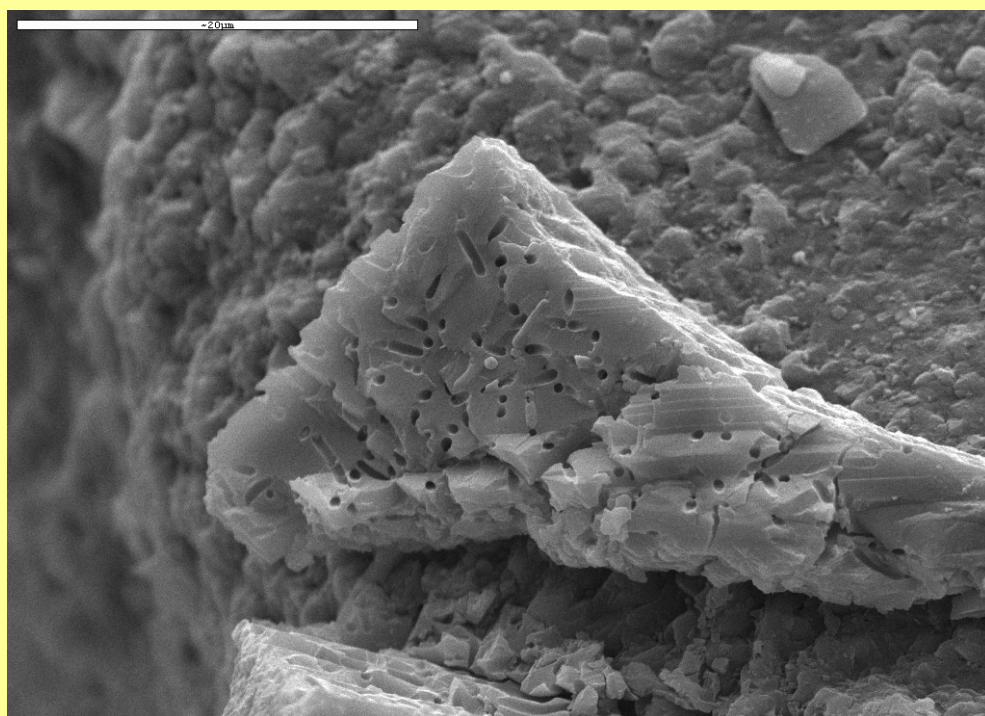




STATENS GEOTEKNISKA INSTITUT
SWEDISH GEOTECHNICAL INSTITUTE



Jordstabilisering med bioteknologi

- En förstudie

Christel Carlsson
David Bendz
Göran Holm

Varia 622

LINKÖPING 2011



STATENS GEOTEKNISKA INSTITUT
SWEDISH GEOTECHNICAL INSTITUTE

Varia 622

Jordstabilisering med bioteknologi - en förstudie

Christel Carlsson
David Bendz
Göran Holm

LINKÖPING 2011

Varia	Statens geotekniska institut (SGI) 581 93 Linköping
Beställning	SGI – Informationstjänsten Tel: 013–20 18 04 Fax: 013–20 19 09 E-post: info@swedgeo.se Internet: www.swedgeo.se
ISSN	1100-6692
ISRN	SGI-VARIA--11/622--SE
Dnr SGI	0610-0604
Uppdragsnr SGI	12998

FÖRORD

Föreliggande studie har utförts i syfte att undersöka möjligheterna att med hjälp av bioteknologi förändra jords egenskaper. Arbetet omfattar dels en litteraturundersökning om mikrobiellt modifierad jord, dels en laborativ studie av mikrobiell karbonatisering av sandig jord. Studien genomfördes redan 2008 men publiceras först nu som en rapport i den Variaserie som ges ut av Statens geotekniska institut (SGI). Av denna anledning kan en del nyare referenser till arbeten på området saknas i rapporten. År 2009 framlades t.ex. en doktorsavhandling i ämnet "Biogrouting" vid Tekniska Universitetet i Delft av Leon Van Paassen, och vid SGI har Pascal Suer m.fl. gjort en jämförande livscykelanalys av kemisk respektive biologisk stabilisering av jord som publicerats Journal of Environmental Science and Health Part A (2009) 44, 346-353. För närvarande pågår också vid SGI arbete med utveckling av en ultraljudsmetod för att kunna verifiera hållfasthetstillväxt i biostabiliserad jord i bänk-skala.

Föreliggande studie har finansierats av SGI och granskats av Lennart Larsson, SGI. Delar av arbetet kunde genomföras tack vare lån av särskild utrustning och lokal vid f.d. Ekologiska institutionen, Lunds Universitet och ett stort tack riktas därför till Professor Göran Bengtsson och Professor Christer Löfstedt för dessa lån.

Malmö 2011-10-05

Christel Carlsson

SGI

Innehållsförteckning

1	BAKGRUND OCH SYFTE	9
2	MIKROBIELL MODIFIERING AV JORD	9
2.1	PROCESSER	9
2.2	TILLÄMPNINGSOMRÅDEN	10
2.3	FRAMTIDA UTMANINGAR	10
3	MIKROBIELL KARBONATISERING I KOLONNFÖRSÖK	11
3.1	INLEDNING	11
3.2	MATERIAL OCH METODER	11
3.2.1	<i>Uppodling av mikroorganism</i>	11
3.2.2	<i>Preparation av sand</i>	12
3.2.3	<i>Tillverkning av ureamedium</i>	12
3.2.4	<i>Experimentell uppställning</i>	12
3.2.5	<i>Mikrobiell karbonatisering i kolonn</i>	13
3.2.6	<i>Kalcium-analys</i>	14
3.2.7	<i>XRD-analys</i>	14
3.2.8	<i>SEM-analys</i>	15
3.3	RESULTAT	15
3.4	DISKUSSION	18
4	HUR GÅR VI VIDARE?	18
4.1	ALLMÄNT	18
4.2	FORTSATT LABORATIVA STUDIER	19
4.3	FÄLTAPPLIKATION	19
5	REFERENSER	20

SGI

1 BAKGRUND OCH SYFTE

Olika faktorer, som högt föroreningsinnehåll, ofördelaktiga hydrauliska egenskaper (konduktivitet, kapillaritet) styvhet och hållfasthet hos naturliga jordar eller avfallsklassificerade material kan begränsa deras användning som anläggningsmaterial. Modifiering av materialegenskaper för att uppfylla ställda tekniska och miljömässiga krav är väsentligt vid all grundläggning. Speciellt stabilisering av jordar som bär last under både nya och befintliga byggnader och vid reducering av permeabiliteten vid byggande under grundvattenytan, t.ex. tunnlar. Forskning om vilka processer och materialegenskaper i nano-/mikro-/porskala som styr de makroskopiska egenskaperna, samt hur dessa kan modifieras (pore-scale engineering) är angeläget.

