

УДК 573; 550.72

APPLICATION OF BIOCEMENTATION IN THE CONTEXT OF SOLVING ENVIRONMENTAL ISSUES

ЗАСТОСУВАННЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ В КОНТЕКСТІ ВИРІШЕННЯ ЕКОЛОГІЧНИХ ПИТАНЬ

V. Udymovych

В.М. УДИМОВИЧ

Національний університет харчових технологій

National University of Food Technologies

Portlandcement and derivative mixtures are the basis for the modern construction industry. Today, this material is used for the construction and development of infrastructure such as housing, industrial production, roads, etc. Portlandcement is also needed to maintain the condition of previously built facilities.

But the production of such building materials requires the creation of complex infrastructure and huge energy costs (portlandcement is obtained at a temperature of 950 °C). The production of cement mixtures leads to emissions of large amounts of carbon dioxide (according to studies of the global carbon project in 2019, cement industry ranks fourth in the world in terms of carbon dioxide emissions with an approximate amount of 1.5 billion tons)

Portlandcement is often used to strengthen coastal areas, mountain ranges and soil during human activities or during natural disasters.

This raises the question of creating inexpensive but efficient and durable building materials based on biotechnology. That is why microbial-induced calcium precipitation (MICP) by microorganisms is considered by many researchers as a promising way for soil strengthening and is called biocementation. MICP can also be used to create the surface protection of concrete structures and for their

recovery. In biocementation, urease-producing bacteria (representatives of the genera *Sporosarcina*, *Yaniella* or *Bacillus*) are mainly used. The development and use of biocementation in the future may solve certain environmental problems associated with carbon emissions in the event of large production facilities.

However, in developing this area it is necessary to pay attention to issues that may arise during implementation, namely: isolation of a microorganism with a high level of urease synthesis; search for a cheap nutrient medium for the accumulation of microorganisms in large-scale production; development of an effective system for the distribution of the necessary components for the successful implementation of microbial-induced calcium precipitation; ensuring biological safety to prevent negative impact on humans and the environment; proper environmental control.

Key words: biocementation, portlandcement, microbiologically induced calcium precipitation, urease-producing bacteria, urease, *Sporosarcina pasterii*, *Bacillus subtilis*.

Портландцемент та похідні суміші є основою для сучасної будівельної галузі. На сьогодні цей матеріал використовується для будівництва і розвитку інфраструктурних об'єктів як житло, промислові виробництва, дороги тощо. Також портландцемент потрібен для підтримання належного стану раніше побудованих об'єктів.

Але виробництво подібних будівельних матеріалів вимагає створення складних інфраструктурних об'єктів та значних енергетичних затрат (портландцемент отримують за температури 950°C). Виробництво цементних сумішей призводить до викидів великої кількості вуглекислого газу (відповідно до даних досліджень глобального проекту з викидів вуглецю за 2019 р, цементна промисловість займає четверте місце у світі за викидами вуглекислого газу з приблизною кількістю у 1,5 млрд. тон).

Портландцемент часто використовується для укріплення прибережних зон, гірських масивів та ґрунтів під час антропогенної діяльності або при природніх катаклізмах.

У зв'язку із цим постає питання щодо створення недорогих але ефективних та довговічних будівельних матеріалів на основі продуктів біотехнології. Саме тому мікробноіндуковане осадження кальцію (МІОК) за допомогою мікроорганізмів, розглядається багатьма дослідниками як перспективний напрямок для забезпечення укріплення ґрунтів та називається біоцементациєю. Також МІОК може використовуватися для створення поверхневого захисту бетонних конструкцій та для їх відновлення. При біоцементациї переважно використовуються уреазопродукуючі бактерії (представники родів *Sporosarcina*, *Yaniella* або ж *Bacillus*). Розвиток і використання біоцементациї в майбутньому може вирішити певні екологічні проблеми, які пов'язані з викидами вуглекислого газу у випадку створення великих виробничих потужностей.

Однак при розробці даного напрямку необхідно приділити увагу питанням, які можуть виникнути під час реалізації, а саме: виділення мікроорганізму з високим рівнем синтезу уреазу; пошук дешевого поживного середовища для накопичення мікроорганізмів при великотоннажному виробництві; розробка ефективної системи розподілу необхідних компонентів для успішної реалізації мікробноіндукованого осадження кальцію; забезпечення біологічної безпеки для недопущення негативного впливу на людину та екологію; належний контроль навколишнього середовища.

Ключові слова: біоцементация, портландцемент, мікробно-індуковане осадження кальцію, уреазо-продукуючі бактерії, уреазу, *Sporosarcina pasteurii* *Bacillus subtilis*.

Постановка проблеми. Належне обслуговування бетонних конструкцій має надзвичайно важливе значення для гарантування розрахованого терміну експлуатації (Czarnecki and Woysiechowski, 2013). При сучасних реаліях бетонні конструкції та покриття при взаємодії з навколишнім середовищем або при механічних пошкодженнях втрачають свою первинну міцність та структуру, що в майбутньому може призвести до катастрофічних наслідків. Європейський стандарт EN 1504 класифікує причини дефектів на дві основні групи: дефекти, які викликані пошкодженням бетонного шару, що викликані механічними, хімічними або фізичними факторами або корозією арматури, що викликана процесом взаємодії карбону та бетону. У зв'язку із цим протягом останніх років були розроблені різноманітні стандарти та рекомендації задля проведення ремонтних робіт, наприклад EN 1504, ACI 562-16 або ACI 546R-14.

Залежно від різних механізмів захисту бетонних поверхонь та конструкцій, розрізняють три методи:

1. Рівномірне покриття з метою просочування засобів на основі воску.
2. Герметизація за допомогою засобів на основі смоли.
3. Покриття акриловими смолами.

Для відновлення та зміцнення конструкцій бетону використовуються ремонтні розчини та бетони. Методи зовнішньої поверхневої обробки зазвичай використовують для захисту від проникнення агресивних агентів, для контролю вологості та для збільшення механічної, фізичної і хімічної стійкості.

Водночас необхідно враховувати, що виробництво цементу є доволі енергоємним процесом оскільки отримання цементу відбувається за температури 950°C протягом кількох годин для належного перетворення вапняку в цементний клінкер. Сучасні цементні матеріали передбачають використання та перетворення вапняку та доломіту при температурі 20 – 60 °C або ж мікробних компонентів

Метою статті є аналіз сучасних публікацій, які стосуються методів обробки бетонних конструкцій та ґрунтів для їхнього укріплення. Наведені в статті результати дослідження узагальнюють інформацію щодо використання не лише традиційних матеріалів, а й альтернативних біоцементуючих розчинів отриманих біотехнологічним шляхом.

Викладення основних результатів дослідження.

Цементні матеріали та речовини для ремонту

Цементні розчини давно використовуються як матеріали для відновлення бетону через їх достатню міцність і високу сумісність з бетоном. Прийнято вважати, що цементні розчини допускається використовувати лише у тріщинах та деформаціях, ширина яких дорівнює хоча б 1,5–2,3 розміру найбільших частинок цементу. Через малий розмір частинок ці суспензії мають непогані характеристики проникнення, що дозволяє заповнювати тріщини (Onofrei et al., 1989)

Набуває популярності також підвищення міцності тріщин за допомогою розчину колоїдних наночастинок гідроксиду кальцію розміром від 50 до 300 нм (Van Hees et al., 2014, Rodriguez-Navarro et al., 2013). В цьому випадку реакція води та вуглекислого газу з гідроксидом кальцію призводить до кристалізації карбонату кальцію з подальшим утворенням стабільного кальциту приблизно через 28 діб (Narwaria and Tiwari, 2016).

Ремонтні розчини та речовини на основі цементу мають надзвичайно широку номенклатуру. На якість подібних розчинів безпосередньо впливає кількість води, яка використовується для приготування, оскільки це напряду впливає на в'язкість кінцевого розчину, проникнення та міцність щеплення мікроструктури бетонної конструкції. (Kubiak et al., 2011, Wojciechowski et al., 2016, Lukovic and Ye, 2015).

