creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학석사학위논문

호알칼리성 포자형성 미생물의 탄산칼슘형성 작용을 이용한 콘크리트 미세균열에 자가치유 능력 부여 연구

Development of concrete with microcrack self-healing ability based on bacterial calcium carbonate formation

2014년 2월

서울대학교 대학원

건설환경공학부

정 보 영

호알칼리성 포자형성 미생물의 탄산칼슘형성 작용을 이용한 콘크리트 미세균열에 자가치유 능력 부여 연구

Development of concrete with microcrack self-healing ability based on bacterial calcium carbonate formation

지도교수 남 경 필

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2014 년 2 월

서울대학교 대학원
건설환경공학부
정 보 영

정보영의 석사 학위논문을 인준함
2014 년 2 월

위 원 장 한 무 영 (인)
부위원장 남 경 필 (인)
위 원 김 재 영 (인)

국문초록

콘크리트는 내구성이 우수하고 시공성, 경제성이 뛰어나 건설재료로 널리 사용되고 있지만, 각종 요인에 의하여 쉽게 균열이 발생한다는 문제점을 가진다. 미세한 균열의 발생은 결과적으로 구조물의 성능 저하를 유발하기 때문에 미세균열의 조기 치유는 균열의 성장으로 인한 구조물의 내구성 악화를 방지할 수 있다. 하지만 0.1 mm이하의 폭을 가지는 미세균열은 육안을 통한 검출과 보수가 어렵고, 기존에 쓰이고 있는 화학적인 보수 방법들이 친환경적이지 못할 뿐 아니라 균열 발생 시 마다 적절한 조치를 취해야 하는 어려움이 있어서, 최근에는 미생물을 이용하여 콘크리트에 균열 자가치유(Self-healing) 능력을 부여하는 연구가 진행되고 있다. 콘크리트 균열의 자가치유는 특정 미생물에 의하여 콘크리트 내 탄산칼슘 결정의 형성이 유도되고, 형성된 탄산칼슘이 콘크리트 균열 부위를 채우면서 일어난다. 이 때, 탄산칼슘 결정은 충분한 칼슘과 무기탄소가 있는 환경에서 형성되고, 미생물은 결정 형성에 유리한 환경을 조성하며, 결정 생성 초기에 핵형성위치(Nucleation site)를 제공하고, 결정 성장과정에서 상호작용하여 결정의 형상과 구조를 결정한다.

본 연구에서는 콘크리트와 같은 높은 pH에서 생존이 가능하고 물리적 압력과 수화열 등에 내구성을 가지는 포자(spore)를 형성하는 미생물을 분리하고, 이 미생물들의 생체광물 형성 능력을 확인하였다. 또한 미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가에 따른 탄산칼슘 결정의 형상과 구조의 변화를 살펴보고, 이러한 물질들의 첨가가 콘크리트의 강도 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 이와 같은 기초연구들에 기반 하여, 콘크리트에 인공 미세균열을 유발한 후 미생물의 생체광물 형성에 의한 콘크리트 미세균열 자가치유를 유도하고, 현미경 관찰을 통해 균열의 치유과정을 살펴보았다.

콘크리트 균열 자가치유에 적합한 미생물을 분리하기 위하여 약알칼리(pH 8~9)의 시화호 갯벌 토양에 서식하는 토양미생물 중 pH 10 (Nutrient Broth+ 10% Na-sesquicarbonate solution)에서 활동성을 가지며 10분간의 80℃ 열충격에 견디는 미생물 97종을 분리하고, 현미경 관찰을 통해 포자를 충분히 형성하는 22종을 선별하였다. 이들의 성장 정도를 비교하여 6종의 미생물을 최종 선택하고 16S ribosomal DNA 염기서열 분석

을 실시하였다. 선별된 6종 미생물은 모두 *Bacillus pseudofirmus*와 100%의 상등성을 가졌고, DDBJ에 *Bacillus sp. BY1*(Accession number: AB830103)으로 등록하였다. *Bacillus sp. BY1*에 대해 pH 10부터 pH 13의 범위에서 pH 내구성을 확인한 결과, pH 10에 비해 pH 11에서는 느린 성장을 보였고, pH 12 이상에서는 성장은 일어나지 않았지만 일정 개체 수는 유지하였다. *Bacillus sp. BY1*을 젖산칼슘(Calcium lactate)과 시트르산나트륨(Sodium citrate), 중탄산나트륨(Sodium bicarbonate)이 포함된 영양배지(Nutrient Broth)에 접종하고, 30℃ 200 rpm에서 48시간 경과 후 현미경 관찰을 통해 탄산칼슘 결정의 형성을 확인하였다.

미생물의 존재 유무는 탄산칼슘 결정의 형상에 큰 차이를 야기하였다. 미생물을 주입하지 않은 경우 결정은 능면체, 구정상의 비교적 규칙적인 결정상으로 나타난 반면, 미생물을 주입한 경우 비교적 크기가 크고 울퉁불퉁하고 불규칙적인 구형의 결정이 형성되었다. 미생물은 결정 생성 초기에 세표 표면을 핵형성 위치로 제공하였고, 미생물과 탄산칼슘의 계속적인 상호작용을 통해 결정이 성장하였다. 충분히 성장한 결정은 서로 교차(Bridge)를 형성하고, 쌍결정(Twin-crystal) 혹은 다결정(Poly-crystal)을 이루어 존재하였다. 결정의 형상은 첨가해준 칼슘유기산의 종류에 따라서도 다르게 나타났다. 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가했을 때 결정은 구정상(spherical)의 결정들이 모여 있는 형상인 반면 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가했을 때의 결정은 능면체(Rhombohedral) 결정들이 결합한 모습으로 관찰되었다. 미생물과 칼슘유기산의 첨가는 탄산칼슘 결정의 광물 구조에도 영향을 미쳤다. 미생물이 존재하지 않을 때는 주로 방해석(Calcite)의 결정 형성된 반면, 미생물이 존재 할 때에는 방해석(Calcite)과 아라고나이트(Aragonite) 함께 형성이 되었고, 아라고나이트(Aragonite)의 형성 비율은 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 가장 높게 나타났다.

미생물과 칼슘물질들의 첨가가 콘크리트 모르타르의 압축강도에 미치는 영향을 확인한 결과, 콘크리트 모르타르 시편의 압축강도는 미생물의 농도가 증가함에 따라 94.2%에서 90.5%로 감소하는 경향을 보였지만, 칼슘물질을 첨가하였을 시에는 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 109.5%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 109.9%, 젖산칼슘

(Calcium lactate) 첨가 시 116.4%로 칼슘유기산의 종류와 무관하게 강도가 모두 증가하였다. 미생물과 칼슘유기산을 모두 첨가하였을 때에는 칼슘유기산이 수화촉진제로서의 작용하여 미생물의 의한 강도 감소효과를 상쇄시켰고, 따라서 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 111.9%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 115.0%, 젖산칼슘(Calcium lactate) 첨가 시 111.5%로 강도가 증가하였다.

콘크리트의 미세균열이 치유되는 과정을 5주간의 현미경촬영을 통해서 살펴본 결과, 미생물 존재 시에 균열이 더 빠르게 치유되는 것이 보였으며, 균열의 내부부터 채워지는 모습을 확인할 수 있었다. 첨가한 칼슘원의 종류에 따라서도 균열 치유 부위는 다른 모습으로 나타났다. 칼슘원으로 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때에 균열 부위를 메꾼 물질은 주위 시멘트와 비슷한 모습이었지만, 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 균열을 메꾼 물질은 주변의 시멘트 매트릭스와 다른 모습으로 약간의 광택을 띄었다.

본 연구를 통해 미생물의 생체광물 형성 능력을 콘크리트 미세균열 자가치유에 적용하기 위한 연구를 수행하였다. 알칼리성 토양으로 분리한 호알칼리성 포자형성 미생물은 콘크리트 내에서의 생존에 유리할 것이며 탄산칼슘 결정의 성장에도 기여할 것이다. 또한 칼슘 첨가 물질에 따라 다양하게 나타나는 결정의 형상은 균열의 충진 효율을 높이는 데 활용될 수 있을 것이다. 미생물의 첨가에 의한 압축강도 감소와 칼슘유기산 첨가제에 의한 압축강도 증가는 전체적으로 콘크리트 모르타르의 압축강도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 본 연구의 최종 결과물은 기존에 사용되고 있는 균열보수제가 환경에 치명적이고 효과가 지속적이지 않아서 야기되었던 문제들을 해결하고, 건설재료 분야뿐만 아니라 미생물의 탄산칼슘형성 능력을 적용할 수 있는 다양한 연구 분야에서 자료로서 사용될 것으로 기대한다.

주요어 : 자가치유 콘크리트, 미세균열 보수, 호알칼리성 포자형성 미생물, 생체광물형성, 탄산칼슘, 친환경 스마트 콘크리트

학 번 : 2012-20919

목 차

1. 서론 ····· 1
1.1. 연구의 배경 ····· 1
1.2. 연구의 목적 ····· 3
1.3. 연구의 범위 ····· 4

2. 문헌 연구 ····· 5
2.1. 콘크리트 균열 ····· 5
2.1.1. 균열의 형성 및 평가 ····· 5
2.1.2. 콘크리트의 보수와 보강 ····· 9
2.2. 자가치유 ····· 11
2.2.1. 자가치유 콘크리트 ····· 11
2.3. 미생물의 생체광물 형성 ····· 15
2.3.1. Microbially induced carbonate precipitation ····· 16
2.3.2. Microbially controlled carbonate precipitation ····· 19
2.3.3. 생체광물 구조와 형상 ····· 20

3. 실험 재료 및 방법 ····· 22
3.1. 실험 재료 ····· 22
3.1.1. 미생물 ····· 22
3.1.2. 모르타르와 콘크리트 ····· 23
3.1.3. 칼슘유기산 ····· 24

3.2. 실험장치 및 방법 ····· 25
3.2.1. 미생물 분리 ····· 25

3.2.1.1. 호알칼리성 포자형성 미생물의 분리 ····· 25
3.2.1.2 미생물의 pH 저항성 평가 ····· 26
3.2.1.3 생체광물 형성 실험 ····· 27
3.2.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가에 따른 결정의 형상과 구조 28
3.2.3. 미생물과 칼슘유기산 첨가에 따른 콘크리트 압축강도 30
3.2.3.1. 모르타르 공시체 제작 ····· 30
3.2.3.2. 압축강도 측정 ····· 34
3.2.4. 자가치유에 의한 균열 폭 감소 ····· 35
3.2.4.1. 콘크리트 공시체 제작 ····· 35
3.2.4.2. 인공 미세균열 형성 ····· 38
3.2.4.3. 콘크리트 미세균열 자가치유 ····· 39

3.3. 분석 방법 ····· 40
3.3.1. 미생물 분석 ····· 40
3.3.2. 결정 형상 분석 (FE-SEM) ····· 40
3.3.3. 결정 구조 분석 (XRD) ····· 40
3.3.4. 실체현미경 (Stereomicroscipe) ····· 41

4. 실험 결과 및 고찰 ····· 42
4.1. 호알칼리성 포자형성 생체광물형성 미생물 분리 ····· 42
4.1.1. 토양 내 호알칼리성 포자형성 미생물 분리 ····· 42
4.1.2. 미생물의 pH 저항성 평가 ····· 44
4.1.3. 생체광물 형성 실험 ····· 46

4.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가가 탄산칼슘 결정 형성과 콘크리트 특성에 미치는 영향 ····· 47
4.2.1. 미생물과 칼슘유기산 첨가 시 결정의 형상과 구조 ····· 47
4.2.1.1 미생물 첨가 시 결정의 형상 변화 ····· 47

4.2.1.2 다양한 칼슘유기산 첨가 시 결정의 형상 변화 ···· 53
4.2.1.3 미생물과 다양한 칼슘유기산 첨가 시 결정의 광물 구조 변화 ····· 59
4.2.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가 시 콘크리트 압축강도 ····· 63
4.2.2.1 미생물 첨가 농도에 대한 압축강도 변화 ····· 63
4.2.2.2 다양한 칼슘유기산 첨가 시 압축강도 변화 ····· 65
4.2.2.3 미생물과 다양한 칼슘유기산 함께 첨가 시 압축강도 변화 ····· 67

4.3. 미생물에 의한 콘크리트 미세균열 자가치유 ····· 69
4.3.1. 미세균열 자가치유에 의한 콘크리트 균열 폭 감소 ····· 69

5. 결론 ····· 75

참고문헌 ····· 78

표 목 차

Table. 2.1. Allowable crack width of reinforced concrete structures W_a (mm) (콘크리트구조기준, 2012) ····· 7
Table. 2.2. Allowable crack width of water treatment concrete structures W_a (mm) (콘크리트구조기준, 2012) ····· 7
Table. 2.3. Allowable crack width related with repair decision W_a (mm) (일본콘크리트공학협회) ····· 8
Table. 3.1. Amount of buffer content addition on the range of pH 9 to pH 13 ····· 26
Table. 3.2. Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing diverse concentration of *Bacillus sp. BY1* ····· 32
Table. 3.3. Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing various calcium additives without *Bacillus sp. BY1* ····· 32
Table. 3.4. Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing various calcium additives with *Bacillus sp. BY1* ····· 33
Table. 3.5. Mixing proportion of concrete specimens ····· 35
Table. 3.6. Experimental condition for testing of concrete microcrack remediation efficiency ····· 37
Table. 4.1. Counting the bacterial cell number on the growth of *Bacillus sp. BY1* in various pH ····· 45
Table. 4.2. Distribution of the calcium carbonate crystal structure on various experimental condition ····· 60
Table. 4.3. Compressive strength test after 7 and 28 days curing of cement mortar specimen containing diverse concentration of *Bacillus sp. BY1* ····· 64

Table. 4.4. Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimen containing various calcium additives ····· 66
Table. 4.5. Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimen containing *Bacillus sp. BY1* and various calcium additives ····· 68

그 림 목 차

Fig. 2.1. Damage start chart relating environmental exposure, crack, width, and necessity for additional evaluation or repair (NUREG/CR-6424, 1996) ····· 6

Fig. 2.2. Capsule based self-healing approaches (Tittelboom and Belie, 2013) ····· 12

Fig. 2.3. Vascular based self-healing approaches (Tittelboom and Belie, 2013) ····· 13

Fig. 2.4. Schematic diagram for microbial self-heling of concrete microcrack ····· 14

Fig. 2.5. Simplified representation of the microbially induced calcium carbonate precipitation (Muynck et al., 2010) ····· 17

Fig. 2.6. Sequences of calcite and vaterite morphologies obtained during the abiotic experiment (Braissant et al., 2003) ·· 21

Fig. 3.1. Site of soil sampling point ····· 22

Fig. 3.2. Schematics of experimental set up for ammonium carbonate free-drift method ····· 28

Fig. 3.3. Mortar specimen molds and procedure of curing mortar specimens ····· 31

Fig. 3.4. Experimental equipment for compressive strength test of mortar specimens ····· 34

Fig. 3.5. Procedure of preparing concrete specimens ····· 36

Fig. 3.6. Splitting test for inducing crack in the specimen ····· 38

Fig. 3.7. Crack generated concrete specimen ····· 39

Fig. 3.8. Stereomicroscope set up ····· 41

Fig. 4.1. Image of spores formed by isolated spore-forming bacteria, *Bacillus sp. BY1* ····· 42

Fig, 4.2. Phylogenetic relationship of isolated bacteria from alkaline

soil, *Bacillus sp. BY1* ····· 43
Fig. 4.3. Growth curve of *Bacillus sp. BY1* in various pH condition 45
Fig. 4.4. Image of biomineral formation induced by *Bacillus sp. BY1* ··· 46
Fig. 4.5. Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium formate addition ····· 48
Fig. 4.6. Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium acetate addition ····· 49
Fig. 4.7. Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium lactate addition ····· 50
Fig. 4.8. Growth of crystals with *Bacillus sp. BY1* and calcium lactate addition ····· 52
Fig. 4.9. Effect of calcium formate on crystal morphology and crystal surface ····· 56
Fig. 4.10. Effect of calcium acetate on crystal morphology and crystal surface ····· 57
Fig. 4.11. Effect of calcium lactate on crystal morphology and crystal surface ····· 58
Fig. 4.12. X-ray diffractograms of $CaCO_3$ crystals in the absence of *Bacillus sp. BY1* ····· 61
Fig. 4.13. X-ray diffractograms of $CaCO_3$ crystals in the presence of *Bacillus sp. BY1* ····· 62
Fig. 4.14. Compressive strength test after 7 and 28 days curing of cement mortar specimen containing diverse concentration of *Bacillus sp. BY1* ····· 64
Fig. 4.15. Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimen containing various calcium additives ····· 66
Fig. 4.16. Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimen containing *Bacillus sp. BY1* and various calcium additives ····· 68

Fig. 4.17. Concrete microcrack self-healing effect with the passing of time in the absence of *Bacillus sp. BY1* ····· 69
Fig. 4.18. Hillerborg's model for concrete crack (Saouma et al., 2002) 70
Fig. 4.19. Process of healing crack which is filled from crack inside to outside ····· 71
Fig. 4.20. Concrete microcrack self-healing efficiency on the presence and absence of *Bacillus sp. BY1* ····· 72
Fig. 4.21. Concrete microcrack self-healing patterns containing various calcium additives ····· 74

1. 서 론

1.1. 연구의 배경

콘크리트는 내구성이 우수하고 시공성, 경제성이 뛰어나서 건설 공사에서 많이 사용되고 있으며 중요도 또한 증가하고 있다. 하지만 콘크리트는 기온의 변화, 구조물의 노후, 외부하중의 작용 등에 의해서 균열이 빈번하게 발생하는 문제점을 가진다. 초기에 구조물에 생성된 균열은 구조물의 사용성과 내구성에 직접적인 악영향을 미치지 않지만, 하중이 부하되었을 때뿐만 아니라 하중의 부하가 없을 때에도 콘크리트의 투수성과 흡수성에 영향을 미치고, 투수성과 흡수성의 증가는 균열 폭과 깊이를 증가시켜 결과적으로 구조물의 성능 저하를 유발하게 된다. 따라서 구조물의 성능 저하를 방지하기 위한 초기 균열의 보수는 필수적이며, 이는 미세균열이 큰 균열로 성장하는 것을 예방하여 구조물의 내구성 악화를 미연에 방지할 수 있도록 할 것이다. 0.1 mm 이하의 폭을 가지는 미세균열을 육안을 통해 검출하여 보수하기는 쉽지 않지만, 미생물은 일반적으로 2 μm의 크기를 가지므로 이를 균열치유에 적용할 경우 육안으로 보수가 어려운 미세균열의 치유가 가능해진다.

콘크리트의 균열부위 보수를 위해 현재는 에폭시수지, 레진모르타르, 탄성 실링재 등의 수지계 재료 또는 폴리머 시멘트 슬리머, 폴리머 시멘트 페이스트, 시멘트 휠러 등의 시멘트계 재료가 사용되고 있다(문승호, 2001). 하지만 이러한 보수재료들은 화학적 합성물질로 인체에 유독하고 환경에 유해하며, 지속적인 효과를 가지지 못하고 재균열이 발생할 우려가 있다. 따라서 친환경적이며 지속적인 효과를 가지는 균열 보수제의 개발에 대한 연구가 요구된다. 합성유기물질과 더불어 석회암(limestone)을 물에 현탁하여 균열부위에 코팅하는 방법도 이용되고 있지만, 무기석회질 보수제는 콘크리트 표면과 물리화학적으로 완전히 결합되지 못하여 균열로 인한 공극을 견고히 잇지 못한다. 미생물의 작용을 통해 생성된 탄산칼슘은 원재료인 콘크리트와의 결합력이 우수할 뿐만 아니라, 화

학적으로 생성된 탄산칼슘보다 용해도가 작고 강도가 세다고 알려져 있다(Muynck et al., 2008; Muynck et al., 2010). 따라서 본 연구에서는 마이크로 크기의 미생물을 콘크리트 균열 보수의 에이전트 물질로 적용하여 연구를 진행한다.

현재 건설재료로 사용되는 콘크리트는 pH 12~13의 강알칼리성이고 시멘트의 수화 과정에서 수화열과 내부 공극의 수축작용이 발생하며 이산화탄소와 암모니아성 염기성기체, 라돈 등의 유해요소가 배출되어 미생물의 생존에 열악한 환경으로 알려져 있다. 콘크리트의 균열 치유에 이용하는 미생물은 이러한 극한 환경을 견딜 수 있어야 하므로, 알칼리 환경(pH 10이상)에서 최적의 성장이 일어나고, 내생포자를 형성하여 열과 화학물질 등에 강한 저항성을 가져야 한다. 따라서 본 연구에서는 콘크리트의 열악한 환경 조건에서 생존이 가능하고 탄산칼슘 형성을 유도하는 호알칼리성 포자형성 생체광물형성 미생물을 토양에서 분리하여 적용한다.

미생물은 결정 생성초기에 핵형성위치로 작용하여 탄산칼슘 형성을 유도할 뿐만 아니라, 결정의 성장과정에서도 계속적으로 탄산칼슘 결정의 형태와 크기에 영향을 미친다. 이때 형성되는 탄산칼슘 결정 형태는 미생물의 종류와 그의 대사생성물, 칼슘의 농도, 용액의 pH 등에 따라 다양하게 나타난다(Lian et al., 2006; Braissant et al., 2003; Li et al., 2013). 하지만 탄산칼슘 형상에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있는데 반해, 미생물과 다양한 칼슘의 첨가가 결정의 형성 속도와 강도 등에 미치는 영향에 대한 연구는 미비하다. 본 연구에서는 미생물과 칼슘유기산의 첨가가 탄산칼슘의 형상 및 강도와 결정 형성 속도에 미치는 영향, 나아가 콘크리트 균열 치유에 미치는 영향을 연구한다.

1.2. 연구의 목적

본 연구는 토양에서 분리한 호알칼리성 포자형성 생체광물형성 미생물의 탄산칼슘형성 작용을 이용하여 콘크리트 미세균열의 자가치유를 유도한다. 본 연구의 세부적인 목적은 다음과 같다.

(1) 콘크리트 미세균열의 자가치유에 적합한 특성을 가지는 미생물을 토양으로부터 분리하고, 분리 미생물의 기본특성을 조사하고 탄산칼슘형성 유도 능력을 확인한다.

(2) 미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가가 탄산칼슘 결정의 형태와 콘크리트 강도 특성에 미치는 영향을 확인한다.

(3) 미생물에 의한 탄산칼슘형성 유도를 통한 미세균열의 치유 과정을 살펴보고, 균열 폭과 투수계수 측정을 통해 균열 치유 효율을 평가한다.

1.3. 연구의 범위

본 연구는 호알칼리성 포자형성 미생물을 토양으로부터 분리하고, 분리 미생물의 생체광물형성 능력을 이용하여 콘크리트 미세균열 자가치유 효율을 살펴보는 것으로, 세부적인 범위 및 내용은 다음과 같이 구성된다.

