

Nghiên cứu phát triển xi măng sinh học có nguồn gốc từ thực vật nhằm giảm phát thải CO₂ trong lĩnh vực xây dựng

Nguyễn Lê Quốc Anh¹, Ngô Hữu Hoàng¹, Hoàng Phương Tùng^{1*}, Nguyễn Thị Minh Xuân²

¹ Khoa Xây dựng Cầu đường, trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng

² Khoa Hóa, trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng

TỪ KHÓA

EICP
Hạt đậu nành
Xi măng sinh học
Enzyme Urease
Giảm phát thải CO₂

TÓM TẮT

Nghiên cứu này sử dụng phương pháp tạo kết tủa CaCO₃ từ Enzyme Urease (Enzyme Induced Carbonate Precipitation - EICP) để sản xuất xi măng sinh học. Enzyme thô (chi phí thấp, thân thiện với môi trường) được chiết xuất từ hạt đậu nành (soybeans) có hoạt tính Urease cao thích hợp cho sản xuất xi măng sinh học. Hoạt tính của enzyme được xác định đồng thời với sự thay đổi pH và độ dẫn điện của dung dịch khi thủy phân urea (CO(NH₂)₂). Kỹ thuật EICP dùng để xi măng hóa các mẫu cát hình trụ. Kết tủa tạo ra từ xi măng sinh học có khả năng kết dính các hạt cát lại với nhau vì vậy tăng cường độ của mẫu cát với các giá trị lớn nhất và nhỏ nhất ứng với cường độ nén lần lượt là 1004,2 kPa và 359,9 kPa, đồng thời chèn vào lỗ rỗng giữa các hạt làm giảm tính thấm với độ thấm ban đầu là 10⁻¹ cm/s. Kết tủa CaCO₃ được xác định bằng các phân tích vi mô sử dụng kỹ thuật nhiễu xạ tia X và kính hiển vi điện tử. Ngoài ra, nghiên cứu còn đánh giá chi phí và lợi ích môi trường về việc giảm phát thải CO₂ so với xi măng Portland thông thường.

KEYWORDS

EICP
Soybean seeds
Biocementation
Enzyme Urease
Low-carbon emissions

ABSTRACT

This study employed the Enzyme Induced Carbonate Precipitation (EICP) to produce bio-cement. Enzyme Urease (low cost, eco-friendly) was extracted from soybean seeds, which obtained high urease activity in the production of bio-cements. The urease activity was also investigated with the change in pH parameters and electrical conductivity in the solution due to hydrolysis of urea (CO(NH₂)₂). The research work used the percolation treatment to solidify the sandy soil at the particle contacts, thus enhancing the strength of sand with the maximum and minimum values corresponding to the compressive strength are 1004,2 kPa and 359,9 kPa, respectively. In addition, CaCO₃ precipitation significantly reduced void volume of soil mass as well as permeability with an initial permeability of 10⁻¹ cm/s. The carbonate precipitation was also confirmed by microscopic analyzes using methods of X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscope. In addition, the paper also presents an assessment of cost and environmental benefits of reducing CO₂ emissions compared with conventional cement (Portland).

1. Giới thiệu

Xi măng là chất kết dính quan trọng bậc nhất trong các công trình xây dựng và hạ tầng giao thông. Ước tính rằng đến năm 2030 mỗi năm trên thế giới có khoảng 4 triệu tấn xi măng Portland được sản xuất [1]. Mỗi tấn xi măng Portland sẽ thải ra xấp xỉ một tấn khí CO₂ vào môi trường [2]. Sự phát thải khí CO₂ từ sản phẩm xi măng phần lớn từ quá trình khai thác và đốt nguyên liệu hóa thạch (~1500 °C) [3]. Để giảm lượng phát thải carbon, các nhà nghiên cứu luôn tìm kiếm một loại chất kết dính thân thiện với môi trường có thể sử dụng trong các công trình xây dựng. Whiffin, 2004 [4] đề xuất dùng kết tủa CaCO₃ sinh ra từ vi sinh vật (Microbial Induced Carbonate Precipitation - MICP) thông qua chuỗi phản ứng hóa sinh để làm xi măng sinh học cho vật liệu địa kỹ thuật cũng như vật liệu xây dựng. Với ưu điểm được sản xuất tại nhiệt độ môi trường nên giảm phát thải carbon, không tốn nhiều năng lượng

cho các quá trình bơm trộn do khả năng thẩm thấu cao, hình thành cường độ trong thời gian ngắn.

Mặc dù có những ưu điểm nói trên, xi măng sinh học dùng phương pháp MICP vẫn tồn tại các nhược điểm như chưa tối ưu được kỹ thuật sản xuất và bảo quản nguồn nguyên liệu sinh học; chưa chuẩn hóa công thức xi măng sinh học cho các loại vật liệu khác nhau; đường kính vi sinh vật vào khoảng 0,5-5 μm nên bị hạn chế khi dùng cho các loại đất/vật liệu có hàm lượng hạt mịn lớn [5]; cần sự cho phép của chính quyền khi bơm vi sinh vật vào môi trường [6]; nuôi cấy và vận chuyển vi sinh vật cũng là một sự hạn chế của phương pháp này. Vì vậy gần đây các nhà nghiên cứu đã sử dụng enzyme urease (protein) thay cho vi sinh vật trong công thức xi măng sinh học, phương pháp này gọi là Enzyme Induced Carbonate Precipitation (EICP). Dung dịch enzyme có ưu điểm vượt trội so với vi sinh vật là kích thước enzyme cực nhỏ chỉ khoảng 12 nm và có khả năng tan trong nước, nên có thể

*Liên hệ tác giả: hptung@dut.udn.vn

Nhận ngày 01/08/2022, sửa xong ngày 15/11/2022, chấp nhận đăng 10/01/2023

Link DOI: <https://doi.org/10.54772/jomc.01.2023.433>

thấm qua các loại đất cát có độ rỗng nhỏ mà phương pháp MICP không áp dụng được [6], [7]. Ngoài ra enzyme sẽ tự phân hủy trong môi trường đất sau phản ứng nên không cần các thủ tục xin phép từ chính quyền về vấn đề môi trường như phương pháp MICP. Các nhóm nghiên cứu về EICP chủ yếu sử dụng enzyme từ nguồn cung cấp thương mại với độ tinh khiết và độ hoạt động cao, nhưng rất đắt tiền [8-10]. Vì vậy gần đây các nhà nghiên cứu tập trung vào việc tự sản xuất enzyme urease để làm nguồn nguyên liệu cho xi măng sinh học. Xi măng sinh học sử dụng phương pháp EICP với enzyme chiết xuất chỉ mới được quan tâm nghiên cứu từ năm 2016 với nguồn thực vật [12] và từ năm 2018 với nguồn từ vi sinh vật [11]. Vì vậy hướng nghiên cứu này rất mới và còn nhiều thách thức cần giải quyết, như tối ưu hóa phương pháp chiết tách dung dịch enzyme urease với thể tích lớn, thử nghiệm công thức xi măng với đất cát tự nhiên, giới hạn về cường độ của mẫu khi dùng phương pháp EICP.

Về nguồn vật liệu để chiết xuất enzyme thì nhóm chúng tôi đã quyết định lựa chọn hạt đậu nành (soybeans) cho nghiên cứu này. Thứ nhất, ở Việt Nam thì cây đậu nành là cây thực phẩm có truyền thống lâu đời, quan trọng và là thành phần không thể thiếu của bữa ăn truyền thống và hiện đại, vì vậy có thể thấy được sự phổ biến của hạt đậu nành ở khắp mọi nơi. Thứ hai, ngoài việc sử dụng hạt đậu nành để chiết xuất enzyme thì còn có thể sử dụng các sản phẩm từ hạt đậu nành đã qua sơ chế như bã đậu nành sau khi làm đậu phụ, nẫu sữa đậu nành... Vì vậy, với nguồn nguyên liệu phong phú, dễ tìm kiếm và có nhiều mặt tích cực như vậy thì nhóm nghiên cứu chúng tôi quyết định lựa chọn hạt đậu nành cho dự án nghiên cứu này.