Суміші з модифікованими полімерами цементу (МПЦ) визначаються як гідравлічний цемент, поєднаний під час змішування з органічними полімерами, які дисперговані або повторно дисперговані у воді, з агрегатами

або без них. Злиття полімеру відбувається у вигляді гідрату цементу, в результаті чого утворюється спільна матриця гідратованого цементу і полімерної плівки. В результаті цього покращуються механічні показники, міцність зчеплення, міцність на розрив разом із зменшенням пружності (Parghi and Alam, 2016).

Геополімерні бетони (ГПБ) можна розглядати як відносно нові стійкі будівельні матеріали, що включають промислові відходи до їх складу (Huseien et al., 2017, Somma et al., 2011). Вони є безцементними альтернативними матеріалами, що виробляються хімічною взаємодією між собою компонентами як попіл, гранульований доменний шлак, суміш гідроксиду натрію (NaOH) та розчину силікату натрію (Na_2SiO_3) (Somma et al., 2011). ГПБ є доволі непоганою альтернативою для ремонту конструкцій на основі портландцементу, за рахунок пружності, коефіцієнта Пуассона та міцності на розриві (Huseien et al., 2017, Pacheco-Torgal et al., 2012).

Відомо, що гідрофобна обробка зменшує вміст вологи у бетоні та пригнічують її капілярне проникнення (Medeiros and Helene, 2009). Ferrara та Pattarini (Ferrara and Pattarini, 2016) у своїх дослідженнях намагалися додати силоксанові сполуки безпосередньо до суміші, для отримання таких же водовідштовхувальних характеристик, як і при використанні звичайних речовин для обробки досліджуваних поверхонь. Але сьогодні проглядається тенденція до використання гідрофобних агентів на основі силану (мікроемульсій) для досягнення водовідштовхувального ефекту (Хуе et al., 2017).

Просочення бетонної поверхні гідрофобними матеріалами (напр., силанами, силоксанами), що здатні проникати крізь пори в бетоні - ефективне рішення для покращення характеристик бетону проти проникнення води. Але дана умова може досягатися лише у випадку якщо молекулярна будова речовини досягає достатньої глибини проникнення та взаємодії з конструкцією для досягнення гідрофобності обробленої поверхні (Pan et al., 2017).

Обробка поверхні для блокування пор, збільшує твердість і непроникність поверхневого шару бетону при блокуванні капілярних пор (Jiang et al., 2015, Baltazar et al., 2014). Найпоширенішим герметиком для цього є силікат натрію (LaRosa Thompson et al., 1997). Pan та ін. (Pan et al., 2015) підтвердили ефективність як силікату натрію, так і фторосилікату для зменшення повітропроникності бетону, вимірювання глибини проникнення до 5 мм. Однак Ibrahim та ін. (Ibrahim et al., 1999) порівняли ефективність різних матеріалів для обробки поверхонь для підвищення стійкості бетону до сульфатного впливу, карбонізації та дифузії хлоридів і зробили висновки, що забезпечується найгірший захист для обробки силікатом натрію. Dai та ін. (Dai et al., 2010) також у своїх дослідженнях повідомляли, що речовини на основі силікату натрію не перешкоджають потраплянню води до капілярних пор бетонних конструкцій.

Мікробноіндуковане осадження кальцію як альтернатива

Мікробноіндуковане осадження кальцію (МІОК) останнє десятиліття все більше вивчається як один з екологічних та перспективних напрямів відновлення та зміцнення не лише бетонних конструкцій, а й піщаних ґрунтів та пісків у прибережних зонах (Wang et al., 2016, Ferrara et al., 2018). Обробка біологічними агентами бетонних матеріалів призводить до більш високої стійкості до різноманітних атмосферних коливань (замерзання/розтавання), поліпшення міцності поверхні та зниження проникності води в цілому (De Muynck et al., 2010, Le Metayer-Levrel et al., 1999, Rodriguez-Navarro et al., 2003, De Muynck et al., 2011, De Muynck et al., 2008 a/b).

Біомінералізація - процес осадження кристалів у клітинному або позаклітинному матриксі живого організму (Lowenstam and Weiner, 1989), який відбувається за рахунок переміщення та перетворення металів мікроорганізмами (Dhami et al., 2013, 2016; Phillips et al., 2013; Zhu and Dittrich, 2016). Одним із найбільш досліджених та вивчених процесів біомінералізації є перетворення карбонату кальцію (CaCO_3) з подальшим

утворенням кальциту (Fernandez et al., 2018, Banks et al., 2010; Ronholm et al., 2014; Rusznayk et al., 2012). Щороку з'являється інформація про проведення досліджень рядом мікроорганізмів щодо осадження карбонату кальцію для геологічного та будівельного застосування (Dhami et al., 2013, 2014).

Відповідно до досліджень та класифікації, Meldrum (2003) пропонує вважати біомінералізацію як "біологічно індуковану" мінералізацію чи "мінералізовану через органічну матрицю". "Біологічно індукована" мінералізація є взаємодією мікроорганізмів з навколишнім середовищем, що призводить до осадження біомінералів. "Мінералізація, опосередкована органічною матрицею" передбачає організм, який безпосередньо контролює процес біомінералізації, наприклад процес осадження кальцію (CaCO_3), або ж мікробноіндуковане осадження кальцію (МІОК).

Кальцит є кінцевим результатом МІОК, котрий можливий за рахунок уреазо-продукуючих бактерій у присутності іонів сечовини та кальцію (Stocks-Fisher et al., 1999; Frankel and Bazyliniski, 2003; Whiffin, 2004; Mitchell and Santamarina, 2005 ; Ivanov and Chu, 2008; DeJong et al., 2010; De Muynck et al., 2010; Ivanov and Stabnikov, 2017; Ivanov, 2010). МІОК передбачає покращення геотехнічних властивостей ґрунтів та відновлення бетонних конструкцій за рахунок осадження кальциту при активності уреазопродукуючих бактерій (Whiffin, 2004; Van Paassen, 2009; DeJong et al., 2013). Вивчення формування цього процесу є важливим для розуміння інших природних механізмів осадження CaCO_3 (Banks et al., 2010; Sacchio et al., 2003; Fukue et al., 2003; Wright and Oren, 2005) з метою подальшої комерціалізації та збільшення об'ємів застосування технології.

МІОК є успішним у випадку досягнення та підтримання п'яти ключових факторів, а саме:

- (1) концентрації кальцію,
- (2) рівня розчиненого неорганічного вуглецю,
- (3) рН середовища,

(4) активності уреаз

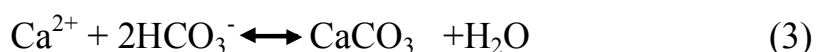
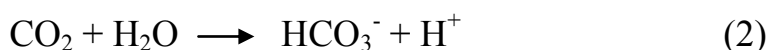
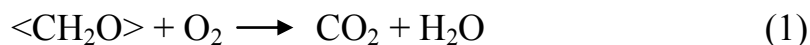
(5) активності карбоангідрази (Hammes and Verstraete, 2002; Hammes et al., 2003; Achal et al., 2015; Ivanov and Stabnikov, 2019).

Оскільки МІОК є доволі складним біохімічним процесом, то на нього суттєво можуть впливати такі фактори як температура навколишнього середовища, рН, вміст води, концентрація сечовини, вид (або ж група видів) та концентрація мікроорганізмів, розміри пор як ґрунту так і бетонних конструкцій (McConnaughey and Whelan, 1997; Stocks-Fischer et al., 1999; Whiffin, 2004; Whiffin et al., 2007; Van Paassen et al., 2010; Achal et al., 2009a; Harkes et al., 2010; Achal and Pan, 2011; Castro et al., 2016; Sharma and Ramkrishnan, 2016).

Результати деяких досліджень зазначають, що біоцементация може успішно збільшувати міцність та в'язкість між частинками піску на відносно великих площах (Van Paassen et al., 2010, Ivanov and Chu, 2008; DeJong et al., 2010, 2013; Dhami et al., 2013; Gao et al., 2019; He et al., 2020), однак без можливості біоцементации мулистих піщаних або глинистих ґрунтів (He et al., 2020).