(1) 토양으로부터 호알칼리성 포자형성 미생물의 분리
콘크리트 미세균열 자가치유에 적합한 특성을 가지는 호알칼리성 포자형성 미생물을 토양으로부터 분리하고 염기분석을 실시하며, 분리 미생물의 pH 저항성과 생체광물형성을 확인한다.

(2) 미생물과 다양한 칼슘유기산이 결정 형성과 콘크리트 특성에 미치는 영향
미생물의 존재가 결정의 형성과 성장 과정에 미치는 영향을 확인하고, 미생물의 존재유무와 다양한 칼슘유기산의 첨가가 탄산칼슘 결정 형상과 구조와 콘크리트 압축강도에 미치는 영향을 확인한다.

(3) 미생물 생체광물형성을 통한 콘크리트 미세균열 자가치유 효율
콘크리트에 인공 미세균열을 유발하고, 미생물의 탄산칼슘형성를 통한 균열의 자가치유를 유도한다. 콘크리트 미세균열 자가치유의 효율은 균열 폭의 확대현미경 사진촬영과 균열 폭의 측정으로 평가한다.

2. 문헌 연구

2.1. 콘크리트 균열

2.1.1. 균열의 형성 및 평가

시멘트, 모래, 굵은 골재와 물의 혼합으로 얻어지는 콘크리트는 강도가 높고 전기와 열에 좋은 절연체이며 내구성과 내화성이 우수하여 가장 많이 사용되고 있는 건설재료이다. 하지만 콘크리트는 액상(liquid)에서 고상(solid)으로 도달하기 전에 중간 단계(transition)에서의 약한 결합력과 낮은 결합에너지로 인해 변형에 취약하며, 따라서 균열도 쉽게 발생한다(최완철, 2010). 균열의 형성은 콘크리트의 강도 발현과 투수성과 밀접한 관계를 가지며, 따라서 내외부에서 발생한 크고 작은 균열은 결과적으로 구조물의 내구성 및 성능 저하를 유발한다(Aldea, 1999).

콘크리트 균열은 설계, 재료, 시공, 환경조건 등의 다양한 요인에 의하여 발생하게 되며, 반복되는 하중의 작용과 균열을 통한 외부물질의 침투에 의하여 폭과 길이가 증가하면서 성장하게 된다(Yi et al., 2011; 문승호, 2001).

균열은 구조 기능에 따라 구조 균열과 비구조 균열로 분류할 수 있다. 구조균열은 설계 오류 및 설계 하중을 초과하는 외부하중의 작용, 시공불량, 물리적 손상 등에 의하여 발생하여 더 이상 구조적인 기능을 발휘할 수 없는 단계로 진행된 균열이고 비구조 균열은 구조적으로 문제는 없으나 시간의 경과에 따라 누수, 철근의 부식, 콘크리트의 중성화 등에 따라 균열이 진행하는 경우로 대부분의 미세균열이 여기에 속한다(최완철, 2010). 또한 크기에 따라서도 분류가 가능하며 0.1 mm 이하를 미세균열, 0.1 mm 이상 0.7 mm 이하를 중간균열, 0.7 mm 이상을 대형 균열로 본다.

균열의 분포·폭·깊이·방향, 콘크리트 밀도, 구조형식, 사용 환경 등이 콘크리트 구조물의 내수성에 영향을 미치는 요인으로 알려져 있고, 그 중 균열의 폭은 구조물의 부식 및 성능저하를 나타내는 대표적인 지표로

사용되고 있다(최완철, 2010). USNRC (United States Nuclear Regulatory Commision)에서는 Fig. 2.1과 같이 균열폭 또는 외관 상태에 따라 현재의 구조물 상태를 ① Structure acceptable as-is without additional assessment (구조물이 건전하고 추가적인 조사가 요구되지 않는 수준) ② Structure requires further evaluation (구조물에 대한 추가적인 조사가 요구되는 수준) ③ Structure requires remedial action (구조물에 대한 보수 보강 작업이 요구되는 수준)의 3단계로 구분하고 있다 (NUREG/CR-6424, 1996).

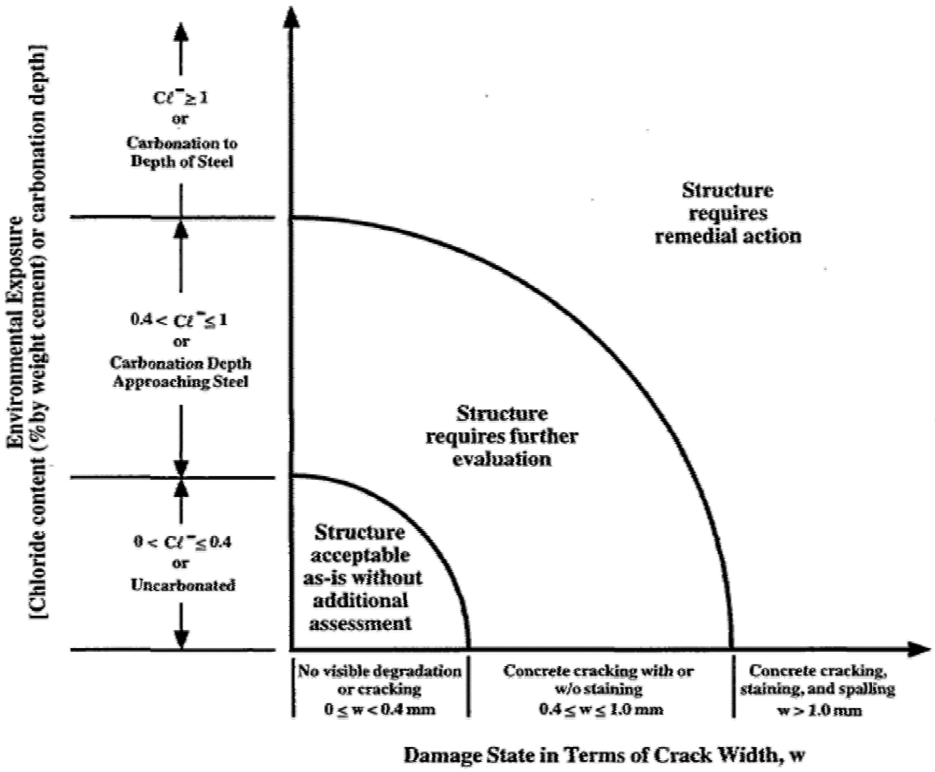

Fig. 2.1 Damage state chart relating environmental exposure, crack width, and necessity for additional evaluation or repair (NUREG/CR-6424, 1996)

우리나라 콘크리트구조기준에서도 허용 균열폭을 규정하여 균열을 검증하도록 하고 있다. 철근콘크리트 구조물의 허용 균열폭은 Table. 2.1과 같으며, 수밀성을 요구하는 구조물의 허용균열폭은 Table. 2.2와 같다(콘크리트구조기준, 2012). 일본콘크리트공학협회의 경우 보수여부와 관련지어 균열폭의 한도를 제시하고 있으며 이는 Table. 2.3과 같다(최완철, 2010).

Table. 2.1 Allowable crack width of reinforced concrete structures w_a (mm) (콘크리트구조기준, 2012)

강재의 종류	강재의 부식에 대한 환경조건			
	건조 환경	습윤 환경	부식성 환경	고부식성 환경
철근	0.4 mm와 0.006 c_c 중 큰 값	0.3 mm와 0.005 c_c 중 큰 값	0.3 mm와 0.004 c_c 중 큰 값	0.3 mm와 0.0035 c_c 중 큰 값
긴장재	0.2 mm와 0.005 c_c 중 큰 값	0.2 mm와 0.004 c_c 중 큰 값		

여기서, c_c는 최외단 주철근의 표면과 콘크리트 표면 사이의 콘크리트 최속 피복 두께(mm)

Table. 2.2 Allowable crack width of water treatment concrete structures w_a (mm) (콘크리트구조기준, 2012)

	휨인장균열	전 단면 인장균열
오염되지 않은 물[1)]	0.25	0.20
오염된 액체[2)]	0.20	0.15

1) 음용수(상수도) 시설물
2) 오염이 매우 심한 경우 발주자와 협의하여 결정

Table. 2.3 Allowable crack width related with repair decision w_a (mm) (일본콘크리트공학협회)

구분	환경[2) / 기타요인[1)]	내구성으로 본 경우			방수성으로 본 경우
		극한조건	보통조건	완만함	-
보수를 필요로 하는 균열폭	대	0.4 이상	0.4 이상	0.6 이상	0.2 이상
	중	0.4 이상	0.6 이상	0.8 이상	0.2 이상
	소	0.6 이상	0.8 이상	1.0 이상	0.2 이상
보수를 필요로 하지 않는 균열폭	대	0.1 이하	0.2 이하	0.2 이하	0.05 이하
	중	0.1 이하	0.2 이하	0.3 이하	0.05 이하
	소	0.2 이하	0.3 이하	0.3 이하	0.05 이하

1) 기타요인(대, 중, 소)이란, 콘크리트 구조물의 내구성 및 방수성에 대한 유해성의 정도를 나타낸 것으로, 아래와 같은 요인의 영향을 종합해 정한다.
   - 균열의 깊이·패턴, 콘크리트 피복두께, 콘크리트 표면 피복의 유무, 재료·배합, 타설 등

2) 주로 철근의 녹의 발생 조건의 관점에서 본 환경 조건

2.1.2. 콘크리트의 보수와 보강

건축물의 유지관리는 보수(Repair), 보강(Rehabilitation), 개량 또는 교체(Renovation or Replacement)의 3가지 방법으로 분류된다. 일반적으로 보수는 손상된 콘크리트 구조물의 내구성, 안정성, 기능, 미관 등 내력 이외의 기능을 회복시키는 것을 목적으로 하며 보강은 손상에 의해 저하된 콘크리트 구조물의 내력을 회복시키는 것 또는 용도 변경 등을 이유로 구조 부재의 내력을 증가시키는 것을 목적으로 한다(최완철, 2010; 대한건축학회, 1997).

2.1.2.1. 보수

균열 보수는 콘크리트 내부 철근의 부식 방지를 주목적으로 한다. 균열 부위를 통해 침투한 수분과 화학물질이 콘크리트 내부 철근의 부식을 촉진 시키므로, 보수를 통해 균열 부위와 외부와의 접촉을 차단하고 수분과 화학물질의 접근을 막는다. 일반적으로 콘크리트에 발생한 균열의 폭이 0.3 mm 이상일 때 보수해야 한다고 규정하고 있으며, 미관과 누수여부 등을 고려하여 0.3 mm 이하의 균열에 대해서도 보수를 실시한다. 균열의 보수는 균열의 원인과 형태, 철근의 부식 여부, 균열의 진행성 여부에 따라 균열 보수 여부, 방법, 및 재료가 달라진다(최완철, 2010; 대한건축학회, 1997).

콘크리트 보수를 위해 대표적으로 사용하는 공법에는 표면처리, 주입, 충전 공법이 있다. 표면처리공법은 통상적으로 0.2 mm 미만의 균열이 발생한 경우 균열 부분을 피복하여 방수성, 내구성을 향상시키기 위한 목적으로 실시하며 목적에 따라 함침, 도포 두께 등으로 구분하여 사용한다. 주입공법은 균열이나 틈새에 보수재를 자연 또는 가압으로 주입하여 균열 부위를 메꾸는 방법으로, 주입용 파이프를 설치하여 보수재를 주입한다. 충전공법은 균열폭 0.5 mm 이상의 비교적 큰 폭의 균열의 보수에 적용하는 공법으로, 균열을 따라 콘크리트를 U형 또는 V형으로 절

단하고 절단 부분에 보수재를 충전하는 방법이다. 이 밖에도 단면복구공법, 방청공법, 수중보수공법 등으로도 콘크리트 보수가 가능하다(최완철, 2010; 대한건축학회, 1997).

보수재료는 성분에 따라 시멘트계, 폴리머 콘크리트계, 수지계로 구분되며, 용도에 따라 재료의 특성을 고려하여 사용한다. 시멘트계 보수재료는 포틀랜드 시멘트를 결합재의 주성분으로 하여 탄성계수나 열팽창률이 콘크리트와 가깝고 가격이 대체로 저렴하다는 장점을 가지고, 폴리머 콘크리트계 보수재료는 콘크리트 재료에 폴리머를 첨가 혼합한 보수재로 인장에 강하고 연성적인 거동을 보이는 장점을 가진다(최완철, 2010).

2.1.2.2. 보강

구조물의 보강은 내력 저하의 회복 또는 용도 개선에 의한 내력의 증가를 목적으로 실시한다. 균열의 원인, 하중 조건, 내력, 보강의 범위와 규모, 환경 조건, 안전, 공사 기간, 경제성, 관리 용이성 등을 고려하여 보강방법과 재료를 결정한다(대한건축학회, 1997).

보강 방법에는 콘크리트 증타법, 강재볼트 관통법, 에폭시 강판 접착법, FRP 복합섬유판 접착법, 포스트텐션법 등이 있다(최완철, 2010). 보강재료로는 주로 강재와 탄소섬유시트가 사용된다. 강재는 가격이 저렴하고 내화성이 좋지만 내부식성과 내화학성, 시공성이 떨어지고 유지보수가 어려운 장단점을 가지고, 탄소섬유시트는 시공성이 좋고 내부식성 내화학성은 좋지만 내화성이 떨어지고 재료비가 높은 장단점을 가진다(대한건축학회, 1997).

2.2. 자가치유(Self-healing)

자가치유는 외부에서의 조정 없이 자율적으로 손상된 부분을 치유 혹은 회복 할 수 있는 재료의 능력으로, 자체수리(self-repairing), 자율치유(autonomic-healing), 자율수리(autonomic-repairing) 등의 개념과 함께 쓰여진다(Ghosh, 2009).

2.2.1. 자가치유 콘크리트(Self-healing concrete)

시멘트질의 물질에서의 자기치유는 자가치유의 기작에 따라 Intrinsic healing, Capsule based healing, vascular healing의 세 가지 방법으로 분류된다(Tittelboom and Belie, 2013).

Intrinsic self-healing은 시멘트질 매트릭스의 구성성분들에 의하여 자가치유의 특성을 가지며, 주로 ① 미수화 시멘트 입자들의 수화와 ② 수산화칼슘($Ca(OH)_2$)의 용해와 추가적인 탄산염화 작용의 두 가지 메커니즘에 기인하여 일어난다(Edvardsen, 1999; Ramm and Biscoping, 1998). 균열이 형성된 시기에 따라 치유 기작이 달라지며, 미수화 시멘트 형태의 존재가 상대적으로 많은 초기재령 콘크리트는 계속적인 수화반응이 주요한 기작으로 작용하고 재령이 경과하였을 때는 탄산칼슘(CaCO3) 침전이 주요한 기작으로 작용하여 균열을 치유한다(Neville et al., 2002).

Capsule based self-healing은 healing agent를 캡슐을 내부에 존재하게 하여 원 시멘트 물질들과 격리시키고, 외부의 충격 등에 의해 캡슐이 깨지면 내부의 healing agent 물질들이 방출되면서 손상된 곳의 자가치유를 촉진하는 방법이다(Tittelboom and Belie, 2013). 캡슐은 Fig. 2.2와 같이 시멘트계 물질 내부에 존재하며 캡슐 내부 물질들은 공기와 수분, 열과 만나 반응하기도 하고(Dry, 1994; Li et al., 1998; Dry, 1999; Dry, 2000), 그 자체로 시멘트질 매트릭스와 접촉하여 반응하기도 하며(Jonkers, 2011; Wiktor and Jonkers, 2011) 매트릭스에 존재하는 second compound와 접촉하여 반응하기도 한다(Wang et al., 2012).

Vascular based self-healing는 구조 내부와 외부를 연결하는 중공관 안에 healing agent를 주입하고, 균열이 발생하면 Fig. 2.3과 같이 관이 파괴되면서 틈새로 healing agent가 흘러나와 균열 부를 치유하는 방법이다(Tittelboom and Belie, 2013; Joseph et al., 2010; Joseph et al., 2011). 균열 폭이 큰 경우에도 치유 효과를 볼 수 있다는 장점을 가진다(Sun et al., 2011).

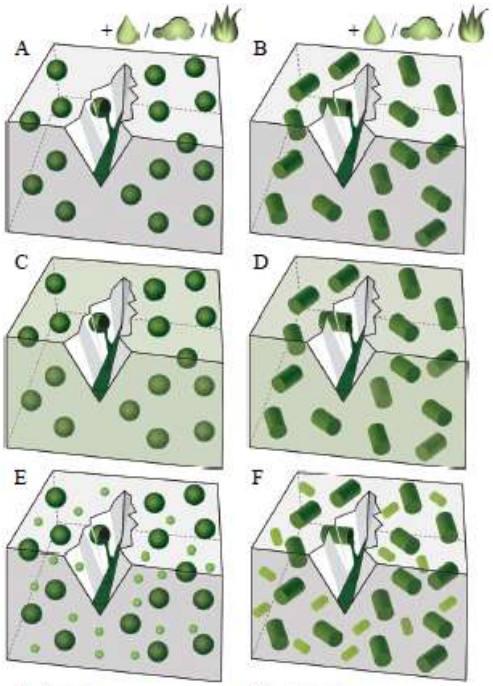

Fig. 2.2 Capsule based self-healing approaches. Reaction of encapsulated agent upon contact with (A, B) moisture, air or heating; (C, D) the cementitious materix; (E, F) a second component present in matrix (Tittelboom and Belie, 2013)

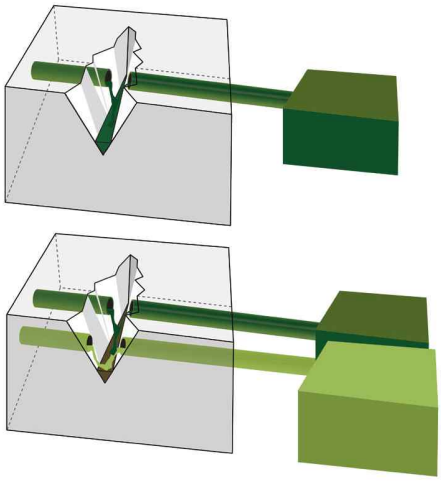

Fig. 2.3 Vascular based self-healing approaches. Leakage of healing agent from the tank via the vascular into the crack due to gravitational and capillary forces and pressure (Tittelboom and Belie, 2013)

또 다른 자가치유 기작으로 구조적으로나 재료 특성에 영향을 미치지 않는 수준에서 콘크리트 매트릭스에 자가치유 에이전트 물질을 첨가하는 방법이 있다. 이 때 미생물이 자가치유 에이전트 물질 중 한가지로 사용되고 있다(Ghosh, 2009).

미생물은 지구상의 모든 환경에 존재하며 극한 환경을 좋아하는 일부 미생물(Extremophilic)들은 극도로 건조한 사막이나, 바위 내부, 심지어 초염기성의 환경에서도 발견된다(Ghosh, 2009; Pedersen et al., 2004; Fajardo-Cavazos and Nicholson, 2006). 콘크리트 내부 환경도 이러한 극한 환경에 상응한다고 볼 수 있고 따라서, 미생물의 생존과 활동이 가능하다(Ghosh, 2009). 알칼리 환경에 내구성을 가지는 미생물 종들은 일반적으로 내생포자를 형성하고, 높은 물리적, 화학적 스트레스에 견디면서 200년도 생존한다고 알려져 있다(Sagripanti and Bonifacino, 1996).

호알칼리성 포자형성 미생물은 콘크리트 내부의 극한 환경을 견디도록 포자상태로 첨가되고, 균열이 없을 시에는 비활성상태로 존재한다. 균

열이 생성되고 균열을 통해 수분과 공기가 유입되면 내생포자로 존재하던 미생물이 활성을 띄고, 주변의 칼슘이온과 탄산이온을 이용하여 탄산칼슘 침전물을 형성하고 균열 부위를 치유한다(Muynck et al., 2010; Jonkers, 2011). Fig. 2.4는 미생물에 의한 콘크리트 균열의 자가치유 기작을 보여준다.

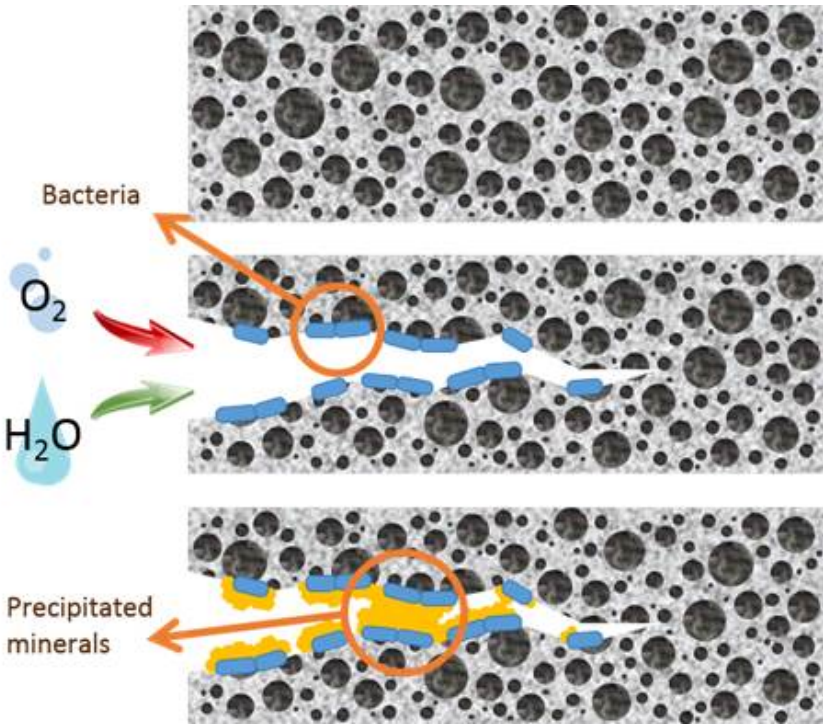

Fig. 2.4 Schematic diagram for microbial self-heling of concrete microcrack

2.3. 미생물의 생체광물 형성

탄산칼슘은 형성이 쉬워 자연계에 존재하는 염 중 가장 많고, 대리석, 방해석, 석회석, 조개껍질, 산호 등 다양한 형태로 쉽게 관찰이 가능하다. 탄산칼슘은 값이 싸고 비중도 크지 않으면서 형성이 쉽고 물에 잘 용해되지 않는 특성을 가져서 공업 분야에서 다양하게 사용되고 있다.

탄산칼슘의 침전은 ① 칼슘이온 농도 ② 용존 무기탄소 농도 ③ pH ④ 핵형성위치의 제공의 네 가지 요인의 영향을 받는다(Hammes and Verstraete, 2002). 충분한 칼슘과 탄산이온이 존재하여 시스템이 과포화되었을 때, 즉 이온활동도(IAP, Ion Activity Product)가 용해도곱상수(K_{sp}, Solubility constant)를 초과할 때 일어난다(Morse, 1983).