Syftet med denna förstudie är att göra en inledande undersökning rörande möjligheter och metoder för att förändra jords egenskaper med hjälp av bioteknik. Genom att utnyttja potentialen hos mikroorganismer att katalysera utfällningsreaktioner kan markens geotekniska och miljötekniska egenskaper modifieras.

Förstudien består av följande moment:

- 1) Litteratursökning och kunskapsinhämtning om mikrobiell modifiering av jord.
- 2) Laborativ studie av mikrobiell karbonatisering av sandig jord inklusive verifiering av registrerad effekt.

2 MIKROBIELL MODIFIERING AV JORD

Idag används flera olika metoder för att stabilisera jord i syfte att förbättra jordens mekaniska egenskaper. Kemisk stabilisering eller cementering är ett exempel på en sådan metod. Ett problem med denna metod har ibland varit att de kemikalier som använts kraftigt förändrat pH i marken eller t.o.m. varit toxiska. En innovativ metod för att stabilisera jord är att låta naturligt förekommande icke-patogena mikroorganismer katalysera utfällning av ett mineral som kan binda samman kornen, i detta fall kalcit. Genom att reglera koncentrationen av mikroorganismer och specifika näringslösningar kan karbonatiseringsprocessen styras och en utfällning skapas.

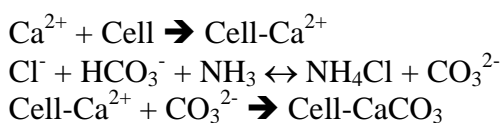
2.1 Processer

Mikrobiellt katalyserade mineralutfällningar är vanligt förekommande i porösa medium i naturen. Utfällningen är en funktion av mediet och vid gynnsamma förhållanden kan de flesta bakterier bilda utfällningar (Boquet et al., 1973). En del bakterier kan producera s.k. exo-polymerer på utsidan av cellväggarna, som bildar ett slemmigt lager som sedan kan kvarstå i naturen även efter att bakterierna dött (Lappin-Scott et al., 1988, MacLeod et al., 1988). Dessa polymerer, eller polysackarider, kan tillsammans med själva mikroorganismerna sätta igen porerna i jorden och påverka dess permeabilitet (Lappan and Scott-Fogler, 1996). Dessutom kan mikroorganismernas negativt laddade cellväggar befrämja ackumulering av metalljoner och organiska ämnen på cellväggarna som också kan påverka jordens permeabilitet (Ghiorse, 1984). Mikroorganismer kan också ackumulera oorganiska ämnen genom utfällning av t.ex. fosforiter, karbonater, silikater samt järn- och manganoxider (Beveridge et al., 1983, Ghiorse, 1984, Knoll,

SGI

1985; Ruiz et al., 1988, Rivadeneya et al., 1991). I naturliga miljöer kan dessa processer ske långsamt över geologisk tid, men vid kontrollerade förhållanden kan processerna stimuleras att ske inom några dagar (Stocks-Fischer et al., 1999, Bachmeier et al., 2002).

Ett sådant exempel på s.k. *selektiv cementering* är mikrobiell utfällning av CaCO_3 . Ett exempel på mikrobiell karbonatisering är då mikroorganismer använder urea som energikälla och producerar ammoniak som ökar pH i miljön närmast cellen, vilket får Ca^{2+} och CO_3^{2-} att falla ut som CaCO_3 (Kroll, 1990, Gollapaudi et al., 1995, Nemati et al., 2005). I en jord där urea och CaCl_2 tillsätts kan den biokemiska reaktionen summeras (Stocks-Fischer et al., 1999):



Ett annat exempel på mikrobiell utfällning är då specifika bakterier faller ut järn- och manganoxider (Jannasch and Wirsén, 1993, Dorn and Oberlander, 1981). Bakterierna skapar speciella förhållande i sin närmiljö (förhöjt pH och Eh) som befrämjar både kemisk och enzymatisk oxidation av Fe och Mn (Ghiorse 1984). De metalloxider som bildas sitter oftast på utsidan av cellväggen hos bakterierna, men kan även återfinnas innanför cellmembranet hos en del bakterier (Nealson and Tebo, 1980).

2.2 Tillämpningsområden

De ovan nämnda mikrobiella processerna kan användas för att modifiera en jords hållfasthet, styvhet och permeabilitet. Mikrobiell karbonatisering har bl.a. använts för att reparera sprickor i historiska byggnader och skulpturer (Rodriguez-Navarro et al., 2003, Webster and May, 2006) samt i berg som fungerar som oljereservoarer (Finnerty and Singer, 1983). I en laborativ studie har man visat att närvaron av en anaerob termofil bakterie (*Shewanella*) genom mineralutfällning kunde öka hållfastheten med 25% hos murbruk bestående av cement och sand (Ghosh et al., 2005). Inom oljeindustrin har man också använt mikroorganismer för att reducera jords permeabilitet (van Hamme et al., 2003). En vanlig teknik för att öka utvinningen av olja i en oljereservoir är att injektera vatten, som tränger undan oljan i porerna (water flooding). Om det ändå finns olja kvar i marken efter injekteringen beror det troligen på att jorden inte är homogen m.a.p. permeabilitet. I zoner med hög permeabilitet kan då en kombination av bakterier och näringsämnen injekteras för att stimulera bakterietillväxt och produktion av exopolymerer som tillsammans sätter igen porerna i marken och därigenom omdirigerar vattenflödet (Khire and Kahn, 1994 a, b).