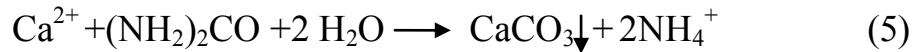
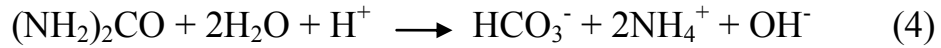
У природі карбонат кальцію виробляється хемотрофними і фототрофними мікроорганізмами, які одночасно утворюють іони карбонату через збільшення значення рН (Castanier et al., 1999, Cacchio et al., 2003, Wright and Oren, 2005).

Хемотрофні осади CaCO_3 :



де: $\langle \text{CH}_2\text{O} \rangle$ - узагальнена формула вуглеводів.

Однак для нейтралізації протонів повинна бути додаткова реакція, наприклад, гідроліз сечовини ферментом уреазою:



Біоцементация, представлена в рівняннях 1-5, наразі є найпопулярнішою методикою, що використовується для агрегації та зміцнення ґрунтів (Whiffin et al., 2017; Ivanov and Chu, 2008, Burbank et al., 2011, Stabnikov et al., 2011, Stabnikov et al., 2013a,b; DeJong et al., 2013; Gurbuz et al., 2015; Kim et al., 2016; Sotoudehfar et al., 2016; Ivanov and Stabnikov, 2017), або для іммобілізації ґрунтових забруднень (Stabnikov et al., 2013a; Warren et al., 2001; Gadd and Pan, 2016). Його часто називають мікробноіндукованим осадження карбонату кальцію (МІОКК) або мікробноіндукованим осадження кальцію (МІОК). Насправді, жоден термін не є науково правильним, оскільки є багато інших хемотрофних та фототрофних типів МІОК. Більш точним, і менш зручним терміном буде «кристалізація карбонату кальцію, котра залежить від уреазної активності».

На сьогодні найбільш вивченими мікроорганізмами для проведення мікробноіндукованого осадження кальцію є уреазопродукуючі бактерії (Whiffin, 2004; Whiffin et al., 2007; Van Paassen, 2011; Stabnikov et al., 2013; Umar et al., 2016; Mujah et al., 2017; Bibi et al., 2018). Hokkanen та Lynch (2003) у своїх дослідженнях відзначають, що передбачити розвиток бактерій, що пропонується використовувати для МІОК, не завжди є можливим, тому необхідно аналізувати у кожному конкретному випадку модель їх застосування та можливі ризики.

Прогалини та обмеження при використанні МІОК

Багато дослідників з усього світу, таких як Al Qabany, DeJong, Valencia, Van Paassen, Whiffin та інші виявили ряд недоліків та обмежень у технології МІОК для стабілізації ґрунту: як забезпечити наявність гомогенного шар покриття при обробці; яким чином створену технологію зробити

безперебійною, системною та однорідною через застосування до різних оброблюваних площ та конструкцій; чи буде досягнуто умову рівномірного просочування та осадження кальцію? Саме ці питання на сьогодні створюють системні обмеження для подальшої економічної, а найголовніше, екологічної перспективи застосування МІОК у промислових масштабах.

Окрім вище зазначених обмежень, які в перспективі можуть бути подолані, також необхідно відзначити щонайменше ще два, які в майбутньому можуть створити негативний ефект: потенційна біологічна небезпека від запропонованих до використання екзогенних бактерій, які є умовно патогенними мікроорганізмами при проведенні МІОК та концентрація амонію з подальшим утворенням аміаку (небажаний побічний продукт МІОК), що може призвести до впливу на навколишнє середовище, за рахунок потрапляння до атмосфери та гідросфери (відкриті водойми та озера) з подальшим впливом на людину.

Однією з перешкод перед промисловим становленням та використанням МІОК для біоцементування є вартісне поживне середовище для накопичення уреазопродукуючих бактерій. В літературі описана спроба використання активного мулу, який утворювався на міських очисних спорудах, для вирощування уреазо-продукуючих бактерій *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 (Whiffin, 2004). Обробку мулу проводили 0,5М NaOH протягом 20 хвилин з наступною нейтралізацією до рН 8,0 сірчаною кислотою, H₂SO₄. Проте, цей гідролізат не забезпечував достатній ріст УПБ. При зміні режиму гідролізу активного мулу вдалося отримати середовище, яке відповідало вимогам отримання біомаси для масштабної біоцементациї при культивуванні уреазо-продукуючих бактерій з конститутивною уреазою (*Bacillus* sp. VS1) та індукцібельною уреазою (*Yaniella* sp. VS8) (Stabnikov, 2016; Ivanov and Stabnikov, 2019).

Одним із способів отримання та накопичення уреазо-продукуючих бактерій, є подача сечовини до ґрунтів (Stabnikov et al., 2013b; Al-Thawadi, 2013). Потім відбувається відбір галофільних і лужнофільних уреазо-

продукуючих бактерій або навіть автохтонних мікроорганізмів для відпрацювання біоцементації за уреазної активності *in situ* (Hammes et al., 2003; Burbank et al., 2011, 2012). Відбір уреазо-продукуючих бактерій відбувається при використанні середовищ, що мають достатньо високу концентрацію солі та високі межі значення pH (Stabnikov et al., 2013 b). Ці умови допомагають отримувати та накопичувати культури з високим рівнем активності уреазу, навіть у не асептичних умовах (Cheng and Cord-Ruwisch, 2012).

Найкращим результатом накопичення *Yaniella sp.* VS8 та *Bacillus sp.* VS1 було використання дріжджового екстракту (20 г/л) та триптон соєвого бульйону в якості поживного середовища. Низька активність уреазу при використанні активного мулу, як джерела поживного середовища, може бути пов'язана з тим, що протеази котрі утворюються при накопиченні біомаси інактивують уреазу, а також синтезом як внутрішньоклітинної, так зовнішньоклітинної уреазу.

Свого часу повідомлялося про те, що всі бактерії на планеті є природними, а отже перенесення певних їх представників у інші ареали існування не спричинить екологічних змін та ризиків у майбутньому. Однак, з огляду на проблеми біологічного ризику, Umar та ін. (2016) згадують, що бактерії котрі пропонується використовувати при МІОК необхідно обирати на основі аналізу біологічної небезпеки не лише під час обробки досліджуваних ділянок, але й після обробки, уникаючи використання генетично модифікованих організмів (ГМО), або збудників, які можуть впливати на місцеву автохтонну мікробну.

Уреаза, що належить до групи гідролаз, - це металофермент, що містить нікель, який каталізує гідроліз сечовини в аміак і карбонат, ініціюючи реакційний ланцюг осадження карбонату кальцію (Castro et al., 2016). Li та ін. (2013) показали, що уреазопродукуючі бактерії можуть поглинати розчинні важкі метали котрі присутні в ґрунтах та ґрунтових водах і є активними під час МІОК. Автори вивчаючи процес МІОК за

допомогою гідролізу сечовини у *Sporosarcina pasteurii* та *Terrabacter* дійшли до висновку, що обидві бактерії успішно асимілюють Ni, Cu, Pb, Co, Zn та Cd з ґрунтів, осаджуючи їх карбонатами навіть за кислого значення рН, моделюючи ситуацію як при кислотних атмосферних опадах.

Іванов та співавт. досліджували технологію використання біоосадження на основі мінералізації заліза шляхом осадження оксиду заліза для поліпшення властивостей ґрунтів (Ivanov et al., 2014 a,b). Для порівняння було використано два різних біорозчини: біорозчин на основі заліза та біорозчин на основі карбонат кальцію, що потім випадає в осад. Контроль біорозчину на основі карбонату кальцію складався з хлориду кальцію, сечовини та бактерій, що розкладають сечовину, тоді як біорозчин на основі заліза складався з можливості використання залізовідновлювальних бактерій, залізної руди та органічних відходів (Ivanov et al., 2014 a). Зразки, де використовувалися за основу залізовідновлювальні бактерії не могли досягти достатньої міцності, як біологічно оброблені зразки на основі кальцію, загальна водопроникність також була значно нижчою у зразках із залізовідновлювальними бактеріями.