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \leftrightarrow CaCO_3$$

$$\Omega = a(Ca^{2+})a(CO_3^{2-})/K_{so} \text{ with } K_{so\ calcite,\ 25℃} = 4.8\times10^{-9}$$

이 때 탄산이온의 농도는 용존 무기탄소의 농도와 시스템의 pH에 따라 결정되고 주위의 온도, 이산화탄소 분압 등에 영향을 받는다. 25℃ 1기압일 때 수계에서의 이산화탄소 평형은 다음과 같다(Stumm and Morgan, 1981).

$$CO_{2(g)} \leftrightarrow CO_{2(aq)} \ (pK_H = 1.468)$$

$$CO_{2(aq)} + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \ (pK = 2.84)$$

$$H_2CO_3 \leftrightarrow H + HCO_3^- \ (pK_1 = 6.352)$$

$$HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-} + H^+ \ (pK_2 = 10.329)$$

미생물에 의한 탄산칼슘 침전이 관찰된 것은 비교적 최근으로 Boquet et al.(1973)에 의해 처음으로 관찰되었다. Boquet는 실험실 조건에서 *Bacterium calcis*에 의한 탄산칼슘 침전을 유도하고, 연구를 통해 미생물에 의한 탄산칼슘 형성은 주위 환경에 영향을 받는 경우가 많으며 적절한 조건이 주어지면 미생물은 결정을 형성한다는 것을 확인하였다(Boquet et al., 1973; Muynck et al., 2010). 비슷한 시기에 스페인의 Adolphe and Billy(1974)도 응회암과 석회암에서 분리한 미생물에 의한 탄산칼슘 침전 형성을 실험을 통해 관찰하였고, 추가적으로 수행한 연구에서 극한 기후에 존재하는 미생물에 의해 형성된 탄산칼슘이 부식에 대해 큰 저항성을 가짐을 확인하였다(Muynck et al., 2010).

이와 같이 생물체가 광물을 형성하는 과정을 생광물화(Biomineralization)라고 하며, 생광물화의 과정은 크게 생물제어광물형성(Biologically controlled mineralization)과 생물유도광물형성(Biologically induced mineralization)의 두 가지 메커니즘을 통해 일어난다(Lowenstan and Weiner, 1989).

2.3.1. Microbially induced carbonate precipitation

미생물에 의한 탄산칼슘 형성 중 대부분이 생물유도광물형성(Microbially induced carbonate precipitation)에 의하여 일어난다. 생물유도광물형성 과정에서 미생물은 광물 입자의 생성과 성장 등의 과정에는 관여하지 않지만 주변 환경 조건에 변화를 줌으로써 탄산칼슘 형성을 유도한다(Rivadeneyra et al., 1993; Hammes and Verstraete, 2002). 즉, 생물제어광물형성(Microbially controlled carbonate precipitation)와는 달리 형성되는 광물의 형태와 종류가 주변 환경 조건의 영향을 받아 결정된다(Lowenstan and Weiner, 1989).

탄산칼슘의 침전은 칼슘이온 농도, 용존무기탄소 농도, pH, 핵형성 위치의 제공의 네 가지 요인의 영향을 받으며 미생물은 인자들을 변화시켜 탄산칼슘 형성을 유도한다.

생물유도광물형성과정에서 미생물의 가장 대표적인 역할은 다양한 생리활성을 통해 주위를 알칼린 환경으로 만드는 것이다. 혐기상태에서 유황환원세균(Sulfate reducing bacteria)에 의한 유황의 환원(Sulphate reduction) 과정 혹은 질소순환(Nitrogen cycle)을 통환 질산염(Nitrate)의 환원 및 요소의 가수분해(Urea hydrolysis) 과정은 주변의 pH를 높이고 결정 형성에 유리한 조건을 형성하도록 한다(Muynck et al., 2010).

또한 미생물은 결정 생성 초기에 핵형성위치(Nucleation site)를 제공하기도 한다. 미생물의 세포 외벽은 음전하를 띄기 때문에 칼슘이온과 같은 양전하를 띄는 물질을 끌어당겨 세포 외벽 주위에 칼슘이온 과포화 상태를 조성한다. 이러한 과포화 상태에서 미생물 표면의 칼슘이온은 주변 의 탄산이온과 반응하여 탄산칼슘 결정을 형성한다(Muynck et al., 2010).

$$Ca^{2+} + Cell \rightarrow Cell\text{-}Ca^{2+}$$

$$Cell\text{-}Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow Cell\text{-}CaCO_3$$

이 뿐만 아니라 미생물은 결정의 성장과정에도 계속적으로 탄산칼슘 결정의 형태와 크기에 영향을 미치는 것으로 연구되었다(Muynck et al., 2010; Lian 2006).

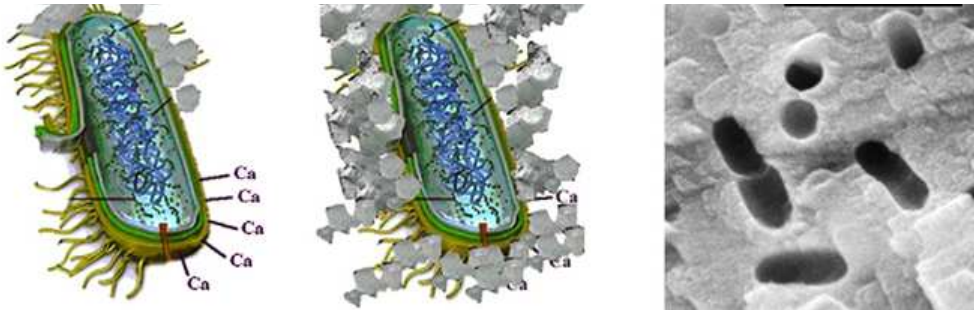

Fig. 2.5 Simplified representation of the microbially induced calcium carbonate precipitation. (A) Calcium ion are attached to the bacterial cell wall due to the negative charge of the cell wall; (B) In the presence of calcium ions, local supersaturation can occur and heterogeneous precipitation of calcium carbonate on the bacterial cell wall; (C) Whole cell becomes encapsulated (Muynck et al., 2010)

2.3.2. Microbially controlled carbonate precipitation

생물제어광물형성(Microbially controlled carbonate precipitation) 과정에서 미생물은 광물 형성을 위한 공간의 확보, 과포화 환경의 조성뿐만 아니라 핵형성, 광물 입자의 성장 등을 제어하면서 광물 형성의 전 과정에 걸쳐 지배적으로 영향을 미친다(Lowenstan and Weiner, 1989; Muynck et al., 2010).

미생물에 의해 지배되는 광물화과정에서 미생물의 가장 큰 역할은 controlled sequence에 따라 용액 내에 이온을 생성하는 것이며, 광물화가 시작되기 전까지 양이온과 음이온을 분리시켜 놓기도 한다. 핵형성 과정에서의 미생물의 관여 정도는 no control부터 highly control까지 그 정도가 다양하지만 미생물의 활동이 결정의 핵형성에 전혀 기여하지 않는 경우는 드물고, 그렇다하더라도 비결정성 광물의 형성 등의 다른 측면에서 광물화 과정에 영향을 미친다(Lowenstan and Weiner, 1989). 뿐만 아니라 미생물은 결정면과 상호작용하며 상대적으로 불안정한 결정면을 형성하는 등 결정의 성장과정에도 관여한다. Addadi et al.(1985)은 몇몇 입체화학적인 법칙들이 결정의 성장과정에서 지배적으로 작용한다고 하였으며, 이는 광물화 과정에 참여하는 미생물 조직의 산성 당단백(Acidic glycoprotein)의 결정 성장 과정에서의 작용과 유사하다(Lowenstan and Weiner, 1989; Addadi et al., 1985; Addadi and Weiner, 1985; Berman et al., 1988).

이처럼 생물제어광물형성 과정에서 미생물은 광물 형성에 필요한 요소들을 조절하며 광물화 과정에 참여하며, 주변 환경 조건에 독립적으로 미생물 종에 따라 특정한 광물과 결정 형상을 형성한다. 철(Ⅲ)환원미생물에 의한 자철석(Magnetite)형성이 생물제어를 통한 광물형성에 속한다(Bazylinski et al., 2007).

2.3.3. 생체광물 구조와 형상

미생물과 탄산칼슘은 결정 형성의 전 과정을 통해 서로 상호작용하며 결정을 형성하고 성장시킨다. 탄산칼슘 결정은 미생물이 콜로니를 성장시킬 수 있도록 기질의 표면을 제공하고, 미생물은 결정의 표면에서 결정의 형성과 성장을 촉진한다(Lian et al., 2006). Lian et al.(2006)은 미생물에 의한 결정화 과정을 핵형성과 핵형성 이후의 2단계로 나누어서 설명하였다. 핵형성 단계에서 미생물이 세포 외벽을 핵형성 위치로 제공하지만, 미생물과 결정의 상호작용에 따른 영향은 결정이 어느 정도 성장한 핵형성 이후의 단계에서 더 두드러지게 보여 졌다(Lian et al., 2006).

미생물의 존재는 생체광물의 결정 형상과 광물 구조에 영향을 미치며, 이러한 영향은 미생물로부터 분비되는 대사산물이나 미생물의 세포 밖 고분자 물질(EPS, Extra polymeric substances)로 인하여 발생한다(Lian et al., 2006; Braissant et al., 2003; Kaur et al., 2013). Barissant et al.(2003)의 연구에서 Exopolysaccharides(EPS)와 아미노산(amino acid)이 탄산칼슘의 형상과 광물 구조를 결정하는데 가장 큰 역할을 하였다. EPS와 아미노산 미첨가시에 $CaCl_2$와 $(NH_4)_2CO_3$는 반응하여 능면체의 calcite를 형성하지만, EPS와 아미노산의 첨가량이 증가할수록 Fig. 2.6의 그림과 같이 점점 구형의 결정이 형성되었고, 방해석(calcite) 뿐만 아니라 바테라이트(vaterite)와 아라고나이트(aragonite) 등의 다양한 광물 구조를 보였다. Lian et al.(2006)도 *Bacillus megaterium*의 상등액이 첨가된 환경에서 바테라이트(vaterite) 구조의 탄산칼슘이 형성된 것을 확인하였고, 이것이 *B.megaterium*이 분비하는 대사산물 내에 다량 함유된 하이드록시기(Hydroxyl group)와 카르복시기(Carboxyl group)의 영향이라는 결과를 얻었다. 이와 같이 여러 연구에서 미생물이 결정 형상과 구조에 영향을 미치며, 미생물 존재 시 방해석(Calcite) 보다 바테라이트(Vaterite)와 아라고나이트(Aragonite) 결정이 우세하게 나타난다는 결과를 보여주었다.

탄산칼슘 결정은 이 밖에도 칼슘 첨가제의 종류, 미생물의 종류, 대사산물, 주변 환경 조건 등 다양한 요인에 의해 영향을 받아 형성되지만, 미생물에 의한 결정 형상과 구조의 다양성에 대한 연구가 아직 부족하며 미생물이 결정의 형성과정에 영향을 미치는 이유와 메커니즘, 영향을 받아 형성되는 결정의 형상과 구조 등을 명확히 설명할 수 없다(Lian et al., 2006).

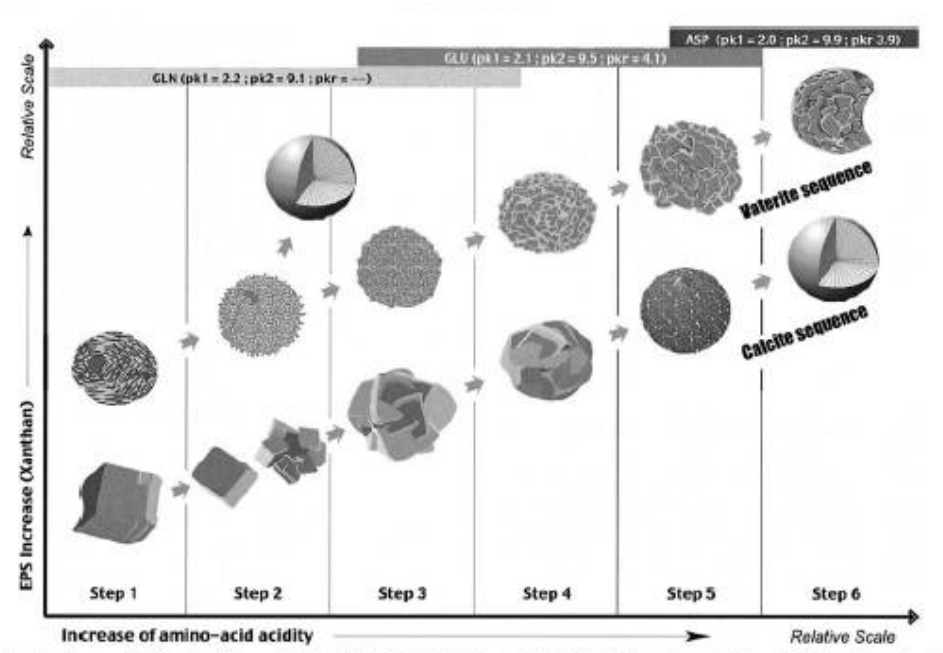

Fig. 2.6 Sequences of calcite and vaterite morphologies obtained during the abiotic experiment. This sketch shows the morphologies related to increasing amino acid acidity and xanthan content. Scales are relative (Braissant et al., 2003)

3. 실험 재료 및 방법

3.1. 실험재료

3.1.1. 미생물

미생물은 경기도 안산시 시화호 간척지 토양에서 호기성 호알칼리성 포자형성 미생물을 분리하여 사용하였다. 토양 시료채취 지점은 아래 Fig. 3.1에 나타내었다.

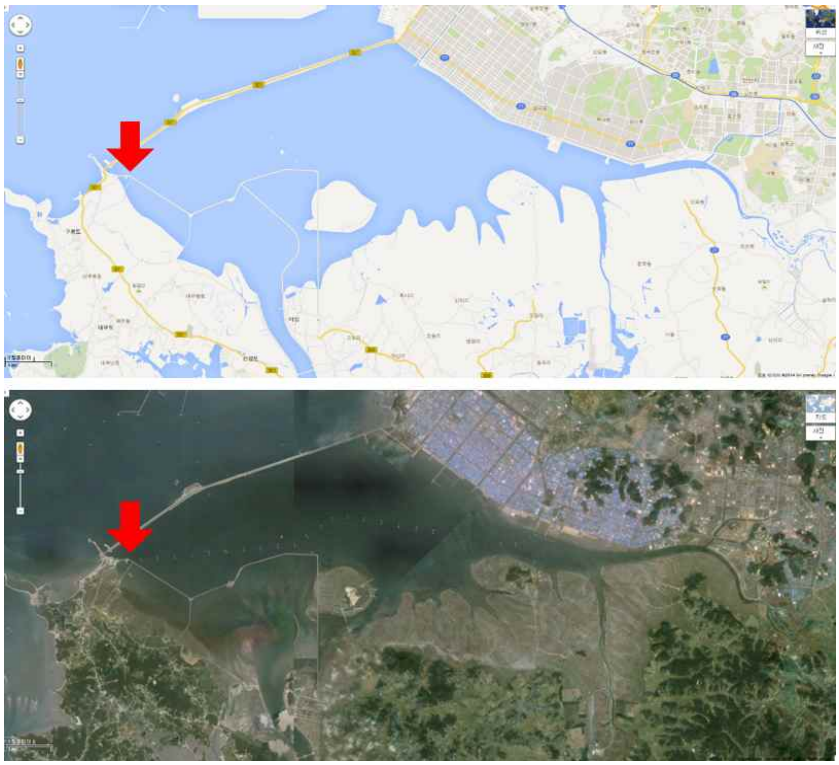

Fig. 3.1 Site of soil sampling point (Shihwa Lake, Ansan-si, Gyeonggi-do, South Korea)

분리한 미생물은 *Bacillus pseudofirmus*와 100% 상등한 미생물로, *Bacillus pseudofirmus*는 호기성 호알칼리성 포자형성 미생물로 알려져 있으며 노란색의 둥근 콜로니를 가지고 세포는 막대 모양을 띄며 구형의 포자를 형성한다. 최적 성장 pH는 9.0이고 10에서 45℃ 사이에서 성장을 보인다(Nielsen et al., 1995).

미생물의 증식을 위한 배양은 pH 9.7의 알칼린 영양배지를 사용하였으며, Nutrient Broth 8 g/L, $NaHCO_3$ 4.2 g/L, Na_2CO_3 5.3 g/L으로 구성되어있다. 포자 형성을 위한 배지로는 알칼린 영양배지에 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 mg/L을 추가하여 구성하였다.

3.1.2. 모르타르와 콘크리트

모르타르는 시멘트, 물 및 잔골재, 경우에 따라서 혼화 재료를 함께 반죽 혼합한 것이다(KS F 1004, 2004). 본 실험에서 시멘트는 KS L 5201 포틀랜드 시멘트에서 규정한 1종 보통 포틀랜드 시멘트를 사용하였고, 잔골재는 KS L ISO 679 시멘트의 강도 시험 방법에서 규정한 표준사를 사용하였다. 모르타르는 KS L ISO 679 시멘트의 강도 시험 방법에 따라 배합, 계량 및 혼합 하였다.

콘크리트는 시멘트, 물, 잔골재, 및 굵은 골재를 혼합하여 만든 것으로, 경우에 따라 혼화 재료를 함께 반죽 혼합한 것이다(KS F 1004, 2004). 시멘트와 잔골재는 모르타르와 동일하게 사용하였고, 굵은 골재는 KS F 2403 콘크리트의 강도 시험용 공시체 제작 방법에 따라 공시체의 지름이 굵은 골재의 최대 치수의 3배 이상이 되도록 KS A 5101-1에서 규정한 19.2 mm 표준 망체를 통과하는 골재를 사용하였다. 콘크리트는 KS F 2425 시험실에서 콘크리트 시료를 만드는 방법에 따라 배합 및 혼합 하였다.

3.1.3. 칼슘유기산

본 연구에서 칼슘유기산으로는 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate), 젖산 칼슘(Cacium lactate)을 사용하였다. 칼슘유기산을 통해 주입된 칼슘이온은 시멘트 매트릭스 내의 미수화 칼슘이온의 존재 비율을 높이고, 칼슘유기산을 통해 주입된 유기탄소는 미생물에 탄소원 영양분으로 작용하며 미생물 대사과정을 통해 무기탄소로 전환시켜 칼슘이온과 반응하여 탄산칼슘을 형성할 수 있는 형태로 존재하도록 한다. 따라서 칼슘유기산의 첨가는 시멘트 내의 미수화 칼슘이온과 탄산이온의 존재율을 높이고, 균열부위에 추가적인 탄산칼슘 결정이 형성될 수 있도록 하여 균열의 잠재적인 치유효율을 높인다(Jonkers and Schlangen, 2008; Jonkers and Schlangen, 2009; Ghosh, 2009). 칼슘유기산 중 특히 Calcium formate (포름산 칼슘)는 유기계 콘크리트 수화 촉진 물질로 잘 알려져 있으며, Cacium lactate (젖산 칼슘)도 α-hydroxy carboxyl group을 포함하는 다른 유기물질들과는 예외적으로 다르게 시멘트 수화 촉진제로 작용하는 것으로 알려져 있다(Rosskopf et al. 1975; Singh et al., 1986).

3.2. 실험장치 및 방법

3.2.1. 미생물 분리

3.2.1.1. 호알칼리성 포자형성 미생물의 분리

미생물의 분리는 3.1.1에서 언급한 경기도 안산시 시화호 간척지의 토양시료로부터 실시하였다. 50 mL cornical tube에 2 g의 토양 시료와 10 mL의 멸균증류수를 놓고 voltex로 1-2분간 잘 혼합한 후 80℃ 항온수조에서 20분간 열충격을 가하여 내생포자를 형성하지 못하는 미생물을 사멸시켰다. 열충격을 가한 튜브 내의 상등액 5 mL를 pH 9.7의 알칼리 배지(Nutrient Broth 8 g/L, $NaHCO_3$ 4.2 g/L, Na_2CO_3 5.3 g/L) 200 mL에 접종하고 30℃, 200 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 희석하여 알칼리 평판배지(Nutrient Broth 8 g/L, $NaHCO_3$ 4.2 g/L, Na_2CO_3 5.3 g/L, Agar 15 g/L)에 도말한 후 30℃에서 30시간 동안 배양하면서 콜로니의 모양, 크기, 색, 광택 등의 특징을 육안으로 관찰하고, 다른 균주로 예상되는 각 균주에 대해 tooth-picking을 실시하였다. 각각의 콜로니는 1.5 mL micro centrifuge tube에 포자형성 배지(Nutrient Broth 8 g/L, $NaHCO_3$ 4.2 g/L, Na_2CO_3 5.3 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 mg/L) 1 mL에 접종하여 30℃, 200 rpm 조건에서 5일간 배양한 후에 광학현미경 관찰을 통하여 내생포자를 형성여부를 확인하였다.

최종적으로 분리한 호알칼리성 포자형성 미생물은 16S ribosomal DNA 염기서열 분석방법으로 동정하였다. 이 때, Primer로는 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다. 염기서열은 NCBI에서 BLAST (Basic local alignment search tool) 검색을 통해 GenBank에 등록된 미생물과 비교하였다.

3.2.1.2. 미생물의 pH 저항성 평가

토양으로부터 분리한 호기성 호알칼리성 포자형성 미생물의 pH 내구성을 보기 위하여 pH 10부터 pH 13의 범위에서 미생물을 배양하며 성장을 살펴보았다. 영양배지(Nutrient Broth 8 g/L)에 완충용액(Buffer solution)을 첨가하여 pH를 조절하였으며, pH에 따른 완충용액의 조성은 다음 Table. 3.1과 같다. 배양액에 미생물을 접종하고 30℃, 200 rpm 조건에서 배양하면서 광밀도(OD, Optical Density)와 개체수(Counting)를 측정하여 pH의 변화에 대한 미생물의 성장정도를 확인하였다.

Table. 3.1 Amount of buffer content addition on the range of pH 9 to pH 13

pH	Composition
9	100 ml 0.025 M $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
	9.2 ml 0.1 M HCl
10	100 ml 0.025 M $Na_2B_4O_7 \cdot 0H_2O$
	36.6 ml 0.1 M NaOH
11	100 ml 0.05 M Na_2HPO_4
	12 ml 0.2 M NaOH
12	50 ml 0.2 M KCl
	12 ml 0.2 M NaOH
13	50 ml 0.2 M KCl
	132 ml 0.2 M NaOH

3.2.1.3. 생체광물 형성 실험

토양으로부터 분리한 호기성 호알칼리성 포자형성 미생물의 생체광물 형성을 확인하였다. 생체광물 형성 실험을 위한 용액은 Nutrient Broth 8 g/L가 포함된 영양배지에 젖산칼슘(Calcium lactate, $C_6H10CaO6$) 0.025M, 시트르산나트륨(Trisodium citrate, $Na_3C_6H_5O_7$) 0.1M, 중탄산나트륨(Sodium bicarbonate, $NaHCO_3$) 0.05M을 추가적으로 첨가하여 사용하였다. 이 때 시트르산나트륨(Trisodium citrate)은 비생물적인 탄산칼슘 형성을 막기 위하여 첨가하였다(Jonkers and Schlangen. 2008). 실험 용액에 증식 배양한 분리 미생물을 접종하고 30℃, 200 rpm에서 48시간 배양한 후에 광학현미경 관찰을 통해 결정 형성 여부를 확인하였다.