Theo như khảo sát thì hiện tại Việt Nam chưa có một nghiên cứu mang tính hệ thống về xi măng sinh học và các ứng dụng của nó. Các nhà khoa học người Việt Nam thực hiện các nghiên cứu xi măng sinh học chủ yếu tại các trường đại học nước ngoài. Nghiên cứu này sẽ là một nghiên cứu mang tính hệ thống, tiên phong tại Việt Nam về chất kết dính xi măng sinh học.

Bài báo này tập trung vào việc phân tích mối tương quan giữa kết tủa CaCO_3 được sinh ra từ phương pháp EICP và sự tăng cường độ của đất cát rời thông qua các kết quả thí nghiệm nén một trục nở hông, tính thấm của đất, phân tích vi cấu trúc (Scanning Electron Microscope – SEM và X-Ray Diffraction – XRD), và đồng thời tính toán tính bền vững về mặt kinh tế và môi trường của sản phẩm. Bài báo này hướng đến sự phát triển và tối ưu công thức xi măng sinh học trong điều kiện thực nghiệm tại Việt Nam.

2. Vật liệu và phương pháp thí nghiệm

2.1. Chỉ tiêu kỹ thuật của vật liệu

Cát sạch, như được mô tả trong TCVN 6227:1996, được sử dụng như một phần đất thô hơn. Vật liệu đất cát này chứa hơn 98,7 % silica (SiO_2). Trọng lượng riêng, tỷ lệ rỗng tối đa và tối thiểu (e_{\max} và e_{\min}) của cát lần lượt là 2,65; 0,74 và 0,51. Vật liệu cát ban đầu cũng được rửa bằng nước tinh khiết để loại bỏ bất kỳ hóa chất hòa tan nào, sau đó được sấy bằng tủ sấy ở nhiệt độ 105 °C trong 24 giờ trước khi được

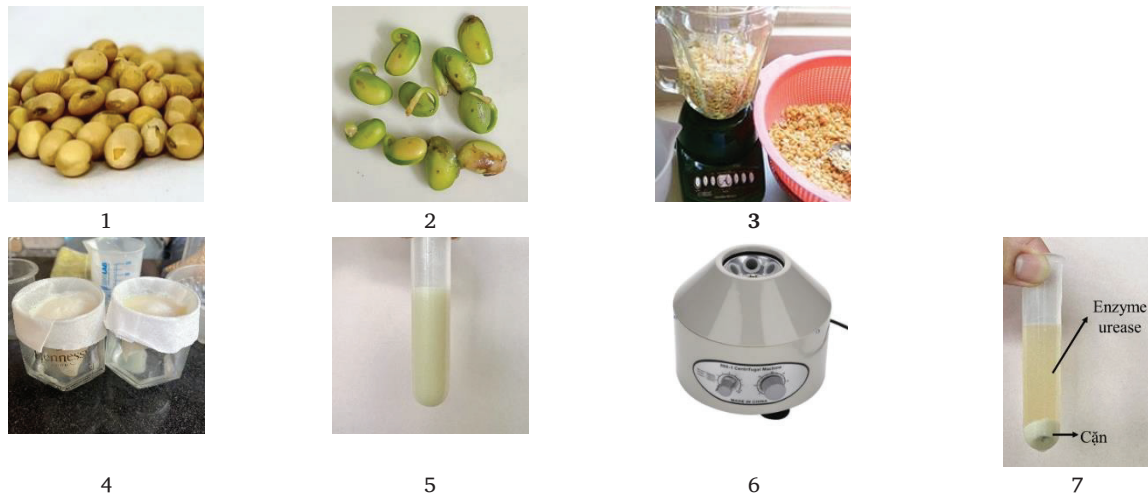
đưa vào thử nghiệm. Cát được phân loại là cát cấp phối kém (SP) theo hệ thống phân loại đất thống nhất (USCS; ASTM 2010 [13]).

2.2. Đánh giá độ hoạt động của enzyme urease

5,0 g hạt đậu nành tươi phơi khô và hạt tươi đã nảy mầm (0-4 ngày) được nghiền mịn bằng máy xay chuyên dụng trong 100 mL nước cất, sau đó được thu thập và lọc qua vải lọc một lần nữa. Một phần của dung dịch chiết xuất thô sẽ được lọc bằng giấy lọc tinh và được sử dụng trực tiếp để xác định hoạt tính của urease. Phần còn lại của dịch chiết thô được lọc, ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 5 phút ở 25 °C, phần nổi phía trên thu được được sử dụng để đánh giá hoạt tính của urease. Ảnh hưởng của pH được khảo sát ở nhiệt độ phòng (25 °C) và ảnh hưởng của nhiệt độ được khảo sát ở điều kiện pH trung tính (pH ~ 7). Sơ đồ quy trình chiết xuất dung dịch urease thô từ hạt đậu nành được trình bày trong Hình 1. Hoạt tính urease của dung dịch enzyme (chiết xuất thô) được tính toán bằng cách đo các ion NH_4^+ được giải phóng do quá trình thủy phân urea. Toàn bộ quy trình thí nghiệm được minh họa trong Hình 2.

2.3. Quy trình thử nghiệm tạo mẫu:

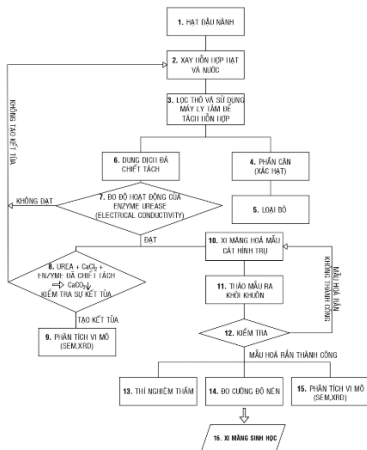
85 g cát khô sạch được đưa vào một ống nhựa (đường kính $d = 2,5$ cm; chiều cao $h = 5$ cm) và được đầm nhẹ. Cả hai đầu trên và dưới mỗi mẫu cát được trang bị phần vải lót đã được cắt sẵn cùng với đường kính ống để phân phối dòng chảy tránh làm tắc nghẽn, đồng thời nhằm tạo điều kiện chống xói mặt trên của cát khi rót dung dịch vào. Trước khi đổ dung dịch urease vào trong các ống nghiệm, lọc những hạt cát ở toàn bộ ống bằng nước cất, bởi lẽ cách lọc ấy sẽ loại bỏ các tạp chất, cặn bẩn có trong cát. Sau đó, 20 mL dung dịch urease đã chiết tách và được thêm vào mỗi mẫu, duy trì mức cuối cùng của dung dịch trên bề mặt trên cùng của vật mẫu. Cho dung dịch chảy liên tục đồng thời xả van bên dưới khoảng 2-3 lần, sau đó khóa van để cho dung dịch chảy nhỏ giọt trong vòng 1 tiếng. Để khảo sát sự thay đổi theo thời gian của các thông số trong mẫu vật, nồng độ pH tại đầu ra của ống được quan sát thường xuyên bằng cách đo giá trị pH của dung dịch urease được hòa tan theo tỷ lệ 1: 1 với dung dịch urea trong ống nghiệm để nghiên cứu diễn biến của các thông số có trong mẫu. 20 mL dung dịch urea + CaCl_2 tỉ lệ 1:1 (1 mol) được đưa vào các mẫu với cùng khối lượng, nồng độ và xả chúng giống như cách cho dung dịch urease thô vào. Qua 3 đến 4 lần xả, thử giấy đo pH vào toàn bộ dung dịch urea + CaCl_2 chảy ra tại các ống, giấy đo đổi màu ứng với độ pH ~ 8,5 trong bảng màu. Điều này cho biết rằng độ phản ứng của hỗn hợp với enzyme urease là hoàn toàn khả thi. Sau đó khóa van để cho dung dịch chảy nhỏ giọt trong vòng 1 tiếng. Sau 1 tiếng đồng hồ, khóa chặt toàn bộ van và để dung dịch urea + CaCl_2 qua đêm. Kết tủa calcium carbonate (CaCO_3) sinh ra sẽ liên kết các hạt cát lại với nhau để tăng cường độ của cát, ngoài ra kết tủa sẽ chèn vào các lỗ rỗng giữa các hạt trong cả khối cát. Từ đó hóa cứng cát và tăng cường độ của mẫu cát rời, giúp mẫu có thể tự đứng được.