Іванов та ін. (Ivanov et al., 2009) окремо підкреслили, що типові значення рН, що можуть бути створені МІОК, знаходяться в діапазоні значень від 8,3 до 9,5, що може бути надзвичайно критичним для корозії сталевий арматури в залізобетонних конструкціях. Тому при використанні МІОК за допомогою уреазопродукуючих або залізовідновлювальних бактерій необхідно ретельно вивчати глибину тріщин бетонних конструкцій, а у разі виявлення доволі глибоких тріщин до арматурного каркасу потрібно забезпечувати ретельний контроль.

Карбоангідраза (КА), як і уреазы, відіграє важливу роль при проведенні МІОК, але на сьогодні ще не є достатньо вивченим як саме впливає на МІОК. КА також є металоферментом, але замість нікелю містить цинк, що вступає у каталітичну взаємодію з CO_2 та HCO_3 (бікарбонатом). При взаємодії бікарбонатом вивільняються іони водню (H_2), які сприяють осадженню

карбонат кальцію до кальциту з вивільненням води та вуглекислого газу (Castro et al., 2016). При осадженні карбонат кальцію за рахунок карбоангідрази форма осаду може бути ромбоедром (менш жорстка структура) або ж багатокутною, а при наявності уреазі еліпсоїдальною або ж багатокутною, що говорить про взаємодоповнення одне одного.

МІОК може функціонувати за рахунок гідролізу сечовини, аеробного окислення, денітрифікації, відновлення сульфату тощо. Однак Van Raassen та ін. (2010) та Achal and Pan (2011) вважають, що МІОК за рахунок гідролізу сечовини (за наявності уреазі) є найбільш контрольованим шляхом з найвищим показником осадження CaCO_3 за найкоротший час.

Мікроорганізми як невідємна складова біоцементації

Грунтові мікроорганізми утворюють одну з найпоширеніших мікробних екосистем на Землі (Mitchell and Santamarina, 2005; Coleman-Derr et al., 2016; Wu et al., 2006; Umar et al., 2016; Wang et al., 2020). Бактерії можуть вижити в середовищах з найрізноманітнішими показниками кислотності, солоності, температури та атмосферного тиску. Більшість видів бактерій виживають у місцях зі значеннями рН від 5 до 7, що характерно для ґрунтових вод та ґрунтів близьких до поверхні, а значення рН знижується зі збільшенням концентрації іонів у ґрунті (Chapelle, 2000; Madigan, 2012).

Уреазопродукуючі бактерії в цілому можна розподілити на дві основні групи (залежно від реакції на певну концентрацію амонію) (Gat et al., 2014): бактерії в яких висока концентрація амонію пригнічує активність уреазі з подальшим низьким біоцементуючим ефектом (напр., *Bacillus megaterium*) та бактерії де активність уреазі при високій концентрації не зменшується, а навпаки, призводить до інтенсивного біоцементуючого ефекту (напр., *Sporosarcina pasteurii*, що раніше мала назву *Bacillus pasteurii*). Саме представники другої групи є найбільш доцільними для біоцементації за достатньої наявності концентрації сечовини, зменшуючи потенційне потрапляння сечовини до ґрунту та ґрунтових вод. Однак цей процес має і

негативну тенденцію, оскільки призводить до викидів амонію (NH_4^+) у навколишнє середовище, що може супроводжуватися легким відтінком амонію в місцях використання (Al Qabany et al., 2012).

Біологічна безпека мікробних штамів, які використовуються при дослідженнях для розвитку промисловості, зокрема і біоцементациї, зазвичай класифікують на чотири групи ризику відповідно до Директиви Європейського союзу (Директива 2000/54/ЄС):

RG1: мінімальний ризик захворювання людини;

RG2: може спричинити захворювання людини або групи людини, можлива локалізація та профілактика поширення;

RG3: може спричинити важкі захворювання людини та представляти велику небезпеку для працівників та суспільства, екології;

RG4: спричиняє тяжке захворювання людини, має високий ризик для суспільства та екології;

Біологічним агентом для МІОК може бути один штам селективно виділеної культури бактерій, що продукує уреазу (Іванов та Стабніков, 2017а, б), або природній штам (штами) бактерій з уреазною активністю (Burbank et al., 2011; Rajasekar et al., 2017). Основними критеріями відбору біоагенту є його відносно висока активність уреазу (0,1 – 10 мМ гідролізованої сечовини/хв) у середовищі з рН в межах від 8,5 до 9,2 та концентрацією солей та сечовини не менше 1 М.

До групи RG1 (біологічно безпечні) зазвичай можна віднести: *Sporosarcina pasterii* або *Sporosarcina aquimarina* (Bang et al., 2001; Bachmeier et al., 2002; Whiffin et al., 2007; Mortensen та DeJong, 2011; Stabnikov et al., 2013; Keykha et al., 2018); з роду *Bacillus* – *B. sphaericus* (нині *Lysinibacillus sphaericus*) (Hammes et al., 2003; De Muynck et al., 2008), *B. megaterium* (Bang et al., 2001; Dhami et al., 2014), *B. lentus* (Sarda et al., 2009), *B. pseudofirmus* (Jonkers et al., 2010), *B. subtilis* (Reddy et al., 2010), *B. mycoides* (Elmanama та Alhour, 2013) та *B. pumilus* (Daskalakis et al., 2015); поодинокі бактерії з роду *Acinetobacter* (Li et al., 2018).

До групи RG2 (умовно-патогенні) зазвичай можна віднести: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* (Whiffin et al., 2007; Varalakshmi, 2014), *Helicobacter pylori* (Dosier, 2014), *Bacillus cereus* (Han et al., 2013; Maheswaran et al, 2014), *Staphylococcus aureus* та *Klebsiella pneumoniae* (Varalakshmi, 2014).

Саме тому перед початком будь яких досліджень та випробувань необхідно провести ретельний відбір котрий передбачає (Ivanov, 2015):

- відбір уреазоактивного штаму з колонії в середовищі, котре планується використовувати для біоцементациї з додаванням 1% - 2% агару в чашках Петрі та індикатор рН фенол червоний;
- вибір на тому самому носії в чашках Петрі з вимірюванням активності ферменту уреазу в рідкій культуральній рідині;
- ПЛР-ампліфікація прямої та зворотної послідовностей гена 16S рРНК вибраного штаму за допомогою праймерів секвенування;
- секвенування та вирівнювання гена 16S рРНК вибраного штаму;
- депонування послідовності в базі даних NCBI GenBank;
- ідентифікація послідовності гена 16S рРНК з використанням результатів Blast для послідовності, депонованої у базі даних NCBI GenBank;
- пошук патогенності ідентифікованих видів у базі даних PubMed.

Зазвичай у методах МІОК пропонується використовувати такі мікроорганізми, що відносяться до родів *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Spoloactobacillus*, *Clostridium* та *Desulfotomaculum*, а також *Serratia* – бактерії, які були ізольовані бразильських ґрунтів (Enriquez, 2017). Enriquez виявив, що *Serratia ureilytica sp* має вищі показники осадження CaCO₃ (кальцит) у порівнянні з *Sporosarcina pasterii* у піщаних ґрунтах за тих самих параметрів і умов (Whiffin (2004)). Morales та ін. (2015) досліджували біоцементацию з низькою кількістю мікроорганізмів в розчині, що імітувало б природній рівень бактерій родини *Bacillaceae* у мулисто-глинисто-піщаному ґрунті. Завданням дослідження було обмежити кількість утворюваного аміаку та його окислених форм, щоб мінімізувати потенційний вплив на навколишнє середовище та можливе розчинення осадженого карбонату кальцію внаслідок

окислення аміаку. Результати дослідження показали низький рівень осадження та меншу стійкість до стиснення у порівнянні з іншими дослідженнями щодо стабілізації ґрунтів. Автори дійшли висновку, що індукована біоцементация ґрунтів в такому випадку не може забезпечити достатній рівень міцності.

