiniuose. Apskaičiuota CuO koncentracija betono bandiniuose buvo 38–291 $\mu\text{g/g}$. Ši koncentracija yra kelis kartus mažesnė už nustatytas minimalios slopinančios koncentracijos vertes, kurios buvo 1500 $\mu\text{g/ml}$ *B. pseudofirmus* bakterijų rūšiai ir 1500 $\mu\text{g/ml}$ *B. cohnii* ir *B. halodurans* bakterijų rūšims. Todėl ZnO yra laikomas potencialiu inhibitoriumi. Nustatyta, kad ZnO yra toksiškiausias metalo oksidas visoms tirtoms bakterijų rūšims ir siekė 12,5 $\mu\text{g/ml}$ *B. pseudofirmus* ir *B. cohnii* bakterijų rūšims, 25 $\mu\text{g/ml}$ *B. halodurans* bakterijų rūšiai. ZnO masės procentinė dalis betone, pagamintame iš baltojo CEM-I 52,5 R-SR5 (Danija) tipo cemento, buvo neaptinkama, o tai palankiai veikė bakterijų išgyvenamumą betono matricoje.

Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad tam tikrų elementų buvimas cemente lemia bakterijų gyvybingumą betono matricoje. ZnO buvimas cemento sudėtyje gali būti pakankama priežastis bakterijų augimo slopinimui biologiniame betone. Nustatytos ZnO minimalios slopinančios koncentracijos vertės trimis skirtingoms bakterijų rūšims buvo gerokai mažesnės už faktinę šio metalo oksido koncentraciją tirtuose cemento tipuose. Bakterijų gyvybingumo tyrimas taip pat patvirtino ryšį tarp cemento sudėtyje randamų metalo oksidų koncentracijų ir kolonijas sudarančių vienetų skaičiaus. Bakterijų gyvybingumas betono bandiniuose buvo reikšmingai mažesnis, kai betono bandiniams paruošti buvo naudojami cemento tipai su didesne ZnO koncentracija. Tai rodo, kad prieš gaminant biologinį betoną, reikia ištirti cemento sudėtį ir konkrečių jame esančių metalo oksidų minimalios slopinančios koncentracijos reikšmes, kad būtų kuo mažiau paveiktas bakterijų gyvybingumas ir plyšių užsivėrimo efektyvumas.

3.7 lentelė. Nustatytos metalo oksidų minimalios slopinančios koncentracijos reikšmės *Bacillus* genties bakterijoms

Table 3.7. Determined minimum inhibitory concentration values of metal oxides for *Bacillus* species

Metalo oksidas	Minimali slopinanti koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>B. pseudofirmus</i>	<i>B. cohnii</i>	<i>B. halodurans</i>
Al_2O_3	–	–	–
Fe_2O_3	–	–	–
MgO	–	–	–
TiO_2	–	–	–
ZnO	12,5	12,5	25
CuO	1500	2000	2000

Cemente esantys mikroelementai gali turėti daug didesnę įtaką bakterijų gyvybingumui nei pH poveikis, kaip buvo teigiama anksčiau. Cemento sudėtyje esanti metalų oksidų koncentracija gali viršyti tipines minimalių slopinančių koncentracijų reikšmes daugiau nei keliasdešimt kartų.

3.7. Trečiojo skyriaus išvados

1. *B. pseudofirmus* bakterijos pasižymi aukščiausiu mineralizacijos aktyvumu, kai likutinė kalcio jonų koncentracija terpėje yra 1,742 mM. Kitos rūšys, tokios kaip *B. cohnii* ir *B. halodurans*, esant kalcio jonų šaltiniui, taip pat gali nusodinti kalcio karbonatą ir būti naudojamos biologiniame betone.
2. Pūsto molio dalelių padengimas stireno-akrilato ir MgO danga 10 kartų padidina bakterijų gyvybingumą betone, nes yra užblokuojamos poros, apsaugančios bakterijas nuo nepalankių aplinkos sąlygų. Taigi, šios dvi dangos gali būti naudojamos bakterijų gyvybingumo išsaugojimui biologiniame betone.
3. *B. pseudofirmus* bakterijų sporų skaičius sumažėja 50 % per pirmuosius tris užšalimo-atšilimo ciklus, tačiau po to išlieka stabilus iki 20 ciklo. Todėl biologinį betoną galima pritaikyti Šiaurės Europos ir Baltijos šalių klimato sąlygomis, tačiau tada naudojamų bakterijų kiekį reikėtų padidinti.
4. Betono kietėjimo temperatūra turi didelę įtaką bakterijų išgyvenamumui. Kai temperatūra pasiekia 80 °C, į pūstą molį įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas sumažėja virš 10 kartų, o į hidrogelį įkapsuliuotų bakterijų gyvybingumas tampa nebeaptinkamas. Vidutinio dydžio konstrukcijose minėtos temperatūros nepasiekiamos, tačiau masyviose biologinio betono konstrukcijose būtina užtikrinti, kad temperatūros neviršytų 40 °C.
5. Betono kietėjimo sąlygos (drėgmė) veikia bakterijų gyvybingumą. *B. pseudofirmus* bakterijų gyvybingumas vandenyje kietinamuose bandiniuose yra virš 10 kartų mažesnis nei ore kietinamuose bandiniuose, kadangi vandenyje vyksta ankstyvas bakterijų sporų dygimas, o tai lemia bakterijų žūtį.
6. Dirbtinio lietaus sąlygomis vykstantis plyšių užsivėrimas biologiniame betone pasižymi kelis kartus mažesne sparta nei vandens aplinkoje, nes yra išplaunamas kalcio karbonatas. Todėl biologinio betono konstrukcijas būtina apsaugoti nuo lietus ir tekančio vandens poveikio.
7. Cemento sudėtyje esantis ZnO yra toksiškas visoms tirtoms bakterijų rūšims ir ženkliai sumažina jų gyvybingumą betone, todėl biologinio betono gamybai rekomenduojama naudoti cementą be šio junginio.

Bendrosios išvados

1. Ištyrus pagrindinius cemento tipus, naudojamus betono konstrukcijose, nustatyta, kad cementų sudėtyje esantis cinko oksidas mažina bakterijų gyvybingumą biologiniame betone, todėl reikia naudoti tokį cementą, kurio sudėtyje cinko oksido nebūtų.
2. Atsižvelgiant į bakterijų gyvybingumą biologiniame betone, mineralizacijos aktyvumą ir gebėjimą užpildyti atsivėrusius plyšius, iš trijų tirtų bakterijų rūšių tinkamiausia naudoti yra *B. pseudofirmus*.
3. Hidrogelis ir pūstas molis geba išlaikyti gyvybingas bakterijų sporas biologiniame betone. Pūsto molio daleles padengus stireno-akrilatu arba MgO turinčiu apvalkalu bakterijų gyvybingumą betone padidėja beveik 10 kartų. Susiformavus plėvelei ant pūsto molio dalelių paviršiaus, susidaro mechaninis barjeras, apsaugantis bakterijas nuo neigiamo cemento komponentų poveikio.
4. Kai temperatūra pasiekia 80 °C, į pūstą molį impregnuotų bakterijų gyvybingumas sumažėja daugiau nei 10 kartų, o į hidrogelį įkapsuliuotos bakterijos žūva. Vidutinio dydžio konstrukcijose 80 °C temperatūra nepasiekama, tačiau masyviose biologinio betono konstrukcijose būtina užtikrinti, kad ji neviršytų 40 °C. Ore kietintuose betono bandiniuose gyvybingumas yra 10 kartų didesnis nei vandenyje kietintuose bandiniuose, kuriuose vyksta ankstyvas sporų dygimas ir bakterijos žūva.

5. Betono bandiniuose, kuriuose bakterijų sporos buvo įkapsuliuotos į hidrogelį, 0,13 mm pločio plyšiai visiškai užsivėrė per 21 dieną. Betono bandiniuose, kuriuose bakterijų sporos buvo imobilizuotos į pūstą molį, 0,17–0,2 mm plyšiai nebuvo visiškai užpildyti per 56 dienas laboratorinėmis sąlygomis. Plyšių užsivėrimo efektyvumas yra mažesnis lietaus ir tekančio vandens sąlygomis dėl galimo susidariusių kalcio karbonato kristalų išplovimo iš konstrukcijos.
6. Biologinis betonas yra tinkamas naudoti Lietuvos klimatinėmis sąlygomis, tačiau bakterijų sporų skaičius biologiniame betone turi būti padvigubintas, nes užšalimo-atšilimo ciklų metu bakterijų gyvybingumas sumažėja per pusę.

Rekomendacijos

1. Atsižvelgiant į bakterijų gyvybingumą betone, mineralizacijos aktyvumą ir gebėjimą užpildyti atsivėrusius plyšius, biologiniame betone rekomenduojama naudoti *Bacillus pseudofirmus*.
2. Betono kietėjimo metu masyviuose betono elementuose pasiekiamos aukštos temperatūros, todėl rekomenduojama imtis priemonių, kad specifinėse biologinio betono konstrukcijose kietėjimo metu temperatūros nebūtų aukštesnės nei 40 °C.
3. Rekomenduojama nenaudoti cinko oksido turinčio cemento biologinio betono gamybai.