2.3 Framtida utmaningar

Hittills har forskningen inom området varit fokuserad på att modifiera jord i laboratorieskala (Whiffin, 2004, DeJong et al., 2006). De biogeokemiska och fysikaliska förhållandena i jorden, salinitet, pH, temperatur, tillgång på näringsämnen, porositet, vatteninnehåll, hydrauliska egenskaper etc. påverkar förutsättningarna för att styra den mikrobiellt katalyserade processen i fält. En stor utmaning är att genomföra studier och praktiska försök i större skala och slutligen under verkliga fältförhållanden. Hur formen och strukturen hos den utfällda kalciten påverkar jordens makroskopiska egenskaper är ej

känt. Givet den fysiska och kemiska heterogeniteten som man kan förvänta sig under fältförhållande så kvarstår frågan om i vilken utsträckning som processen går att kontrollera. Ökad kunskap är nödvändigt för att kunna utforma strategier och teknik för att tillämpa tekniken i fält.

3 MIKROBIELL KARBONATISERING I KOLONNFÖRSÖK

3.1 Inledning

Vid detta försök önskades optimala betingelser för processen. Bakteriell utfällning påverkas av egenskaper hos det porösa mediet (sand), storleken på biomassan, bakteriernas metaboliska aktivitet, tillgången på näringsämnen, pH i den omgivande miljön m.m.

För att mikroorganismer ska kunna inducera utfällning av kalcit på ett effektivt sätt krävs att dessa producerar CO₂ samtidigt som de genererar ett högt pH till omgivningen. Alkaliska förhållanden krävs för att en utfällning av CaCO₃ ska kunna ske. Aeroba bakterier som kan använda urea som energikälla är särskilt bra kandidater eftersom dessa kan producera CO₂ på två sätt, dels genom att respirera, dels från nedbrytningen av urea. En sådan kandidat är *Bacillus pasteurii*, som är en vanligt förekommande aerob bakterie i marken som producerar enzymet ureas som krävs för nedbrytning av urea. *Bacillus pasteurii* är dessutom en bakterie som inte tenderar att aggregera, vilket ökar sannolikheten för en hög bakteriell specifik yta (hög kvot mellan bakteriens yta och dess volym) vilket är nödvändigt för en effektiv induktion av utfällning. Denna bakterie valdes därför som mikrobiell komponent i föreliggande experiment.

Hur den mikrobiellt inducerade karbonatiseringen kommer att påverka graden av granuler och därmed hållfastheten beror bl.a. på bakteriernas möjlighet att röra sig (aktivt eller passivt) i porerna och på graden av kontakt mellan sandkornen per volymenhet. I ett arbete av Mitchell och Santamarina (2005) finns ett resonemang kring val av sand vid mikrobiell karbonatisering i sandkolonner, där man menar att relationen mellan sandens partikelstorlek samt mikroorganismernas storlek, har betydelse för hur effektiv karbonatiseringen blir. För att uppnå en effektiv process ska bakterierna initialt enkelt kunna passera in i porerna i sanden och där tillåtas sorbera till partikelytorna. Efter tillsats av näringslösning ökar cellerna i omfattning på grund av tillväxt och hindras därmed steriskt från att passera ut ur sandens porer. *Bacillus pasteurii* förväntas vara mellan 1 och 3 µm innan tillväxt och ska inte kunna passera genom porerna i en kvartssand med partikelstorlek mellan 0,2 och 0,3 mm (DeJong et al, 2006).

3.2 Material och metoder

3.2.1 Uppodling av mikroorganism

Bacillus pasteurii (American Type Culture Collection 6453) från CCUG (Culture Collection, University of Göteborg) odlades upp på skak (150 rpm) vid 37 °C i 36 timmar i en liter av ett uppodlingsmedium innehållande 5 g pepton, 3 g köttextrakt och 20 g urea per liter destillerat vatten. Mediet hade autoklaverats 120 °C i 20 minuter varvid urea delvis sönderdelats och pH i lösningen höjts från neutralt pH till ungefär pH 8. Alkaliskt förhållande är nödvändigt för tillväxt av *Bacillus pasteurii*. Cellerna skördades genom centrifugering 1000×g vid 4 °C i 20 minuter och extracellulärt material tvättades bort

SGI

genom att supernatanten tömdes av och nytt uppodlingsmedium tillsattes. Centrifugeringen upprepades och cellerna resuspenderades slutligen i 200 ml uppodlingsmedium. Celltätheten i denna stamlösning bestämdes genom bakterieräkning i Bürkerkammare i mikroskop.

3.2.2 Preparation av sand

I studien användes Baskarpsand 25TM med ett organiskt innehåll på 0,22% (analyserat med glödningsförlust vid 1000 °C) och en kvartshalt på ungefär 73%. Sanden siktades till partikelstorlek mellan 0,2 mm och 0,3 mm och steriliserades (150 °C i 20 timmar) innan den packades i kolonner.