3.2.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가에 따른 결정의 형상과 구조

미생물과 칼슘유기산 첨가에 따른 결정의 형상과 구조를 살펴보는 실험은 Ammonium carbonate free-drift method (Becker et al., 2003; Braissant et al., 2003; Lian et al., 2006; Li et al., 2013)와 동일하게 수행하였다. 10 L의 밀폐된 데시케이터 내부의 도자기판 아래쪽에는 중탄산암모늄($(NH_4)HCO_3$) 분말 10 g이 담긴 비커를 놓고, 도자기판 위쪽에는 실험용액이 담긴 페트리 접시를 올려놓았다. 페트리 접시 내부에는 탄산칼슘 결정을 채취하기 위한 지른 12 mm의 커버글라스를 넣어주었다(Fig. 3.2).

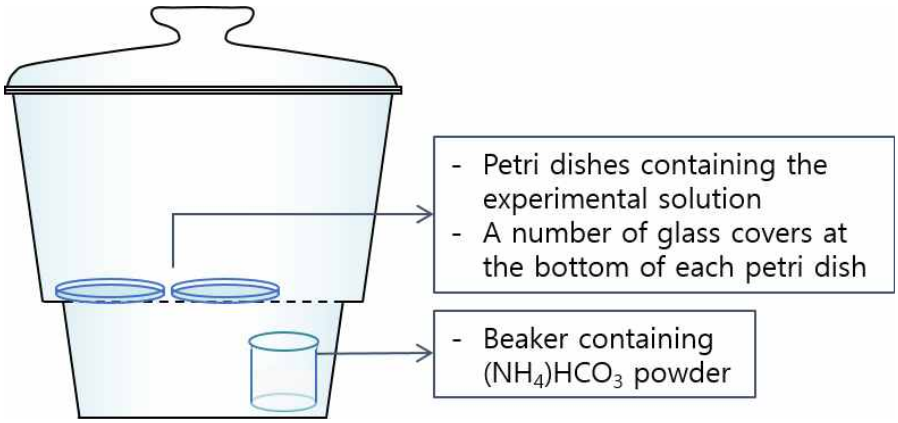

Fig. 3.2 Schematics of experimental set up for ammonium carbonate free-drift method

도자기판 아래쪽에 넣어준 중탄산암모늄은 휘발되어 암모니아와 이산화탄소를 발생시키고 이는 위쪽으로 확산되어 페트리 접시 내부에서 반응을 일으킨다(Lian et al., 2006). 반응식은 다음과 같다.

$$NH_4HCO_{3(s)} \rightarrow NH_{3(g)} + CO_{2(g)} + H_2O_{(l)}$$

이 때 생성된 암모니아 기체는 페트리 접시의 용액 내에 녹아 아래의 반응식와 같은 반응을 보이면서 용액의 pH를 높인다. 이산화탄소 기체도 용액 속에 녹아들어가 $CO_{2(aq)}$, $HCO_3^-{}_{(aq)}$, $CO3^{2-}{}_{(aq)}$를 생성하며 침전 반응이 일어나도록 한다(Li et al., 2013). 반응식은 다음과 같다.

$$NH_{3(g)} + H_2O_{(l)} \rightarrow NH^{4+}{}_{(aq)} + OH^-{}_{(aq)}$$

$$CO_{2(g)} \leftrightarrow CO_{2(aq)}$$

$$CO_{2(aq)} + H_2O \leftrightarrow HCO^{3-} + H^+$$

$$HCO^{3-} \leftrightarrow H^+ + CO_3^{2-}$$

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3 \downarrow$$

실험용액은 칼슘유기산 0.002 M와 탄산수소나트륨($NaHCO_3$) 0.002 M를 포함하는 salt solution 25 mL와 미생물 용액 1.5 mL를 포함한다. 칼슘유기산으로는 3.1.3에서 언급한 포름산칼슘(Calcium formate), 아세트산칼슘(Calcium acetate), 젖산칼슘(Calcium lactate)을 사용하였으며, 미생물 용액으로는 미생물 배양액과 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 사용하였다.

실험 시작 2, 4, 6, 10, 24시간 경과한 후에 데시케이터 내의 커버글라스를 샘플링 한다. 충분히 건조킨 후에 주사전자현미경(SEM, Scanning Electron Microscope)을 통해 탄산칼슘의 형상을 촬영한다.

충분한 시간이 경과한 후에 페트리 접시를 데시케이터에서 꺼내 클린벤치 내에서 자연건조 시킨다. 충분히 건조시킨 샘플은 면도칼로 채취하여 파우더 형태로 얻은 후 XRD (X-ray diffraction) 분석을 통해 결정의 구조를 분석한다.

3.2.3. 미생물과 칼슘유기산 첨가에 따른 콘크리트 압축강도

실험은 세 번에 걸쳐서 수행하였으며 미생물의 첨가량에 따라, 칼슘유기산 첨가물의 종류에 따라, 미생물과 다양한 칼슘유기산이 함께 첨가됨에 따라 콘크리트 압축강도의 변화를 조사하였다.

3.2.3.1. 모르타르 공시체 제작

실험에 필요한 모르타르 공시체는 KS L 5105 수경성 시멘트 모르타르의 압축 강도 시험방법에 따라 제작하였다. 모르타르 공시체 제작에 사용한 재료는 앞의 3.1.2와 동일하게 준비하였다. 한 변의 길이가 50 mm인 입방 시험체를 시험체 성형용 틀로 사용하며, 규정된 시험의 각 재령에 대하여 3개씩 제작하였다. 시험체는 Fig. 3.2a과 같다.

모르타르를 배합하는 시험실은 온도는 20℃에서 27.5℃로 유지하고 상대습도는 50% 이상을 유지하도록 하였다. 물과 시멘트와 모래를 0.5 : 1 : 2.45 무게비로 섞어서 재료를 배합하였으며, 배합은 혼합기를 이용하였다.

시험체 틀 내면에 광유(mineral oil)를 엷게 바르고 틀을 조립한 뒤, 각 틀의 내면 및 아래 윗면에서 여분의 기름을 닦은 후에 혼합기를 이용하여 배합한 모르타르를 시험체 성형용 틀에 채워 넣었다. 배합한 모르타르를 채운 시험체는 온도 (23±2)℃, 습도 90%로 일정하게 유지시킨 항온항습기에서 24시간 동안 습윤양생하고, 탈형하여 23℃ 수조에서 수중양생 하였다. 아래 Fig. 3.3b는 시험체 틀에 모르타르를 채운 모습이고, Fig. 3.3c는 시험체 틀에 모르타르를 채우고 24시간이 경과한 후의 모습, Fig. 3.3d는 시험체 틀을 탈형한 모르타르 공시체의 모습이다.

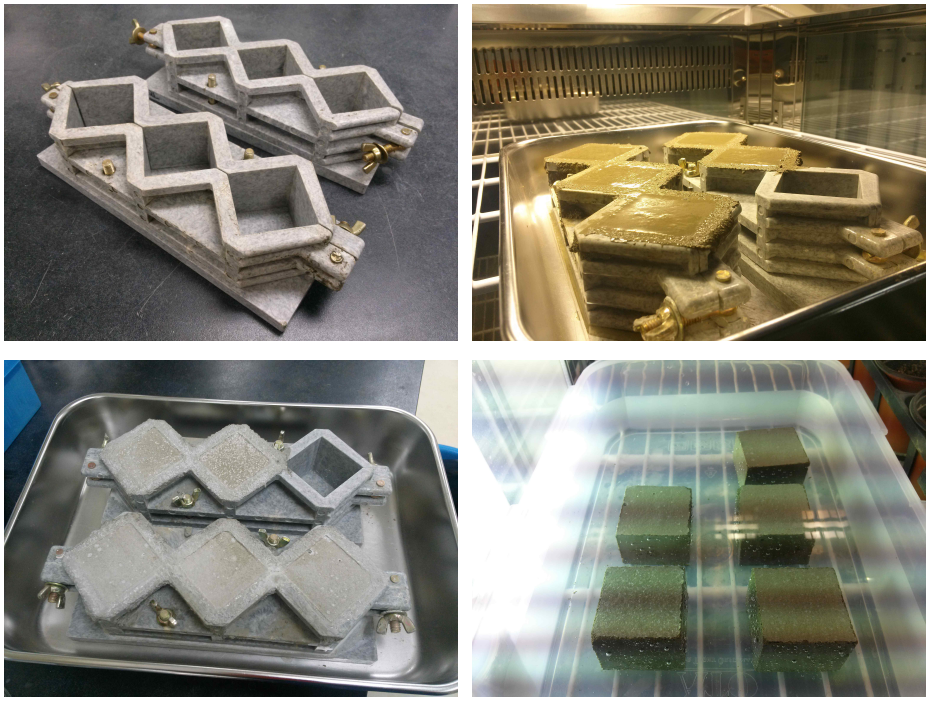

Fig. 3.3 Mortar specimen molds and procedure of curing mortar specimens: (a) mortar specimen molds (50×50×50 mm) (KS L 5105 Testing method for compressive strength of hydraulic cement mortar); (b) mortar specimens filling with mortar paste; (c) mortar specimens after 24 hours elapsed time; (d) demolded mortar specimens.

미생물은 3.1.1에 적은 것과 동일한 포자형성 배지에서 30℃에서 200 rpm으로 5일간 배양하고 내생포자의 형성을 확인한 후, 인산완충액(pH 7)에 2회 세척하여 모르타르 배합 시에 혼합수와 함께 첨가하였다. 칼슘 유기산으로는 3.1.3에서 언급한 포름산칼슘(Calcium formate), 아세트산칼슘(Calcium acetate), 젖산칼슘(Calcium lactate)을 사용하였으며, 시멘트 무게의 1%로 하여 건조배합 시에 시멘트, 모래와 함께 첨가하였다. 실험에서의 실험군과 대조군은 Table. 3.2와 Table 3.3, Table 3.4에 각각 나타내었다.

Table. 3.2 Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing diverse concentration of *Bacillus sp. BY1*

Group	Composition	
	Mortar	Bacteria
Control group	Cement Sand Water	o
Experimental group		10^5 CFU/mL
		10^6 CFU/mL
		10^7 CFU/mL

Table. 3.3 Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing various calcium additives without *Bacillus sp. BY1* addition

Group	Composition	
	Mortar	Calcium additives
Control group	Cement Sand Water	-
Experimental group		Calcium formate
		Calcium acetate
		Calcium lactate

Table. 3.4 Experimental condition of compressive strength testing of cement mortar containing various calcium additives with *Bacillus sp. BY1* addition

Group	Composition		
	Mortar	Bacteria	Calcium additives
Control group	Cement Sand Water	10^6 CFU/mL	-
Experimental group		10^6 CFU/mL	Calcium formate
		10^6 CFU/mL	Calcium acetate
		10^6 CFU/mL	Calcium lactate

3.2.3.2. 압축강도 측정

압축강도 측정 실험은 KS L 5105 수경성 시멘트 모르타르의 압축강도 시험방법에 따라 양생 1, 3, 7, 28일이 경과한 후에 측정하였다. 모르타르 시험체는 압축강도를 측정시키기 바로 전에 수중에서 꺼내 표면의 물기를 완전히 닦아낸 상태에서 강도시험장비를 이용하여 측정하였다. 강도시험장비로는 MTS사의 MTS 815를 사용하였으며, 강도시험장비는 Fig. 3.4와 같다.

Fig. 3.4 Experimental equipment for compressive strength test of mortar specimens (MTS 815)

3.2.4. 자가치유에 의한 균열 폭 감소

3.2.4.1. 콘크리트 공시체 제작

실험에 필요한 콘크리트 공시체의 배합설계는 Table. 3.5와 같고 이때 사용하는 재료는 앞의 3.1.2와 동일하게 준비하였다.

Table. 3.5 Mixing proportion of concrete specimens

물	시멘트	잔 골재	굵은 골재
184	368	736	1012

공시체는 지름 100 mm 높이 200mm의 원주 공시체를 사용하였고 Fig. 3.5a와 같다. 콘크리트의 혼합은 믹서(Fig. 3.5b)를 이용하였고, 이때 시험실의 온도는 20℃에서 27.5℃, 상대습도는 50% 이상으로 유지하였다. 시험체 틀 내면에 광유(mineral oil)를 엷게 바르고 틀을 조립한 뒤, 각 틀의 내면 및 아래 윗면에서 여분의 기름을 닦아내었다. 배합한 콘크리트는 두 번에 나누어서 시험체에 채우고 진동대식 진동기를 이용하여 다져넣었다(Fig. 3.5c). 배합한 콘크리트를 채운 시험체는 온도 (23±2)℃, 습도 90%로 일정하게 유지시킨 항온항습기에서 24시간 동안 습윤양생하고, 탈형하여 23℃ 수조에서 28일간 수중양생 하였다. Fig. 3.5d는 시험체 틀에 콘크리트를 채운 모습이고, Fig. 3.5e는 시험체 틀에 콘크리트를 채우고 24시간이 경과한 후의 모습이며, Fig. 3.5f는 탈형한 공시체의 모습이다. 공시체는 28일 수중양생 후 50 mm 두께로 절단하였다(Fig. 3.5g 와 Fig. 3.5h).

NNC 17-2.

Fig. 3.5 Procedure of preparing concrete specimens: (a) concrete specimen molds (ϕ100×200 mm); (b) mixing concrete paste using a laboratory concrete mixer; (c) compacting the concrete paste into molds using vibrating table; (d) concrete specimens filled with concrete paste; (e) concrete specimens after 24 hours elapsed time; (f) demolded concrete specimens; (g) cutting the specimen using specimen cutting machine after 28 days curing period; (h) prepared concrete specimen.

미생물과 칼슘유기산은 3.2.3.1. 모르타르 공시체 제작에서와 동일하게 첨가하였다. 본 실험에서의 실험군과 대조군은 Table. 3.6에 나타내었다.

Table. 3.6 Experimental condition for testing of concrete microcrack remediation efficiency

Group	Composition		
	Concrete	Bacteria	Calcium additives
Control group	Cement Sand Gravel Water	-	-
Experimental group		-	Calcium lactate
		10^6 CFU/mL	-
		10^6 CFU/mL	Calcium formate
		10^6 CFU/mL	Calcium acetate
		10^6 CFU/mL	Calcium lactate

3.2.4.2. 인공 미세균열 형성

50 mm 두께로 절단한 공시체는 인장 쪼갬 실험을 통해 인공 미세균열을 형성하였다. 실험은 MTS 815 기기를 이용하여 수행하였고, 하나의 공시체 당 한 개의 인공 미세균열을 유발하였다. 기기의 양 테이블과 공시체 단면의 지름이 수직을 이루도록 공시체를 위치시키고 1 μm/sec의 일정한 속도로 변위를 증가시키면서 수직 인장 응력을 가하였다 (Wang et al., 1997; Aldea et al., 1999a; Aldea et al., 1999b). (Fig . 3.6a와 Fig. 3.6b).

공시체에 유발한 인공 균열 중 100 μm 이하의 폭을 가지는 미세균열을 선정하여 이후의 실험을 수행하였다. 인공 미세균열이 형성된 공시체의 단면 모습은 Fig. 3.7a, Fig 3.7b와 같다.

Fig. 3.6 Splitting test for inducing crack in the specimen

Fig. 3.7 Crack generated concrete specimen

3.2.4.3. 미생물에 의한 콘크리트 미세균열 치유

3.2.4.2에서 인공 미세균열을 형성한 공시체는 콘크리트 내부의 미생물의 활성을 증가시키기 위하여 멸균한 알칼린 영양배지에 24시간 담가두었다. 24시간이 경과한 후에 실험체 외부의 배지를 잘 닦아내고 온도 (25±2)℃의 수조에 담가둔다. 2주일에 한번 수조에 공시체를 꺼내 균열의 모습을 실체현미경으로 모습을 촬영하고, 균열폭 감소량을 측정하여 콘크리트 미세균열의 치유과정을 살펴보았다.

3.3. 분석 방법

3.3.1. 미생물 분석

미생물의 성장은 OD(Optical Density)와 개체수 측정을 통해 확인하였다. OD는 분광광도계(2120UV, Optizen, 한국)로 600 nm에서 측정하였고, 개체수는 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 미생물 배양액을 10^2, 10^4, 10^6, 10^8 배 희석시킨 후 알칼린 평판배지(Alkaline nutrient agar)에 도말하여 24시간 배양한 후 개수하였다.

미생물의 내생포자 형성은 광학현미경(AXIO Imager A1, Carl zeiss, 독일) 촬영을 통하여 확인하였다.

3.3.2. 결정 형상 분석 (FE-SEM)

결정의 형상은 표면 분석 기기 중 하나인 FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope)로 분석하였다. 3.2.2의 커버글라스는 전도성 탄소 테이프에 고정하고, 백금 코팅을 하여 표면에 전도성을 부여한 후에 FE-SEM 촬영을 하였다. 백금 코팅기는 BAL-TEC사의 SCD 005를 사용하였고, FE-SEM은 Carl Zeiss사의 AURIGA FE-SEM을 사용하였다. 이 때 해상도는 1.0nm @15kV로 하였다.

3.3.3. 결정 구조 분석 (XRD)

결정의 구조는 무기 분석 기기 중 하나인 분말 XRD (X-ray Diffraction)로 분석하였다. Bruker사의 D8 ADVANCE with Davinci를 사용하여 분석하였고, 이때 검출기로는 LYNX EYE XE를 사용하였다. 2 Θ 범위는 5에서 80도로 하였고 1 degree/min의 속도로 측정하였다.

3.3.4. 실체현미경 (Stereomicroscope)

시험체 인공 미세균열의 균열 폭은 실체현미경 촬영을 통해 얻었다. Carl Zeiss사의 Stemi DV4 spot stereomicroscope를 사용하였고, 8, 16, 25, 32배율에서 촬영하였다.

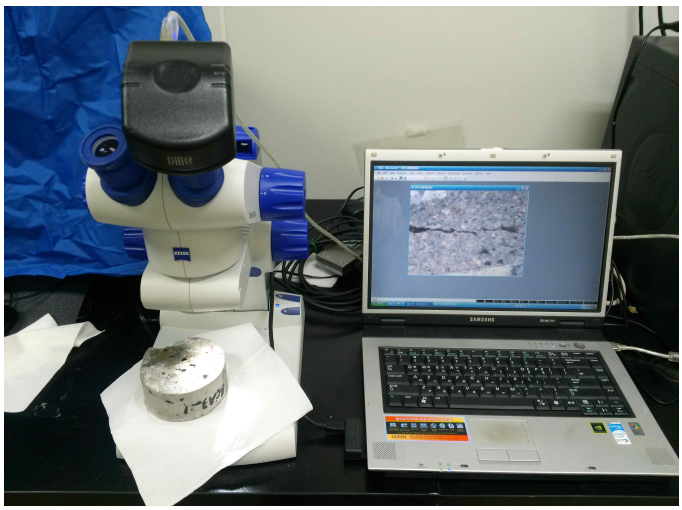

Fig. 3.8. Stereomicroscope set up

4. 실험 결과 및 고찰

4.1. 호알칼리성 포자형성 생체광물 미생물 분리

4.1.1. 토양 내 호알칼리성 포자형성 미생물 분리

경기도 안산시 시화호 간척지의 약알칼리 토양에서 서식하는 미생물 중 알칼리 환경에서 활동성을 가지며, 내생포자를 형성하여 열과 화학물질에 강한 내구성을 가지는 미생물을 분리하였다.

pH 9.7의 알칼린 평판배지(Nutrient Broth 8 g/L, $NaHCO_3$ 4.2 g/L, Na_2CO_3 5.3 g/L, Agar 15 g/L)에서 배양한 콜로니의 특징을 육안으로 관찰하여 97 종의 콜로니를 분리하였다. 분리한 97 종 콜로니는 포자형성배지에 접종하여 5일간 배양한 후, 광학현미경 관찰을 실시하여 내생포자를 형성하는 미생물 22종을 선별하였다. 현미경을 통해 관찰한 포자는 Fig. 4.1과 같다. 그림에서 검정색의 막대 모양의 물체가 미생물(*Bacillus sp. BY1*)이고, 검정색 막대 모양 속에 흰색의 구형 물체가 미생물이 형성한 내생포자이다. 선별한 22종 미생물에 대해 포자형성정도와 성장도를 비교하였고, 최종적으로 6종의 미생물을 선정하였다.

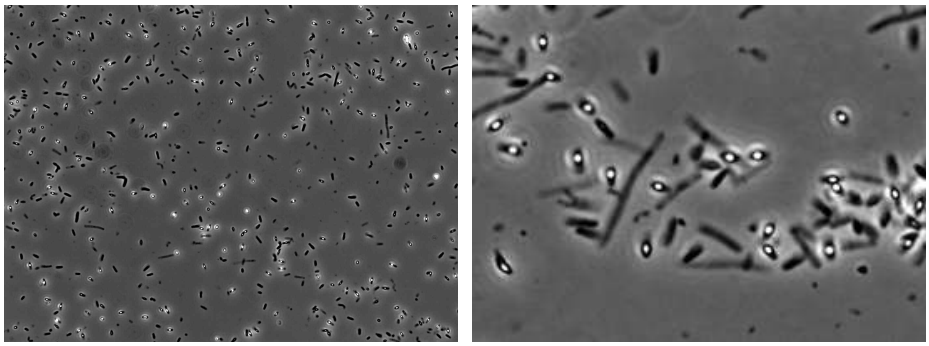

Fig. 4.1 Image of spores formed by isolated spore-forming bacteria, *Bacillus sp. BY1.*

최종적으로 분리한 호알칼리성 포자형성 미생물 6종에 대하여 16S ribosomal DNA 염기서열 분석을 실시한 결과 분리한 미생물은 *Bacillus pseudofirmus*와 100%의 상등성을 가졌다. 미생물은 DDBJ에 *Bacillus sp. BY1*(Accession number: AB830103)으로 등록하였으며, 그 계통학적 관계도는 Fig. 4.2와 같다. ■ BY1이 본 연구에서 분리한 미생물이며, *Desulfurococcus fermentans* (Z-1312)와 *Desulfurococcus mobilis* (M36474)는 아래 계통수(Phylogenetic tree)의 Out group이다.