Іванов та Стабніков (2019) зазначають навіть вищі значення рН – вище 8,5, а мікроорганізми є галотолерантними (зростають при концентраціях кальцію та сечовини вище 1 М), грампозитивними видами бактерій з родів *Bacillus* та *Sporosarcina*. Штам *Sporosarcina pasteurii* ATCC11859 (DSMZ33, LMG 7130) є найпопулярнішим при цих дослідженнях (Whiffin et al., 2007, Achal et al., 2009). Для біоцементации використовуються й інші фізіологічно подібні види *Bacillus megaterium* (Dhami et al., 2014), *B. sphaericus* (Hammes et al., 2003), *B. pseudofirmus* (Jonkers et al., 2010), *B. subtilis* (Reddy et al., 2010), *Bacillus pumilus* (Daskalakis et al., 2015), *B. lentus* (Sarda et al., 2009) та деякі невідомі види мікроорганізмів. Штам грампозитивних бактерій, що продукують уреазу, *Staphylococcus succinus* був виділений з води Мертвого моря (34% солоності) (Stabnikov et al., 2013), проте штами *S. succinus* часто гемолітичний та токсигенний (Novakova et al., 2006, Zell et al., 2008), тому виділений штам не використовували для досліджень біоцементации. Уреазапродукуючі бактерії можуть бути і умовно-патогенними мікроорганізмами, наприклад *Helicobacter pylori*, котрий може накопичуватися у шлунці людини та завдавати непоправної шкоди здоров'ю (Stabnikov et al., 2013).

Існує багато відомих патогенних видів, які також є галотолерантними та лужнофільними. Навіть вищезгаданий галофільний штам *Staphylococcus succinus*, виділений з води Мертвого моря (з солоністю близько 35%), має уреазну активність (Stabnikov et al., 2013). Штами *Staphylococcus succinus* може бути гемолітичним та токсичним (Zell et al., 2008) та асоціюватися з інфекційними захворюваннями (Novakova et al., 2006).

Ivanov and Stabnikov (2019) при своїх дослідженнях відзначали, що лужнофільні уреазопродукуючі бактерії штамів VS8, VS1, VS21 та VS17

складають 55%, 30%, 10% та 5% загальної кількості колоній відповідно. Основним штамом була *Yaniella sp.* / *Enteractinococcus sp.* штам VS8 з клітинами, схожими на мікрококи, був із сімейства *Micrococcaceae*. Це важливо для промислових процесів, оскільки *Yaniella* належать до першої групи ризику і в базі даних PubMed не було виявлено інформації про патогенність даного мікроорганізму.

Другий штам - *Bacillus sp.* штам VS1, виділений Stabnikov et al. (2011) раніше використовувався в лабораторних дослідженнях для дослідження біоцементациї, а третій уреазопродукуючий штам VS17 був представником роду *Staphylococcus*. Третій уреазопродукуючий штам VS17 був доволі близьким до *Staphylococcus sp.* R-25657 (ідентичність 100%) та *Staphylococcus sp.* ZWS13 (ідентичність 99%). Штам VS21 був близьким до штаму *Bacillus thuringiensis serovar kurstaki* HD1 (ідентичність 99%). Штам *Bacillus thuringiensis serovar kurstaki* HD1 знайшов своє застосування як екологічно чистий пестицид. Тому на практиці необхідно використовувати біологічно безпечні штами для унеможливлення непередбачуваних наслідків.

Ivanov та Stabnikov (2019) зазначають, що одним зі способів забезпечення біобезпеки при використанні уреазопродукуючих штамів є використання неочищеної бактеріальної уреазы при зменшенні активності бактеріальних клітин для утворення центрів кристалізації кальцію. Саме тому було проведено дослідження котре пропонує використовувати наступну схему при біоцементуванні:

- Провести обробку досліджуваного зразка розчином сечовини та кальцію карбонату;
- Провести обробку поверхні культурою *Yaniella sp.* VS8;
- Провести обробку 0,5% розчином додецилсульфатом натрію (для інактивації культури).
- При дотриманні даної послідовності дій було виявлено, що уреазна активність інактивованих бактерій не зменшувалась та залишалась на прийнятному рівні. Тому подібний підхід до використання культур

з інактивацією дає надію щодо вирішення питання біологічної безпеки при біоцементуванні.

МІОК як потенційний спосіб поглинання вуглекислого газу

Degens та ін. (2000), Nannipieri та співавт. (2003), Millo та ін. (2012) та Murugan та ін. (2014) у своїх дослідженнях при вивченні ролі ґрунтових мікробіологічних спільнот для підтримки функцій ґрунтових екосистем, запропонували технологію біоцементациї за допомогою уреазопродукуючих бактерій як потенційний спосіб поглинання вуглекислого газу. Ця модель передбачає, що при МІОК відбувається захоплення та накопичення вуглецю шляхом використання розчинного CO_2 як джерела вуглецю при біоцементациї. Автори підсумували нещодавнє дослідження, яке стверджувало, що види МІОК з лужним метаболізмом можуть відігравати активну роль у секвестрації CO_2 на довготривалу перспективу.

Водночас Castanier та ін. (1999) детально описали реакції, що призводять до осадження карбонатів при збільшенні значення рН та карбонатної лужності. Dupraz та ін. (2009а, б) називають це "лужним двигуном" за рахунок накопичення HCO_3^- та CO_2 за рахунок зменшення розчиненого CO_2 . Але Warren та ін. (2001) вважають, що випадання карбонату кальцію може впливати на біогеохімічні цикли з потенційним впливом на концентрацію CO_2 в атмосфері з подальшим забрудненням водоносних горизонтів.

Необхідні параметри контролю МІОК при біоцементациї

Більшість опублікованих статей, зазначають у назвах досліджень саме покращення міцності «ґрунтів». Однак результати відображають застосування біоцементациї лише до піску або піщаного ґрунту, без перспектив застосування у залізобетонних та/або бетонних конструкціях. Аналіз піску, піщаного ґрунту та гранулометричний стабілізований ґрунт

продемонстрував, що очікуваний ефект МІОК був дуже різноманітний залежно від використовуваної матриці (розподілу розміру частинок).

Методика, щодо застосування методик, повинна гарантувати надійні результати щодо оцінки геотехнічних інженерних властивостей по відношенню до оброблюваних поверхонь як проникність, пористість, жорсткість, міцність на зсув, без обмежень міцність при навантаженнях, параметри надійної процедури цементації ґрунту та інших матеріалів (Machado et al., 2009).

Необхідні параметри контролю: проникність води (гідравлічна провідність)

Caruto (1999) у своїй роботі визначає проникність ґрунту як кількість води котра проходить в порах між частинками з різною швидкістю за певний проміжок часу. Оцінка швидкості проходження води є актуальною, оскільки вміст води в будь-якій ґрунтовій зоні пов'язаний зі взаємозв'язками між натягом ґрунту і тиском, що залежить від підвищеної кількості води, що проникає (Franca et al, 2009; Rufino et al, 2011).

Коефіцієнт проникності (кількість води, що проходить) доцільно використовувати зазвичай для пористих середовищ і досліджуваних зразків, котрий залежить від температури та пористості, оскільки висока температура знижує в'язкість води, збільшує перколяцію і відповідно збільшує швидкість проникнення у ґрунти (Caruto, 1999; Franca et al, 2009; Rufino et al, 2011). Доволі часто саме цей фактор зазвичай ігнорується у публікаціях щодо дослідження біоцементації, бо не вказується температура лабораторно або навколишнього середовища де відбувається дослідження, що може призвести до не вірного тлумачення результатів або взагалі бути не вірними.

Висновки

На основі проведення аналізу літературних джерел можна відзначити, що мікробноіндуковане осадження кальцію (МІОК) має значний потенціал з

точки зору будівельної біотехнології, адже біоцемент має ряд переваг та вирішує цілу низку екологічних проблем. Для досягнення даної мети зазвичай пропонується використовувати уреазопродукуючі мікроорганізми, а також ацидогенні, галофільні, лужнофільні та денітрифікуючі мікроорганізми.