3.2.3 Tillverkning av ureamedium

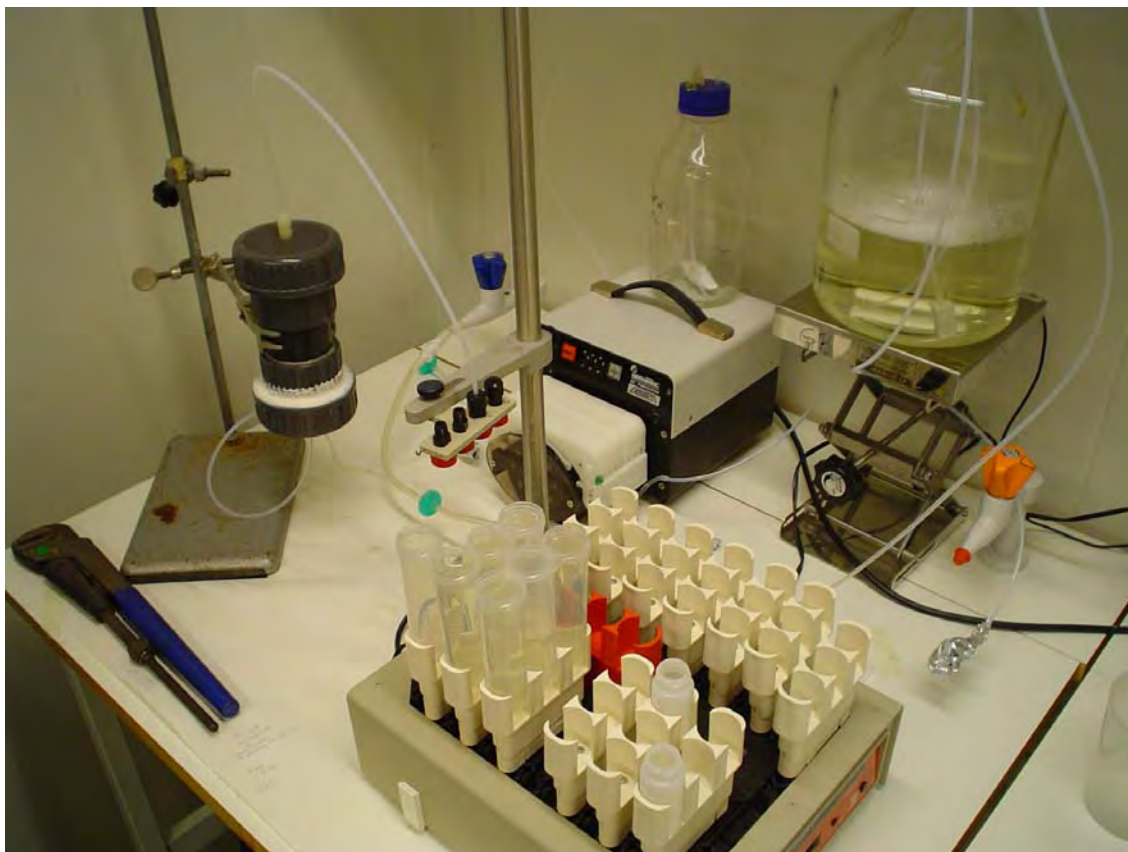
En urealösning bestående av 20 g urea ($\text{NH}_2(\text{CO})\text{NH}_2$), 10 g NH_4Cl , 2,12 g NaHCO_3 och 3 g pepton per liter destillerat vatten blandades och pH justerades genom tillsats av 6 M HCl till pH 6.0 för att minimera bakterietillväxt under lagring i kylskåp. Urealösningen sterilfiltrerades precis innan användning och pH i lösningen höjdes därefter till 7.5 genom steril luftning. En lösning med CaCl_2 (140 g/L) blandades separat och autoklaverades. Innan användning i experimentet tillsattes CaCl_2 till urealösningen så att slutkoncentrationen var ungefär 25 mM m.a.p. CaCl_2 i denna.

3.2.4 Experimentell uppställning

Figur 1 visar den experimentella uppställningen som användes i studien. Två kolonnförsök utfördes; ett experiment med tillsatta bakterier och ett kontrollexperiment utan tillsatts av bakterier. I experimentet med tillsatta bakterier användes en PVC-kolonn med en inre diameter på 57 mm och en längd på 150 mm som packades med ungefär 850 g sand. I experimentet utan tillsatta bakterier användes en mindre plastkolonn med en inre diameter på 39,5 mm och en längd på 101 mm och denna packades med ungefär 270 g sand. Kolonnernas respektive snittytor var därmed 2553 mm² respektive 1225 mm² (Tabell 1). Kolonnerna var försedda med avtagbara skruvlock i båda ändar som hade anslutningar av teflon (Swagelok) till vilka teflonslangar (1.6 mm i.d.) var monterade. Som filter vid in- och utlopp av kolonnen användes ett lager av glaskulor (2 mm i diameter) med en ungefärlig höjd av en halv till en cm. I botten av kolonnen monterades dessutom ett glest glasfilter för att hålla kvar glaskulorna i kolonnen. Bakterie- och näringslösningar förvarades i sterila glasflaskor och tillfördes kolonnerna under omrörning och luftning via teflonslangar med hjälp av en peristaltisk pump (Ismatech Reglo-Digital MS-4/8-100). Pumpen använde en pumpslang (0,38 mm i.d., Ismaprene) som sköljdes med 70% etanol innan användning. En fraktionssamlare (ISCO retriever II) användes för uppsamling av eluatet i 50 ml plastcentrifugrör (Nunc).

Tabell 1. Kolonn- och flödesdata

	Biotiskt försök	Abiotiskt kontrollförsök
Kolonns ytarea (cm ²)	25,53	12,25
Flödeshastighet (ml/min)	1	0,48
Flöde per areaenhet (cm/min)	0,039	0,039



Figur 1. Experimentell uppställning.

3.2.5 Mikrobiell karbonatisering i kolonn

Den större sandpackade kolonnen med teflonslangarna monterade autoklaverades två gånger vid 120 °C i 20 minuter med ett dygns mellanrum. En bakterielösning bestående av 400 ml urealösning med tillsatt CaCl_2 och med en celltäthet på $5,0 \times 10^6$ celler/ml pumpades sedan underifrån genom den större kolonnen med ett flöde av 20 ml/min (motsvarande en Darcy hastighet av 8 mm/min). Därefter fick bakterierna acklimatisera och sorbera till sanden under 4 timmar innan nyberedd urealösning med CaCl_2 tillfördes kolonnen med en flödes hastighet på 1 ml/min (Darcy hastighet = 0,4 mm/min). Försöket fick fortgå under 10 dagar vid denna flödes hastighet varvid eluatet kontinuerligt samlades i 50 ml fraktioner i plaströr innehållande 1 ml svavelsyra (48,5%) för att inhibera mikrobiell aktivitet. Eluatets pH mättes periodiskt under försökets gång för att kontrollera att alkaliska förhållanden ($\text{pH} > 8,2$) rådde i kolonnen. Eluatets pH var efter de första 500 ml ungefär 8,5. Därefter steg pH i eluatet till $\text{pH} > 9$ under resten av försöket. Efter 10 dagar avbröts experimentet. Då hade 11,7 liter urealösning passerat den större kolonnen.