Literatūra ir šaltiniai

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>

Ahamed, M., Alhadlaq, H. A., Khan, M. A. M., Karuppiah, P., & Al-Dhabi, N. A. (2014). Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/637858>

Ahmad, M. R., Chen, B., & Farasat Ali Shah, S. (2019). Investigate the influence of expanded clay aggregate and silica fume on the properties of lightweight concrete. *Construction and Building Materials*, 220, 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.05.171>

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>

Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., Saquib, Q., & Musarrat, J. (2014a). Interaction of Al₂O₃ nanoparticles with Escherichia coli and their cell envelope biomolecules. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 772–783. <https://doi.org/10.1111/jam.12423>

Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., Saquib, Q., & Musarrat, J. (2014b). Interaction of Al₂O₃ nanoparticles with Escherichia coli and their cell

- envelope biomolecules. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 772–783. <https://doi.org/10.1111/jam.12423>
- Arora, B., Murar, M., & Dhumale, V. (2015). Antimicrobial potential of TiO₂ nanoparticles against MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Nanoscience*, 10(11), 819–827. <https://doi.org/10.1080/17458080.2014.902544>
- Barbosa, C. A. M., Gonc, R. B., Alves, Siqueira, J. F., & De Uzeda, M. (1997). Evaluation of the Antibacterial Activities of Calcium Hydroxide, Chlorhexidine, and Camphorated Paramonochlorophenol as Intracanal Medicament, A Clinical and Laboratory Study. *Journal of Endodontics*, 23(5), 297–300. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(97\)80409-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(97)80409-8)
- Ben Chekroun, K., Rodri, C., Teresa Gonza, M., Maria Arias, J., Cultrone, G., & Rodri, M. (2004). Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by *Myxococcus xantus*: implications for recognition of bacterial carbonates. *Journal Of Sedimentary Research*, 74(6). SEPM (Society for Sedimentary Geology). <https://doi.org/10.1306/050504740868>
- Bindschedler, S., Cailleau, G., & Verrecchia, E. (2016). Role of fungi in the biomineralization of calcite. *Minerals* 6(2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/min6020041>
- Cao, M., Ming, X., He, K., Li, L., & Shen, S. (2019). Effect of macro-, micro- and nano-calcium carbonate on properties of cementitious composites-A review. *Materials*, 12(5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12050781>
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., & Perthuisot, J.-P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126, 9–23. [https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(99)00028-7)
- 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. *Frontiers in Materials*, 6. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>
- Dumitru, L. M., Manoli, K., Magliulo, M., Ligonzo, T., Palazzo, G., & Torsi, L. (2015). A hydrogel capsule as gate dielectric in flexible organic field-effect transistors. *APL Materials*, 3(1). <https://doi.org/10.1063/1.4901124>
- Dzionaek, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. In *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, (pp. 28–36). Electronic Journal of Biotechnology. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>
- 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). <https://doi.org/10.3390/MA13173711>
- Fairbairn, E. M. R., & Azenha, M. (2019). *RILEM State-of-the-Art Reports Thermal Cracking of Massive Concrete Structures State of the Art Report of the RILEM Technical Committee 254-CMS*. <http://www.springer.com/series/8780>

- Feng, C., Cui, B., Huang, Y., Guo, H., Zhang, W., & Zhu, J. (2022). Enhancement technologies of recycled aggregate – Enhancement mechanism, influencing factors, improvement effects, technical difficulties, life cycle assessment. *Construction and Building Materials*, 317. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.126168>
- Feng, C., Zong, X., Cui, B., Guo, H., Zhang, W., & Zhu, J. (2022). Application of Carrier Materials in Self-Healing Cement-Based Materials Based on Microbial-Induced Mineralization. *Crystals*, 12(6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cryst12060797>
- Frankel, R. B. (2003). Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95–114. <https://doi.org/10.2113/0540095>
- Gao, M., Guo, J., Cao, H., Wang, H., Xiong, X., Krastev, R., Nie, K., Xu, H., & Liu, L. (2020). Immobilized bacteria with pH-response hydrogel for self-healing of concrete. *Journal of Environmental Management*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110225>
- Gu, F., Amsden, B., & Neufeld, R. (2004). Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *Journal of Controlled Release*, 96(3), 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.02.021>
- Gupta, S., Pang, S. D., & Kua, H. W. (2017). Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – A review. *Construction and Building Materials*, 146, 419–428. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.04.111>
- Han, L., Li, J., Xue, Q., Chen, Z., Zhou, Y., & Poon, C. S. (2020). Bacterial-induced mineralization (BIM) for soil solidification and heavy metal stabilization: A critical review. *Science of the Total Environment*, 746. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140967>
- Han, S., Choi, E. K., Park, W., Yi, C., & Chung, N. (2019). Effectiveness of expanded clay as a bacteria carrier for self-healing concrete. *Applied Biological Chemistry*, 62(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0426-4>
- Han, S., Jang, I., Choi, E. K., Park, W., Yi, C., & Chung, N. (2020a). Bacterial Self-Healing Performance of Coated Expanded Clay in Concrete. *Journal of Environmental Engineering*, 146(7). [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0001713](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0001713)
- Han, S., Jang, I., Choi, E. K., Park, W., Yi, C., & Chung, N. (2020b). Bacterial Self-Healing Performance of Coated Expanded Clay in Concrete. *Journal of Environmental Engineering*, 146(7). [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0001713](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0001713)
- He, Y., Ingudam, S., Reed, S., Gehring, A., Strobaugh, T. P., & Irwin, P. (2016a). Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0202-0>
- He, Y., Ingudam, S., Reed, S., Gehring, A., Strobaugh, T. P., & Irwin, P. (2016b). Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0202-0>

- Heng, M., & Murata, K. (2004). Aging of concrete buildings and determining the pH value on the surface of concrete by using a handy semi-conductive pH meter (2004). *Analytic Sciences*, 20, 1087–1090. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1087>
- Huynh, N. N. T., Phuong, N. M., Toan, N. P. A., & Son, N. K. (2017). Bacillus Subtilis HU58 Immobilized in Micropores of Diatomite for Using in Self-healing Concrete. *Procedia Engineering*, 171, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.01.385>
- Jędrzejewska, A., Kanavaris, F., Zych, M., Schlicke, D., & Azenha, M. (2020). Experiences on early age cracking of wall-on-slab concrete structures. *Structures*, 27, 2520–2549. <https://doi.org/10.1016/j.istruc.2020.06.013>
- 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. <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>
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., & Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36(2), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(5), 417–427. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>
- Justo-Reinoso, I., Reeksting, B. J., Hamley-Bennett, C., Heath, A., Gebhard, S., & Paine, K. (2022). Air-entraining admixtures as a protection method for bacterial spores in self-healing cementitious composites: Healing evaluation of early and later-age cracks. *Construction and Building Materials*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.126877>
- Kanavaris, F., Jędrzejewska, A., Sfikas, I. P., Schlicke, D., Kuperman, S., Šmilauer, V., Honório, T., Fairbairn, E. M. R., Valentim, G., Funchal de Faria, E., & Azenha, M. (2021). Enhanced massivity index based on evidence from case studies: Towards a robust pre-design assessment of early-age thermal cracking risk and practical recommendations. *Construction and Building Materials*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121570>
- 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>
- Khatamnejad, M. R., Mirnejad, R., Sharif, M., Hashemi, M., Sajadi, N., & Piranfar, V. (2015a). Antimicrobial effect of imipenem-functionalized Fe₂O₃ Nanoparticles on pseudomonas aeruginosa producing metallo β-lactamases. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13(4). <https://doi.org/10.15171/ijb.1138>

- Khataminejad, M. R., Mirnejad, R., Sharif, M., Hashemi, M., Sajadi, N., & Piranfar, V. (2015b). Antimicrobial effect of imipenem-functionalized Fe₂O₃ Nanoparticles on pseudomonas aeruginosa producing metallo β-lactamases. *Iranian Journal of Biotechnology*, 13(4). <https://doi.org/10.15171/ijb.1138>
- Kliukas, R., Daniunas, A., Gribniak, V., Lukoseviciene, O., Vanagas, E., & Patapavicius, A. (2018). Half a century of reinforced concrete electric poles maintenance: inspection, field-testing, and performance assessment. *Structure and Infrastructure Engineering*, 14(9), 1221–1232. <https://doi.org/10.1080/15732479.2017.1402068>
- Lee, B. B., Ravindra, P., & Chan, E. S. (2013). Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chemical Engineering and Technology*, 36(10). <https://doi.org/10.1002/ceat.201300230>
- Lee, Y. S., & Park, W. (2018). Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3059–3070. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8830-y>
- Li, T., Zhang, H., Tan, X., Zhang, R., Wu, F., Yu, Z., & Su, B. (2023a). New insights into Saccharomyces cerevisiae induced calcium carbonate precipitation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1261205>
- Li, T., Zhang, H., Tan, X., Zhang, R., Wu, F., Yu, Z., & Su, B. (2023b). New insights into Saccharomyces cerevisiae induced calcium carbonate precipitation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1261205>
- Li, Z., & Li, T. (2022). New Insights Into Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation Using Saccharomyces cerevisiae. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904095>
- Liu, B., Wu, M., Du, W., Jiang, L., Li, H., Wang, L., Li, J., Zuo, D., & Ding, Q. (2023). The Application of Self-Healing Microcapsule Technology in the Field of Cement-Based Materials: A Review and Prospect. *Polymers*, 15(12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym15122718>
- Liu, C., Xu, X., Lv, Z., & Xing, L. (2020). Self-healing of concrete cracks by immobilizing microorganisms in recycled aggregate. *Journal of Advanced Concrete Technology*, 18(4), 168–178. <https://doi.org/10.3151/jact.18.168>
- Meng, S., Winters, H., & Liu, Y. (2015). Ultrafiltration behaviors of alginate blocks at various calcium concentrations. *Water Research*, 83, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.008>
- Menon, R. R., Luo, J., Chen, X., Zhou, H., Liu, Z., Zhou, G., Zhang, N., & Jin, C. (2019). Screening of Fungi for Potential Application of Self-Healing Concrete. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39156-8>
- Mo, L., Deng, M., & Wang, A. (2012). Effects of MgO-based expansive additive on compensating the shrinkage of cement paste under non-wet curing conditions. *Cement and Concrete Composites*, 34(3), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2011.11.018>