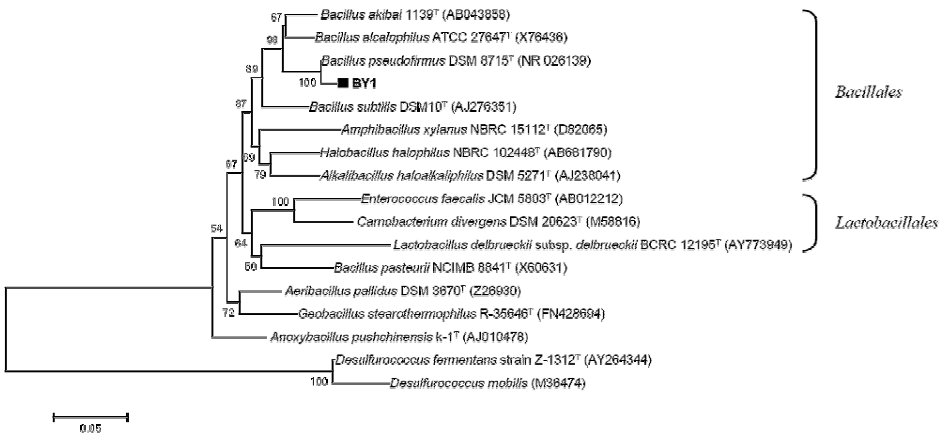

Fig. 4.2 Phylogenetic relationship of isolated bacteria from alkaline soil, *Bacillus sp. BY1*

4.1.2. 미생물의 pH 저항성 평가

pH 10에서 13의 범위에서 *Bacillus sp. BY1*를 배양하며 pH 내구성을 평가한 결과는 Fig. 4.3과 같다. OD 측정을 통해 살펴본 결과 pH 11에서는 느린 성장을 보이고 pH 12이상에서는 성장이 보이지 않았다. 하지만 개체수 측정을 통해 살펴보았을 때 pH 12 이상에서도 일정 개체수를 유지하며 생존하고 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 연구에서 분리한 미생물 *Bacillus sp. BY1*이 pH 10 이상의 알칼리 환경에서 생존이 가능하고, 따라서 콘크리트 미세균열 자가치유 연구에 적용이 가능함을 확인하였다.

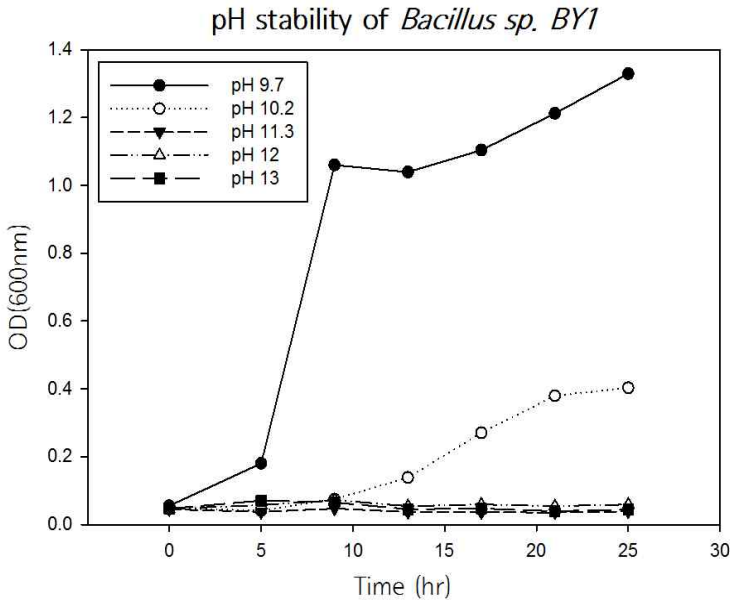

Fig. 4.3 Growth curve of *Bacillus sp. BY1* in various pH condition

Table. 4.1 Counting the bacterial cell number on the growth of *Bacillus sp. BY1* in various pH range

pH	0 h	5 h	13 h	21 h	25 h
pH 9.7	0	$7.5X10^{6}$	$6.0X10^{8}$	$4.5X10^{8}$	$5.0X10^{8}$
pH 10.2	0	$1.4X10^{5}$	$2.7X10^{7}$	$2.5X10^{6}$	$3.0X10^{7}$
pH 11.3	0	$3.9X10^{3}$	$9.5X10^{4}$	$3.0X10^{5}$	$1.4X10^{5}$
pH 12	0	$3.1X10^{4}$	0	$5.3X10^{5}$	$4.4X10^{5}$
pH 13	0	$5.0X10^{1}$	0	$5.0X10^{3}$	$1.5X10^{4}$

4.1.3. 생체광물 형성 실험

토양에서 분리한 *Bacillus sp. BY1*의 생체광물 형성을 유도하고 형성 유무를 광학현미경을 통해 확인하였다. 광학현미경 통해 Fig. 4.4와 같이 막대 모양의 결정이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. Fig. 4.4b에 표시한 부분이 미생물이며, 미생물과 결합하여 결정을 형성하였음을 관찰하였다. 이전의 연구들에서도 이와 유사하게 미생물에 의한 결정 형성을 유도하였고, 미생물과 결합한 형태의 결정 사진을 얻었다(Jonkers and Schlangen, 2008). 이러한 결과를 통해, 본 연구에서 분리한 *Bacillus sp. BY1*이 생체광물형성 유도능력을 가짐을 확인하였다.

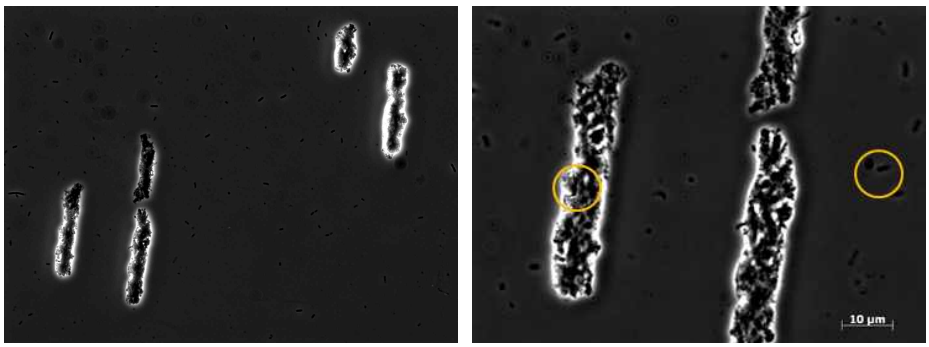

Fig. 4.4 Image of biomineral formation induced by *Bacillus sp. BY1.* (a) 400x; (b) 1000x

4.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가가 탄산칼슘 결정 형성과 콘크리트 특성에 미치는 영향

4.2.1. 미생물과 칼슘유기산 첨가 시 결정의 형상과 구조

4.2.1.1. 미생물 첨가 시 결정의 형상 변화

Ammonium carbonate free-drift method (Becker et al., 2003; Braissant et al., 2003; Lian et al., 2006; Li et al., 2013)를 통해 미생물의 존재 유무가 결정의 형상에 미치는 영향을 살펴본 결과, 미생물이 존재하지 않은 경우 결정은 능면체 혹은 구정상의 규칙적인 결정상을 나타냈지만, 미생물이 존재할 때 결정은 대부분 표면이 울퉁불퉁한 구형의 형상으로 나타났다. 첨가해준 칼슘원이 포름산칼슘(Calcium formate), 아세트산칼슘(Calcium acetate), 젖산칼슘(Calcium lactate)으로 달라져도 결정 형상에 미생물이 미치는 영향은 유사한 경향성을 보였다.

포름산칼슘(Calcium formate)이 칼슘원으로 존재 할 때, 미생물을 첨가하지 않았을 때 결정은 Fig. 4.5a와 Fig. 4.5b와 같이 대부분 능면체(Rhombohedral, 능면 결정면을 가진 평행육면체)나 능면체의 결합체의 형상을 나타내었고, 미생물을 첨가하였을 때 결정은 Fig. 4.5c와 Fig. 4.5d와 같이 전체적으로 울퉁불퉁하고 불규칙한 구형과 타원형의 형상을 나타내었다. 이 때 전체적인 형상은 구형이었지만, 결정의 표면은 각진 면들이 붙어있는 모습으로 나타났다.

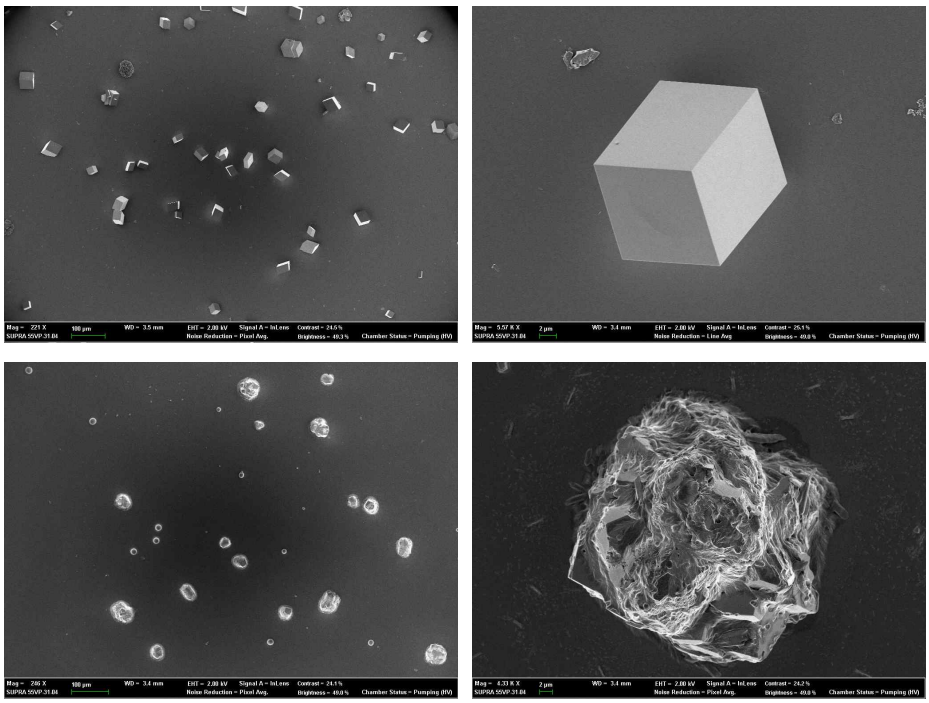

Fig. 4.5 Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium formate addition (a) overview of crytals without *Bacillus sp. BY1*; (b) detail of crystal morphology without *Bacillus sp. BY1*; (c) overview of crytals with *Bacillus sp. BY1*; (d) detail of crystal morphology with *Bacillus sp. BY1*;

아세트산칼슘(Calcium acetate)이 칼슘원으로 존재 할 때, 미생물을 첨가하지 않았을 때 결정은 Fig. 4.6a와 Fig. 4.6b와 같이 능면체(Rhombohedral)와 바늘로 둘러싸인 것 같은 혹은 산호모양의 형상을 나타내었고, 미생물을 첨가하였을 때 결정은 Fig, 4.6c와 Fig. 4.6d와 같이 전체적으로 울퉁불퉁하고 불규칙한 구형과 타원형의 형상을 나타내었다. 이 때 형성된 결정의 크기와 모양은 비교적 동일하였다.

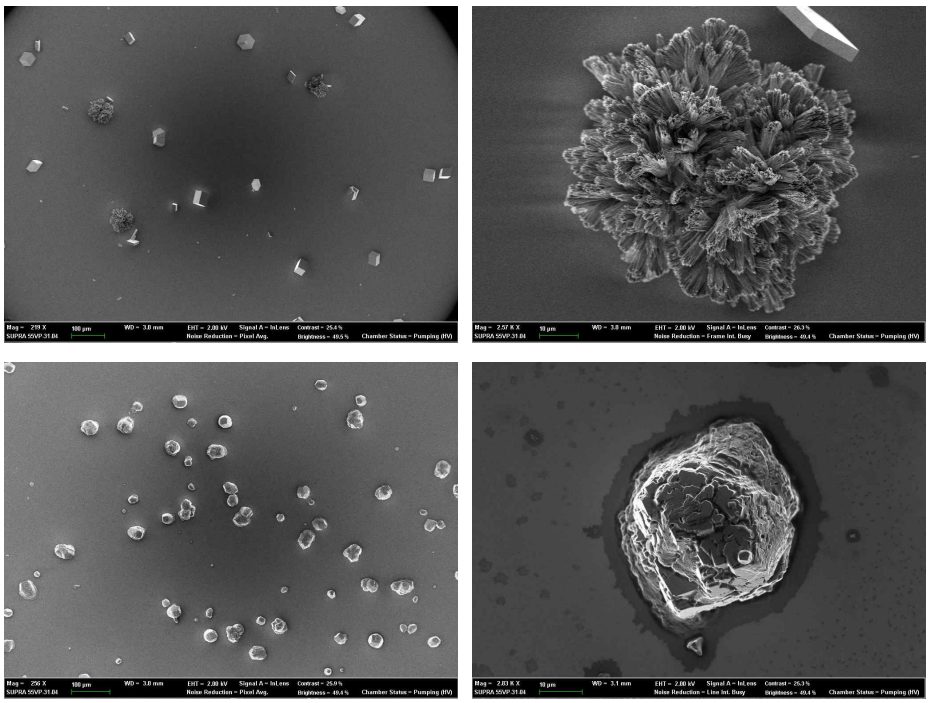

Fig. 4.6 Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium acetate addition (a) overview of crytals without *Bacillus sp. BY1*; (b) detail of crystal morphology without *Bacillus sp. BY1*; (c) overview of crytals with *Bacillus sp. BY1*; (d) detail of crystal morphology with *Bacillus sp. BY1*;

젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 존재 할 때, 미생물을 첨가하지 않았을 때 결정은 Fig. 4.7a와 Fig. 4.7b와 같이 능면체(Rhombohedral)와 회전구형체(Sperulites)의 형상으로 나타났고 능면체보다 회전체의 형상을 가진 결정이 많이 관찰 되었다. 반면, 미생물을 첨가하였을 때 결정은 Fig, 4.7c와 Fig. 4.7d와 같이 각진 면들이 모여있는 것처럼 보이는 표면을 가지고, 불규칙적이고 각진 형상을 가지는 것으로 보여졌다.

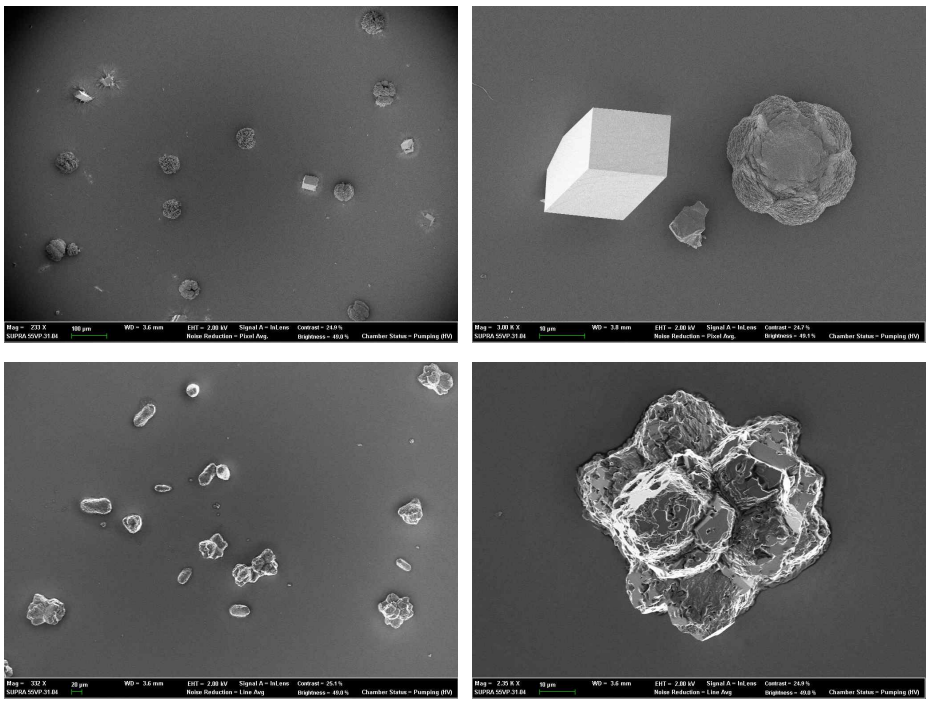

Fig. 4.7 Differences in crystal morphology with and without *Bacillus sp. BY1* in calcium lacetate addition (a) overview of crytals without *Bacillus sp. BY1*; (b) detail of crystal morphology without *Bacillus sp. BY1*; (c) overview of crytals with *Bacillus sp. BY1*; (d) detail of crystal morphology with *Bacillus sp. BY1*;

위의 결과는 선행연구(see Lian et al., 2006; Braissant et al., 2003; Becker et al., 2003)들에서 살펴본 미생물의 첨가에 따른 결정의 형상 변화와 유사한 경향성을 보였다. 이렇듯 미생물의 존재 유무에 따라 $CaCO_3$ 결정의 형상에 큰 변화가 있었고, 이는 $CaCO_3$와 핵형성이 일어나는 표면과의 상호작용(see Archibald et al.; Berman et al., 1995), 결정 성장과정에서 유기물과 무기물의 상호작용(see Mann, 2001), 미생물의 대사물질 또는 EPS (Extracellular Polymeric Substances) (see Braissant et al., 2003; Li et al., 2013)의 존재 등이 결정화 과정에서 영향을 미치기 때문이다.

미생물의 존재가 결정 형상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 미생물이 존재 할 때의 결정의 초기 형성과 성장 과정을 살펴보았다. 아래의 Fig. 4.8은 미생물과 함께 젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 존재할 때 1, 2, 4, 8, 14, 24 시간이 경과한 후 형성된 결정의 모습이다.

*Bacillu sp. BY1*의 표면에 구형의 조그만 결정의 핵들이 붙어있는 것을 확인하였고(Fig. 4.8a 와 Fig. 4.8b), 이를 통해 미생물의 세포 외벽이 핵형성 위치로 작용하여 미생물 표면에서부터 결정의 핵을 형성하는 것을 확인하였다. 시간이 경과하면서 결정의 핵들이 미생물 표면을 가득 채웠고, 이렇게 결정핵으로 덮인 미생물들이 모여 Fig. 4.8c와 같은 모습으로 초기 결정을 형성하였다. 초기 결정은 계속적으로 미생물과 탄산칼슘과 상호작용하면서 성장하였다. 2시간, 4시간이 경과한 후의 결정 크기는 약 4 μm와 9 μm였으나, 8시간이 경과한 후에 약 45 μm, 14시간이 경과한 후에는 약 74 μm로, 결정이 미생물보다 큰 크기로 계속 성장하고, Fig. 4.8d, Fig. 4.8e와 같은 형상으로 발전하였다. 충분히 성장한 결정들은 서로 교차를 형성하며 Fig. 4.8f와 같이 쌍정결정(Twin crystal) 또는 다결정(Poly crystal)로 존재하였다.

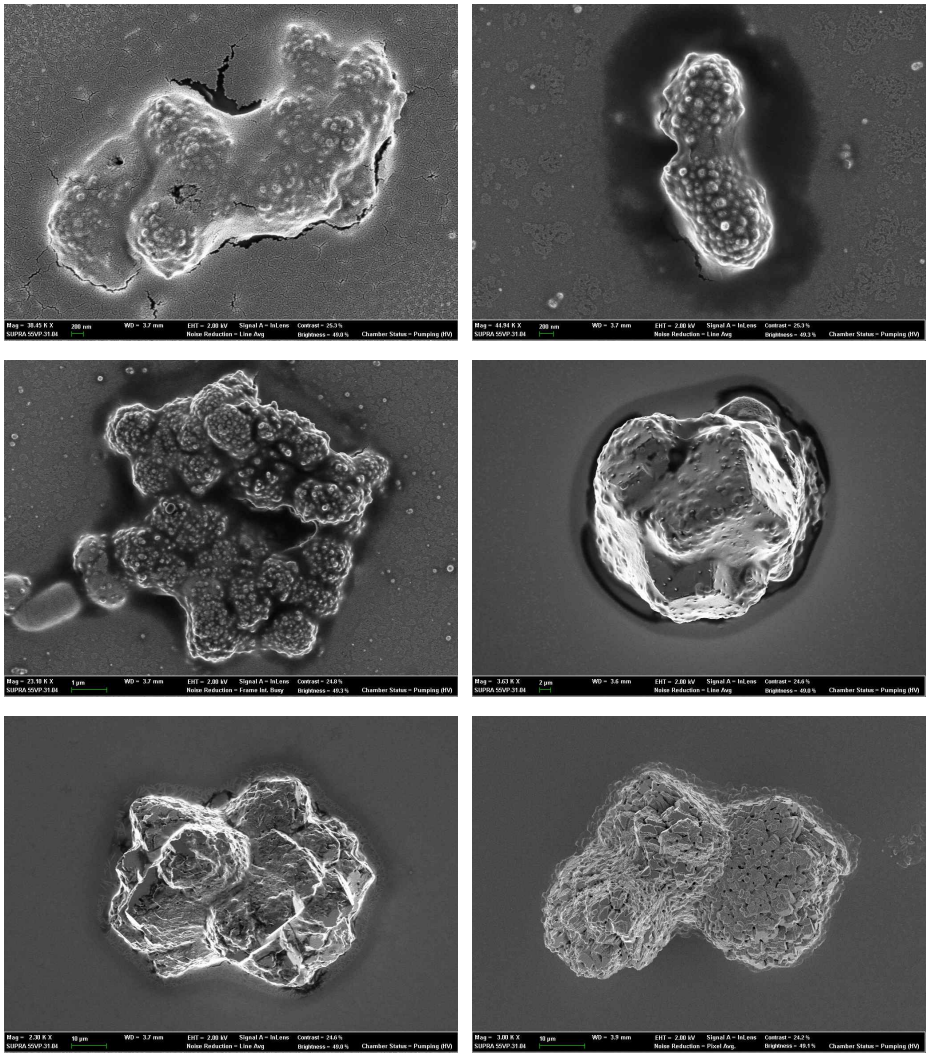

Fig 4.8 Growth of crystals with *Bacillus sp. BY1* and Calcium lactate addition after (a) 1h; (b) 2h; (c) 4h; (d) 8h; (e) 14h; (f) 24h.

4.2.1.2. 다양한 칼슘유기산 첨가 시 결정의 형상 변화

결정의 형상은 첨가해준 칼슘유기산의 종류에 따라서도 다르게 나타났다. Fig. 4.9.는 포름산칼슘(Calcium formate)이 칼슘원으로 존재할 때, Fig. 4.10은 아세트산칼슘(Calcium acetate)이 칼슘원으로 존재할 때, Fig. 4.11은 젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 존재할 때의 결정 형상이다. 아세트산칼슘(Calcium acetate)이 존재할 때 결정이 대체적으로 구형의 형태를 가지고 표면도 둥글고 부드러운 모양으로 나타난 반면에, 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 첨가되었을 때에는 불규칙적이고 각진 면을 가진 결정의 형상과 능면체(Rhombohedral)의 면들이 모여 있는 표면 모습이 나타났다. 또한, 포름산칼슘(Calcium formate)을 첨가하였을 때와 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 형성된 결정은 유사한 형태를 가졌지만, 포름산칼슘(Calcium formate)이 존재할 때 표면이 얼기설기 얽혀있는 것과 같은 모습으로 나타나는 등 표면 모습에서 차이를 보였다. 각 칼슘원에 대해서 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때, 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때, 미생배양액을 첨가하였을 때의 결정 형상을 살펴보면 칼슘첨가제의 종류에 따른 결정 형상의 변화가 더 명확히 보인다.