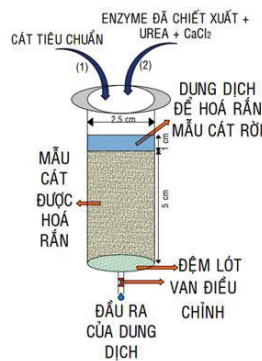
Hình 1. Quy trình chiết xuất dung dịch urease từ hạt đậu nành

(Ghi chú: 1: Hạt khô; 2: Hạt nảy mầm sau 48h; 3: Xay hạt đậu nành chung với nước;

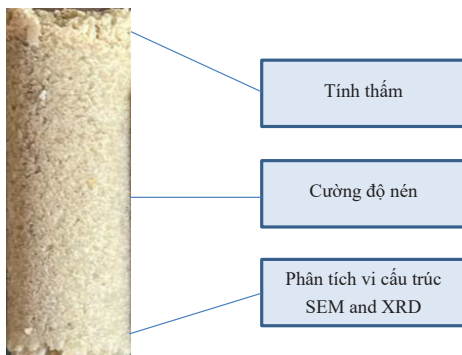
4: Lọc dung dịch sau khi xay bằng giấy lọc; 5: Dung dịch sau khi lọc; 6: Sử dụng máy ly tâm để tách dung dịch; 7: Dung dịch enzyme thu được sau khi dùng máy ly tâm).



Hình 2. Toàn bộ quy trình thí nghiệm.



Hình 3. Kỹ thuật hóa cứng cột cát rời dùng xi măng sinh học EICP.



Hình 4. Những thử nghiệm trên mẫu xi măng sinh học sử dụng trong nghiên cứu này.

Sau khi đo độ thấm của các mẫu xi măng sinh học, các khuôn ống nhựa được cất cẩn thận bằng dao để tách các mẫu xi măng sinh học. Các mẫu có thể đứng ổn định trong điều kiện ẩm ướt, điều đó có nghĩa là sự ổn định đã xảy ra. Sau đó, các mẫu được sấy hơn 48 giờ ở nhiệt độ vừa phải (tức là ~ 50 °C) để tránh làm biến đổi các hợp chất có trong các mẫu. Thử nghiệm đo cường độ được thực hiện theo tiêu chuẩn ASTM (1996) [16] D4219-08. Các thử nghiệm được tiến hành trên các mẫu có kích thước tiêu chuẩn đặt trước theo kích thước của mẫu thử nghiệm (nghĩa là đường kính $d = 2,5$ cm và chiều cao $h = 5$ cm). Hệ thống máy nén Loadtrac II Geocomp (Hình 5) tại phòng thí nghiệm tính năng cao Khoa Xây dựng Cầu đường, trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng được sử dụng để nén các mẫu. Tốc độ tải là 2 mm/phút. Một túi nhựa được sử dụng trong quá trình thử nghiệm để thu thập các vật liệu mẫu bị vỡ vụn và nứt rời, sau đó chúng được tận dụng để phân tích hàm lượng hợp chất kết tủa $CaCO_3$ có trong mẫu cát xi măng sinh học.

2.4. Thử nghiệm tính thấm, cường độ và hàm lượng $CaCO_3$ có trong mẫu

2.4.1. Thử nghiệm cường độ của cát xi măng sinh học



Hình 5. Kiểm tra cường độ của mẫu cát bằng hệ thống máy nén Loadtrac II Geocomp.

2.4.2. Xác định độ thấm của cát xi măng sinh học

Độ thấm của các mẫu cát xi măng sinh học được đo bằng phương pháp cột nước không đổi (constant head) theo tiêu chuẩn ASTM 2006 D2434-68 [14] với các mẫu vẫn được giữ trong các ống nghiệm. Trước khi thử nghiệm độ thấm, cả hai đầu lọc (trên và dưới) của ống đã được loại bỏ. Cho nước cất qua mẫu đất xi măng sinh học để đẩy không khí ra ngoài và làm bão hòa mẫu trước khi đo độ thấm, Cheng và cộng sự, 2013 [15]. Sau bước bão hòa ban đầu, các thử nghiệm thấm được chạy cho đến khi đạt được các giá trị độ thấm (k) (cm/s). Các thử nghiệm được dừng lại sau khi độ thấm (k) của mẫu vật không thay đổi quá 20 %. Trạng thái này sẽ chỉ đạt được nếu mẫu đã bão hòa hoàn toàn.

2.4.3. Hàm lượng hợp chất calcite sinh ra trong quá trình carbonate hóa

Phương pháp hòa tan bằng axit đã được sử dụng để xác định hàm lượng calcium carbonate cho nghiên cứu này được thực hiện ngay sau kiểm tra cường độ nén [17]. Hàm lượng calcium carbonate của đất được xác định theo phần trăm trọng lượng. Ban đầu, nước cất được đi qua các mẫu thử được tráng xi măng để hòa tan và loại bỏ các muối hòa tan còn đọng lại. Sau khi các mẫu được chia nhỏ bằng thử nghiệm nén, khoảng 5g xi măng sinh học được lấy ở giữa khối cát và được đặt trên một tấm đệm lọc bằng sợi thủy tinh. Sau đó, những mẫu vụn xi măng sinh học được làm khô quá mức ở 105 °C qua đêm. Sau đó, chúng được nghiền nhỏ và thêm dung dịch HCl 1 mol/L để hòa tan kết tủa calcium carbonate cho đến khi không sinh ra bọt khí.

Cuối cùng, phần đất đó được rửa sạch bằng nước tinh khiết và sấy khô một lần nữa để xác định khối lượng khô của phần đất còn lại được rửa axit (không có kết tủa CaCO₃). Lượng kết tủa CaCO₃ được tính bằng hiệu số giữa trọng lượng khô (W) của mẫu trước (cát + CaCO₃) và sau (chỉ còn cát) rửa trong axit (%CaCO₃ = 100 % × (W_{cát + CaCO₃} - W_{cát}) / W_{cát + CaCO₃}).

2.5. Thử nghiệm kết tủa CaCO₃

Các thí nghiệm đã được tiến hành để xác định trạng thái kết tủa của CaCO₃ và xu hướng kết tủa của nó, bằng sự kết hợp của CaCl₂-urea và urease. Thí nghiệm được tiến hành trong ống nghiệm gồm 20 mL

dung dịch CaCl₂-urea được trộn theo tỉ lệ 1:1 và được điều chỉnh nồng độ riêng biệt bằng cách thêm dung dịch enzyme chiết xuất thô từ hạt đậu nành. Sau đó, dung dịch đã điều chỉnh được thêm vào ống nghiệm và giữ ở 30 °C trong 24 giờ (Hình 6). Kết tủa CaCO₃ được quan sát trong ống nghiệm sau đó tách ra khỏi dung dịch bằng giấy lọc và giữ trong tủ sấy trong khoảng 24 giờ ở 100 °C. Ngoài ra, để đảm bảo độ chắc chắn cho kết quả thử nghiệm, nhóm đã nghiền nhỏ những mẫu kết tủa, sau đó cho đi qua sàng 75 μm. Hình thái của kết tủa CaCO₃ được xác định bằng kỹ thuật phân tích vi mô sử dụng SEM và XRD.



Hình 6. Kiểm tra kết tủa CaCO₃ trong ống nghiệm.