- Morley, C. R., Trofymow, J. A., Coleman, D. C., & Cambardella, C. (1983). Effects of Freeze-Thaw Stress on Bacterial Populations in Soil Microcosms. *Microb Ecol*, 9, 329–340. <https://doi.org/10.1007/BF02019022>
- Mors, R. M., & Jonkers, H. M. (2017). Feasibility of lactate derivative based agent as additive for concrete for regain of crack water tightness by bacterial metabolism. *Industrial Crops and Products*, 106, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.037>
- Nagler, K., Julius, C., & Moeller, R. (2016). Germination of Spores of Astrobiologically Relevant Bacillus Species in High-Salinity Environments. *Astrobiology*, 16(7), 500–512. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1419>
- Nagler, K., Setlow, P., Li, Y. Q., & Moeller, R. (2014). High salinity alters the germination behavior of Bacillus subtilis spores with nutrient and nonnutrient germinants. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1314–1321. <https://doi.org/10.1128/AEM.03293-13>
- Nicholson, W. L., & Galeano, B. (2003). UV resistance of Bacillus anthracis spores revisited: Validation of Bacillus subtilis spores as UV surrogates for spores of B. anthracis Sterne. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1327–1330. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1327-1330.2003>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3).
- 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49002-6>
- Qin, W., Wang, C. yu, Ma, Y. xuan, Shen, M. juan, Li, J., Jiao, K., Tay, F. R., & Niu, L. na. (2020). Microbe-Mediated Extracellular and Intracellular Mineralization: Environmental, Industrial, and Biotechnological Applications. *Advanced Materials*, 32(22). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adma.201907833>
- Qureshi, T., Kanellopoulos, A., & Al-Tabbaa, A. (2018). Autogenous self-healing of cement with expansive minerals-I: Impact in early age crack healing. *Construction and Building Materials*, 192, 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.10.143>
- Qureshi, T. S., & Al-Tabbaa, A. (2016). Self-healing of drying shrinkage cracks in cement-based materials incorporating reactive MgO. *Smart Materials and Structures*, 25(8). <https://doi.org/10.1088/0964-1726/25/8/084004>
- Sallehi, H. (2015). *Characterization of Cement Paste in Fresh State Using Electrical Resistivity Technique*.
- Saridhe, S. P., & Selvaraj, T. (2020). Microbial precipitation of calcium carbonate in cementitious materials - A critical review. *Materials Today: Proceedings*, 43, 1232–1240. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.762>

- Schwantes-Cezario, N., Ferreira Nogueira Camargo, G. S., Franco do Couto, Á., Porto, M. F., Cremasco, L. V., Andrello, A. C., & Toralles, B. M. (2020). Mortars with the addition of bacterial spores: Evaluation of porosity using different test methods. *Journal of Building Engineering*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2020.101235>
- Schwantes-Cezario, N., Porto, M. F., Sandoval, G. F. B., Nogueira, G. F. N., Couto, A. F., & Toralles, B. M. (2019). Effects of *Bacillus subtilis* biocementation on the mechanical properties of mortars. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, 12(1), 31–38. <https://doi.org/10.1590/s1983-41952019000100005>
- Seifan, M., Samani, A. K., & Berenjian, A. (2016). Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2591–2602. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7316-z>
- Seifan, M., Samani, A. K., Hewitt, S., & Berenjian, A. (2017). The effect of cell immobilization by calcium alginate on bacterially induced calcium carbonate precipitation. *Fermentation*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation3040057>
- 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. *Materials*, 14(17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma14175116>
- Shen, T., Urrutia Benet, G., Brul, S., & Knorr, D. (2005). Influence of high-pressure-low-temperature treatment on the inactivation of *Bacillus subtilis* cells. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(3), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.03.004>
- Snyder, K. A., Feng, X., Keen, B. D., & Mason, T. O. (2003). Estimating the electrical conductivity of cement paste pore solutions from OH⁻, K⁺ and Na⁺ concentrations. *Cement and Concrete Research*, 33(6), 793–798. [https://doi.org/10.1016/S0008-8846\(02\)01068-2](https://doi.org/10.1016/S0008-8846(02)01068-2)
- Soysal, A., Milla, J., King, G. M., Hassan, M., & Rupnow, T. (2020). Evaluating the Self-Healing Efficiency of Hydrogel-Encapsulated Bacteria in Concrete. *Transportation Research Record*, 2674(6), 113–123. <https://doi.org/10.1177/0361198120917973>
- Spencer, C. A., & Sass, H. (2019). Use of carrier materials to immobilise and supply cementation medium for microbially mediated self-healing of biocement. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 660(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/660/1/012067>
- Takey, M., Shaikh, T., Mane, N., & Majumder, D. R. (n.d.). Bioremediation of xenobiotics: use of dead fungal biomass and biosorbent. *IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology*. <http://www.ijret.org>

- Tziviloglou, E., Wiktor, V., Jonkers, H. M., & Schlangen, E. (2016a). Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. *Construction and Building Materials*, *122*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.06.080>
- Tziviloglou, E., Wiktor, V., Jonkers, H. M., & Schlangen, E. (2016b). Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. *Construction and Building Materials*, *122*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.06.080>
- 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>
- Vega-Carranza, A. S., Cervantes-Chávez, J. A., Luna-Bárceñas, G., Luna-González, A., Diarte-Plata, G., Nava-Mendoza, R., Rodríguez-Morales, J. A., Escamilla-Montes, R., & Pool, H. (2021). Alginate microcapsules as delivery and protective systems of *Bacillus licheniformis* in a simulated shrimp's digestive tract. *Aquaculture*, *540*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736675>
- Vijay, K., Murmu, M., & Deo, S. V. (2017). Bacteria based self healing concrete – A review. *Construction and Building Materials*, *152*, 1008–1014. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.07.040>
- Wang, B., Xu, X., Yao, X., Tang, H., & Ji, F. (2019). Degradation of phenanthrene and fluoranthene in a slurry bioreactor using free and Ca-alginate-immobilized *Sphingomonas pseudosanguinis* and *Pseudomonas stutzeri* bacteria. *Journal of Environmental Management*, *249*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109388>
- Wang, D., Shi, C., Farzadnia, N., Shi, Z., Jia, H., & Ou, Z. (2018). A review on use of limestone powder in cement-based materials: Mechanism, hydration and microstructures. *Construction and Building Materials*, *181*, 659–672. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.06.075>
- Wang, J., Ersan, Y. C., Boon, N., & De Belie, N. (2016). Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 2993–3007. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7370-6>
- Wang, J., Mignon, A., Snoeck, D., Wiktor, V., Van Vlierghe, S., Boon, N., & De Belie, N. (2015). Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: A promising strategy for crack self-healing. *Frontiers in Microbiology*, *6*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01088>
- Wang, J. Y., De Belie, N., & Verstraete, W. (2012). Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *39*(4), 567–577. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1037-1>
- Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W., & De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and Concrete Research*, *56*, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2013.11.009>

- Wang, X., Xu, J., Wang, Z., & Yao, W. (2022). Use of recycled concrete aggregates as carriers for self-healing of concrete cracks by bacteria with high urease activity. *Construction and Building Materials*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2022.127581>
- Wang, Y., Lin, Z., Tang, C., & Hao, W. (2021). Influencing factors on the healing performance of microcapsule self-healing concrete. *Materials*, 14(15). <https://doi.org/10.3390/ma14154139>
- Weiser, D., Sóti, P. L., Bánóczy, G., Bódai, V., Kiss, B., Gellért, Á., Nagy, Z. K., Koczka, B., Szilágyi, A., Marosi, G., & Poppe, L. (2016). Bioimprinted lipases in PVA nanofibers as efficient immobilized biocatalysts. *Tetrahedron*, 72(46), 7335–7342. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.06.027>
- 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>
- Wu, Q., Zou, Y., Gu, J., Xu, J., Ji, R., & Wang, G. (2020). The influence and action mechanization of mineral mixed material on high fluidity potassium magnesium phosphate cement (Mkpc). *Journal of Composites Science*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jcs4010029>
- Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., & Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2325–2331. <https://doi.org/10.1128/AEM.02149-10>
- Xing, Z., Bai, L., Ma, Y., Wang, D., & Li, M. (2018). Mechanism of magnesium oxide hydration based on the multi-rate model. *Materials*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/ma11101835>
- Xu, S., Tabaković, A., Liu, X., & Schlangen, E. (2018). Calcium alginate capsules encapsulating rejuvenator as healing system for asphalt mastic. *Construction and Building Materials*, 169, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.01.046>
- Xu, X., Wang, B., Tang, H., Jin, Z., Mao, Y., & Huang, T. (2020). Removal of phosphate from wastewater by modified bentonite entrapped in Ca-alginate beads. *Journal of Environmental Management*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110130>
- Youm, K. S., Moon, J., Cho, J. Y., & Kim, J. J. (2016). Experimental study on strength and durability of lightweight aggregate concrete containing silica fume. *Construction and Building Materials*, 114, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.03.165>
- 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, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.05.021>

Zhang, X., & Qian, C. (2020). Engineering Application of Microbial Self-healing Concrete in Lock Channel Wall. *Case Studies in Construction Materials*, e00398. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2020.e00398>

Zhao, J., Dyer, T., Csetenyi, L., Jones, R., & Gadd, G. M. (2022). Fungal colonization and biomineralization for bioprotection of concrete. *Journal of Cleaner Production*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129793>

Zheng, T., Qian, C., & Su, Y. (2021). Influences of different calcium sources on the early age cracks of self-healing cementitious mortar. *Biochemical Engineering Journal*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107849>