Kontroll experimentet med den mindre kolonnen utfördes på samma sätt som beskrivs ovan, men med skillnaden att inga bakterier tillsattes den första lösningen och att hela uppställningen belystes med UV-ljus under hela experimentet för att förhindra bakterietillväxt i slangar och kärl. Flödet genom kontrollkolonnen halverades jämfört med i den större kolonnen, för att ge samma Darcy hastigheter som ovan, vilket också resulterade i att en mindre volym lösning användes till detta försök (5,5 liter). Eluatets pH mättes under försökets gång och varierade mellan 7,5 och 7,8. Försöket avbröts 0,35 liter (12

timmar) tidigare än planerat efter att den ingående lösningen infekterats av bakterier. En bakterieinfektion i urealösningen uppstod också redan efter 1800 ml. För att återupprätta abiotiskt förhållande i kolonnen tillsattes vid detta tillfälle 0,5 ml formalin (37%-ig) vid inloppet till kolonnen som sedan pumpades igenom denna. Den tillsatta mängden motsvarade en genomsnittshalt i vattenfasen i kolonnen på ungefär 0,4%.

Efter avslutat experiment öppnades de båda kolonnerna och sanden pressades underifrån ut ur dessa och hyvlades av i portioner som sparades i kylskåp för vidare analys.

Experimenten med de båda kolonnerna utfördes inte parallellt utan efter varandra i tid.

3.2.6 Kalcium-analys

Halten kalcium i lösningar och eluat bestämdes med ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, Perkin-Elmer Optima 3000 DV) av laboratoriet vid Växtekologiska institutionen, Lunds Universitet. Halterna kalcium i ingående lösningar samt i 6 prov på eluatet bestämdes i det biotiska försöket med den större kolonnen (Tabell 2). Prover på eluatet togs jämnt fördelat över tid. I det abiotiska kontrollexperimentet bestämdes halterna på ingående lösningar och i fyra prov på eluatet under försökets gång.

Tabell 2. Kalciumhalter i lösningar och eluat, samt ackumulerad volym av eluat i biotiskt försök och i abiotiskt kontrollförsök.

Biotiskt försök				Abiotiskt kontrollförsök			
provnr	Ca-halt i ingående lösning (mg/l)	Ca-halt i eluat (mg/l)	Ackumulerad volym (l)	provnr	Ca-halt i ingående lösning (mg/l)	Ca-halt i eluat (mg/l)	Ackumulerad volym (l)
24	1630	1,89	1,075	8	441	395	1,646
46	909	1,10	1,818	36	1427	811	2,7735
90	869	1,02	6,466	88	1399	981	4,2246
155	1600	1,23	7,017	114	1448	768	5,4903
207	1080	1,23	10,324				
250	1050	1,23	11,678				

3.2.7 XRD-analys

Röntgendiffraktion för pulver (Pulver XRD) har här använts för att karakterisera ett prov av den karbonatiserade sanden för att undersöka vilka kristallina utfällningar som har skett i materialet. Genom att analysera diffraktionsmönster med en speciell programvara och en databas med kända diffraktionsmönster så kan den kristallina fasen bestämmas. Om det inte funnits några kristallina faser och materialet hade varit helt och hållet amorft skulle inga ”toppar” ha registrerats utan det skulle endast ha blivit ett bakgrundsbrus. XRD analys genomfördes på ett litet prov som togs i den karbonatiserade delen i kolonnens botten med följande utrustning: Bruker D8 Advance, radiation: CuK α , Bragg-Bentano geometry.

SGI

3.2.8 SEM-analys

Analys av den karbonatiserade sanden gjordes också med SEM (Scanning Electron Microscopy) modell Philips 515 vid institutionen för Klinisk Vetenskap, avdelningen för Elektronmikroskopi, Lunds Universitet. Både SEM bilder och energispektra framställdes.

3.3 Resultat

I den större kolonnen (biotiskt försök) där bakterier tillsatts hade ett fast material bildats i botten av kolonnen genom utfällning så att glaskulorna som fungerade som filter i kolonnen helt var inneslutna i detta. Kalcitutfällning hade även skett i den del av sanden som var närmast glaskulorna i botten av den större kolonnen (Figur 2). I den abiotiska kontrollkolonnen hade ingen synlig fast fällning bildats (okulärt bestämt efter avslutat försök).



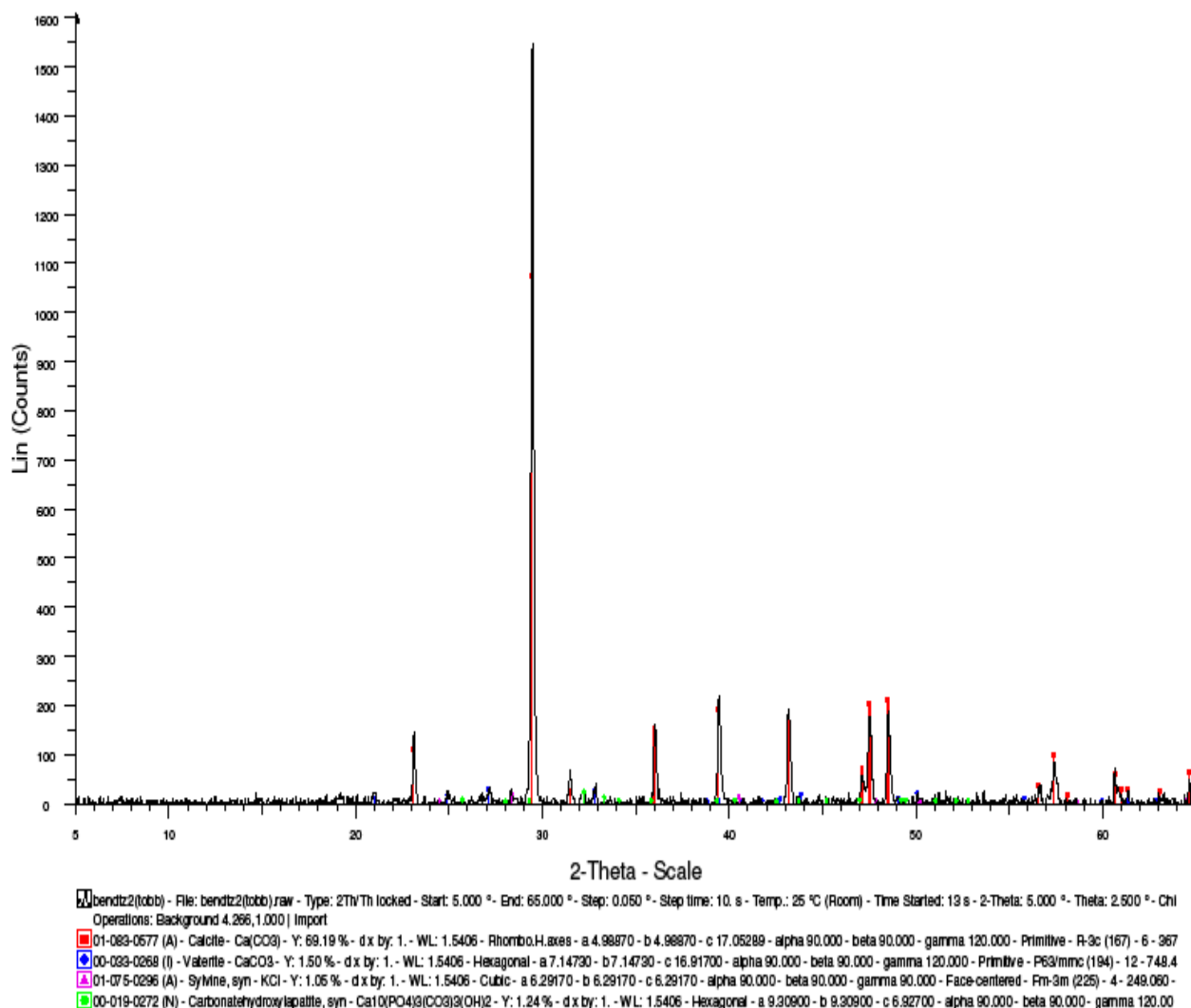
Figur 2. Sandsten bildad under det biotiska kolonnförsöket med tillsatta bakterier (vänster) och ursprungssanden (höger).