3. Kết quả và thảo luận

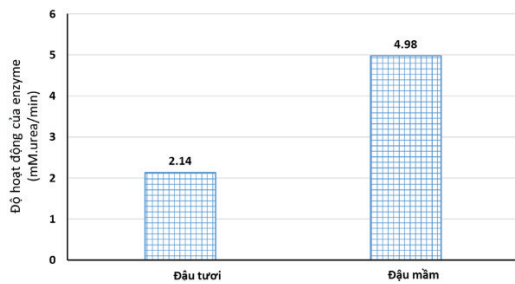
3.1. Độ hoạt động của chiết xuất enzyme urease:

Mức độ hoạt động của enzyme trong chiết xuất từ hạt đậu nành được thể hiện trong Bảng 1 và Hình 7 tương ứng với tình trạng hạt khô và tình trạng hạt này mầm của hạt tại các thời điểm khác nhau. Kết quả cho thấy, đối với trường hợp dung dịch chiết xuất thô từ hạt tươi, hoạt động của urease là 2,14 mM.urea/min và tăng dần theo thời gian (điều kiện nảy mầm). Sau vài ngày nảy mầm liên tục (48 giờ), hoạt động của urease đạt đến đỉnh điểm là 4,98 mM.urea/min. Các biến đổi trong hoạt động của urease bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trao đổi chất, phản ứng sinh học và các protein [18, 19] chức năng kích hoạt hoạt động enzyme của hạt. Hoạt tính urease thu được (đối với hạt tươi) trong nghiên cứu này tương đương với một số các nghiên cứu trước đây. Ngoài ra, nghiên

cứu này cũng cho thấy hoạt tính urease cao hơn được chiết xuất từ hạt đậu nành này mầm, điều này làm tăng tỷ lệ hoạt động của urease gấp đôi từ cùng một khối lượng hạt giống được sử dụng, để cải tiến phương pháp xi măng sinh học gây ra bởi enzyme và ứng dụng của nó. Do đó, hạt này mầm (48 giờ) được sử dụng cho phần còn lại của nghiên cứu.

Bảng 1. Độ hoạt động của enzyme urease được chiết xuất từ đậu nành đối với tình trạng hạt tươi và tình trạng hạt này mầm.

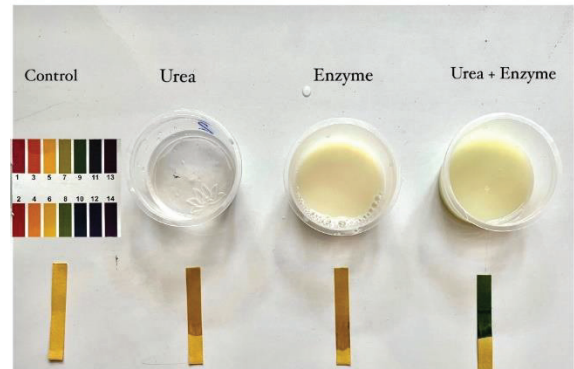
Thời gian (phút)	Độ dẫn điện EC - Electrical Conductivity (mS)	Độ hoạt động của enzyme urease (mM.urea/min)	Độ dẫn điện EC	
			Hạt đậu nành này mầm	Hạt đậu nành tươi
0	5,90	0,00	5,57	0,00
2	6,11	3,13	5,56	-2,51
4	6,36	4,78	5,72	0,80
6	6,57	4,98	5,79	1,13
8	6,75	4,89	5,86	1,30
16	7,25	4,05	6,10	1,42
32	8,59	4,17	6,64	1,58
45	9,07	3,52	7,04	1,58
60	10,67	4,01	8,14	2,12
120	15,16	3,92	11,49	2,14
240	23,70	3,79	14,75	1,94



Hình 7. Độ hoạt động của enzyme.

Độ hoạt động của enzyme urease chiết xuất từ hạt đậu nành được kiểm tra thông qua sự thay đổi độ pH. Hình 8 thể hiện độ hoạt động của enzyme được đo bằng phương pháp giấy đo pH. Màu sắc của giấy đo pH là màu vàng khi độ pH ~ 6 được thể hiện ở mẫu control như cột 1 ở hình bên dưới. Quan sát lần lượt ở cốc 2 và 3, giấy đo khi được thử lần lượt vào dung dịch urea và enzyme urease cho ra độ pH gần bằng 7. Tuy nhiên khi thử giấy với dung dịch trộn urea và enzyme thì màu sắc của giấy đã chuyển sang màu xanh đậm ứng với độ pH ~ 8,8 trong bảng màu. Sự tăng độ pH chứng tỏ rằng enzyme được chiết tách đã đẩy nhanh quá trình thủy phân urea tạo ra môi trường kiềm. Sự tăng pH này tương ứng với các kết quả được đề cập bởi [20]. Điều này chứng tỏ enzyme urease chiết tách từ hạt đậu nành đã cho độ hoạt động tốt và có khả năng sử dụng làm vật liệu cho xi măng sinh học. Ngoài ra,

theo quan sát thì độ hoạt động là cao nhất đối với enzyme tươi vừa được chiết xuất và giảm dần theo thời gian (3 ngày).

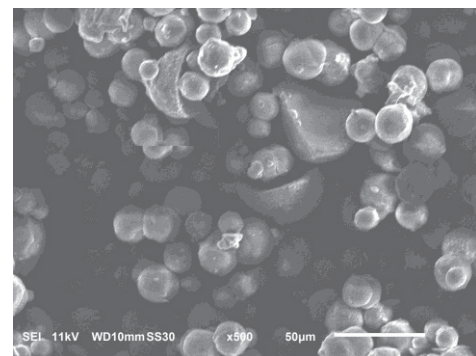


Hình 8. Độ hoạt động của enzyme thay đổi theo độ pH.

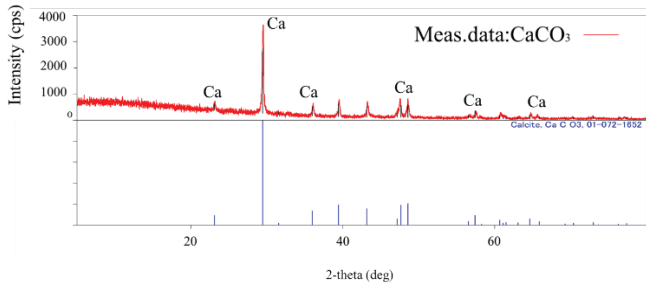
3.2. Phân tích vi cấu trúc của kết tủa CaCO₃

3.2.1. Thử nghiệm tại ống nghiệm

Sau khi chiết tách thành công enzyme urease từ hạt đậu nành, dung dịch enzyme được trộn cùng với dung dịch urea và CaCl₂ trong ống nghiệm. Kết quả quan sát sau 24 h thì thấy kết tủa trắng đọng lại dưới đáy ống nghiệm 2 (Hình 6). Trong khi đó ống nghiệm 1 (chỉ bao gồm urea và CaCl₂) thì không thấy kết tủa sau 24 giờ. Kết tủa trắng được thu thập, sấy khô và thực hiện các thí nghiệm phân tích vi mô SEM cho kết quả ở Hình 9. Phân tích SEM từ Hình 9 cho thấy các tinh thể Calcite và Vaterite dưới dạng hình cầu và khối là các dạng đặc trưng của kết tủa CaCO₃, điều này cũng được quan sát trong nghiên cứu của nhóm nghiên cứu của Imran và cộng sự [21] đã chiết tách enzyme từ hạt dưa hấu. Hình thái học của kết tủa đã khẳng định rằng kết tủa này là CaCO₃. Tuy nhiên để tăng độ tin cậy thì phân tích XRD đã được tiến hành và thể hiện ở Hình 10. Phân tích XRD cho thấy các đỉnh của tinh thể Calcite rất rõ ràng, điều này trùng khớp với nghiên cứu của nhóm Imran và cộng sự [21]. Kết quả phân tích vi mô đã chứng tỏ rằng enzyme chiết tách từ hạt đậu nành có khả năng tạo ra kết tủa CaCO₃. Điều này cho thấy khả năng sử dụng enzyme chiết tách từ thực vật để làm nguyên liệu cho xi măng sinh học là hoàn toàn khả thi.



Hình 9. Phân tích SEM tinh thể kết tủa CaCO₃.