Fig. 4.9는 포름산칼슘(Calcium formate)이 칼슘원으로 존재할 때 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때의 결정 형상(Fig. 4.9a와 Fig. 4.9b), 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때 결정의 형상(Fig. 4.9c)과 표면(Fig. 4.9d), 미생물 배양액을 첨가하였을 때의 결정의 형상(Fig. 4.9e)과 표면(Fig. 4.9f) 모습이다. 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때 결정은 대부분 일반적인 $CaCO_3$의 형상으로 알려진 능면체(Rhombohedral)의 구조를 보였다. 하지만 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때에는 결정의 형상과 표면에 변화가 있었다. 결정은 울퉁불퉁한 형상을 보이고, 표면은 섬유질로 얽혀있는 것과 같은 모양으로 나타났다. 이러한 결정의 형상과 표면 모습의 변화는 미

생물 배양액을 첨가하였을 때에도 유사한 경향을 띄면서 나타났다.

Fig. 4.10은 아세트산칼슘(Calcium acetate)이 칼슘원으로 존재할 때 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때의 결정 형상(Fig. 4.10a와 Fig. 4.10b), 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때 결정의 형상(Fig. 4.10c, Fig. 4.10d), 미생물 배양액을 첨가하였을 때의 결정의 형상(Fig. 4.10e)과 표면(Fig. 4.10f) 모습이다. 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때 결정은 대부분 $CaCO_3$의 형상으로 알려진 능면체(Rhombohedral) 또는 판상(Tabular)면들로 이루어진 회전체(Sperulites)의 구조를 보였다. 하지만 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때에는 결정은 부드러운 구형 혹은 모서리가 부드러운 능면체(Rhombohedral)의 형상을 보이며 전체적으로 둥근 결정들을 형성하였다. 이러한 결정 형상의 변화는 미생물 배양액을 첨가하였을 때도 유사한 경향을 띄었으며, 결정은 주로 둥근 형태로 나타났으며, 표면도 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 보다 부드러운 곡면들로 이루어졌다.

Fig. 4.11은 젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 존재할 때 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때의 결정 형상(Fig. 4.11a와 Fig. 4.11b), 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때 결정의 형상(Fig. 4.11c)과 표면(Fig. 4.11d), 미생물 배양액을 첨가하였을 때의 결정의 형상(Fig. 4.11e)과 표면(Fig. 4.11f) 모습이다. 미생물 용액을 첨가하지 않았을 때 결정은 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때와 유사하게 $CaCO_3$의 형상으로 알려진 능면체(Rhombohedral) 또는 판상(Tabular)면들로 이루어진 회전체(Sperulites)의 구조를 보였지만, 결정 주변이 편삼각면체(Scalenohedral) 혹은 바늘모양(Needle like)으로 얽혀있는 모습을 보였다. 0.22 μm 실린지 필터를 통과한 미생물 상등액을 첨가하였을 때 결정은 포름산칼슘(Calcium formate)이 첨가되었을 때 보다 더 각지고 울퉁불퉁한 형상으로 나타났고, 표면도 판상(Tabular)이 쌓여있는 혹은 능면체(Rhombohedral)나 주상(Prismatic)의 결정이 모여 있는 모습으로 보여

졌다. 이러한 결정 형상의 변화는 미생물 배양액을 첨가하였을 때도 유사한 경향을 띄었다. 결정은 포름산칼슘(Calcium formate)을 첨가하였을 때 보다 더 각지고 울퉁불퉁한 형상과 표면 모습을 보였다.

미생물 상등액에는 미생물이 없음에도 형상과 구조, 표면 모습에 변화가 나타난 것으로 보아, 미생물의 존재 자체 보다 상등액에 존재하는 미생물 대사산물과 유기산의 상호작용이 결정 형상에 크게 영향을 미치는 것으로 보여 졌다. 또한 미생물 상등액 첨가 시와 미생물 배양액 첨가 시 형성된 결정의 형상과 표면모습이 유사한 경향성을 가지는 것으로 보아, 이러한 결정 형상의 경향성에 칼슘유기산의 종류가 기여했음을 알 수 있었다. 이와 같이 결정의 형상은 칼슘유기산 첨가제의 종류에 따라 다르게 나타났고, 선행연구들에 따르면 탄산칼슘 결정의 형상은 용액 내의 아미노산이나 유기산의 종류나 양에 따라 다르게 나타나며(see Braissant et al., 2003; Mann et al, 1990), 이는 미생물이 존재할 때에 유기물과 무기물의 상호작용 과정에 영향을 미치며 결정의 형상 변화를 야기한다(Mann, 2001). 이렇게 칼슘유기산의 종류에 따라 다르게 나타나는 결정의 형상은 결정의 압밀도와 생성속도, 균열 치유 속도와 효율에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

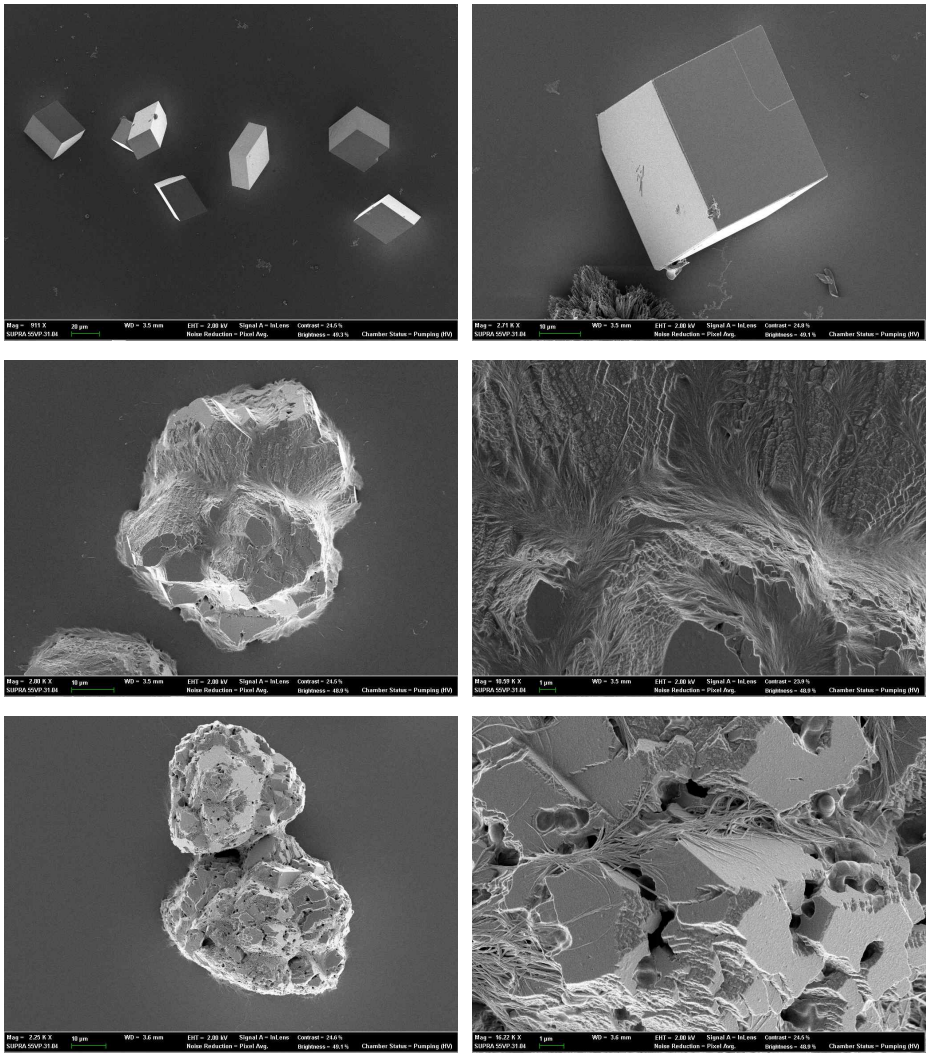

Fig. 4.9 Effect of different calcium formate on crystal morphology and crystal surface. (a) overall crystal shape with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium formate; (b) surface of crystal with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium formate; (c) overall crystal shape with 0.22 μm filltered bacterial supernatant and calcium formate; (d) surface of crystal with 0.22 μm filltered bacterial supernatant cultured medium and calcium formate.

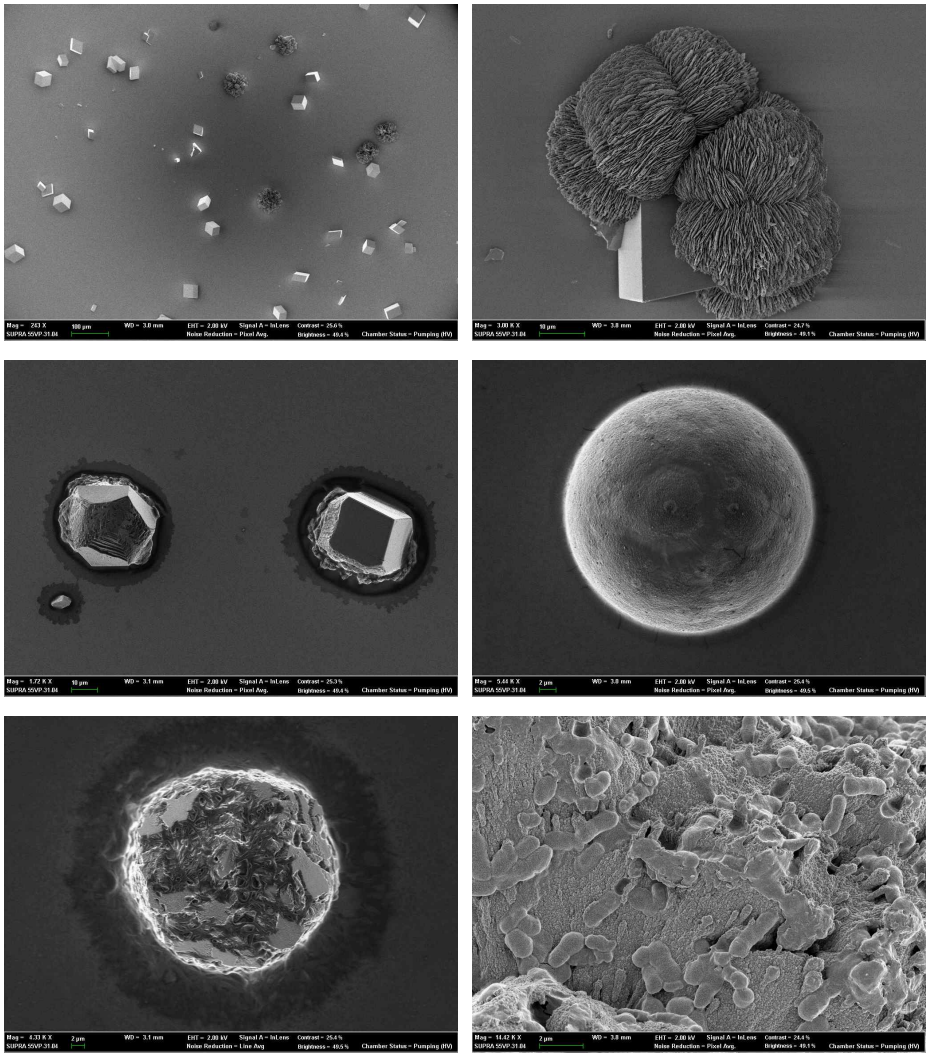

Fig. 4.10 Effect of different calcium acetate on crystal morphology and crystal surface. (a) overall crystal shape with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium acetate; (b) surface of crystal with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium acetate; (c, d) overall crystal shape with 0.22 μm filltered bacterial supernatant and calcium acetate.

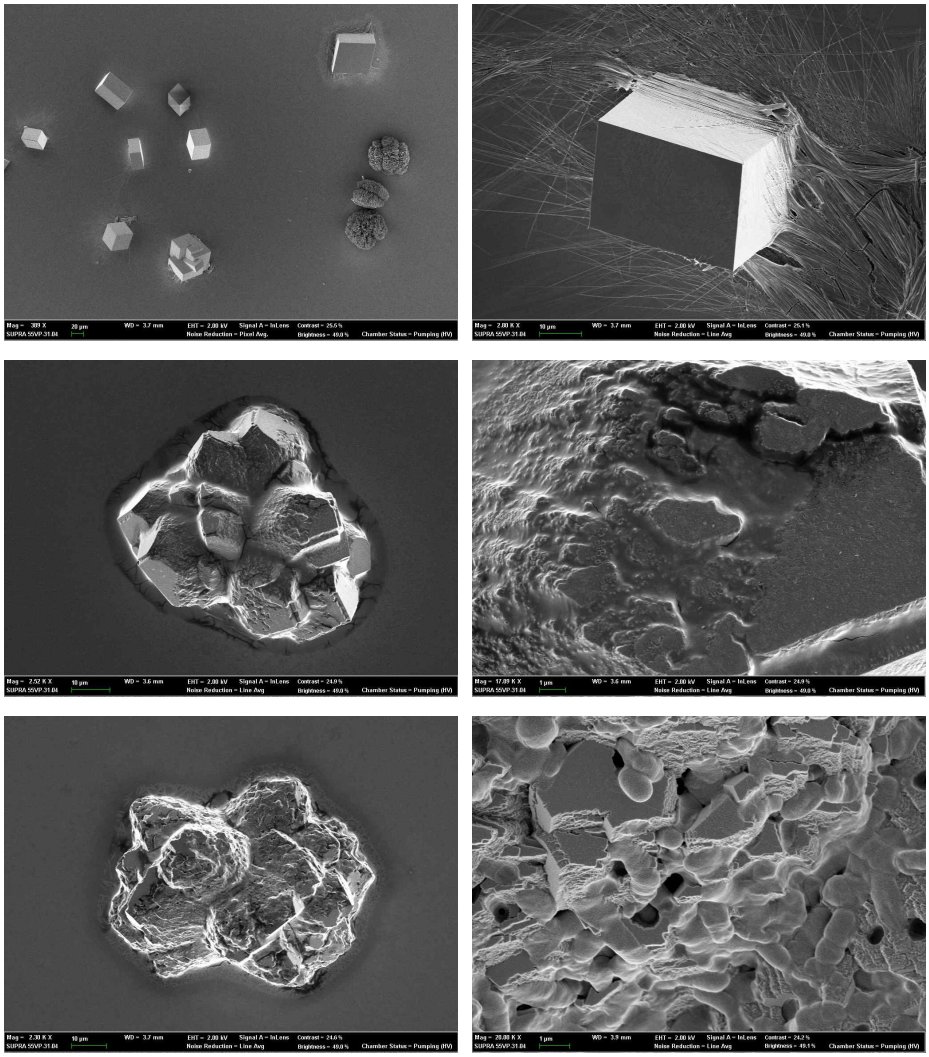

Fig. 4.11 Effect of different calcium lactate on crystal morphology and crystal surface. (a) overall crystal shape with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium lactate; (b) surface of crystal with *Bacillus sp. BY1* cultured medium and calcium lactate; (c) overall crystal shape with 0.22 μm filltered bacterial supernatant and calcium lactate; (d) surface of crystal with 0.22 μm filltered bacterial supernatant cultured medium and calcium lactate.

4.2.1.3. 미생물과 다양한 칼슘유기산 첨가 시 결정의 광물 구조 변화

미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가는 결정의 형상뿐만 아니라 광물 구조에도 영향을 미쳤다. Ammonium carbonate free-drift method (Becker et al., 2003; Braissant et al., 2003; Lian et al., 2006; Li et al., 2013)를 통해 얻은 결정의 광물 구조를 XRD (X-ray Diffraction)로 분석한 결과, 각각의 조건들에서 형성된 결정의 XRD peak는 모두 $CaCO_3$의 XRD peak와 일치하였지만 광물의 구조에서 차이를 보였다.

미생물을 첨가하지 않았을 때 생성된 결정은 Fig. 4.12의 XRD peak를 통해 볼 수 있는 것과 같이 대부분 방해석(Calcite)의 형태로 존재하지만, 미생물을 첨가하였을 때에는 Fig. 4.13의 XRD peak에서 보이는 것과 같이 방해석(Calcite)외에 아라고나이트(Aragonite) 결정도 일부 형성되는 것으로 보여 졌다. 무수탄산칼슘의 광물 구조는 방해석(Calcite), 아라고나이트(Aragonite), 바테라이트(Vaterite)의 세 가지 형태로 존재하고 그 중 방해석(Calcite)이 가장 안정적인 구조를 이루고 있다(Gopi et al., 2013). 미생물의 존재 유무가 형성되는 결정 구조의 안정성에 영향을 미친 것으로 생각 되었으며, 이 역시 결정 형상에서와 유사하게 미생물의 대사산물과 미생물과 유기산의 상호작용의 영향이라고 생각 된다.

칼슘원으로 첨가 된 칼슘유기산의 종류에 따라서도 광물의 구조는 다르게 나타났다. 4.2.1.1.와 4.2.1.2.에서 결정의 형상을 통해 보았을 때에도 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 각진 형상과 표면을 가진 결정을 형성한 반면 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때 둥근 형상과 부드러운 표면의 결정을 형성하였다. Fig. 4.12와 Fig. 4.13의 XRD peak와 Table 4.2.의 각 조건서 형성된 결정들의 광물 구조 비율을 통해 봤을 때도, 미생물의 존재 유무와 무관하게 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때 형성된 결정 중 방해석(Calcite)이 차지하는 비율이 적었다. 미생물을 첨가되지 않은 조건에서도 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 칼슘원으로 사용한 경우 방해석(Calcite)의 결정만 형성되었지

만, 아세트산칼슘(Calcium acetate)를 칼슘원으로 사용한 경우 방해석(Calcite)이 91.18%, 바테라이트(Vaterite)가 8.82% 형성 되었다. 즉, 포름산칼슘(Calcium formate)이나 젖산칼슘(Calcium lactate)이 칼슘원으로 제공되었을 때 보다 무르고 불안정한 탄산칼슘 결정을 형성하였다고 생각할 수 있다. 미생물이 첨가된 조건에서도 아라고나이트(Aragonite)가 차지하는 비율이 38.52%로 가장 많았다.

이를 통해 미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가가 결정의 형상뿐만 아니라 광물 구조에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 미생물의 존재와 칼슘유기산의 선정이 균열 내부에 형성되는 탄산칼슘 결정의 밀도와 안정성 등에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

Table. 4.2 Distribution of the calcium carbonate crystal structure on various experimental condition

Calcium source	Bacterial source	
	No *Bacillus sp. BY1* addition	*Bacillus sp. BY1* addition
Calcium formate	Calcite 100%	Calcite 100% Aragonite 5.81%
Calcium acetate	Calcite 91.18% Vaterite 8.82%	Calcite 100% Aragonite 38.52%
Calcium lactate	Calcite 100%	Calcite 100% Aragonite 8.46%

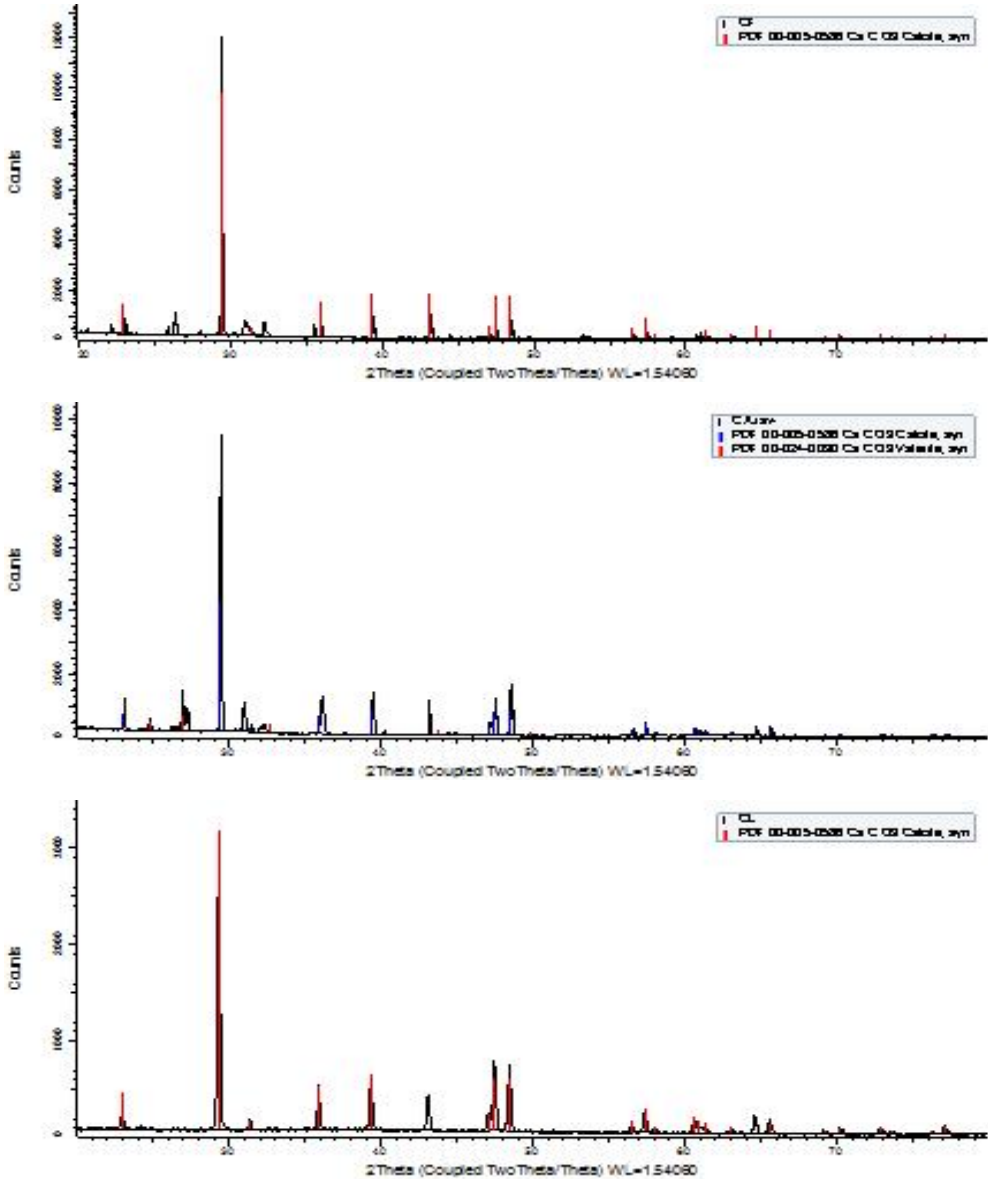

Fig. 4.12 X-ray diffractograms of $CaCO_3$ crystals in the absence of *Bacillus sp. BY1.* (a) crystal peak associated with calcium formate addition; (b) crystal peak associated with calcium acetate addition; (c) crystal peak associated with calcium lactate addition