Autorės mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas

Straipsniai recenzuojamuose mokslo žurnaluose

Ivaškė, A.; Jakubovskis, R.; Boris, R.; & Urbonavičius, J. (2024). Effects of low temperature, freeze thaw cycles, and healing conditions on viability on non-ureolytic bacteria in biological self-healing concrete. *Materials*, 17, 5797. <https://doi.org/10.3390/ma17235797>

Ivaškė, A.; Gribniak, V.; Jakubovskis, R.; & Urbonavičius, J. (2023). Bacterial viability in self-healing concrete: A case study of non-ureolytic *Bacillus* species. *Microorganisms*, 11(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102402>

Jakubovskis, R., Ivaškė, A., Malaiškienė, J., & Urbonavičius, J. (2022). Impact of portland cement type on bacterial viability in biological concrete. *Cement and concrete composites*, 127, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2022.104413>

Jakubovskis, R., Jankutė, A., Guobužaitė, S., Boris, R., & Urbonavičius, J. (2021). Prolonging bacterial viability in biological concrete: coated expanded clay particles. *Materials, Special issue: Self-healing concrete and cement-based materials*, 14(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ma14112719>

Jakubovskis, R., Jankutė, A., Urbonavičius, J., & Gribniak, V. (2020). Analysis of mechanical performance and durability of self-healing biological concrete. *Construction and building materials*, 260, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119822>

Straipsniai kituose leidiniuose

Jakubovskis, R., Ivaškė, A., Guobužaitė, S., & Malaiškienė, J. (2024). Impact of freeze-thaw cycles on bacterial viability in concrete. *Proceedings of International Structural Engineering and Construction*, 11(2), 1–6. [https://doi.org/10.14455/ISEC.2024.11\(2\).CGC-03](https://doi.org/10.14455/ISEC.2024.11(2).CGC-03)

Summary in English

Introduction

Problem formulation

One of the most critical problems in concrete exploitation is its durability in non-ideal environments. Concrete suffers from various physical, chemical, and biological factors that lead to the degradation of the concrete and deterioration of its mechanical and structural properties. When cracks open up, aggressive substances enter through them and break down the concrete's structure, causing reinforcement corrosion. The formation of cracks cannot be prevented, but it is possible to fill them in. Synthetic materials such as epoxides can be used for this purpose, but they are expensive and only effective in the short term. On the other hand, using bacteria is an environmentally friendly method with a fast crack-filling capability and potential for long-term application.

One of the biggest challenges in developing bio-concrete is ensuring the long-term viability of bacteria. For self-healing, the bacterial spores must survive the mechanical stress of concrete mixing and tolerate extreme pH conditions. They can be immobilised into expanded clay, perlite, and hydrogel carriers to protect the bacterial spores. However, such protection alone is not sufficient as the viability of the bacteria is drastically reduced during the early curing period of concrete. Therefore, the design of self-healing concrete mixes requires the proper selection of the type of bacteria, the cement type, and the type of carrier to maintain the long-term viability of bacteria in the concrete matrix.

One of the biggest challenges in developing bio-concrete is ensuring the long-term viability of bacteria. For a crack closure to occur, the bacterial spores must survive the mechanical stresses of concrete mixing and tolerate the extreme pH conditions during concrete curing. However, these are not the only reasons for a significant reduction in the bacterial content of concrete. The composition of the cement, the curing temperature of the concrete and the environmental conditions may also determine the viability of bacterial spores. Investigating these causes could help to ensure the viability of bacteria in the concrete matrix and the effective filling of cracks in concrete.

A key requirement for the crack-filling capacity of bio-concrete is to ensure bacterial viability. To minimise the environmental impact on the bacterial spores, they can be immobilised in various carriers such as expanded clay, expanded perlite, and hydrogel. However, such protection alone is not sufficient, and the design of bio-concrete mixes requires the selection of the type of bacteria, the type of cement and the carrier to maintain the viability of the bacteria in the concrete matrix.

Recently, research on bio-concrete has been carried out around the world. However, to adapt self-healing concrete for use in the Lithuanian climate, the ability of spores to survive in the concrete matrix at low temperatures and under freeze-thaw cycles needs to be investigated. In Lithuania, there are, on average, 120 days per year when the temperature crosses 0 °C.

Relevance of the dissertation

When a crack opens in the bio-concrete samples to be exposed, the carrier with the immobilised bacteria is damaged. At this point, water and oxygen penetrate the structure, stimulating the bacterial spores to turn into vegetative cells and metabolic processes. The bacteria use the oxygen and the nutrients embedded in the carrier to release carbon dioxide and large quantities of calcium carbonate into the environment, which precipitates out and fills the cracks that open up. This blocks further water and oxygen penetration into the structure, thus protecting the reinforcement against corrosion.

Research object

The present study focuses on biological concrete mixtures containing different alkaliphilic spore-forming bacteria of the genus *Bacillus* embedded in different carriers. Biological concrete is defined as concrete containing bacterial spores whose metabolism produces calcium carbonate, which closes cracks.

Aim of the dissertation

The dissertation aims to select a bio-concrete formulation that ensures bacterial viability and to investigate the closure of cracks in it under laboratory conditions.

Objectives of the dissertation

To achieve the objective of the work, the following tasks need to be addressed:

1. To select the composition of the bio-concrete with regard to the type of bacteria, their viability and the type of cement, considering the concentration of metal oxides in the cement.
2. To determine the ability of additional coated expanded clay particles and calcium alginate microcapsules to protect the bacteria in bio-concrete.
3. To investigate the influence of environmental factors (freeze–thaw cycles, humidity) and the hydration temperature of Portland cement on bacterial viability.
4. To investigate the ability of bacteria to fill cracks in concrete under laboratory conditions.

Research methodology

The viability of the bacteria in the concrete matrix was determined by serial dilution method by spreading the bacteria on an agarose alkaline medium. Minimum inhibitory concentrations of metal oxides were determined by spreading the bacteria on an agarose alkaline medium with metal nanoparticles. The self-healing performance of the concrete specimens was measured by immersing them in water or under artificial rain conditions and measuring the crack width.

The following material engineering methods were applied: pH and electrical conductivity determination, calorimetric analysis, chemical composition determination, and microstructure analysis (scanning electron microscopy).

The scientific novelty of the dissertation

The following new results have been obtained during the preparation of the dissertation and are of relevance for materials engineering science:

1. It has been found that the concentrations of ZnO found in the main types of cement used in concrete structures kill bacteria and are not suitable for use in biological concrete.
2. Styrene-acrylate and MgO coatings on expanded clay particles with impregnated bacterial spores increase bacterial viability in bio-concrete by up to a factor of 10, as the coatings form a film that acts as a mechanical barrier blocking the pores.

The practical value of the research findings

Bacterial processes in the biological concrete fill the cracks in the bio-concrete. Alkali-tolerant and spore-forming bacteria embedded in carriers can precipitate calcium carbonate, which is deposited and fills the cracks in the concrete. This can significantly extend the lifetime of the concrete structure and reduce maintenance costs.

Defended statements

1. Zinc oxide in cement, at concentrations of at least 12.5 or 25 µg/ml, depending on the type of *Bacillus* genus bacteria, leads to the death of the bacteria in the biological concrete.

2. Expanded clay particles coated with a styrene acrylate or MgO-based coating increase the viability of bacterial spores and promote the spontaneous healing of cracks in the biological concrete.
3. Bacterial spores immobilised in expanded clay and hydrogel can survive in concrete under harsh environmental conditions, such as alkaline pH and freezing–thawing cycles.

Approval of the research findings

Five research articles were published on the dissertation topic: four were included in the *Web of Science* database, and one was in other peer-reviewed scientific journals.

The results of the research were presented at eight scientific conferences in Lithuania and online:

- International Conference “5th Congress of Baltic Microbiologists”, 2023, Vilnius, Lithuania.
- International conference “FEMS Conference on Microbiology 2022”, 2022, online.
- National Conference on Microbiology 2022, 2022, Birštonas, Lithuania.
- International Conference “European Young Engineers Conference”, 2022, online.
- International Conference “World Microbe Forum”, 2021, online.
- 64th International Conference for Physics and Natural Science “Open Readings 2021”, 2021, online.
- International Conference “1st International Electronic Conference on Microbiology”, 2020, online.
- International Conference “FEMS Online Conference on Microbiology”, 2020, online.

The structure of the dissertation

The dissertation consists of an introduction, three chapters, general conclusions, a list of references, and the author’s scientific publications on the dissertation’s topic.

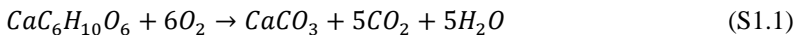
The dissertation consists of 116 pages; the text of the dissertation contains 27 numbered formulae, 31 figures, 15 tables, and 100 references.

1. Overview of biological mineralisation and the use of bacterial in biological concrete

Concrete is the most popular building material in the world, known for its high compressive strength, excellent formability, and low cost. However, its main shortcoming is low tensile strength, which makes it susceptible to cracking. Once a crack opens, water, oxygen, and salts can easily penetrate, leading to rapid corrosion of the reinforcement and deterioration of the concrete, consequently shortening the structure’s service life. Self-healing technology has emerged in recent decades as a sustainable solution to overcome the problem of cracking and deterioration of concrete. At present, several self-healing approaches are under development. These include micro- or macro-encapsulation of healing agents, biological healing, mineral admixtures, vascular systems, or shape memory alloys. One of the most environmentally friendly and efficient techniques for concrete healing is

biological healing, which is based on the use of calcium carbonate-precipitating bacteria. Biological concrete emerges as a very promising, effective, and sustainable solution for crack healing due to several important reasons: (i) the calcium carbonate precipitated by bacteria firmly adheres to the crack surface, resulting in strength recovery; (ii) the newly formed CaCO_3 is fully compatible with the concrete matrix; and (iii) crack healing is feasible for cracks up to 0.8–1 mm in width.