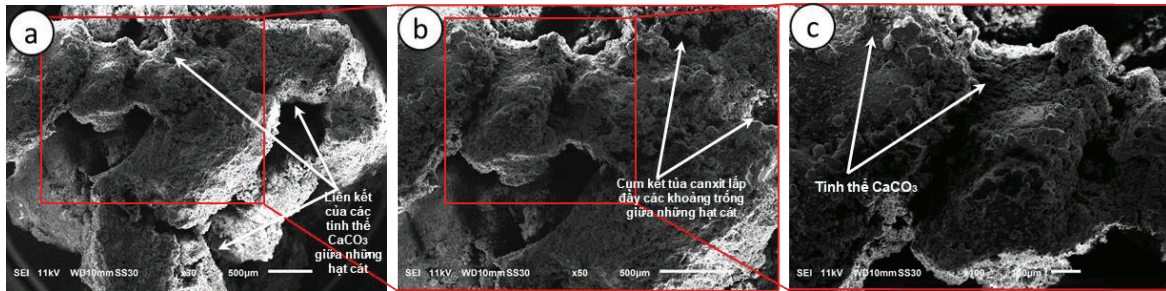


Hình 10. Phân tích XRD tinh thể kết tủa CaCO₃.

3.2.2. Thử nghiệm đối với mẫu cát đã được xi măng hóa

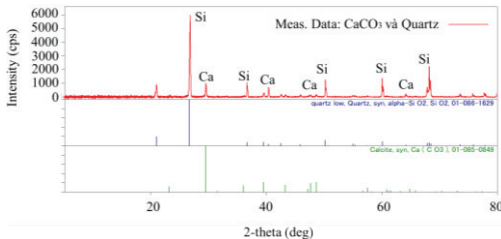
Đối với các mẫu xi măng sinh học khô, kết quả quan sát từ kính hiển vi điện tử, cung cấp góc nhìn trực quan về sự phân bố, kích thước, và mật độ kết tủa của các tinh thể CaCO₃ còn xuất hiện trên các hạt cát

và hình khối của kết tủa calcium carbonate bao quanh các hạt cát, cho thấy mức độ hiện diện kết tủa dày đặc và phân bố rộng rãi hơn đáng kể. Hiệu quả liên kết và sự kết tủa của các tinh thể CaCO₃ giữa những hạt cát được thể hiện trong Hình 11. Các cụm kết tủa CaCO₃ tại các điểm tiếp xúc giữa các hạt cát, chúng tích tụ bên trong các khoảng trống giữa các hạt cát liền kề và dần dần lấp đầy chúng lại với nhau. Có thể thấy rõ các cụm calcite lắng đọng tại ba vị trí: các điểm tiếp xúc của hạt, bề mặt hạt cát và các lỗ rỗng giữa những hạt cát. Khi tăng độ phóng đại của kính hiển vi, kết tủa calcite bao phủ các bề mặt hờ, tiếp xúc của các hạt một cách tương đối đồng đều và có nồng độ CaCO₃ lớn hơn khi tại điểm tiếp xúc hạt - hạt. Kết quả của việc phân tích này đã cho ra các số liệu trùng hợp với các bài báo cáo trước đây [22, 23]). Hình 12 cho thấy kết tủa calcite được thể hiện cùng với tinh thể silica của hạt cát thông qua kết quả phân tích XRD. Điều này chứng tỏ kết tủa được tạo ra là CaCO₃.



Hình 11. Phân tích SEM tinh thể kết tủa CaCO₃ với mẫu cát xi măng sinh học

(a) Độ phóng đại x30; (b) Độ phóng đại x50; (c) Độ phóng đại x100.



Hình 12. Phân tích XRD tinh thể kết tủa CaCO₃ với mẫu cát xi măng sinh học.

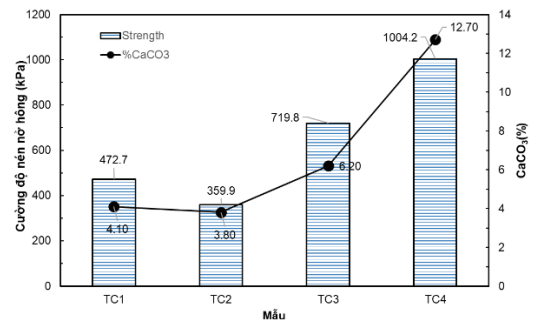
Bảng 2. Cường độ nén, độ thấm và phần trăm lượng kết tủa CaCO₃ của 04 mẫu cột cát.

Ký hiệu mẫu	Lượng kết tủa CaCO ₃ (%)	Cường độ nén (kPa)	Độ thấm của mẫu (cm/s)
TC1	4,10	472,68	0,04942
TC2	3,80	359,90	0,09855
TC3	6,20	719,81	0,06935
TC4	12,70	1004,20	0,02996

3.3. Cường độ, độ thấm và hàm lượng calcite trong mẫu xi măng sinh học

3.2.1. Đánh giá cường độ của mẫu cát xi măng sinh học

Bảng 2 và Hình 13 cho thấy quy trình tạo mẫu cát bằng phương pháp EICP cho ra khả năng tăng cường độ nén đồng thời lượng kết tủa calcium carbonate khá cao, các giá trị lớn nhất và nhỏ nhất lần lượt là 1004,20 kPa và 359,90 kPa. Mức độ kết tủa CaCO₃ và cường độ này tương tự như các kết quả được báo cáo trong những nghiên cứu trước đó ([25], [27-30]). Các mức độ kết tủa CaCO₃ cao đã thu được ở quá trình EICP cho thấy rằng phương pháp này có khả năng tăng mức độ kết dính, liên kết của các hạt cát dẫn đến cường độ cao hơn của mẫu.

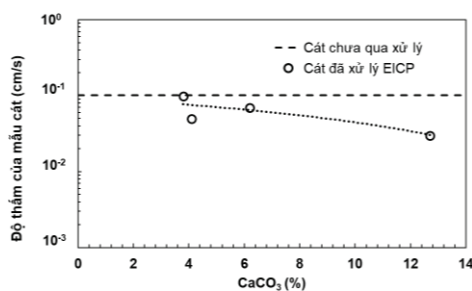


Hình 13. Cường độ nén của mẫu cát xi măng sinh học.

3.2.2. Độ thấm của khối cát EICP

Kết quả độ thấm được đưa ra trong Hình 14, được trình bày liên quan đến kết quả kết tủa calcium carbonate được tạo ra với mẫu được xử lý bằng kỹ thuật EICP. Những khối cát chưa xử lý có độ thấm ban đầu là 10^{-1} cm/s. Trong trường hợp này, sự giảm độ thấm của cát được xử lý bằng EICP xảy ra sau khi kết tủa calcium carbonate chèn vào và lấp đầy các khe hở trước đó trong khối cát [24]. Kết quả về độ thấm này tương tự như những kết quả được báo cáo bởi Al Qabany và Soga, 2013 [25] và Choi và cộng sự, 2016 [26] khi sử dụng các dung dịch hóa học có cùng nồng độ và hàm lượng kết tủa calcium carbonate tương tự.

Tuy nhiên, Yasuhara và cộng sự, 2012 [27] đã sử dụng nồng độ urease và hàm lượng CaCl_2 cao hơn những nghiên cứu khác cũng như của nghiên cứu này. Giả sử, việc gia tăng lượng dung dịch urease và calcium chloride được dùng trong nghiên cứu này sẽ dẫn đến mức độ kết tủa cao hơn từ đó dẫn đến việc tính thấm sẽ giảm nhiều hơn.



Hình 14. Độ thấm của mẫu cát xi măng sinh học.

3.4. Đánh giá lợi ích về kinh tế và tính bền vững đối với môi trường về việc giảm phát thải CO₂

Chi phí về việc sử dụng phương pháp EICP phụ thuộc vào các quy trình và thành phần cụ thể được sử dụng. Với EICP là một công nghệ tương đối mới với rất ít báo cáo về kỹ thuật có quy mô lớn được thực hiện [28, 31-35], nên khó ước tính được chi phí thực tế của nó. Đối với bài nghiên cứu này, một đánh giá tính bền vững định lượng đã được thực hiện để tạo ra một kịch bản công nghệ giả định đơn giản. Chi phí xử lý được ước tính cùng với lợi ích môi trường của EICP trong việc giảm lượng khí thải CO₂ so với các kỹ thuật và vật liệu thông thường hiện nay.