Література

- Achal, V., Kawasaki, S. (2016) Biogrout: A novel binding material for soil improvement and concrete repair. *Front. Microbiol*, 7:314, DOI.org/10.3389/fmicb.2016.00314
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.C., Reddy, M.S. (2009) Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (3), pp. 433-438. DOI: 10.1007/s10295-008-0514-7
- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., Zhang, Q. (2015) Biomineralization for sustainable construction - A review of processes and applications. *Earth-Science Reviews*, 148, pp. 1-17. doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.05.008
- Achal, V., Pan, X. (2011) Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*. 62 (3), pp. 894-902. DOI: 10.1007/s00284-010-9801-4
- Al-Thawadi SM. (2013) Consolidation of sand particles by aggregates of calcite nanoparticles synthesized by ureolytic bacteria under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Science and Technology*, 2, pp. 141-146.
- Al Qabany A., Soga, K., Santamarina, C. (2012) Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 138 (8), pp. 992-1001.
- Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R., Bang, S.S. (2002) Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93, pp. 171-181. DOI: 10.1016/s0168-1656(01)00393-5.
- Baltazar L., Santana J., Lopes B., Rodrigues M.P., Correia J.R. (2014) Surface skin

protection of concrete with silicate-based impregnations: influence of the substrate roughness and moisture. *Construction and Building Materials*, 70, pp. 191–200.

Bang, S.S., Galinat, J.K., Ramakrishnan, V. (2001) Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, pp. 404-409. DOI: [10.1016/s0141-0229\(00\)00348-3](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00348-3)

Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., et al. (2010) Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, 27 (5), pp. 444-454. DOI.org/10.1080/01490450903485136

Bessler, K.E., Rodrigues, L.C. (2008) Os polimorfos de carbonato de calcio: uma síntese fácil de aragonita. *Química Nova*, 31 (1), pp. 178-180. DOI.org/10.1590/S0100-40422008000100032

Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq, M.Y., Suleiman, M.T., Zouari, N. (2018) Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *RSC Adv*, 8 (11), DOI.org/10.1039/C7RA12758H

Burbank MB, Weaver TJ, Williams BC, Crawford RL. (2012) Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29, pp. 389-395.

Burbank MB, Weaver TJ, Green TL, Williams BC, Crawford RL. (2011) Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soil. *Geomicrobiology Journal*, 28, pp. 301-312. DOI.org/10.1080/01490451.2010.499929

Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., Lepidi, A. (2003) Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal*, 20 (2), pp. 85-98. DOI.org/10.1080/01490450303883

Caputo, M. (1999) Diffusion of fluids in porous media with memory. *Geothermics*, 28 (1), pp. 113-130.

- Castanier S, Le Metayer-Levrel G, Perthuisot JP. (1999) Ca-carbonates precipitation and limestone genesis - the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126, pp. 9-23. DOI.org/10.1016/S0037-0738(99)00028-7
- Castro, M.J., Lopez, C.E., Narayanasamy, R., Marszalek, J.E., Luevanos Escareno, M.P., Fajardo, G.J., Balagurusamy, N. (2016) Potential of enzymes (urease & carbonic anhydrase). *Chimica Oggi – Chemistry Today*, 34 (4).
- Chapelle, F.H. (2000) Ground-water microbiology and geochemistry. *John Wiley and Sons*, 468 p.
- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R. (2012) In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation. *Ecological Engineering*, 42, pp. 64-72. DOI.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.013
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, 209 (2), pp. 798-811. DOI: 10.1111/nph.13697
- Czarnecki L., Woyciechowski P. (2013) Prediction of the reinforced concrete structure durability under the risk of carbonation and chloride aggression. *The Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 61, pp. 173–181.
- Dai J., Akira Y., Wittmann F.H., Yokota H., Zhang P. (2010) Water repellent surface impregnation for extension of service life of reinforced concrete structures in marine environments: the role of crack. *Cement and Concrete Composites*, 32, pp. 101–109.
- Daskalakis, M.I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I., et al. (2015) Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, pp.73-84. DOI.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.005.

- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Vojvodic-Vukovic, M. (2000) Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 (2), pp.189-196. DOI.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8
- DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C., Nelson, D.C. (2010) Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36 (2), pp. 197-210. DOI : 10.1016/j.ecoleng.2008.12.029
- DeJong, J.T., Soga, K., Banwart, S.A., Whalley, W.R., Ginn, T.R., Nelson, D.C., et al. (2011) Soil engineering in vivo: harnessing natural biogeochemical systems for sustainable, multi-functional engineering solutions. *Journal of The Royal Society Interface*, 8(54), pp. 1–15. DOI:10.1098/rsif.2010.0270
- DeJong, J.T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., Van Paassen, L.A., Al Qabany, A., et al. (2013) Biogeochemical processes and geotechnical applications: progress, opportunities and challenges. *Geotechnique*, 63 (4), pp.287-301.
- De Muynck, W., Cox, K., Verstraete, W., De Belie, N. (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, 22, pp. 875-885. DOI.org/10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011.
- De Muynck W., Leuridan S., Van Loo D., Verbeken K., Cnudde V., De Belie N., et al. (2011) Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 77, pp. 6808–6820.
- De Muynck W., Cox K., De Belie N., Verstraete W. (2008) Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment, *Construction and Building Materials*, 22, pp.875–885.
- De Muynck W., Debrouwer D., De Belie N., Verstraete W. (2008) Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, 38, pp. 1005–1014.
- De Muynck W., De Belie N., Verstraete W. (2010) Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological engineering*, 36, pp. 118–136.

Dhami, N.K., Sudhakara, R.M., Abhijit, M. (2013) Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, 4 (314), pp. 1-13. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00314.

Dhami, N.K., Reddy, M.S., Mukherjee, A. (2014) Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. *Frontiers in Microbiology*. DOI 10.3389/fmicb.2014.00304

Dhami, N.K., Mukherjee, A., Reddy, M.S. (2016) Applicability of bacterial biocementation in sustainable construction materials. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 11 (5), pp.795-802. DOI:10.1002/apj.2014

Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

Donnelly, F.C., Purcell-Milton, F., Framont, V., Cleary, O., Dunne, P.W., Gun'ko, Y.K. (2017) Synthesis of CaCO₃ nano-and micro-particles by dry ice carbonation. *Chemical Communications*, 53 (49), pp. 6657-6660. DOI:10.1039/C7CC01420A

Dosier, G.K. (2014) Methods for making construction material using enzyme producing bacteria. Patent US 8728365 B2.

Dupraz, S., Parmentier, M., Menez, B., Guyot, F. (2009a) Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers. *Chemical Geology*, 265 (1-2), pp. 44-53. DOI:10.1016/j.chemgeo.2009.05.003

Dupraz, S., Menez, B., Gouze, P., Leprovost, R., Benezeth, P., Pokrovsky, O.S., Guyot, F. (2009b) Experimental approach of CO₂ biomineralization in deep saline aquifers. *Chemical Geology*, 265 (1-2), pp. 54-62. DOI:10.1016/j.chemgeo.2008.12.012

Elmanama, A.A., Alhour, M.T. (2013) Isolation, characterization and application of calcite producing bacteria from urea rich soils. *International journal of advanced science and engineering*, 3, pp. 388-399.

Fernandez, M.S., Montt, B., Ortiz, L., Neira-Carrillo, A., Arias, J.L. (2018) Effect of carbonic anhydrase immobilized on eggshell membranes on calcium carbonate

- crystallization *in vitro*. In *Biom mineralization* pp. 31-37. Springer, Singapore.
- Ferrara L., Pattarini A. (2016) Siloxanes in concrete: from manual application of water-proofing treatments to mix-design addition for concrete hydrophobicity. *Proceedings CONSEC 2016*, in: 8th International Conference on Concrete under Severe Conditions - Environment & loading, M. Colombo and M. di Prisco (Eds.) Lecco, Italy, pp. 263-268
- Ferrara L., Van Mullem T., Alonso M.C., Antonaci P., Borg R.P., Cuenca E., Jefferson A., Ng P.L., Peled A., Roig-Flores M., Sanchez M., Serna P., Snoeck D., Tulliani J.M., De Belie N. (2018) Experimental characterization of the self-healing capacity of cement based materials and its effects on the material performance: a state of the art report by COST Action SARCOS WG2, *Construction and Building Materials*, 167, pp. 115–142.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. (2003) Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54 (1), p. 95-114. DOI:10.2113/0540095
- Fukue, M., Sato, Y., Yamashita, M., Yanai, M., & Fujimori, Y. (2003). Change in microstructure of soils due to natural mineralization. *Applied Clay Science*, 23(1-4), pp. 169–177. DOI:10.1016/s0169-1317(03)00100-5.
- Gadd GM, Pan X. (2016) Biom mineralization, bioremediation and biorecovery of toxic metals and radionuclides. *Geomicrobiology Journal*, 33, pp. 175-178.
- Gao, Y., Hang, L., He, J., Chu, J., 2019. Mechanical behavior of biocemented sands at various treatment levels and relative densities. *Acta Geotechnica*, 14 (3), pp. 697-707.
- Gat, D., Tsesarsky, M., Shamir, D., Ronen, Z. (2014) Accelerated microbial-induced CaCO₃ precipitation in a defined coculture of ureolytic and non-ureolytic bacteria. *Biogeosciences*, 11 (10). DOI:10.5194/BG-11-2561-2014
- Gurbuz A, Sari YD, Yuksekdogan ZN. (2015) Bacteria-induced cementation in sandy soils. *Geomicrobiology Journal*, 32, pp. 853-859.
- Han, J., Lian, B., Ling, H. (2013) Induction of calcium carbonate by *Bacillus cereus*. *Geomicrobiology Journal* 30, pp. 682-689.