Alkali-tolerant and spore-forming bacterial species are commonly used to produce self-healing concrete. The healing process is only possible if the bacterial spores are dormant. They reactivate when the environmental stimuli are triggered (i.e., the nutrients start to flow through the opened crack). Bacterial spores resist many agents, including high temperatures, extreme freezing, ultraviolet radiation, desiccation, and chemical disinfectants. Some biological pathways have been proposed to achieve the precipitation of calcium carbonate. These include ureolysis, denitrification, and metabolic conversion of organic acids. *Pseudomonas aeruginosa* and *Diaphobacter nitroreducens* are typical strains of denitrifying bacteria used for this purpose. The enzyme urease is produced by the ureolytic bacteria used to precipitate the calcium carbonate. This enzyme catalyses the breakdown of urea into carbonate ions and the by-product ammonia. *Bacillus* strains such as *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, and *B. megaterium* are typically used. The disadvantage of bacteria using this pathway is that although large amounts of calcium carbonate are precipitated, ammonia is released into the environment. An alternative source of nutrients has been identified to overcome the problems of urea hydrolysis. Non-ureolytic bacteria can convert calcium-containing organic acids to calcium carbonate without releasing ammonium ions. The genus *Bacillus* also contains typical alkaliphilic bacteria capable of precipitating calcium carbonate. *B. pseudofirmus*, *B. cohnii*, *B. halodurans*, *B. subtilis*, and *B. alkalinitrilicus* are the most commonly used species for the study of self-healing concrete. In an alkaline environment, organic compounds are decomposed into CO_2 and H_2O , then CO_2 is converted to CO_3^{2-} ions, and in the presence of Ca^{2+} ions, CaCO_3 crystals can be formed due to non-ureolytic bacterial metabolism:



Ideally, bacterial viability and healing ability should be maintained for a structure's lifetime, typically 50–100 years. Unfortunately, the viability of bacteria tends to decrease drastically within the first few days after the application of biological concrete, which complicates the healing process. According to several publications, only 1–3% of intact bacterial cells survive the first week of concrete curing. The harsh concrete environment during the curing process is one of the most common explanations for bacterial mortality. With the limited amount of moisture and oxygen available, the pH of concrete can reach as high as pH 13 at an early age. Furthermore, as calcium silicate hydrate crystals form, the pore size of the concrete gradually decreases, leading to a high probability of mechanical damage being caused by bacterial spores. Both of these factors are considered significant contributors to the low survival rate of bacteria mixed directly into the concrete. Therefore, spore encapsulation protects the bacteria from the harsh concrete environment and mechanical stresses of forming C-S-H crystals. A variety of encapsulation techniques have been proposed. They are based on bacterial carriers such as silica gel, polyurethane, graphite nanoparticles, expanded perlite (EP), hydrogel, or expanded clay (EC). Expanded

clay and expanded perlite have been extensively investigated for their potential use as bacterial carriers. These materials are inexpensive and lightweight. Most importantly, they can form a strong bond with the concrete matrix. In addition, both EC and EP are highly porous. In self-healing concrete, high porosity is highly beneficial as it allows immobilisation of bacterial spores. It has been shown that bacterial spores can easily penetrate the internal pores of an EC and adhere to them, demonstrating an excellent survival ability. Furthermore, EC-embedded bacteria have been shown to survive negative temperatures as low as $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 days. Despite the advantages mentioned above of the porosity of EC and EP, this sponge-like structure may also facilitate the diffusion of metal oxide nanoparticles and thus gradually increase the toxicity to bacteria. Another promising carrier used to protect bacteria in the concrete matrix is a hydrogel. Due to their desirable gelling properties, chemical stability, biodegradability, non-toxicity, and economic advantages, natural polysaccharides such as alginate have recently been explored to prepare self-healing hydrogels. The use of such natural polymers provides a sustainable route for the development of self-healing materials.

2. Methods for the investigation of biological concrete

The strains used in the study were non-ureolytic bacterial strains. These strains were chosen because using ureolytic bacteria leads to the formation of ammonium ions during the precipitation of calcium carbonate, which is harmful to humans and causes corrosion of the reinforcement. The bacterial strains used in the study were *Bacillus pseudofirmus* (DSM 8715), *Bacillus cohnii* (DSM 6307), and *Bacillus halodurans* (DSM 497), which are spore-forming and alkali resistant. The bacterial strains were obtained from the German Microorganism and Cell Culture Collection (DSMZ, Braunschweig, Germany). According to the manufacturer's recommendations, the microorganisms were grown in liquid and solid culture media.

Five ordinary types of Portland cement from different European manufacturers were used during the studies: CEM-I 42.5 R, Akmenės Cementas, Lithuania; CEM-II/A-LL 42.5 N, Akmenės Cementas, Lithuania; CEM-I 42.5 R, Rocket, Heidelberg Cement Group, Sweden; CEM-I 42.5 N, Enci, Heidelberg Cement Group, The Netherlands; white CEM-I 52.5 R-SR5, Aalborg White, Denmark. All cement types conformed to the EN 197-1 standard.

The chemical composition of cement was determined using a wavelength dispersive X-ray fluorescence (WD-XRF) spectrometer (Rigaku ZSX Primus IV). The scan was set to identify all detectable elements at concentrations higher than 0.01% by mass. Measurements were recorded using a dual-purpose conductivity/pH meter (Mettler-Toledo MPC 227) to evaluate the electrical conductivity and pH of cement. The pH and electrical conductivity were recorded for 360 min. The heat of hydration of the Portland cement pastes was measured.

Sigma Aldrich provided metal oxide nanoparticles for the toxicity studies. Bacteria were spread onto Petri dishes with agarose nutrient media containing metal oxide nanoparticles.

For the healing agent preparation, bacteria strains were incubated in a liquid sporulation alkaline nutrient medium at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for four days. The sporulation of bacteria was quantified by staining bacteria using the Scheaffer–Fulton method and light microscopy.

The suspension was heated for 30 min at 80 °C to eliminate vegetative cells. The resulting spore suspension in a Tris-HCl (pH 9) buffer was prepared. Aliquots of suitable dilutions were spread on an alkaline nutrient agar and grown at 30 °C overnight. The grown colonies were counted after 24 hours.

Expanded clay and hydrogel capsules were used as carriers of bacterial spores in the bio-concrete. Expanded clay (4–8 mm, Liapor) was impregnated by a vacuum pressure of 0.1 MPa. The impregnation solution consists of 80 g/l calcium lactate pentahydrate, 1 g/l yeast extract, and $1 \cdot 10^8$ CFU/ml bacterial spores. Expanded clay particles were dried at room temperature until constant mass, and the number of bacterial spores they contained was determined. Cylindrical concrete specimens were cast from cement, local river sand (0/4 mm), and bacteria-immobilised expanded clay particles were obtained. The prepared concrete specimens were further used in bacterial viability studies. The influence of the type of cement, the type of bacteria, and the temperature on bacterial viability were investigated, and depending on the experiment type, the curing time of the concrete specimens varied. For each bacterial viability test, 6.53 g of concrete sample was milled into a powder that contained approximately 1 g of bacteria-embedded expanded clay. Concrete powder was suspended in the sterile 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9), homogenised, and diluted. Aliquots of suitable dilutions were plated onto alkaline nutrient agar and grown at 30 °C overnight. The obtained colonies were counted after 24 hours, and the number of CFUs was calculated by multiplying the number of grown colonies on the agar plate by the 1/dilution factor.

Expanded clay particles were additionally coated with shells. Eight different coatings were tested: potassium magnesium phosphate cement (MKPC), one layer of styrene-acrylate emulsion (A1), two layers of styrene-acrylate emulsion (A2), one layer of waterborne, latex, acrylic-composite paint (P1), two layers of waterborne, latex, acrylic-composite paint (P2), magnesium oxide and magnesium hydroxide (MgO), styrene-acrylate-magnesium oxide solution (10:1) (AM1) and styrene-acrylate-magnesium oxide solution (30:1) (AM2). Expanded clay particles were immersed into the protective solution and left to dry at room temperature. Uncoated bacteria-embedded expanded clay particles were used as a negative control, and uncoated expanded clay particles without bacteria were used as a double-negative control. Cylindrical concrete specimens were cast from white CEM-I type Portland cement, local river sand (0/4 mm), and obtained coated expanded clay particles. The prepared concrete specimens were further used in bacterial viability studies. Bacterial viability was tested using the method described above.

The effect of environmental conditions on bacterial viability was investigated by placing *B. pseudofirmus* bacteria in expanded clay particles with a styrene-acrylate emulsion coating. The white Portland cement type (CEM-I 52.5 R-SR5, Denmark) was used for this research. The influence of freeze–thaw cycles, low-temperature fluctuations, and concrete curing conditions on the viability of bacteria in the concrete matrix was investigated. Concrete samples were immersed in water and subjected to repeated freeze–thaw (FT) cycles to investigate the influence of freeze–thaw cycles on bacterial viability. One freeze–thaw cycle consisted of 2–4 days in a freezer at -20 °C, followed by 1 day of thawing at room temperature (20 °C). Twenty FT cycles were performed. The procedure was identical to freeze–thaw tests for the negative temperature fluctuations, but the specimens were kept in the air. Also, the variation of concrete curing conditions was investigated.

Concrete specimens were immersed in the water or kept in air (RH ~ 50%) at room temperature. Bacterial viability was tested using the method described above.