Ứng dụng kỹ thuật được lựa chọn trong nghiên cứu này là mặt đường bê tông xi măng. Nói chung, mặt đường bê tông xi măng bao gồm một lớp rắn được đặt trên những lớp cát hoặc sỏi, được phủ bởi hạt hoặc các vật liệu khác tùy thuộc vào điều kiện giao thông và các tính chất cơ học của lớp kết cấu nền đường. Ứng dụng cụ thể này đã được chọn vì hai lý do. Đầu tiên, giống như các kết cấu mặt đường khác, chúng được cấu tạo từ một số vật liệu khác nhau và phương pháp xử lý EICP có thể được áp dụng cho nhiều lớp kết cấu mặt đường bê tông xi măng này. Thứ hai, việc xây dựng đường và mặt đường tiêu tốn nhiều nguyên vật liệu, có thể gây tổn kém và phát thải CO₂ ra môi trường. Tính toán được trình bày cho một đoạn đường dài 1 km và bề rộng 7 m.

Một cấu hình với các đặc tính của các vật liệu khác nhau được sử dụng được liệt kê trong Bảng 3. Đây là những vật liệu tiêu biểu được sử dụng trong thiết kế/xây dựng thực tế hiện nay. Vì EICP là một công nghệ mới nên việc triển khai nó trong lĩnh vực này sẽ phải theo từng giai đoạn, Porter và cộng sự [36] khuyến cáo rằng việc thay thế một phần xi măng bằng một vật liệu ổn định khác sẽ là bước đầu tiên hợp lý. Nhiều nghiên cứu [37-39] đã báo cáo sự gia tăng 17 đến 36 % cường độ nén của chất kết dính do xi măng được xử lý bằng enzyme từ thực vật. Giải pháp phát triển xi măng sinh học có nguồn gốc từ thực vật có thể cải thiện 25 % cường độ nén của mặt đường và do đó cho phép thay thế 25 % xi măng trong mặt đường (ước tính dựa trên mối quan hệ giữa tỷ lệ nước - xi măng và cường độ nén [40, 41]).

Bảng 3. Tính chất cơ học của các vật liệu được sử dụng để thiết kế lớp mặt đường bê tông xi măng cho 1 km đường, bề rộng 7 m.

Lớp	Bề dày (mm)	Mô đun đàn hồi* (Mpa)	Hệ số Poisson	Thể tích (m ³)
Mặt đường bê tông xi măng	80	3200	0,30	560

*[42-46]

Bảng 4. Ước tính chi phí vật liệu cho việc xử lý bằng phương pháp EICP.

Vật liệu	Khối lượng (g/L)	Đơn giá (VNĐ/kg)	Chi phí/L (VNĐ)
Urea	20 *	4705 ^	94,10
CaCl ₂	2,77 *	4705 ^	13,03
Tổng cộng			107,13

* giá trị từ Achel và cộng sự [37] và Achel và cộng sự [47];

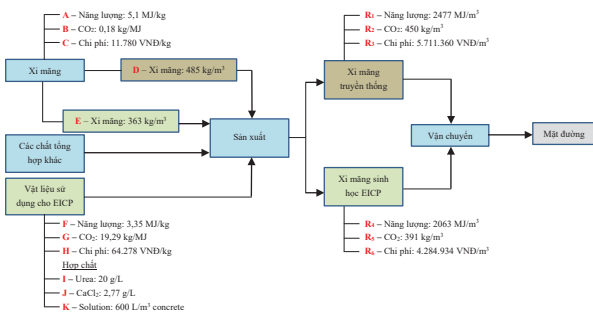
^ Chi phí trung bình so với thị trường

Cường độ nén yêu cầu của bê tông để đáp ứng các yêu cầu về mô đun của mặt đường trong Bảng 3 có thể được ước tính bằng cách sử dụng mối quan hệ tương quan [48], trong trường hợp này là 40 MPa. Tính toán thiết kế cấp phối bê tông [41] yêu cầu khoảng 485 kg/m³ xi măng để sản xuất bê tông có kích thước hạt danh nghĩa là 12,5 mm và độ sụt mục tiêu là 50 mm (giả định được dựa tại khu công nghiệp thực tế hiện tại) với cường độ 40 MPa. Do đó, xử lý EICP có thể thay thế khoảng 121 kg xi măng trên một m³ bê tông.

Bảng 4 cho thấy lượng hóa chất ước tính và chi phí (đồng) để sản xuất 1 lít dung dịch quy trình cho mỗi thiết kế hỗn hợp [37]. Cần khoảng 600 L dung dịch đóng rắn (200 L cho hỗn hợp thiết kế + 400L cho đóng rắn) để xử lý 1 m³ bê tông, và chi phí xử lý khoảng 107,13 đồng/m³ (các chi phí được tính toán chỉ là gần đúng mặc dù hầu hết các nghiên cứu đều báo cáo hóa chất cấp trong phòng thí nghiệm đã qua sử dụng). Tuy nhiên, chi phí dự kiến sẽ giảm xuống mức này khi nghiên cứu tiến triển,

đặc biệt là trong lĩnh vực sử dụng chất thải tái chế trong xử lý sinh học [47-49] và các phát triển khác. Ngoài ra, chi phí nhân công được thiết lập giống như phương pháp sản xuất bê tông thông thường (có hoặc không xử lý EICP).

Hình 15 cho thấy sự so sánh giữa lượng CO₂ và mức tiêu thụ năng lượng cho các tình huống được xử lý và không được xử lý EICP. Vòng đời quy trình của sản xuất xi măng truyền thống và xi măng được xử lý bằng EICP, xem xét các vật liệu và quy trình liên quan, sự khác biệt về tiêu thụ năng lượng và phát thải CO₂, và chi phí được ước tính cho hệ thống mặt đường. Vì cùng một cách tổng hợp sẽ được áp dụng trong cả hai trường hợp, nên đóng góp của nó đối với chi phí và năng lượng là trung tính. Mức tiêu thụ năng lượng cho sản xuất và vận chuyển cũng được giả định là như nhau. Để đơn giản, thay vì xem xét tổng năng lượng tiêu thụ, bao gồm cả năng lượng tiêu thụ trong nguyên liệu thô, đối với xi măng và hóa chất, chi cường độ năng lượng của các quá trình sản xuất được xem xét trong nghiên cứu này.

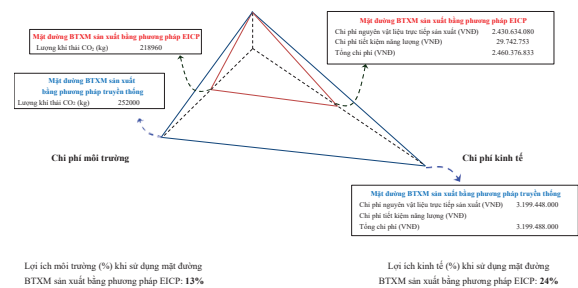


Hình 15. Vòng đời quy trình sản xuất xi măng truyền thống và sản xuất xi măng sinh học EICP và chi phí kinh tế - môi trường cho mỗi giai đoạn lần quy trình cuối cùng.

Ghi chú: Tổng hợp các vật liệu, quy trình sản xuất và năng lượng vận chuyển yêu cầu được giả định là giống nhau
R1: Được tính theo A và D / **R2:** Được tính theo A, B và D / **R3:** Được tính theo C và D / **R4:** Năng lượng tiêu thụ với xi măng + Năng lượng tiêu thụ với hóa chất = $(E \times A) + ((I + J) \times J \times F) / R5$: Lượng CO₂ thải ra khi sản xuất mặt đường BTXM bằng phương pháp EICP + Lượng CO₂ thải ra từ hóa chất = $(R4 \times B) + G / R6$: Chi phí xi măng để sản xuất mặt đường BTXM bằng phương pháp EICP + Chi phí lượng hóa chất sản xuất - Năng lượng được tiết kiệm = $C \times E + H - (R1 - R4) \times \text{Chi phí năng lượng}$ (128.80 VNĐ/MJ)*

Ghi chú:
A: Mô phỏng theo Madlood và cộng sự (2011) [50] / **B:** [51,52] / **C:** Chi phí trung bình giá xi măng thị trường / **D:** [41] / **E:** Giảm khoảng 25% xi măng bằng EICP cho cùng một lần nén; **F:** [53,54] / **G:** Tính toán dựa trên lượng CO₂ thải ra của các hóa chất [55,56] trong việc sản xuất bằng EICP được trình bày trong **Bảng 4**; **H, I, J:** Được lấy từ **Bảng 4** / **K:** [57] / * [52].