DOI:10.1080/01490451.2012.758194.

Hammes, F., Verstraete, W. (2002) Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1 (1), pp. 3-7. DOI :10.1023/A:1015135629155

Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D. (2003) Strain-Specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), pp. 4901-4909. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003

He, J., Gao, Y., Gu, Z., Chu, J., Wang, L. (2020) Characterization of crude bacterial urease for CaCO₃ precipitation and cementation of silty sand. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32 (5). DOI:10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0003100

Hokkanen, H.M., Lynch, J.M. (2003) Biological control: benefits and risks, vol. 4. *Cambridge University Press*.

Huseien G.F., Mirza J., Ismail M., Ghoshal S.K., Hussein A.A. (2017) Geopolymer mortars as sustainable repair material: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80. pp. 54–74.

Ibrahim M., Al-Gahtani A.S., Maslehuddin M., Dakhil F.H. (1999) Use of surface treatment materials to improve concrete durability. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 11, pp. 36–40.

Ivanov, V. (2010) *Environmental Microbiology for Engineers*. CRC Press.

Ivanov, V., Chu, J. (2008) Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil *in situ*. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7 (2), pp. 139-153.

Ivanov V, Stabnikov V. (2017) Springer Science+Business Media 2017; *Construction Biotechnology (Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes)*. 317 p.

Ivanov V., Chu J., Stabnikov V. (2014) Iron- and calcium-based biogrouts for porous soils. *Construction Materials*, 167, pp. 36–41.

- Ivanov V., Chu J., Stabnikov V., He J., Naeimi M. (2010) Iron-based bio-grout for soil improvement and land reclamation. Second International Conference on Sustainable Construction Materials and Technologies, Ancona
- Ivanov V., Kuang S., Stabnikov V. (2009) The removal of phosphorus from reject water of municipal wastewater treatment plant using iron ore. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84, pp. 78–82.
- Jaji, A.Z., Zakaria, Z.A.B., Mahmud, R., Loqman, M.Y., Hezmee, M.N.M., Abba, Y., et al. (2017) Safety assessments of subcutaneous doses of aragonite calcium carbonate nanocrystals in rats. *Journal of Nanoparticle Research*, 19 (5)
- Jiang L., Xue X., Zhang W., Yang J., Zhang H., Li Y., Zhang R., Zhang Z., Xu L., Qu J., Song J., Qin J. (2015) The investigation of factors affecting the water impermeability of inorganic sodium silicate-based concrete sealers. *Construction and Building Materials*, 93, pp. 729–736.
- Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E. (2010) Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36, pp. 230-235.
- Keykha, H.A., Afshin, A., Bujang, B.K.H., Kawasaki, S. (2018) Microbial induced calcite precipitation by *Sporosarcina pasteurii* and *Sporosarcina aquimarina*. *Environmental Geotechnics*, DOI.org/10.1680/jenge.16.00009
- Kim HJ, Eom HJ, Park C, et al. (2016) Calcium carbonate precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* strains isolated from concrete and analysis of the bacterial community of concrete. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26(3), pp. 540-548. DOI.org/10.4014/jmb.1511.11008
- Kubiak K.J., Wilson M.C.T., Mathia T.G., Carval P., Wettability versus roughness of engineering surfaces. *Wear*, 271 (2011), pp.523–528.
- LaRosa Thompson J., Silsbee M.R., Gill M.R., Scheetz B.E. (1997) Characterization of silicate sealers on concrete. *Cement and Concrete Composites*, 27, pp. 1561–1567.
- Le Metayer-Levrel G., Castanier S., Oriol G., Loubiere J.F., Perthuisot J.P. (1999) Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of

limestones in buildings and historic patrimony. *Sedimentary Geology*, 126, pp. 25–34.

Li, M., Cheng, X., Guo, H. (2013) Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76, pp. 81-85.

Lowenstam, H.A., Weiner, S. (1989) On Biomineralization. *Oxford University Press on Demand*.

Li, M., Fang, C., Kawasaki, S., Huang, M., Achal, V. (2018) Bioconsolidation of cracks in masonry cement mortars by *Acinetobacter sp.* SC4 isolated from a karst cave. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 141, pp. 94-100. DOI.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.008.

Lukovic M., Ye G. (2015) Effect of moisture exchange on interface formation in the repair system studied by X-Ray Absorption, *Materials* (9), DOI.org/10.3390/ma9010002.

Maheswaran, S., Dasuru, S.S., Murthy, A.R.C., Bhuvaneshwari, B., Kumar, V.R., Palani, G.S., et al. (2014) Strength improvement studies using new type wild strain *Bacillus cereus* on cement mortar. *Current Science*, 106, pp. 50-57.

McConnaughey, T.A., Whelan, J.F. (1997) Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth-Science Reviews*, 42 (1-2), pp. 95-117.

Medeiros M.H.F., Helene P. (2009) Surface treatment of reinforced concrete in marine environment: Influence of chloride diffusion coefficient and capillary water absorption. *Construction and Building Materials*, 23, pp. 1476–1484.

Millo, C., Dupraz, S., Ader, M., Guyot, F., Thaler, C., Foy, E., Menez, B. (2012) Carbon isotope fractionation during calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 98, pp. 107-124.

Mitchell, J.K., Santamarina, J.C. (2005) Biological considerations in geotechnical engineering. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 131 (10), pp. 1222-1233.

Mortensen, B., DeJong, J. (2011) Strength and stiffness of MICP treated sand subjected to various stress paths. In: Han, J., Alzamora, D.A. (Eds.), ASCE Geo-

Frontiers, 211. *Geotechnical Special Publication*, pp. 4012-4020.

Morales, L., Romero, E., Jommi, C., Garzon, E., Gimenez, A. (2015) Feasibility of a soft biological improvement of natural soils used in compacted linear earth construction. *Acta Geotech*, 10 (1), pp. 157-171.

Mujah, D., Shahin, M.A., Cheng, L. (2017) State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Geomicrobiology Journal*, 34 (6), pp. 524-537.

Murugan, R., Loges, R., Taube, F., Sradnick, A., Joergensen, R.G. (2014) Changes in soil microbial biomass and residual indices as ecological indicators of land use change in temperate permanent grassland. *Microb. Ecol*, 67 (4), pp. 907-918.

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54 (4), pp. 655-670.

Narwaria R.S., Tiwari A. (2016) Development of cracks in concrete, preventive measures and treatment methods: a review. *Journal of Engineering and Technology*, 3, pp. 671–677

Onofrei M., Gary M.N., Keil L.D., Pusch R. (1989) Studies of cement grouts and grouting techniques for sealing a nuclear fuel waste disposal vault. *Materials Research Society*, 137, pp. 349–358.

Ozen, I., Sims, ek, S. (2015) Vital importance of moisture level in all stages of processing from calcium carbonate coating through polyethylene/calcium carbonate compounding to film generation. *Powder Technol*, 270, pp. 320-328.

Pacheco-Torgal F., Abdollahnejad Z., Miraldo S., Baklouti S., Ding Y. (2012) An overview on the potential of geopolymers for concrete infrastructure rehabilitation. *Construction and Building Materials*, 36, pp. 1053–1058.