Prepared bacterial spores were encapsulated in hydrogel microcapsules. The spore suspension was added to the sterile encapsulation solution of 2% sodium alginate and nutrients (5 g/l peptone and 3 g/l meat extract). The final concentration of bacterial spores in the encapsulation mixture was about 10^7 bacterial spores/ml. Capsules containing nutrients and no bacterial spores were used as controls. Cylindrical specimens were prepared from cement paste and mortar using white CEM-I type 52.5 R-SR5 (Denmark) Portland cement, sand (0/4 mm), tap water, and obtained hydrogel capsules. The viability of encapsulated bacterial spores was determined 7, 14, 21, and 28 days after cement paste or mortar specimens were prepared. It was determined by dissolving five capsules in 5 mL of sterile citrate buffer and subsequent dilution. For CFU estimation, aliquots of appropriate dilutions were plated on alkaline nutrient agar plates. After 24 h incubation at 30 °C overnight, the colonies were counted. The number of bacterial spores per capsule was calculated from these counts. This methodology was used to investigate the dependence of the viability of *B. pseudofirmus* on the curing temperature of cement paste.

The self-healing efficacy was measured by immersing the samples in water. Concrete specimens with white CEM-I type 52.5 R-SR5 (Denmark) Portland cement and expanded clay particles impregnated with bacteria spores and covered with additional coatings or hydrogel-encapsulated bacterial spores were used for this research. At 7, 14, 28, and 56 days, the crack width was measured, and the self-healing coefficient was calculated according to the following formula (S2.1), where H_c is the healing ratio, w_i is the initial crack width, and w_t is the crack width after healing:

$$H_c = \frac{w_i - w_t}{w_i}, \quad (\text{S2.1})$$

Reinforced concrete specimens were also placed in specially designed rain-simulating basins for long-term incubation. Expanded clay particles impregnated with *B. pseudofirmus* bacteria and coated with styrene-acrylate coating were used. Water was automatically sprayed on the specimens for 30 minutes twice a day. After each drying cycle, the water slowly drained and evaporated from the underside of the specimens. The rest of the time, the specimens were kept in the air with relative humidity (RH) varying between 40% and 50%. Crack widths were measured after 28 and 98 days of healing, and the self-healing coefficient was calculated according to formula (S2.2).

3. Studies on bacterial viability in biological concrete

This chapter presents the following results and their evaluation: pH, electrical conductivity and exothermic temperatures of the most common cement types used in concrete structures. The investigation focused on the dependence of the viability of bacterial spores impregnated in expanded clay particles in fine-grained concrete on the type of cement and the effect of metal oxides in the cement on the viability of bacteria, and the ability of the different coatings of the expanded clay particles to protect the bacterial spores in the concrete. The influence of concrete hardening temperature and environmental conditions

(freeze–thaw and frost cycles, concrete curing conditions and humidity) on bacterial viability in concrete and on the efficiency of self-healing of cracks were investigated. The viability of bacteria encapsulated in the hydrogel in cement paste and in fine-grained concrete was also investigated, and the self-healing efficiency was assessed.

The temperature variation recorded in the cement pastes during the first 70 hours of hydration. The peak temperatures varied from 76.7 °C to 88.1 °C, the highest temperature recorded for cement CEM-I 42.5 R (Sweden). The lowest temperatures were recorded for cement types CEM-II/A-LL 42.5 N (Lithuania) and white CEM-I 52.5 R-SR5 (Denmark). It should be noted that these temperatures were obtained in cement paste samples of 100×100×100 mm in size. The internal temperatures of concrete structures are usually much lower due to heat transfer to fine and coarse aggregates. The effect of concrete curing temperature on bacterial viability was investigated. Certain types of cement can release different amounts of heat during hydration. The viability of *B. pseudofirmus* bacteria was investigated at temperatures of 20, 40, and 80 °C. Bacterial viability was not affected by temperatures up to 40 °C. However, the number of viable cells decreased more than ten-fold at 80 °C (Fig. S3.4). This indicates the damage to the bacterial spores during the curing period.

The cement pH was also measured. The pH of all cement types was in the range of pH 12.4 to pH 12.8. An alternative way of assessing the pH of cement paste is to measure its electrical conductivity. All other cement types showed comparable electrical conductivity values. These values correlated well with the pH measurements. These results show only minor differences in pH between the cement types tested. It appears that the effect of pH was non-significant concerning bacterial viability. No clear pattern indicated bacterial viability was higher in cement types with lower early-age pH. This suggests that other factors, such as the cement's chemical composition, may determine the bacteria's survival in concrete.

The viability of bacteria embedded in expanded clay particles was tested using different types of cement. The highest initial bacterial viability (3–7 days) was observed in the samples prepared using CEM-II/A-LL 42.5 N (Lithuania) (Fig. S3.1). A limestone additive (15% by weight) present in this type of cement may have partially filled the porous surface of the expanded clay. This may have protected the bacteria from the hydroxide ions. After one week, the bacterial viability declined gradually, reaching almost undetectable levels by day 60. A similar long-term (7–60 days) viability trend was also observed for the other cement types tested, except white CEM-I 52.5 R-SR5 (Denmark) (Fig. S3.3C). The results show that the long-term viability of the bacterial strain *B. pseudofirmus* in the white CEM-I 52.5 R-SR5 (Denmark) is almost 100 times higher than in the other types of tested cement.

A detailed look at the chemical composition of the cement used in this study showed that some of the detected metal oxides are known for their anti-microbiological activity. These metal oxides are MgO and Al₂O₃, TiO₂, Fe₂O₃, ZnO and CuO. Therefore, they were selected for further detailed investigation and divided into two groups according to their abundance in the tested cement. The main distinguishing feature was the evaluated mass percentage in cement, 0.29–4.94% and 0.01–0.44% for common and rare groups, respectively. All the tested cement types contained a comparable amount of the typical metal oxides. In contrast, there is more variation between the cements regarding the rare oxides.

Interestingly, white CEM-I 52.5 R-SR5 (Denmark) cement had a significantly lower amount of common and rear metal oxides. The mass per cent of selected metal oxides in cement was recalculated as mass per cent in concrete.

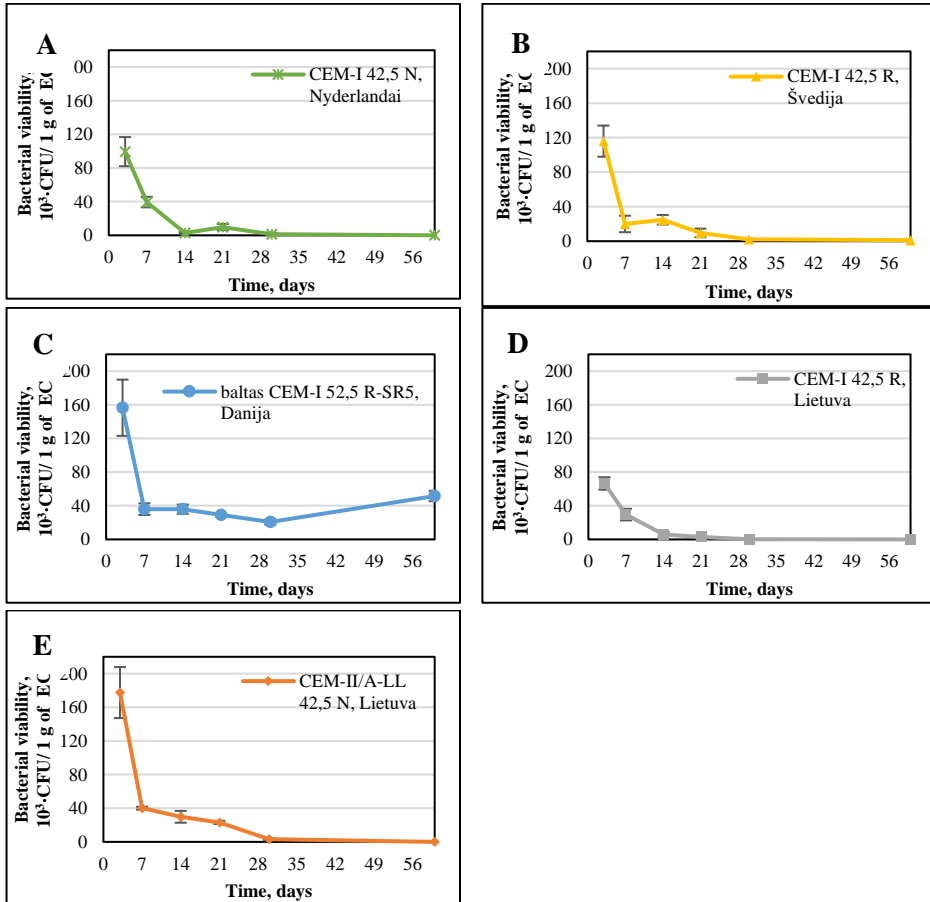


Fig. S3.1. Dependence of the viability of *B. pseudofirmus* on cement type: A – CEM-I 42.5 N, The Netherlands, B – CEM-I 42.5 R, Sweden, C – CEM-I 52.5 R-SR5, Denmark, D – CEM-I 42.5 R, Lithuania, E – CEM-II/A-LL 42.5 N, Lithuania

The minimal inhibitory concentration (MIC) values were examined separately for each metal oxide and bacterial strain to characterise the inhibitory effect of the metal oxides on the bacteria. It was found that no inhibitory effect of Fe_2O_3 , MgO , Al_2O_3 , and TiO_2 was observed at concentrations up to 2000–6000 $\mu\text{g/ml}$. The remaining metal oxides were found to be toxic. However, the remaining metal oxides were found to be toxic. Depending on the bacterial strain, MIC values varied between 12.5 $\mu\text{g/ml}$ and 25 $\mu\text{g/ml}$ and between 1500 $\mu\text{g/ml}$ and 2000 $\mu\text{g/ml}$ for ZnO and CuO , respectively. ZnO was the most toxic metal

oxide for all tested bacterial strains. The mass percentage of ZnO in the white cement concrete was not detectable, which favoured the survival of the bacteria concrete.