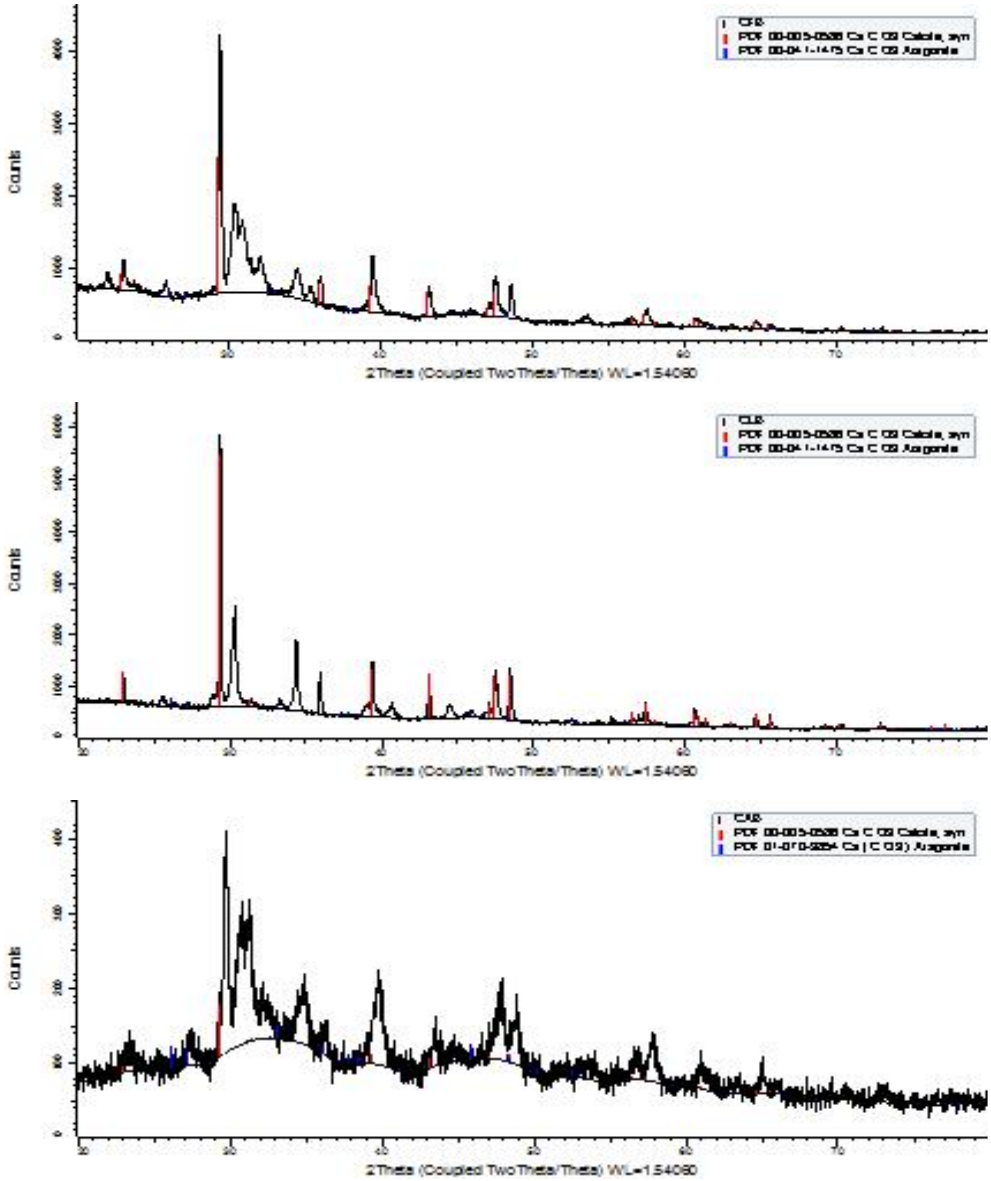

Fig. 4.13 X-ray diffractograms of $CaCO_3$ crystals in the presence of *Bacillus sp. BY1.* (a) crystal peak associated with calcium formate addition; (b) crystal peak associated with calcium acetate addition; (c) crystal peak associated with calcium lactate addition

4.2.2. 미생물과 칼슘유기산 첨가 시 콘크리트 압축강도

4.2.2.1. 미생물 첨가 농도에 대한 압축강도 변화

미생물 첨가 농도에 대한 콘크리트 모르타르의 압축강도 실험 결과는 Fig. 4.14, Table. 4.3과 같다. 콘크리트 모르타르 배합 시에 첨가한 미생물의 농도가 증가할수록 28일 재령 압축강도는 94.2%, 93.4%, 90.5%로 점차 감소하는 경향을 보였다. 콘크리트가 수화되어 강도를 발현하는 과정에서 미생물이 이물질 혹은 수화지연제로 작용한 것으로 여겨진다. 하지만 미생물 농도가 3.1×10^6 CFU/mL 첨가 될 때까지는 강도의 감소량이 통계적으로 유의한 수준으로 나타나지는 않았다.

미생물의 첨가가 콘크리트 및 모르타르의 강도에 미치는 영향은 연구에 따라 상이한 결과를 보였다. 미생물의 첨가가 콘크리트 및 모르타르의 강도를 증가시키기도 하였고(see Chahal et al., 2012; Ghosh et al., 2009; Ramachandran et al., 2001), 모르타르의 강도를 감소시키기도 하였다(see Jonkers and Schlangen, 2008; Jonkers and Schlangen, 2009; Jenkers, 2007; Jenkers et al., 2010). 본 연구의 경우 미생물의 첨가가 콘크리트 모르타르의 강도를 증가시키지는 못하였지만, 미생물의 농도가 $1\text{-}10\times10^6$ CFU/mL 이하인 경우 강도의 감소량이 크지 않았기 때문에, 따라서 이후의 실험에서는 $1\text{-}10\times10^6$ CFU/mL 농도의 미생물을 첨가하여 실험을 진행하였다.

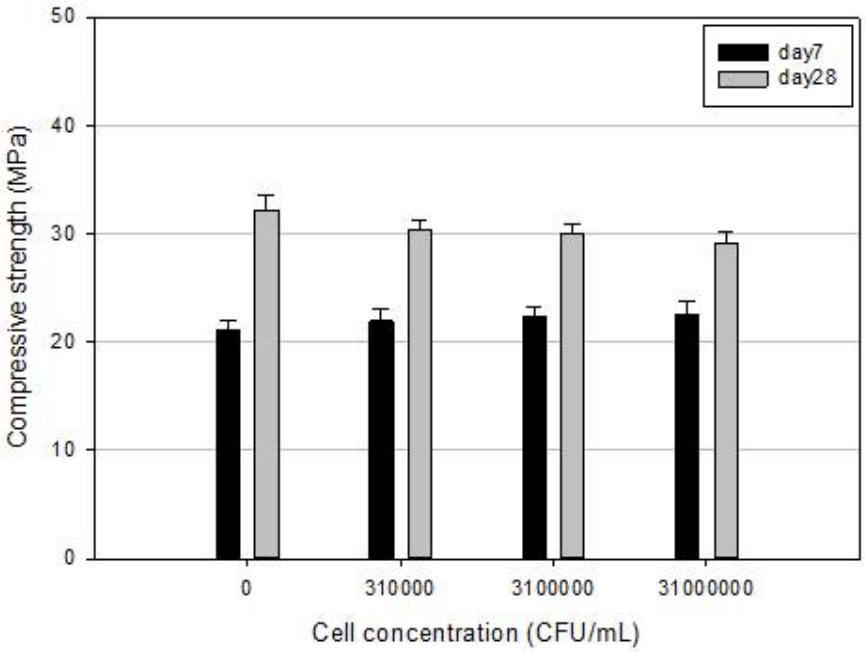

Fig. 4.14 Compressive strength test after 7 and 28 days curing of cement mortar specimen containing diverse concentrations of *Bacillus sp. BY1*

Table. 4.3 Compressive strength test after 7 and 28 days curing of cement mortar specimen containing diverse concentrations of *Bacillus sp. BY1* (Mpa)

Days	0	3.1×10^{5}	3.1×10^{6}	3.1×10^{7}
7	22.06	22.00	22.30	22.63
28	32.23	30.35	30.10	29.18

4.2.2.2. 다양한 칼슘 유기산 첨가 시 압축강도 변화

다양한 칼슘 유기산 첨가 시의 콘크리트 모르타르의 압축강도 실험 결과는 Fig. 4.15, Table. 4.4과 같다. 콘크리트 양생 후 7일이 경과한 시점부터 실험군의 압축강도가 대조군의 압축강도보다 높게 나타났다. 28일 재령 압축강도를 기준으로 살펴보았을 때 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 109.5%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 109.9%, 젖산칼슘(Calcium lactate) 첨가 시 116.4%로 칼슘유기산의 종류와 무관하게 칼슘 첨가시의 강도가 무 첨가시보다 높게 측정되었다. 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 시에는 P-value가 각각 0.092와 0.076으로 강도의 증가량이 통계적으로 유의한 수준에 미치지 못하였지만 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 시에는 P-value가 0.002로 압축강도의 증가량이 통계적으로 유의한 수준으로 나타났다. 실험에 사용한 세 가지 유기산은 시멘트 수화촉진 물질로 초기 수화 강도와 수화 속도, 수화열 발생량을 높인다고 알려져 있으며(see Rosskopf et al. 1975; Singh et al., 1986), 이는 실험 결과를 통해서도 확인 할 수 있었다.

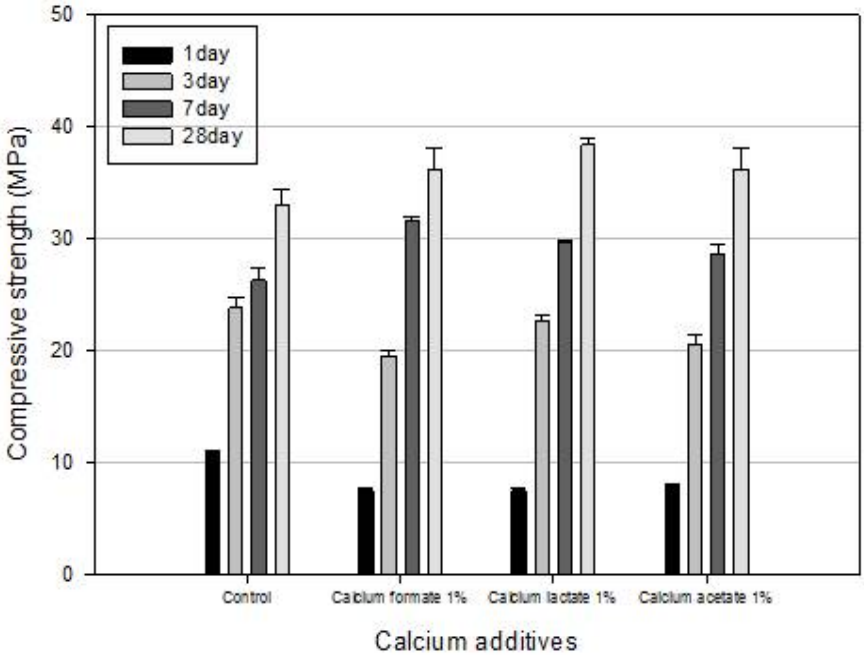

Fig. 4.15 Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimens containing various calcium additives (1% of cement weight)

Table. 4.4 Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimens containing various calcium additives (1% of cement weight) (Mpa)

Days	Controal	Calcium formate	Calcium acetate	Calcium lactate
1	10.83	7.52	7.86	7.48
3	23.82	19.53	20.51	22.61
7	26.27	31.62	28.68	29.62
28	32.99	36.11	36.26	38.40

4.2.2.3. 미생물과 다양한 칼슘 유기산 함께 첨가 시 압축강도 변화

다양한 칼슘 유기산과 함께 미생물을 첨가하였을 시의 콘크리트 모르타르의 압축강도 실험 결과는 Fig. 4.16, Table. 4.5과 같다. 28일 재령 압축강도로 살펴볼 때 세 조건에 대한 강도가 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 111.9%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 115.0%, 젖산칼슘(Calcium lactate) 첨가 시 111.5% 증가하였다. 측정된 압축강도는 통계적으로 유의한 수준에는 못 미치지만 모두 대조군의 압축강도 보다 높은 값으로, 칼슘유기산이 수화촉진제로 작용하여, 미생물에 의한 강도 감소효과를 상쇄시킨 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 살펴볼 때 콘크리트 균열 치유를 위해 박테리아와 칼슘을 추가적으로 첨가하는 것이 콘크리트 원재료의 특성에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각되어진다.

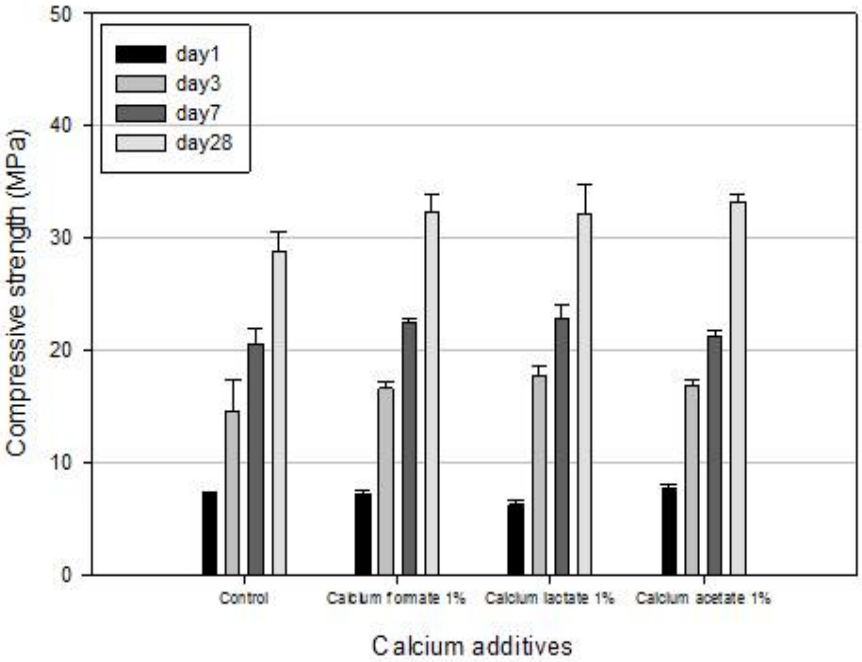

Fig. 4.16 Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimens containing *Bacillus sp. BY1* and various calcium additives (1% of cement weight)

Table. 4.5 Compressive strength test after 1, 3, 7, 28 days curing of cement mortar specimens containing *Bacillus sp. BY1* and various calcium additives (1% of cement weight) (Mpa)

Days	Controal	Calcium formate	Calcium acetate	Calcium lactate
1	7.17	7.28	7.74	6.28
3	14.65	16.61	16.90	17.80
7	20.63	22.56	21.27	22.90
28	28.90	32.33	33.23	32.22

4.3. 미생물에 의한 콘크리트 미세균열 자가치유

4.3.1. 미세균열 자가치유에 의한 콘크리트 균열 폭 감소

인장실험을 통해 미세균열을 유발한 실험체는 수조에 담가놓고 1일, 1주, 3주, 5주가 경과한 후에 실체현미경 촬영을 하였고, 시간이 경과함에 따라 균열 부위가 치유되고 균열 폭이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4.17은 미생물과 아세트산칼슘(Calcium acetate)를 첨가한 시편의 균열 치유 과정을 촬영한 사진으로 왼쪽 위에서부터 균열 형성 후 1일, 1주, 3주, 5주가 경과한 후의 균열 부위의 모습이다. 사진의 원형으로 표시한 부분을 보면 균열의 치유과정을 명확히 살펴볼 수 있다.

Fig. 4.17 Concrete microcrack self-healing effect with the passing of time in the absence of *Bacillus sp. BY1* (a) after 1 day curing; (b) after 1 week curing; (c) after 3 week curing; (d) after 5 week curing. calcium acetate is added for the calcium source

이러한 균열의 치유과정이 모든 실험체에서 발견되지는 않았다. 이는 균열의 치유가 미생물과 칼슘유기산 등의 첨가뿐만 아니라 균열의 폭과 길이, 깊이 등의 조건에도 영향을 받기 때문으로 여겨진다. Hillerborg의 균열 모델에 의하면 우리가 보는 균열면의 내부는 Fig. 4.18과 같다(Saouma et al., 2002). 균열의 치유는 Hillerborg의 균열 모델 가장 안쪽에서부터 시작되는 것으로 생각되고, 따라서 균열의 폭이 넓거나 균열의 깊이가 깊은 경우 외부에서 균열의 치유를 확인하기 어려웠다. 이는 Fig. 4.19를 통해서도 확인할 수 있다. Fig. 4.19는 미생물과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가한 시편의 균열 치유 과정을 촬영한 사진으로 1일(Fig. 4.19a), 5주(Fig. 4.19b)가 경과하였을 때의 모습이다. 균열의 외부 균열 폭의 변화는 미비하지만, 내부가 채워진 것을 확인할 수 있었다.

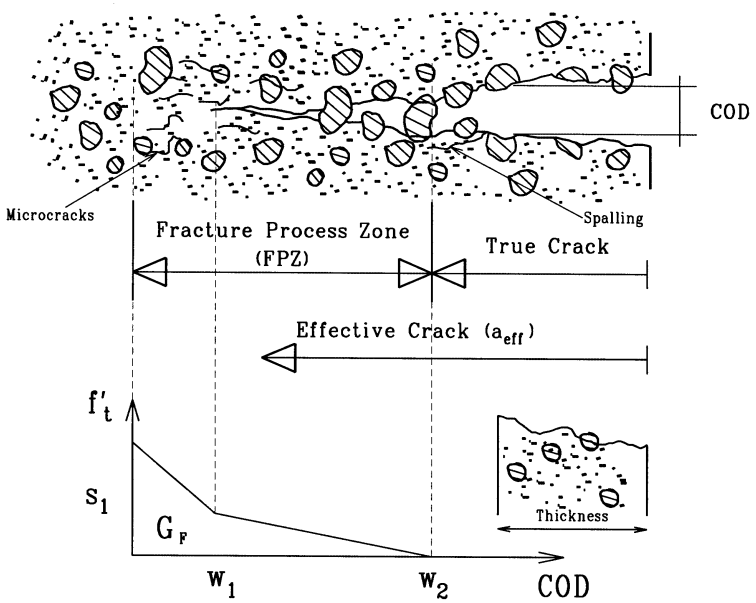

Fig. 4.18 Hillerborg's model for concrete crack (Saouma et al., 2002)

Fig. 4.19 Process of healing crack which is filled from crack inside to outside. (a) after 1 day curing; (b) after 5 week curing.

실험은 3.2.4.1.에서 언급한 것과 같이 대조군과 5가지의 실험군을 설정하여 진행하였고, 미생물과 칼슘원을 모두 첨가하지 않은 경우와 미생물은 첨가하였지만 칼슘원을 첨가하지 않은 경우를 제외한 모든 실험군에서 균열의 치유를 확인할 수 있었다. 미생물을 첨가하지 않은 실험체에서도 균열의 치유는 일어났다. 따라서 균열에 치유에 미생물의 존재와 칼슘원의 존재가 모두 영향을 미친다고 생각 할 수 있다.

하지만 칼슘원으로 동일하게 젖산칼슘(Calcium lactate)이 공급된 경우, 미생물이 존재할 때에 균열의 치유가 더 빠르고 확실하게 일어나는 것으로 보여 졌다. 미생물을 첨가한 경우 Fig. 4.20a와 Fig. 4.20b에서 보이는 것과 같이 균열 부위가 완벽히 메꾸어진 반면, 미생물을 첨가하지 않은 경우 Fig. 4.20c와 Fig. 4.20d에서 보이는 것처럼 균열 내부만 메꾸어진 것을 확인할 수 있었다.

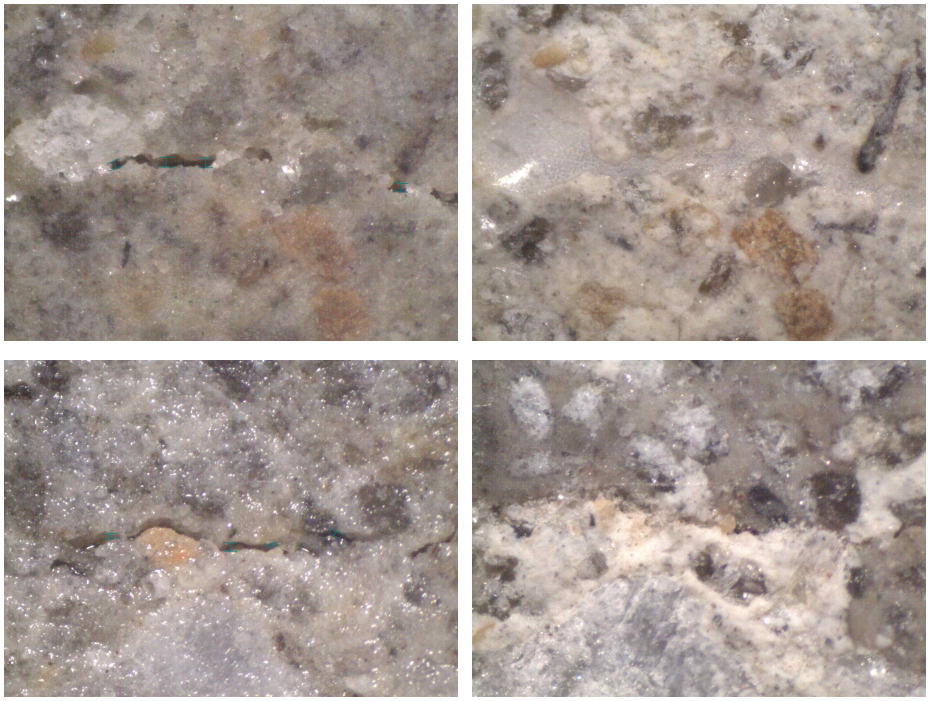

Fig. 4.20 Concrete microcrack self-healing efficiency on the presence and absence of *Bacillus sp. BY1.* (a) calcium lactate and *Bacillus sp. BY1* are added and 1 day elapsed; (b) calcium lactate and *Bacillus sp. BY1* are added and 5 weeks elapsed; (c) only calcium lactate is added and 1 day elapsed; (d) only calcium lactate is added and 1 day elapsed.

균열 치유면의 모습은 첨가한 칼슘원의 종류에 따라서도 다르게 나타났다. Fig. 4.21은 미생물과 함께 칼슘원으로 포름산칼슘(Calcium formate) (Fig. 4.21a와 Fig. 4.21b), 아세트산칼슘(Calcium acetate) (Fig. 4.21c와 Fig. 4.21d), 젖산칼슘(Calcium lactate) (Fig. 4.21e와 Fig. 4.21f)을 첨가한 실험체의 균열 형성 후 1일, 5주일이 경과한 후의 모습이다. 칼슘원으로 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때에 균열 부위를 메꾼 물질은 주위 시멘트와 비슷한 모습이었지만, 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 균열을

메꾼 물질은 주변의 시멘트 매트릭스와 다른 모습으로 약간의 광택을 띄었다. 또한 균열을 메우는 속도와 정도도 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때에 확연히 큰 것으로 보여 졌다.