Mängden kalciumkarbonat som fällt ut i kolonnerna beräknades utifrån skillnaden i koncentrationen kalcium i ingående lösning och i eluatet vilken var 12,3 g Ca i den större kolonnen och 2,2 g Ca i kontrollkolonnen (Tabell 3). Detta motsvarade 30,8 g CaCO_3 i den stora kolonnen och 5,6 g CaCO_3 i kontrollkolonnen (eller 1,2 g CaCO_3 per cm^2 sand i den större kolonnen och 0,46 g CaCO_3/g sand i kontrollkolonnen).

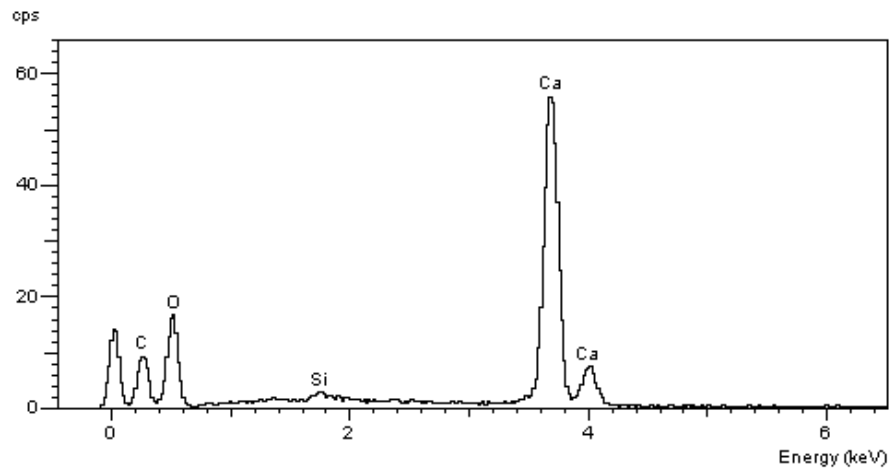
Tabell 3. Skillnader i mängden kalcium i ingående lösning och i eluat samt beräknade mängder utfälld CaCO_3 i kolonnerna i biotiskt försök och i abiotiskt kontrollförsök

	Biotiskt försök	Abiotiskt kontrollförsök
Differens $\text{Ca}(\text{in}) - \text{Ca}(\text{ut})$ (g)	12,3	2,2
Beräknad mängd CaCO_3 kvar kolonnen (g)	30,8	5,6
CaCO_3 per ytenhet (g/cm^2)	1,20	0,46

Vid XRD-analys erhöles det diffraktionsmönster som visas i figur 3. Mönstret visar att utfällningen huvudsakligen består av kalcit (CaCO_3), men också till ungefär 4-5% av vaterit som är en metastabil form av CaCO_3 . Det finns ytterligare två små toppar som möjligtvis kan representera sylvit och apatit, men utgör i så fall högst 2-4 % (personlig kommunikation Madai, 2007).