Như có thể thấy từ Hình 16, xử lý bằng EICP trên mặt đường bê tông xi măng mang lại những lợi ích kinh tế và môi trường tiềm năng đáng kể so với việc sử dụng bê tông xi măng thông thường. Tổng chi phí kinh tế và môi trường (dưới dạng lượng phát thải CO₂ và giả định đơn giá ước tính) cho 1 km đường về việc sử dụng cả hai loại mặt đường bê tông xi măng được thể hiện trong Hình 15 và Hình 16, cho thấy việc xử lý bằng EICP góp phần mang lại lợi ích môi trường 13 % (khoảng 33.000 kg CO₂) và lợi ích kinh tế 24 % so với mặt đường bê tông xi măng được sản xuất bằng phương pháp truyền thống. Vì cả hai quy trình đều đảm bảo chất lượng của hệ thống, nên yếu tố rủi ro được trung hòa.



Hình 16. Tổng chi phí kinh tế và môi trường đối với mặt đường xi măng truyền thống và mặt đường xi măng sản xuất bằng phương pháp EICP cho 1 km đường.

4. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu này trình bày quy trình chiết tách thành công enzyme urease thô (từ hạt đậu nành nảy mầm); kỹ thuật tạo ra xi măng sinh học hóa cứng cát rời; ảnh hưởng của Ca²⁺ đối với sự kết tủa calcium carbonate, hình thái của chúng; hiệu quả về chi phí và tính bền vững với môi trường của vật liệu xi măng sinh học. Xem xét kết quả thực hiện trong nghiên cứu này, có thể rút ra kết luận sau:

- Chiết xuất thô từ hạt nảy mầm trong hai ngày (48 giờ) cho thấy hoạt tính enzyme urease cao hơn gấp đôi với chiết xuất từ hạt tươi phơi khô.
- Hình thái học của kết tủa CaCO₃ đã được khẳng định thông qua kết quả phân tích vi mô đối với thử nghiệm tại ống nghiệm và thử nghiệm trực tiếp mẫu xi măng sinh học. Kết quả của cho thấy sự phân bố của kết tủa CaCO₃ xảy ra chủ yếu ở điểm tiếp xúc của những hạt cát và giữa các lỗ rỗng làm tăng cường độ và giảm tính thấm.
- Có sự khác biệt rõ rệt về kết quả độ thấm và cường độ với đất cát được xử lý theo phương pháp EICP so với cát rời.
- Trong phân tích tính bền vững, công nghệ EICP có thể có khả năng tiết kiệm chi phí 24% cũng như góp phần mang lại lợi ích môi trường 13 % so với những công nghệ truyền thống như hiện nay. Việc sử dụng các chất thải sinh học và chất thải khác trong quá trình này sẽ gia tăng hơn nữa lợi ích môi trường về giảm lượng CO₂.

Nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng áp dụng loại chất kết dính không xi măng, không sử dụng nguyên liệu hóa thạch, có thể tạo ra ở

hiệt độ tự nhiên, và thân thiện với môi trường để thay thế các chất kết dính xi măng truyền thống là hoàn toàn hợp lý. Từ kết quả nghiên cứu, nhận thấy rằng phương pháp sử dụng chất enzyme urease chiết xuất từ hạt đậu nành tạo kết tủa (EICP) dễ dàng hóa cứng cát rời rạc và nâng cao các tính chất cơ lý. Tuy nhiên, một số thách thức lớn đối với việc triển khai phương pháp EICP này trên thực địa vẫn còn khá mới mẻ trong lĩnh vực này. Những phát hiện của nghiên cứu này có thể ứng dụng cho giải pháp chống xói mòn cát để bảo vệ bờ biển nhằm ứng phó với sự biến đổi khí hậu.

Lời cảm ơn

Bài báo này được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa-Đại học Đà Nẵng với đề tài có mã số: T2022-02-05TN.

Tài liệu tham khảo

- [1] H. Klee, E. Coles, and A. Costoloe, "The cement sustainability initiative Implementing change across a global industry," *Corp. Soc. Responsib. Environ. Manag.*, vol. 11, no. 2, pp. 114–120, 2004.
- [2] C. Meyer, "The greening of the concrete industry," *Cem. Concr. Compos.*, vol.31, no. 8, pp. 601–605, 2009.
- [3] E. Gartner, "Industrially interesting approaches to 'low-CO2' cements," *Cem. Concr. Res.*, vol. 34, no. 9, pp. 1489–1498, 2004.
- [4] V. S. Whiffin, "Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement," Murdoch University, Australia, 2004.
- [5] V. Rebata-Landa and J. C. Santamarina, "Mechanical limits to microbial activity in deep sediments," *Geochemistry, Geophys. Geosystems*, vol. 7, no. 11, pp. 1–12, 2006.
- [6] D. Ran and S. Kawasaki, "Effective use of plant-derived urease in the field of geoenvironmental/geotechnical engineering," *J. Civ. Environ. Eng.*, vol. 6, no. 1, p. 207, 2016.
- [7] E. Kavazanjian and N. Hamdan, "Enzyme induced carbonate precipitation (EICP) columns for ground improvement," in *Proc., ASCE IFCEE 2015*, 2015, pp. 2252–2261.
- [8] H. Yasuhara, D. Neupane, K. Hayashi, and M. Okamura, "Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation," *Soils Found.*, vol. 52, no. 3, pp. 539–549, 2012.
- [9] D. Neupane, H. Yasuhara, N. Kinoshita, and T. Unno, "Applicability of enzymatic calcium carbonate precipitation as a soil-strengthening technique," *ASCE J. Geotech. Geoenvironmental Eng.*, vol. 139, no. December, pp. 2201–2211, 2013.
- [10] N. Hamdan and E. Kavazanjian, "Enzyme-induced carbonate mineral precipitation for fugitive dust control," *Géotechnique*, vol. 66, no. 7, pp. 546–555, 2016.
- [11] T. Hoang, J. Alleman, B. Cetin, K. Ikuma, and S.-G. Choi, "Sand and silty-sand soil stabilization using bacterial enzyme induced calcite precipitation (BEICP)," *Can. Geotech. J.*, vol. 56, no. 6, pp. 808–822, 2019.
- [12] R. A. N. Dilrukshi, J. Watanabe, and S. Kawasaki, "Strengthening of sand cemented with Calcium Phosphate Compounds using Plant-derived Urease," *Int. J. Geomate*, vol. 11, no. 25, pp. 2461–2467, 2016.
- [13] ASTM. 2010. Standard practice for classification of soils for engineering purposes (Unified Soil Classification System). ASTM D2487-10. ASTM.
- [14] ASTM. 2006. Standard test method for permeability of granular soils (constant head). ASTM D2434-68. ASTM.
- [15] Cheng, L., Cord-Ruwisch, R., and Shahin, M.A. 2013. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. *Canadian Geotechnical Journal*, 50(1): 81–90.
- [16] ASTM. 1996. Standard test method for unconfined compressive strength index of chemical grouted soil. ASTM D4219-08. ASTM.
- [17] Feng, K., and Montoya, B.M. 2015. Influence of confinement and cementation level on the behavior of microbial-induced calcite precipitated sands under monotonic drained loading. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2: 1–9.
- [18] Wani, A.A.; Sogi, D.S.; Singh, P.; Wani, I.A.; Shivhare, U.S. Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins. *J. Sci. of Food Agric.* 2011, 91, 113–121.
- [19] Abas Wani, A.; Sogi, D.S.; Grover, L.; Saxena, D.C. Effect of Temperature, Alkali Concentration, Mixing Time and Meal/Solvent Ratio on the Extraction of Watermelon Seed Proteins—A Response Surface Approach. *Biosyst. Eng.* 2006, 94, 67–73.
- [20] Whiffin, V. S. (2004). "Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement." Ph.D. dissertation, Murdoch University, Australia.
- [21] Imran, M. Al, Nakashima, K., and Kawasaki, S. (2021). "Bio-mediated soil improvement using plant derived enzyme in addition to magnesium ion." *Crystals*, 11(5).
- [22] Almajed A., Tirkolaei H.K. and Kavazanjian E., Baseline investigation on enzyme-induced calcium carbonate precipitation., *Journal of Geotechnology and Geoenvironmental Eng.*, Vol. 144, Issue 11, 2018, pp. 1-11.
- [23] Al-Thawadi S., Cord-Ruwisch R., Calcium Carbonate Crystals Formation by Ureolytic Bacteria Isolated from Australian Soil and Sludge. *J. Adv. Sci. Eng. Res.*, Vol. 2, 2012, pp. 12-26.
- [24] Nemati, M., and Voordouw, G. 2003. Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5): 635–642.
- [25] Al Qabany, A., and Soga, K. 2013. Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils. *Géotechnique*, 63(4): 331–339.
- [26] Choi, S.-G., Wang, K., and Chu, J. 2016. Properties of biocemented, fiber reinforced sand. *Construction and Building Materials*, 120: 623–629.
- [27] Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K., and Okamura, M. 2012. Experiments and predictions of physical properties of sand cemented by enzymatically-induced carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 52(3): 539–549.
- [28] Van Paassen, L.A.; Ghose, R.; Van Der Linden, T.J.M.; Van Der Star, W.; Van Loosdrecht, M.C.M. Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: Large Scale BiogROUT Experiment. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 2010, 136, 1721–1728
- [29] Van Der Linden, T.J.M. 2010b. Strength and deformation of biologically cemented sandstone. In *Proceedings of Rock Engineering in Difficult Ground Conditions - Soft Rocks and Karst*. Edited by I. Vrkljan. CRC Press, Cavtat, Croatia, pp. 405–410
- [30] Cui, M.J., Zheng, J.J., Zhang, R.J., Lai, H.J., and Zhang, J. 2017. Influence of cementation level on the strength behaviour of bio-cemented sand. *Acta Geotechnica*, 12(5): 971–986. doi:10.1007/s11440-017-0574-9.
- [31] Gomez, M.G.; Anderson, C.M.; Graddy, C.M.R.; DeJong, J.; Nelson, D.C.; Ginn, T.R. Large-Scale Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation Approaches for Biocementation of Sands. *J. Geotech. Geoenviron. Eng.* 2017, 143, 04016124.
- [32] Van Paassen, L.A. Bio-Mediated Ground Improvement: From Laboratory