이러한 차이는 앞의 4.2.1.2.와 4.2.1.3에서 언급한 것과 같이 첨가하는 칼슘유기산의 종류가 형성되는 탄산칼슘의 결정 형상과 광물 구조에 영향을 미치기 때문에 발생하는 것으로 생각된다.

Fig. 4.20 Concrete microcrack self-healing patterns containing various calcium additives. (a) calcium formate and *Bacillus sp. BY1* are added and 1 day elapsed; (b) calcium formate and *Bacillus sp. BY1* are added and 5 weeks elapsed; (c) calcium acetate and *Bacillus sp. BY1* are added and 1 day elapsed; (d) calcium acetate and *Bacillus sp. BY1* are added and 5 weeks elapsed; (e) calcium lactate and *Bacillus sp. BY1* are added and 1 day elapsed; (f) calcium lactate and *Bacillus sp. BY1* are added and 5 weeks elapsed.

5. 결론

본 연구에서는 토양에서 분리한 호알칼리성 포자형성 생체광물형성 미생물의 탄산칼슘형성 작용을 이용하여 콘크리트 미세균열의 자가치유를 유도하였다. 본 연구를 통해 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 약알칼리(pH 8~9)의 경기도 안산시 시화호 간척지 토양으로부터 콘크리트 미세균열 자가치유에 적합한 특성을 가지는 미생물 6종을 분리하였다. 분리한 미생물은 pH 10의 알칼리 환경에서 성장을 보이고 내생포자를 형성하여 극한 환경에서 견디는 미생물로, 16S ribosomal DNA 염기서열 분석 결과 모두 *Bacillus pseudofirmus*와 100% 상등하였고, DDBJ에 *Bacillus sp. BY1*(Accession number: AB830103)으로 명명하여 등록하였다. 분리한 미생물의 pH 내구성을 확인한 결과, pH 10에 비해 pH 11에서는 느린 성장을 보였고, pH 12 이상에서는 성장은 일어나지 않았지만 일정 개체 수는 유지하였고, 생체광물형성 유도를 통해 탄산칼슘의 결정의 형성을 관찰하였다.

(2) 미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가는 탄산칼슘 결정의 형상과 광물 구조에 큰 차이를 야기하였다. 미생물을 주입하지 않은 경우 결정이 능면체(Rhombohedral), 구정상(Spherical)의 비교적 규칙적인 결정상으로 나타난 반면, 미생물을 주입한 경우 비교적 크기가 크고 울퉁불퉁하고 불규칙적인 구형의 결정이 형성되었다. 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가했을 때 결정은 구정상의 결정들이 모여 있는 형상인 반면 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)를 첨가했을 때의 결정은 능면체 결정들이 결합한 모습으로 관찰되었다. 이러한 차이는 미생물의 대사산물과 미생물과 유기산의 상호작용의 영향으로 인한 것으로 생각된다. 이러한 첨가물에 따른 차이는 광물의 구

조에서도 비슷한 경향으로 나타났다. 미생물이 존재하지 않을 때는 주로 방해석(Calcite)의 결정 형성된 반면, 미생물이 존재할 때에는 방해석(Calcite)과 아라고나이트(Aragonite) 함께 형성이 되었고, 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 칼슘원으로 사용하였을 때 아라고나이트(Aragonite)의 형성 비율이 포름산칼슘(Calcium formate)과 젖산칼슘(Calcium lactate)을 칼슘원으로 사용할 때 보다 높게 나타났다.

(3) 콘크리트 모르타르 시편의 압축강도는 미생물의 농도가 증가함에 따라 94.2%에서 90.5%로 감소하는 경향을 보였고, 칼슘유기산을 첨가하였을 시에는 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 109.5%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 109.9%, 젖산칼슘(Calcium lactate) 첨가 시 116.4%로 칼슘유기산의 종류와 무관하게 강도가 모두 증가하였다. 시멘트 수화과정에서 미생물은 수화지연제로, 칼슘유기산은 수화촉진제로 작용하여 강도를 감소 혹은 증가 시킨 것으로 생각된다. 미생물과 칼슘유기산을 모두 첨가하였을 때에는 칼슘유기산이 수화촉진제로서의 작용하여 미생물의 의한 강도 감소효과를 상쇄시켰고, 따라서 포름산칼슘(Calcium formate) 첨가 시 111.9%, 아세트산칼슘(Calcium acetate) 첨가 시 115.0%, 젖산칼슘(Calcium lactate) 첨가 시 111.5%로 통계적으로 유의하지 않은 수준에서 강도가 증가하였다.

(4) 콘크리트의 미세균열이 치유되는 과정을 5주간의 현미경촬영을 통해서 살펴보았다. 균열의 치유는 미생물과 칼슘유기산 등의 첨가뿐만 아니라 균열의 폭과 길이, 깊이 등의 조건에도 영향을 받기 때문에 모든 균열에서 균열 치유가 끝난 모습을 확인할 수는 없었지만, 균열의 내부부터 채워지는 모습을 확인할 수 있었다. 미생물과 칼슘원을 모두 첨가하지 않은 경우와 미생물은 첨

가하였지만 칼슘원을 첨가하지 않은 경우를 제외한 모든 실험군에서 균열의 치유를 확인할 수 있었고, 따라서 균열에 치유에 미생물의 존재와 칼슘원의 존재가 모두 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 균열의 치유는 칼슘원의 종류에 따라서도 다르게 나타났다. 칼슘원으로 포름산칼슘(Calcium formate)과 아세트산칼슘(Calcium acetate)을 첨가하였을 때에 균열 부위를 메꾼 물질은 주위 시멘트와 비슷한 모습이었지만, 젖산칼슘(Calcium lactate)을 첨가하였을 때 균열을 메꾼 물질은 주변의 시멘트 매트릭스와 다른 모습으로 약간의 광택을 띄었다. 이러한 차이는 칼슘유기산의 종류가 형성되는 탄산칼슘의 결정 형상과 광물 구조에 영향을 미치기 때문에 발생하는 것으로 생각된다.

이상, 약알칼리 토양으로부터 콘크리트 미세균열 자가치유에 적용 가능한 미생물을 분리하고, 미생물과 다양한 칼슘유기산의 첨가가 탄산칼슘의 결정 형상 및 광물 구조를 다양하게 하고, 콘크리트 압축강도를 증가 및 감소시키는 것을 확인하였다. 이에 기반하여 미생물의 생체광물 형성에 의한 콘크리트 미세균열 자가치유를 유도하였고, 콘크리트 내의 미세균열이 치유되는 것을 살펴보았다. 본 연구 결과의 결과물은 육안으로 검출 및 보수가 어려운 균열폭 0.1 mm 이하의 미세균열의 조기치유를 가능하게하며, 기존에 사용되고 있는 균열보수제가 환경에 치명적이고 효과가 지속적이지 않아서 야기되었던 문제들을 해결 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 적절한 칼슘유기산 첨가제의 선정 및 사용을 통해 균열의 치유 효율을 높이는데 기여할 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

산업자원부. 기술표준원 (2007) KS L 5105 수경성 시멘트 모르타르의 압축 강도 시험 방법. 한국표준협회

지식경제부. 기술표준원 (2006) KS L ISO 679 시멘트의 강도 시험 방법. 한국표준협회

지식경제부. 기술표준원 (2010) KS F 2403 콘크리트의 강도 시험용 공시체 제작 방법. 한국표준협회

지식경제부. 기술표준원 (2010) KS F 5201 포틀랜드 시멘트. 한국표준협회

한국표준협회. (2004) KS F 1004 콘크리트 용어. 한국표준협회

한국콘크리트학회 (2012). (국토해양부 제정) 콘크리트구조기준, (서울: 한국콘크리트학회).

대한건축학회 (1997). 콘크리트 구조물의 보수 보강, (서울: 대한건축학회).

일본토목학회. (2002) 콘크리트표준시방서(구조성능조사편)

문승호, and 김용석 (2010). 콘크리트구조균열, (서울: 기문당).

최완철 (2010). 콘크리트, (파주: 동화기술).

현태양, 김진용, and 김진근 (2008). 수압과 균열폭 변화에 따른 콘크리트 투수계수의 실험적 연구. 콘크리트학회 논문집 20, 291-298.

Addadi, L., Berkovitch-Yellin, Z., Weissbuch, I., van Mil, J., Shimon, L. J. W., Lahav, M., and Leiserowitz, L. (1985). GROWTH AND DISSOLUTION OF ORGANIC CRYSTALS WITH 'TAILOR-MADE' INHIBITORS - IMPLICATIONS IN STEREOCHEMISTRY AND MATERIALS SCIENCE. Angewandte Chemie - International Edition in English 24, 466-485.

Addadi, L., and Weiner, S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 4110-4114.

Aldea, C. M., Shah, S. P., and Karr, A. (1999a). Effect of cracking on water and chloride permeability of concrete. Journal of Materials in Civil Engineering 11, 181-187.

Aldea, C. M., Shah, S. P., and Karr, A. (1999b). Permeability of cracked concrete. Materials and Structures/Materiaux et Constructions 32, 370-376.

Archibald, D. D., Qadri, S. B., and Gaber, B. P. (1996). Modified calcite deposition due to ultrathin organic films on silicon substrates. Langmuir 12, 538-546.

Bazylinski, D. A., Frankel, R. B., and Konhauser, K. O. (2007). Modes of biomineralization of magnetite by microbes. Geomicrobiology

Journal 24, 465-475.

Becker, A., Becker, W., Marxen, J. C., and Epple, M. (2003). In-vitro Crystallization of Calcium Carbonate in the Presence of Biological Additives - Comparison of the Ammonium Carbonate Method with Double-Diffusion Techniques. Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie 629, 2305-2311.

Becker, A., Becker, W., Marxen, J. C., and Epple, M. (2003). In vitro Crystallization of Calcium Carbonate in the Presence of Biological Additives—Comparison of the Ammonium Carbonate Method with Double Diffusion Techniques. Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie 629, 2305-2311.

Berman, A., Addadi, L., and Weiner, S. (1988). Interactions of sea-urchin skeleton macromolecules with growing calcite crystals- a study of intracrystalline proteins. Nature 331, 546-548.

Berman, A., Ahn, D. J., Lio, A., Salmeron, M., Reichert, A., and Charych, D. (1995). Total alignment of calcite at acidic polydiacetylene films: Cooperativity at the organic-inorganic interface. Science 269, 515-518.

Boquet, E., Boronat, A., and Ramos Cormenzana, A. (1973). Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. Nature 246, 527-529.

Braissant, O., Cailleau, G., Dupraz, C., and Verrecchia, E. P. (2003). Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial

environments: The role of exopolysaccharides and amino acids. Journal of Sedimentary Research 73, 485-490.

Chahal, N., Siddique, R., and Rajor, A. (2012). Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. Construction and Building Materials 28, 351-356.

Clear, C. A. (1985). EFFECTS OF AUTOGENOUS HEALING UPON THE LEAKAGE OF WATER THROUGH CRACKS IN CONCRETE. In.

De Muynck, W., De Belie, N., and Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. Ecological Engineering 36, 118-136.

De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., and Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. Cement and Concrete Research 38, 1005-1014.

Dry, C. (1994). Matrix cracking repair and filling using active and passive modes for smart timed release of chemicals from fibers into cement matrices. Smart Materials and Structures 3, 118-123.

Dry, C. (1999). Repair and prevention of damage due to transverse shrinkage cracks in bridge decks. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 3671, 253-256.

Dry, C. M. (2000). Three designs for the internal release of sealants,

adhesives, and waterproofing chemicals into concrete to reduce permeability. Cement and Concrete Research 30, 1969-1977.

Edvardsen, C. (1999). Water permeability and autogenous healing of cracks in concrete. ACI Materials Journal 96, 448-454.

Fajardo-Cavazos, P., and Nicholson, W. (2006). Bacillus endospores isolated from granite: Close molecular relationships to globally distributed Bacillus spp. from endolithic and extreme environments. Applied and Environmental Microbiology 72, 2856-2863.

Gérard, B., Breysse, D., Ammouche, A., Houdusse, O., and Didry, O. (1996). Cracking and permeability of concrete under tension. Materials and Structures/Materiaux et Constructions 29, 141-151.

Ghosh, S., Biswas, M., Chattopadhyay, B., and Mandal, S. (2009). Microbial activity on the microstructure of bacteria modified mortar. Cement and Concrete Composites 31, 93-98.

Ghosh, S. K. (2009). Self-healing materials: Wiley. com).

Gopi, S., Subramanian, V. K., and Palanisamy, K. (2013). Aragonite-calcite-vaterite: A temperature influenced sequential polymorphic transformation of CaCO3 in the presence of DTPA. Materials Research Bulletin 48, 1906-1912.

Hammes, F., and Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 1, 3-7.

Hillerborg, A., Modéer, M., and Petersson, P. E. (1976). Analysis of crack formation and crack growth in concrete by means of fracture mechanics and finite elements. Cement and Concrete Research 6, 773-781.

Jonkers, H. M. (2008). Self healing concrete: a biological approach. In Self Healing Materials, (Springer), pp. 195-204.

Jonkers, H. M. (2011). Bacteria-based self-healing concrete. Heron 56, 5-16.

Jonkers, H. M., and Schlangen, E. (2008). Development of a bacteria-based self healing concrete. Paper presented at: Proc. int. FIB symposium.

Jonkers, H. M., and Schlangen, E. (2009). A two component bacteria-based self-healing concrete. (Cape Town).

Joseph, C., Gardner, D., Jefferson, T., Isaacs, B., and Lark, B. (2011). Self-healing cementitious materials: A review of recent work. Proceedings of Institution of Civil Engineers: Construction Materials 164, 29-41.

Joseph, C., Jefferson, A. D., Isaacs, B., Lark, R., and Gardner, D. (2010). Experimental investigation of adhesive-based self-healing of cementitious materials. Magazine of Concrete Research 62, 831-843.

Kaur, N., Reddy, M. S., and Mukherjee, A. (2013). Biomineralization

of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. Journal of Microbiology and Biotechnology 23, 707-714.

Li, V. C., Lim, Y. M., and Chan, Y. W. (1998). Feasibility study of a passive smart self-healing cementitious composite. Composites Part B: Engineering 29, 819-827.

Li, W., Chen, W. S., Zhou, P. P., Zhu, S. L., and Yu, L. J. (2013). Influence of initial calcium ion concentration on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by bacterial carbonic anhydrase. Chemical Engineering Journal 218, 65-72.

Lian, B., Hu, Q., Chen, J., Ji, J., and Teng, H. H. (2006). Carbonate biomineralization induced by soil bacterium Bacillus megaterium. Geochimica et Cosmochimica Acta 70, 5522-5535.

Lowenstam, H. A., and Weiner, S. (1989). On biomineralization: Oxford University Press).

Mann, S. (2001). Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry, Vol 5: Oxford University Press).

Mann, S., Didymus, J. M., Sanderson, N. P., Heywood, B. R., and Samper, E. J. A. (1990). Morphological influence of functionalized and non-functionalized α,ω-dicarboxylates on calcite crystallization. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 86, 1873-1880.

Meichsner, H. (1992). Autogeneous healing of cracks in concrete.

Ueber die Selbstdichtung von Trennrissen in Beton 87, 95-99.

Morse, J. W. (1983). The kinetics of calcium carbonate dissolution and precipitation. Carbonates: Mineralogy and Chemistry, 227-264.

Naus, D., Oland, C., and Ellingwood, B. R. (1996). Report on aging of nuclear power plant reinforced concrete structures. In, (Nuclear Regulatory Commission, Washington, DC (United States). Div. of Engineering Technology; Oak Ridge National Lab., TN (United States); Johns Hopkins Univ., Baltimore, MD (United States). Dept. of Civil Engineering).

Nielsen, P., Fritze, D., and Priest, F. G. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic Bacillus strains: Proposal for nine new species. Microbiology 141, 1745-1761.

Pedersen, K., Nilsson, E., Arlinger, J., Hallbeck, L., and O'Neill, A. (2004). Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hyper-alkaline spring waters of Maqarin in Jordan. Extremophiles 8, 151-164.

Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V., and Bang, S. S. (2001). Remediation of concrete using micro-organisms. ACI Materials journal 98, 3-9.

Ramm, W., and Biscoping, M. (1998). Autogenous healing and reinforcement corrosion of water-penetrated separation cracks in reinforced concrete. Nuclear Engineering and Design 179, 191-200.

Rivadeneyra, M. A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M. R., and Ramos-Cormenzana, A. (1993). Precipitation of calcium carbonate by Vibrio spp. from an inland saltern. FEMS Microbiology Ecology 13, 197-204.

Rosskopf, P. A., Linton, F. J., and Peppler, R. B. (1975). EFFECT OF VARIOUS ACCELERATING CHEMICAL ADMIXTURES ON SETTING AND STRENGTH DEVELOPMENT OF CONCRETE. Journal of Testing and Evaluation 3, 322-330.

Sagripanti, J. L., and Bonifacino, A. (1996). Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents. Applied and Environmental Microbiology 62, 545-551.

Saouma, V. E., Natekar, D., and Sbaizero, O. (2002). Nonlinear finite element analysis and size effect study in a metal-reinforced ceramics-composite. Materials Science and Engineering: A 323, 129-137.

Singh, N. B., Prabha, S., and Singh, A. K. (1986). Effect of lactic acid on the hydration of portland cement. Cement and Concrete Research 16, 545-553.

Sun, L., Yu, W. Y., and Ge, Q. (2011). Experimental research on the self - Healing performance of micro - Cracks in concrete bridge. In, (Haikou), pp. 28-32.

Van Tittelboom, K., and De Belie, N. (2013). Self-healing in cementitious materials-a review. Materials 6, 2182-2217.

Wang, J. Y., De Belie, N., and Verstraete, W. (2012). Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 39, 567-577.

Wang, K., Jansen, D. C., Shah, S. P., and Karr, A. F. (1997). Permeability study of cracked concrete. Cement and Concrete Research 27, 381-393.

Wiktor, V., and Jonkers, H. M. (2011). Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. Cement and Concrete Composites 33, 763-770.

Yi, S. T., Hyun, T. Y., and Kim, J. K. (2011). The effects of hydraulic pressure and crack width on water permeability of penetration crack-induced concrete. Construction and Building Materials 25, 2576-2583.

Abstract

Development of concrete with microcrack self-healing ability based on bacterial calcium carbonate formation

Boyoung Jeong
Civil and Environmental Engineering
The Graduate School
Seoul National University

Concrete is a widely used construction material because of its high durability and workability; however, various factors result in concrete cracks, which facilitate permeability of air, gas, and moisture into concrete. Microcracks (<0.1 mm) initially do not affect the durability of structure, while they have potential to develop into macrocracks (>0.7 mm) causing structural degradation. Therefore, it is necessary to treat microcracks in advance in order to prevent the growth of the cracks that could lead to deterioration of structures. Microcracks are hard to detect with naked eyes and current approaches for crack repair are not environmental-friendly, and labor intensive. Accordingly, studies for adding self-healing ability to concrete using bacteria have been conducted recently. In this study, bacterial species capable of self-healing concrete cracks by forming $CaCO_3$ were isolated from an area with high soil pH, and the isolated

bacteria were tested for their pH durability and bio-minerals forming ability. Then the effects of the presence of bacteria and various calcium organics on $CaCO_3$ morphology and concrete strength were investigated. The self-healing process was then studied using artificially made microcracks on concrete.

Bacteria species capable of self-healing of concrete cracks was isolated from high pH(8~9) soil around the Shihwa lake in Ansan-si, Gyeonggi-do, South Korea. The isolated bacteria were active in an alkaline environment and formed endospore to endure extreme environmental conditions. The isolated bacteria showed 100% homology to *Bacillus pseudofirmus*, which are well-known alkaliphilic spore-forming and bio-mineral forming bacteria. It was registered on DDBJ as "*Bacillus sp. BY1*" (Genbank accession number: AB830103).

$CaCO_3$ morphology was affected by the presence of bacteria. The addition of *Bacillus sp. BY1* resulted in the formation of more irregular crystals. This irregularity could enhance the coherence between $CaCO_3$ and concrete pastes. Nucleation of $CaCO_3$ on the bacterial cell surface was confirmed in this study. Those cells then combined together to form a larger crystal. Two big enough crystals developed into twins or poly-crystals. The overall shape of crystals and their textures also depended on the types of additives. Crystals formed in the presence of either calcium formate or calcium lactate were rhombohedral, while the crystals formed in the presence of calcium acetate was rounded. These rhombohedral and spherical shapes and textures of crystals might affect the compactness of crystals and crack healing rates.

$CaCO_3$ mineral structure was also affected by the presence of bacteria and calcium organics. Most of minerals formed were calcite in the absence of *Bacilus sp. BY1*, while aragonite and vaterite were

formed in the presence of *Bacillus sp. BY1*. The ratio of different minerals depended on the calcium additives, and aragonite accounted for the highest percentage with the calcium acetate addition.

The addition of *Bacillus sp. BY1* lowered the compressive strength of concrete mortars to 90.5 - 94.2 % of that without bacteria - it decreased with increasing bacterial cell concentration. The addition of various calcium organics, on the other hand, enhanced the compressive strength of concrete mortars to 109.5 - 116.4 % of that without bacteria. With the addition of both *Bacillus sp. BY1* and calcium additives, compressive strength was increased to 111.5 - 115.0 %. It is likely that calcium organic additives work as a cement hydration accelerator, and they counterbalance the hydration retardation due to the presence of *Bacillus sp. BY1*.

The self-healing process of concrete microcracks were observed with stereomicroscope over 5 weeks. Microocracks were filled from inside to outside, and they have better self-healing efficiency in the presence of *Bacillus sp. BY1* . When calcium formate and calcium acetate were added, the crack-filling material looked similar to the cement material around the cracks, while it looked more glossy with calcium lactate addition.

This research studied potential for applying bacterial bio-mineral forming ability on concrete microcrack treatment. The isolated alkaliphilic spore-forming bacteria have advantages of surviving in the concrete environment and of contributing to the growth of calcium carbonate crystals. The crystal morphology and structure varied according to the types of calcium additives, and these can be further studied to enhance the filling efficiency of the cracks. The changes in concrete compressive strength with bacteria and calcium organics addition are not likely to have significant effects on the characteristics of concrete materials. This research will contribute in

solving issues raised with current crack repair agents, and can be applied to various studies in the field of microbial biomineralization inclduing construction materials.

Keywords : Self-healing concrete, Microcrack remediation, Alkaliphilic spore-forming bacteria, Biomineral formation, ($CaCO_3$) Calcium carbonate, Environmentally-friendly smart concrete

Student Number : 2012-20919