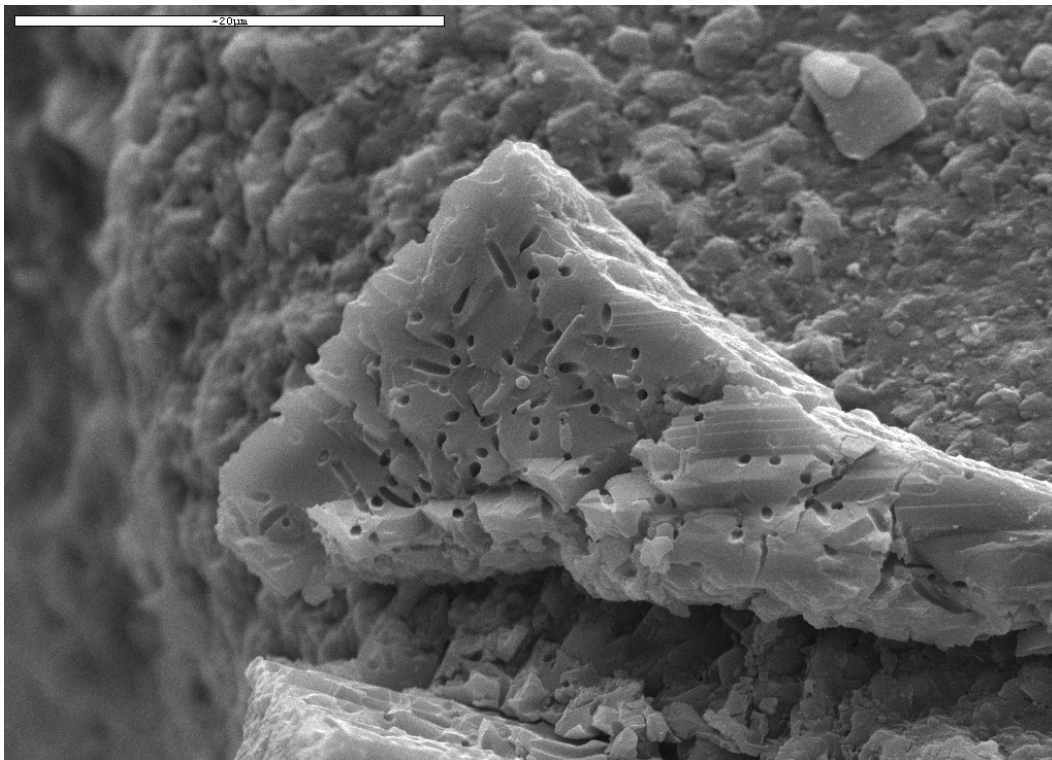


Figur 3. Röntgendiffraktogram som visar mönstret för kalcitutfällningen. Utfällningen består av kalcit (CaCO_3), men också till ungefär 4-5% av vaterit som är en metastabil form av CaCO_3 . Det finns ytterligare två små toppar som möjligtvis kan representera sylvit och apatit, men utgör i så fall högst 2-4 % (personlig kommunikation Madai, 2007).



Figur 4. Ett energispektra framtaget med SEM som identifierar de ingående elementen i de bildade kalcitkristallerna, dvs. Ca, C och O.

Vid analys med SEM bekräftades genom energispektra (figur 4) att de bildade kristallerna innehöll Ca, O och C. Analys med SEM visar att kristaller fällts ut på sandkornen och att kristallerna har innehållit och delvis fortfarande innehåller bakterier (figur 5).



Figur 5. SEM-bild med 2620 ggr förstoring som visar en delad kalcitkristall på ytan av ett sandkorn. Den blottade kristallytan visar de hålrum där de kalcitproducerande bakterierna funnits. Några bakterier syns också kvar inuti kristallen. Längden på den vita liggande stapeln i bilden motsvarar 20 µm.

3.4 Diskussion

Försöket visar att fast kalksandsten skapats av lös sand då näringslösning och specifika mikroorganismer tillsatts till kolonnssystemet med packad sand. Försöket fick fortgå under 10 dagar. Sista dagen började den stora kolonnen läcka. Detta berodde förmodligen på att utfällningen av kalцит var så omfattande i botten av kolonnen att lösningen inte kunde tränga igenom materialet vidare upp i kolonnen. Ett sätt att undvika att kalцитutfällning endast sker i botten av kolonnen skulle kunna vara att tillföra lösningen snabbare genom att använda ett högre flöde. Då skulle lösningen hinna längre upp i kolonnen innan kalцитutfällningen sker. Man skulle också kunna tänka sig batchvis tillsats av lösningen såsom gjordes i arbetet av DeJong et al (2006). Eventuellt hade högre koncentrationen av urea och CaCl_2 också kunnat öka karbonatiseringen högre upp i kolonnen.

Verifiering av bildandet av kalцит har gjorts genom massbalansberäkningar, kemisk analys, röntgendiffraktometri och elektronmikroskopering. Dessutom har kontrollförsök utförts utan tillsats av mikroorganismer. Enligt massbalansberäkningen m.a.p. innehållet av kalcium i ingående lösning och i eluatet, var det en relativt stor andel av det kalcium som tillfördes i kontrollförsöket som också blev kvar i kolonnen. Det kan inte uteslutas att denna mängd kalcium omvandlades till CaCO_3 i kontrollkolonnen. Eftersom urealösningen i kontrollexperimentet tidigt infekterades av bakterier är det också sannolikt att kolonnen trots den tillsats av biocid (formalin) som gjordes innehöll bakterier (om än inte i den omfattning som i huvudexperimentet) som kunnat bidra till en karbonatiseringsprocess lokalt inuti kolonnen, även om pH i eluatet inte indikerade tillräckligt höga värden för att utfällningen av karbonat skulle vara optimal. För att veta om CaCO_3 bildats måste sanden från denna kolonn analyseras. Koncentrerad formalin har mycket lågt pH (uppmättes till ungefär 4). För att kontrollera att tillsatsen av formalin inte skulle innebära en sådan pH-sänkning i kontrollkolonnen så att en eventuellt bildad kalцит i denna kunde gå i lösning, mättes pH i ett batchtest där formalin (0,4%) tillsatts lösningen. Testet visade inte på någon pH-sänkning utöver den variation som fanns över tid i eluatet. Eftersom tillsatsen i kontrollförsöket gjordes i en puls, kan det dock inte helt uteslutas att det lokalt i inloppet till kolonnen kan ha uppstått ett lägre pH i kontrollkolonnen än det som uppmättes i batchtestet. Eluatets pH var dock runt pH 7.7. Kontrollförsöket avbröts i förtid eftersom urealösningen infekterats med bakterier. Vid mikroskopering av eluatet i kontrollförsöket visades att bakterier fanns med i eluatet.

4 HUR GÅR VI VIDARE?

4.1 Allmänt

Tekniken med mikrobiell karbonatisering förefaller ha flera viktiga tillämpningsområden. Det designade materialet (d.v.s. mikrobiellt bildad kalцит i en granulär matris), kan utgöra ett element i en teknisk konstruktion, t.ex. en grundläggnings- eller jordförstärkningskonstruktion genom

- en ökning av hållfasthetsegenskaperna i en granulär matris till följd av att korn cementeras/fästs vid varandra och skapar en fast struktur.
- en reducering av porositet och permeabilitet hos en porös matris.

Ett annat möjligt tillämpningsområde är reparation av sprickor i historiska byggnader och skulpturer (Rodriguez-Navarro et al., 2003, Webster and May, 2006). I en laborativ

SGI

studie har man visat att närvaron av en anaerob termofil bakterie (Shewanella) genom mineralutfällning kunde öka hållfastheten med 25% hos murbruk bestående av cement och sand (Ghosh et al., 2005). Det bör också nämnas att det finns mycket kunskap om mineralutfällningens (kalcit) beständighet i olika geokemiska miljöer.