To increase bacterial viability in bio-concrete, expanded clay particles with embedded bacterial spores were coated with additional protective coatings. The main results of the viability of bacteria in concrete samples with differently coated expanded clay particles are shown in Fig. S3.2. The five types of coatings were significantly more protective, increasing the viability of bacteria by almost tenfold. It was one and two layers of styrene-acrylate emulsion (A1 and A2), MgO-based coating (MgO), and styrene-acrylate and magnesium hydroxide coatings prepared at the rate 10:1 and 30:1 (AM1 and AM2).

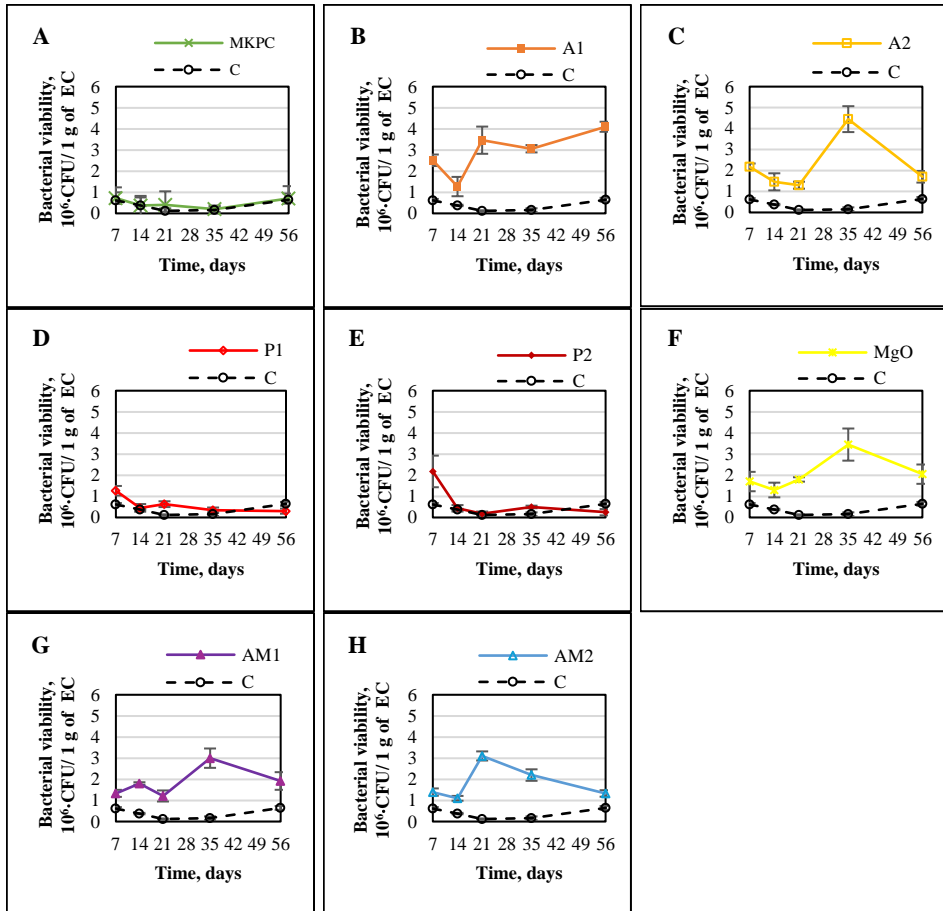


Fig. S3.2. Bacterial viability in concrete specimens produced with expanded clay particles coated with A – a potassium magnesium phosphate cement shell; B, C – one and two layers of styrene-acrylate emulsion, respectively; D, E – one or two layers of waterborne, latex, and acrylic-composite paints, respectively; F – magnesium oxide and magnesium hydroxide shell; G, H – styrene-acrylate and magnesium hydroxide solution, prepared at a rate of 10:1 and 30:1, respectively. The control sample is uncoated expanded clay particles impregnated with bacterial spores

The styrene-acrylate emulsion formed a visible glossy film on the surface of the expanded clay, sealing the pores, as shown in Fig. S3.3. The thickness of this protective layer varied from 8 to 14 μm . Interestingly, it was found that there was little or no difference whether one or two layers of styrene-acrylate emulsion coated the bacteria-embedded expanded clay particles, as the viability results were quite similar (Fig. S3.3B and C). This indicates that the mechanical blocking of the surface pores of the EC particles is sufficient to protect the bacterial spores.

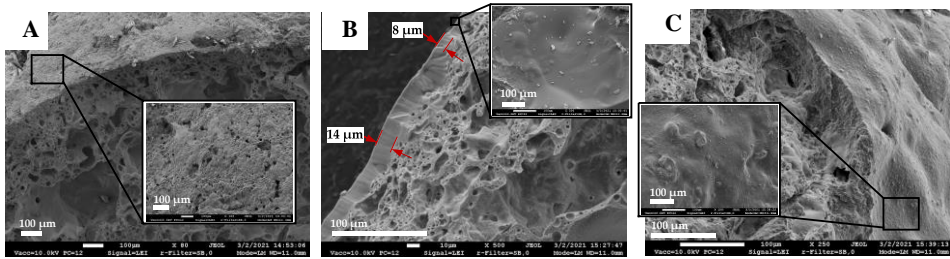


Fig. S3.3. Scanning electron microscopy images of expanded clay particles: A – an uncoated expanded clay particle with many open pores on its surface; B – an expanded clay particle with styrene acrylate coating; C – an expanded clay particle with MgO-based coating

The effect of the two most common curing conditions on bacterial viability in early-age concrete showed that after two weeks, the bacterial viability in water and air differed by more than tenfold and remained the same until day 28 of curing. It is possible that a large proportion of the bacterial spores germinated into active cells a few days after the concrete was cast, as the nutrients dissolved in the water and the substances necessary for the germination of the bacterial spores have become available to the spores in the samples stored in water. However, the vegetative cells could not proliferate without oxygen, and most of them may have died.

Fig. S3.4A shows the variation of *B. pseudofirmus* bacterial viability with low-temperature cycles. After several initial cycles, the initial bacterial count in the low-temperature-treated specimens decreased by about 50–60%. Subsequently, the viable cell counts stabilised and remained almost constant until the 20th cycle. The number of viable bacteria was similar in both control and low-temperature-treated samples. This indicates that *B. pseudofirmus* embedded in expanded clay particles coated with styrene-acrylate emulsion coating can survive repeated exposure to adverse temperatures. Similarly to the low-temperature cycles, the initial viable *B. pseudofirmus* bacterial numbers dropped by about 50% after the first few freeze-thaw cycles and remained stable until the 20th cycle (Fig. S3.4B). This trend was observed for both the specimens stored in water (positive control) and the specimens subjected to the freeze-thaw cycles, indicating that the decrease in viable spores is due to the ageing of the concrete rather than to the effect of freezing and thawing.

Spores encapsulated in 2% sodium alginate hydrogel with nutrients were used to prepare cement paste samples. In all cases, there was a decrease in spore viability. *B. pseudofirmus* and *B. halodurans* viability remained relatively constant at $32 \pm 0.74\%$ and $31 \pm 1.40\%$ on day 28. *B. cohnii* bacteria had the lowest viability in cement paste

(Fig. S3.5A). It was 19% of the initial spore viability, and this number did not change during the study. No bacterial growth was observed in control groups without bacterial spores. Capsules containing bacterial spores were then incorporated into the cement mortar. *B. pseudofirmus* bacteria, whose viability was $3.24 \pm 0.23\%$ after seven days, showed the most significant adverse effect (Fig. S3.5B). After 14 days of curing, the viability was $2.29 \pm 0.07\%$ and remained stable during the experiment. *B. cohnii* had the highest viability percentage at the beginning of the experiment ($12.36 \pm 0.69\%$). However, after 56 days, it decreased to $2.90 \pm 0.07\%$. The viability of *B. halodurans* remained above 5% throughout the experiment.

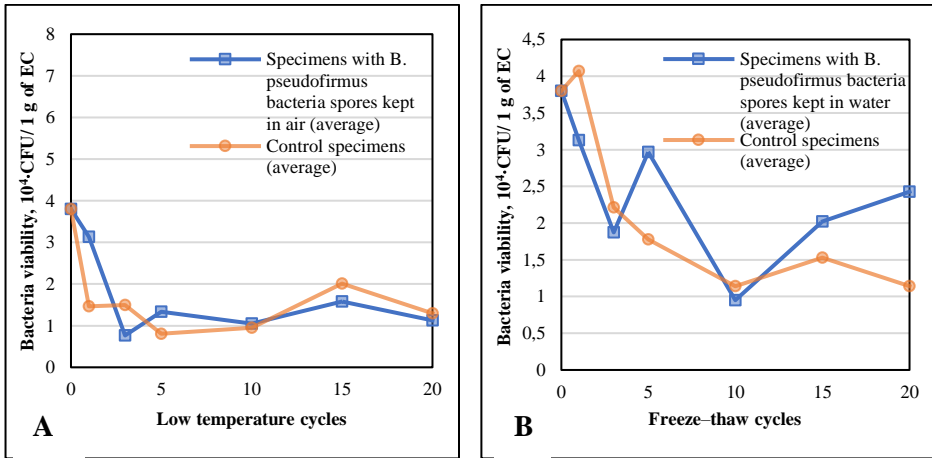


Fig. S3.4. Viability of *B. pseudofirmus* bacteria: A – during low-temperature cycles; B – during freeze-thaw cycles