- Experiment to Pilot Applications. *Geo-Frontiers* 2011 2011, 4099–4108.
- [33] Gomez, M.G.; Martinez, B.C.; DeJong, J.; Hunt, C.E.; DeVlaming, L.A.; Major, D.W.; Dworatzek, S.M. Field-scale bio-cementation tests to improve sands. In *Institution of Civil Engineers-Ground Improvement*; Thomas Telford Ltd.: London, UK, 2015; Volume 168, pp. 206–216.
- [34] Gomez, M.G.; DeJong, J.; Anderson, C.M.; Nelson, D.C.; Graddy, C.M.R. Large-Scale Bio-Cementation Improvement of Sands. *Geotechnical and Structural Engineering Congress 2016* 2016, 941–949.
- [35] Nassar, M.K.; Gurung, D.; Bastani, M.; Ginn, T.; Shafei, B.; Gomez, M.; Graddy, C.M.R.; Nelson, D.C.; DeJong, J.T. Large-Scale Experiments in Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP): Reactive Transport Model Development and Prediction. *Water Resour. Res.* 2018, 54, 480–500.
- [36] Porter, H.; Mistri, A.; Mukherjee, A. Sustainable Road bases with microbial precipitation. In *Institution of Civil Engineers-Construction Materials*; Thomas Telford Ltd.: London, UK, 2018; Volume 171, pp. 95–108.
- [37] Achal, V.; Mukherjee, A.; Reddy, M.S. Microbial Concrete: Way to Enhance the Durability of Building Structures. *J. Mater. Civ. Eng.* 2011, 23, 730–734.
- [38] Ghosh, P.; Mandal, S.; Chattopadhyay, B.; Pal, S. Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cem. Concr. Res.* 2005, 35, 1980–1983.
- [39] Achal, V.; Mukherjee, A.; Basu, P.C.; Reddy, M.S. Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 36, 981–988.
- [40] Piasta, W.; Zarzycki, B. The effect of cement paste volume and w/c ratio on shrinkage strain, water absorption and compressive strength of high-performance concrete. *Constr. Build. Mater.* 2017, 140, 395–402.
- [41] ACI. *ACI Manual of Concrete Practice 2000, Part 1: Materials and General Properties of Concrete*; American Concrete Institute: Farmington Hills, MI, USA, 2000.
- [42] Rahman, M.; Beecham, S.; Iqbal, A.; Karim, R.; Rabbi, A.T.Z. Sustainability Assessment of Using Recycled Aggregates in Concrete Block Pavements. *Sustainability* 2020, 12, 4313.
- [43] Azam, A.M.; Cameron, D.A.; Rahman, M. Permanent Strain of Unsaturated Unbound Granular Materials from Construction and Demolition Waste. *J. Mater. Civ. Eng.* 2015, 27, 04014125.
- [44] Azam, A.; Cameron, D.A.; Rahman, M. Model for prediction of resilient modulus incorporating matric suction for recycled unbound granular materials. *Can. Geotech. J.* 2013, 50, 1143–1158.
- [45] Rahman, M.M.; Beecham, S.; McIntyre, E.; Iqbal, A. Mechanistic Design of Concrete Block Pavements. In *Australian Geomechanics Society Victorian Symposium: Geotechnics and Transport. Infrastructure*; King, D., Ed.; Australian Geomechanics Society: Melbourne, Australia, 2018; pp. 13–17.
- [46] Rahman, M.M.; Beecham, S.; McIntyre, E. A new approach to the mechanistic design and analysis of concrete block pavement. In *Proceedings of the 12 International Conference on Concrete Block Pavement*, Seoul, Korea, 16–19 October 2018; pp. 37–41.
- [47] Sarda, D.; Choonia, H.S.; Sarode, D.D.; Lele, S. Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: A novel application. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 36, 1111–1115.
- [48] Omoregie, A.I.; Ngu, L.H.; Ong, D.E.; Nissom, P.M. Low-cost cultivation of *Sporosarcina pasteurii* strain in food-grade yeast extract medium for microbially induced carbonate precipitation (MICP) application. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, 17, 247–255.
- [49] Fang, C.; He, J.; Achal, V.; Plaza, G. Tofu Wastewater as Efficient Nutritional Source in Biocementation for Improved Mechanical Strength of Cement Mortars. *Geomicrobiol. J.* 2019, 36, 515–521.
- [50] Madloul, N.; Saidur, R.; Hossain, M.; Rahim, N.A. A critical review on energy use and savings in the cement industries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2011, 15, 2042–2060.
- [51] NRMCA. *Concrete CO2 Fact Sheet*; National Ready Mixed Concrete Association: Alexandria, VA, USA, 2012.
- [52] CA. *Gas. Price Trends Review*; Department of Industry, Innovation and Science, Commonwealth of Australia: Canberra, Australia, 2015.
- [53] APPEA. *Natural Gas—Essential for Australian Manufacturing*; The Australian Petroleum Production & Exploration Association: Canberra, Australia, 2016.
- [54] DTE. *Indian Urea Plants Comparable to the Best Worldwide: Study*; DownToEarth: New Delhi, India, 2019.
- [55] CW. *Emission Factors in kg CO2-Equivalent Per Unit*; City of Winnipeg: Manitoba, Canada, 2012.
- [56] Sigurdarson, J.J.; Svane, S.; Karring, H. The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2018, 17, 241–258.
- [57] Ivanov, V.; Chu, J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2008, 7, 139–153.