Den stora konkurrensfördelen är att materialet kan skapas på plats, även på svåråtkomliga ställen och att på platsen befintligt material (jorden) utnyttjas. Exempelvis en befintlig och bristfällig grundläggning av en byggnad kan förstärkas på plats genom att injektera mikroorganismer, kalcium och näringslösning under byggnaden. Ett annat exempel är tätning av jordlagret mellan underkant spont och berg. Studien demonstrerar att råvarans (jordens) struktur kan manipuleras med bioteknologi för att förändra dess uppbyggnad (hållfasthet, porositet och permeabilitet). På så sätt kan materialet få en önskad funktionalitet och ingå som ett element i en grundläggningskonstruktion. Men, de styrande processerna och inverkan av viktiga systemparametrar bör utredas ytterligare.

4.2 Fortsatta laborativa studier

Fortsatta forskningsinsatser kommer att vara inriktade på följande moment i labskala:

- Framtagning av metod för att följa process och hållfasthetstillväxt
- Alternativa försöksuppställningar som på ett mer realistiskt sätt återspeglar fältförhållanden (t.ex. 2D, resp. 3D-box)
- Styrning av karbonatiseringsprocessen (koncentration, flöde, pH etc.)
- Försök med alternativa substrat och alternativa bakteriearter (inklusive befintlig mikroflora i jord)
- Geokemisk modellering av processen

4.3 Fältapplikation

Tekniken är ytterst lite undersökt i fält, men på basis av ovanstående kan planering av fältförsök ske för att verifiera effekt i fältskala. Utveckling av injekteringstekniker för att styra spatiell tillväxt av utfällningar är angeläget. En analys bör ske av vilken ytterligare dokumentation och undersökningar som måste göras för att tekniken skall vara intressant att utveckla:

- Acceptans för att injektera bakterier i mark
- Alternativa substrat, alternativa bakteriestammar
- Effekt av närvaro av andra bakteriestammar
- Styrning av karbonatisering (koncentration, flöde, pH, etc)
- Beständighet

5 REFERENSER

Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R., Bang, S.S. (2002) Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology* 93:171-181.

Beveridge, T.J., Meldoche, J. D., Fyfe, W.S., Murray, R.G.E. (1983) Diagenesis of metals chemically complexed to bacteria: laboratory formation of metal phosphates, sulfides, and organic condensates in artificial sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3):1094-1108.

Boquet, E., Boronat, A., Ramos-Cormenzana, A. (1973) Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246 December 21/28.

DeJong, J, Fritzges, M.B., Nusslein, K (2006) Microbially induced cementation to control sand response to undrain shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental engineering* 132:1381-1392.

Dorn, R.I., Oberlander, T. M. (1981) Microbial origin of desert varnish. *Science* 213 (4513): 1245-1247.

Finnerty, W.R., Singer, M.E. (1983) Microbial enhancement of oil-recovery. *Biotechnology* 1(1):47-54.

Ghiorse, W. C. (1984) Biology of Iron- and Manganese-depositing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 38:515-550.

Ghosh, P. Mandal, S., Chattopadhyay, B.D., Pal, S. (2005) Use of microorganisms to improve strength of cement-mortar. *Cement and Concrete Research* 35:1980-1983.

Gollapudi, U.K., Knutson, C.L., Bang, S.S., Islam, M.R. (1995) A new method for controlling leaching through permeable channels. *Chemosphere* 30(4):695-705.

Jannasch, H. W., Wirsén, C.O. (1981) Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2):528-538.

Khire, J.M. Kahn, M.I. (1994a) Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanisms of microbial enhanced oil recovery. *Enzyme Microb. Technol.* 16:170-172.

Khire, J.M. Kahn, M.I. (1994b) Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 2. Microbes and subsurface environment for microbial enhanced oil recovery. *Enzyme Microb. Technol.* 16:258-259.

Knoll, A.H. (1985) The distribution and evolution of microbial life in the late proterozoic era. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:391-417.

SGI

Kroll, R.G. (1990) Alkalophiles. In Edwards, C. (Ed.), *Microbiology of Extreme Environments*. McGraw-Hill, New York, pp. 55-92.

Lappan, R. E., Scott Fogler, H. (1996) Reduction of porous media permeability from in situ *Leuconostoc mesenteroides* growth and dextran production. *Biotechnology and Bioengineering* 50:6-15.

Lappin-Scott, H.M., Cusack, F. Costerton, J.W. (1988) Nutrient resuscitation and growth of starved cells in sandstone cores: a novel approach to enhanced oil recovery. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6):1373-1382.

MacLeod, F.A., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W. (1988) Plugging of a model rock system by using starved bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6):1365-1372.

Mitchell, J.K., Santamarina, J.C.(2005) Biological considerations in Geotechnical Engineering. *Journal of geotechnical and geoenvironmental engineering.* 131:1222-1233.

Nealson K.H., Tebo, B. (1980) Structural features of manganese precipitating bacteria. *Origins of life and evolution of the biosphere* 10(2):117-126.

Nemati, M. Greene, E.A., Voordouw, G. (2005) Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: comparison with enzymic option. *Process Biochemistry* 40:925-933.

Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Quesada, E., Ramos-Cormenzana, A. (1991) Precipitation of calcium carbonate by *Deleya halophila* in media containing NaCl as sole salt. *Current microbiology* 22:185-190.

Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Chekroun, K. B., Gonzalez-Munoz, M. T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(4):2182-2193.

Ruiz, C., Monteolivia-Sanches, M., Huertas, F., Ramos-Cormenzana, A. (1988) Calcium carbonate precipitation by several species of *Myxococcus*. *Chemosphere* 17:835-838.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. Bang, S.S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry* 31:1563-1571.

Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O.P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):503-549.

Webster, A. May, E. (2006) Bioremediation of weathered-building stone surfaces. *TRENDS in Biotechnology* 24(6):255-260.

Whiffin, V.S., (2004) Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement, in School of Biological Sciences and Biotechnology. Murdoch University, Western Australia: Perth.



Statens geotekniska institut
Swedish Geotechnical Institute

SE-581 93 Linköping, Sweden

Tel: 013-20 18 00, Int + 46 13 201800

Fax: 013-20 19 14, Int + 46 13 201914

E-mail: sgi@swedgeo.se Internet: www.swedgeo.se