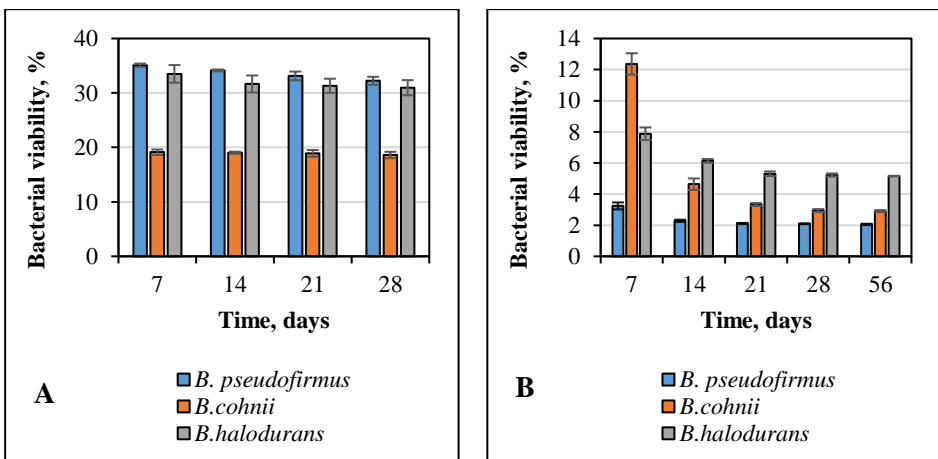


Fig. S3.5. Viability of *Bacillus* species in A – cement paste, B – mortar

Viability has been studied at 20 °C, 40 °C, and 80 °C. The results show that 2.1% of the encapsulated bacterial spores were recovered after 28 days of the mortar cured at 40 °C compared to the control samples cured at 20 °C. However, the viability of the mortar samples cured at 80 °C drastically decreased. No viable bacterial spores were detected after seven days.

The ability of bacteria to fill cracks in biological concrete samples with expanded clay particles coated with different coatings was assessed using optical microscopy. The crack filling efficiency was monitored at 14, 28, and 56 days after the concrete specimens were prepared and immersed in tap water. The negative control sample, free of impregnated bacteria and nutrients, had a self-healing ratio of 0.26 after 56 days (Fig. S3.6A). These results confirm that the concrete can fill cracks on its own to a certain extent without any active agents. A higher self-healing coefficient was observed in the negative control sample, where bacterial spores and nutrients were incorporated into the expanded clay. Still, the particles of the expanded clay are not coated. The self-healing coefficient was 0.31 in these specimens (Fig. S3.6B).

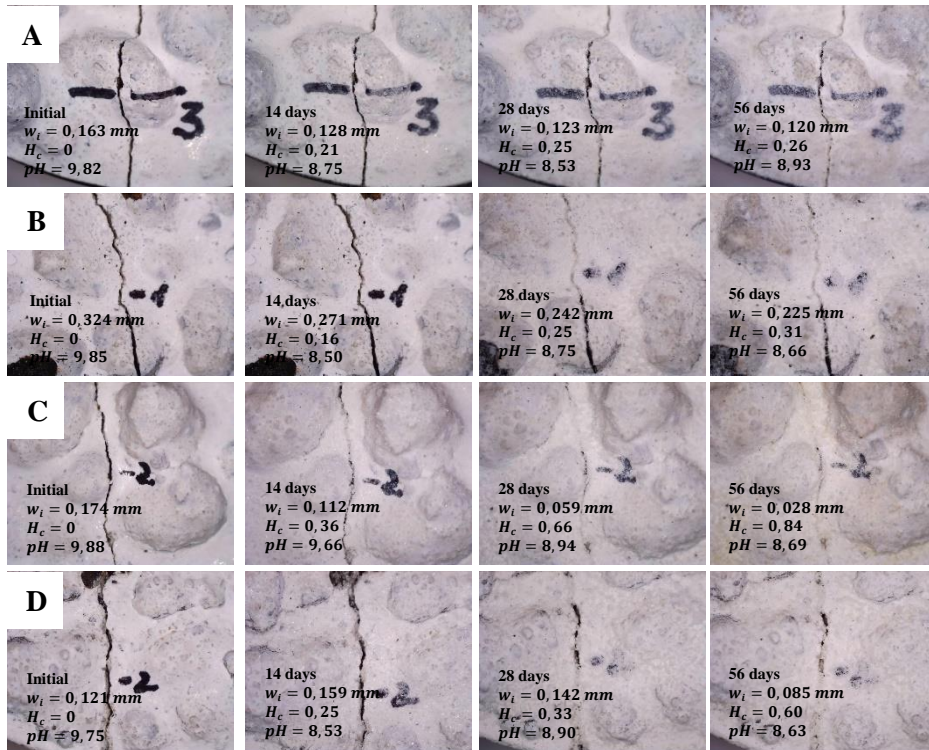


Fig. S3.6. Optical measurement of crack healing of concrete specimens with coated expanded clay particles: A – negative control specimen without coating and bacteria; B – negative control specimen with embedded bacteria, without coating; C – specimen with expanded clay particles coated with a single layer of a styrene-acrylate emulsion; D – specimen with expanded clay particles coated with a MgO-based coating

The self-healing coefficient was significantly higher in the concrete specimens with coated expanded clay particles. The self-healing coefficient of the coated specimens was 0.84 in the specimens with the styrene-acrylate emulsion coating and 0.60 in the specimens with the MgO-based coating (Fig. S3.6C and D). The results show that the self-healing efficiency of the bio-concrete specimens is closely related to the number of viable bacteria. Bio-concrete samples with more viable bacteria had a higher self-healing ratio. Therefore, to increase the viability of the bacteria in the concrete matrix and thus improve the filling of open cracks, it is necessary to coat the expanded clay particles with additional coatings.

The experimental programme for self-healing in bio-concrete elements was specifically designed to simulate self-healing conditions similar to the real-life behaviour of the structures. Artificial rain conditions were imitated for the crack healing analysis. Such healing conditions were considered to be more representative compared to conventional self-healing after immersion in water or 100% sanitary humidity indoors. The control samples showed a marginal self-healing efficiency in tests with both bacterial species, with a final self-healing coefficient ranging from 0.37 to 2.2% (Fig. S3.7). In contrast, the healing rates of the bacteria-containing samples were several times higher. The final healing rates were 13.6 and 16.8% in the samples with *B. pseudofirmus* and *B. cohnii*, respectively. However, the healing capacity of both test series was significantly lower than the results of the previous studies, with a self-healing rate of 80%. These significant differences are probably due to the different healing conditions. The previous study used water healing, whereas this study used a rain-simulated environment.

The analysis of the bacterial ability to heal cracks of 0.130–0.136 mm shows that the samples with hydrogel-encapsulated *B. cohnii* and *B. halodurans* bacteria had a higher self-healing rate – the cracks were filled after 14 days. The mortar samples with 0.213–0.288 mm cracks did not heal throughout the study. After 28 days of self-healing, crack widths and self-healing coefficients were similar for all bacterial species, reaching 0.497, 0.466, and 0.484 for *B. pseudofirmus*, *B. cohnii*, and *B. halodurans*, respectively. The cracks in the control specimens (without capsules and with capsules without bacterial spores and nutrients) were not filled.

General conclusions

1. A study of the main types of cement used in concrete structures has shown that zinc oxide in cement reduces bacterial viability in biological concrete and that it is therefore necessary to use a cement that does not contain zinc oxide.
2. With regard to the viability of the bacteria in biological concrete, the mineralisation activity and the ability to fill open cracks, *B. pseudofirmus* is the most suitable of the three species of bacteria tested.
3. Hydrogel and expanded clay can support viable bacterial spores in biological concrete. Coating of expanded clay particles with a styrene-acrylate or MgO-containing coating increases the viability of bacteria in the concrete by a factor of almost 10. The formation of a film on the surface of the expanded clay particles creates a mechanical barrier which protects the bacteria from the adverse effects of the cement components.

4. At temperatures reaching 80 °C, the viability of bacteria encapsulated in expanded clay decreases by more than a factor of 10, while the viability of bacteria encapsulated in hydrogel becomes undetectable. In medium-sized structures, these temperatures are not achievable, but in massive biological concrete structures, it is necessary to ensure that temperatures do not exceed 40 °C. Air-cured concrete samples have a viability 10 times higher than water-cured samples, where early spore germination occurs and the bacteria die.
5. In the concrete samples where the bacterial spores were encapsulated in the hydrogel, the 0.13 mm wide cracks closed completely within 21 days. In the concrete samples in which the bacterial spores were immobilised in expanded clay, cracks of 0,17-0,2 mm were not completely filled within 56 days under laboratory conditions. The effectiveness of crack closure is lower under rain and running water conditions due to the possible leaching of the calcium carbonate crystals formed from the structure.
6. The biological concrete is suitable for use in Lithuanian climatic conditions, but the number of bacterial spores in the biological concrete should be doubled, as the viability of bacteria is halved during freeze-thaw cycles.

Augusta IVAŠKĖ

BACILLUS GENTIES BAKTERIJŲ GYVYBINGUMO
POVEIKIS PLYŠIŲ UŽSIVĖRIMUI BETONE

Daktaro disertacija

Technologijos mokslai,
medžiagų inžinerija (T 008)

INFLUENCE OF THE VIABILITY OF *BACILLUS* GENUS
BACTERIA ON THE CRACK CLOSURE IN CONCRETE

Doctoral Dissertation

Technological Sciences,
Materials Engineering (T 008)

Lietuvių kalbos redaktorė Deimantė Grigaitė

Anglų kalbos redaktorė Jūratė Griškėnaitė

2025 01 06. 11,2 sp. I. Tiražas 20 egz.
Leidinio el. versija <https://doi.org/10.20334/2025-004-M>
Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Saulėtekio al. 11, Vilnius
Spausdino UAB „Ciklonas“,
Žirmūnų g. 68, 09124 Vilnius