Pan X., Shi C., Jia L., Zhang J., Wu L. (2015) Effect of inorganic surface treatment on air permeability of cement-based materials. *Journal of Materials in Civil Engineering*

Pan X., Shi Z., Shi C., Ling T.C., Li N. (2017) A review on surface treatment Part I: Types and mechanisms. *Construction and Building Materials*, 132, pp. 578–590.

- Parghi A., Alam M.S. (2016) Effects of curing regimes on the mechanical properties and durability of polymer-modified mortars – an experimental investigation. *Journal of Cement-Based Materials*, 5, pp. 324–347.
- Phillips, A.J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A.C., Cunningham, A.B., Spangler, L. (2013) Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review. *Biofouling*, 29 (6), pp. 715-733.
- Piekarska, K., Piorkowska, E., Bojda, J. (2017) The influence of matrix crystallinity, filler grain size and modification on properties of PLA/calcium carbonate composites. *Polym. Test*, 62, pp. 203-209.
- Reddy, S., Rao, M., Aparna, P., Sasikala, C. (2010) Performance of standard grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete. *Asian Journal of Civil Engineering (Building and Housing)*, 11, pp. 43-55. DOI.org/10.1007/s40030-017-0227-x.
- Rodriguez-Navarro C., Suzuki A., Ruiz-Agudo E. (2013) Alcohol dispersions of calcium hydroxide nanoparticles for stone conservation. *Langmuir*, 29, pp.11457–11470.
- Rodriguez-Navarro C., Rodriguez-Gallego M., Ben K., Gonzalez-Munoz M.T. (2003) Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 69, pp. 2182–2193.
- Ronholm, J., Schumann, D., Sapers, H.M., Izawa, M., Applin, D., Berg, B., et al. (2014) A mineralogical characterization of biogenic calcium carbonates precipitated by heterotrophic bacteria isolated from cryophilic polar regions. *Geobiology*, 12 (6), pp. 542-556.
- Rufino, R.D., Rodrigues, G.I.B., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A., Ferreira, S.R.M. (2011) Application of a yeast biosurfactant in the removal of heavy metals and hydrophobic contaminant in a soil used as slurry barrier. *Applied and Environmental Soil Science*
- Rusznyak, A., Akob, D.M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K.U., Neu, T.R., et al. (2012) Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently

discovered pristine karstic Herrenberg cave. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 78 (4), pp. 1157-1167.

Sarda, D., Choonia, H.S., Sarode, D.D., Lele, S.S. (2009) Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, pp. 1111-1115.

Sharma, A., Ramkrishnan, R. (2016) Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine-grained soils. *Perspectives on Science*, 8, pp. 198-202.

Somma K., Jaturapitakkul C., Kajitvichyanukul P., Chindaprasirt P. (2011) NaOH-Activated ground fly ash geopolymer cured at ambient temperature.

Sotoudehfar AR, Sadeghi MM, Mokhtari E, Shafiei F. (2016) Assessment of the parameters influencing microbial calcite precipitation in injection experiments using Taguchi methodology. *Geomicrobiology Journal*, 33, pp. 163-72.

Stabnikov, V., Chu, J., Ivanov, V. (2013) Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29, pp. 1453-1460. DOI.org/10.1007/s11274-013-1309-1.

Stabnikov V, Chu J, Naeimi M, Ivanov V. (2011) Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement. *Cement and Concrete Research*, 41. pp. 1143-1149. DOI.org/10.1016/j.cemconres.2011.06.017

Stabnikov V, Chu J, Myo AN, Ivanov V. (2013) Immobilization of sand dust and associated pollutants using bioaggregation. *Water Air Soil Pollut*, 224, pp. 1631-1700. DOI.org/10.1007/s11270-013-1631-0

Stabnikov V, Chu J, Ivanov V, Li Y. (2013) Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(8), pp. 1453-1460. DOI.org/10.1007/s11274-013-1309-1

Stepkowska, E.T., Perez-Rodríguez, J.L., Sayagues, M.J., Martínez-Blanes, J.M. (2003) Calcite, vaterite and aragonite forming on cement hydration from liquid and gaseous phase. *J. Therm. Anal. Calorim*, 73 (1), pp. 247-269.

- Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K., Bang, S.S. (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (11), pp. 1563-1571.
- Umar, M., Kassim, K.A., Chiet, K.T.P. (2016) Biological process of soil improvement in civil engineering: a review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 8 (5), pp. 767-774.
- Valencia, Y. (2009) Influencia da biomineralizacao nas propriedades fisico-mecanicas de um perfil de solo tropical afetado por processos erosivos. Doctoral dissertation, PhD Thesis. Universidad de Brasilia, Brasilia, Brasil.
- Valencia, Y., Camapum, J., Torres, F.A. (2014) Influence of biomineralization on the physico-mechanical profile of a tropical soil affected by erosive processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 74, pp. 98-99.
- Van Hees R.P.J., Lubelli B., Niiland T., Bernardi A. (2014) Compatibility and performance criteria for nano-lime consolidants, in: Proceeding of 9th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Ankara
- Van Paassen, L.A. (2009) Biogrout, Ground Improvement by Microbial Induced Carbonate Precipitation, Ph.D. thesis. Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- Van Paassen, L.A., Daza, C.M., Staal, M., Sorokin, D.Y., van der Zon, W., van Loosdrecht, M.C. (2010) Potential soil reinforcement by biological denitrification. *Ecological engineering*, 36 (2), pp. 168-175.
- Varalakshmi, A.D. (2014) Isolation and characterization of urease utilizing bacteria to produce biocement. *IOSR-JESTFT* 8, pp. 52-57.
- Wang J., Cagatay Y., Boon N., De Belie N. (2016) Application of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, pp.2993–3007.
- Wang, Y., Wang, H., Cheng, H., Chang, F., Wan, Y., She, X. (2020) Niche differentiation in the rhizosphere and endosphere fungal microbiome of wild *Paris polyphylla* Sm. *PeerJ*, 8.

- Warren, L.A., Maurice, P.A., Parmar, N., Ferris, F.G. (2001) Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18 (1), pp. 93-115.
- Wei, S., Cui, H., Jiang, Z., Liu, H., He, H., Fang, N. (2015) Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Braz. J. Microbiol*, 46 (2), pp. 455-464.
- Whiffin, V.S. (2004) Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. Doctoral dissertation. Murdoch University.
- Whiffin, V.S., Van Paassen, L.A., Harkes, M.P. (2007) Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24 (5), pp. 417-423.
- Wojciechowski L., Kubiak K.J., Mathia T.G. (2016) Roughness and wettability of surfaces in boundary lubricated scuffing wear. *Tribology International*, 93 pp. 593–601.
- Wright, D.T., Oren, A. (2005) Nonphotosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporites through time. *Geomicrobiology Journal*, 22 (1-2), pp. 27-53.
- Wu, J.R., Han, S.F., Zhu, Y.Y., Lu, M., Wang, G.P., Guo, W.L. (2006) Study on taxonomy of endophytic fungi isolated from orchid mycorrhizae in Yunnan province. *J. Southw. For. Coll*, 26 (3), pp. 5-10.
- Xue X., Li Y., Yang Z., He Z., Dai J.G., Xu L., Zhang W. (2017) A systematic investigation of the waterproofing performance and chloride resistance of self-developed waterborne silane-based hydrophobic agent for mortar and concrete. *Construction and Building Materials*, 155, pp. 939–946.
- Yang, X., Xu, G., Chen, Y., Wang, F., Mao, H., Sui, W., et al. (2009) CaCO₃ crystallization control by poly (ethylene oxide) poly (propylene oxide) poly (ethylene oxide) triblock copolymer and O - (hydroxy isopropyl) chitosan. *J. Cryst. Growth*, 311 (21), pp. 4558-4569.

Zhang, Q., Ren, L., Sheng, Y., Ji, Y., Fu, J. (2010) Control of morphologies and polymorphs of CaCO₃ via multi-additives system. *Materials Chemistry and Physics*, 122 (1), pp. 156-163.

Zhu, T., Dittrich, M. (2016) Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4, 4.