

## PRE-TREATMENT OF UREASE-PRODUCING BACTERIAL CELLS BY CALCIUM IONS FOR INTENSIFICATION OF BIOCEMENTATION

V. Stabnikov

National University of Food Technologies

Key words:	ABSTRACT
Urease-producing bacteria Biocementation Pre-treatment of cells	Biotechnology of biocement production for its application in geotechnical and construction engineering is developing as an alternative to conventional cement. Biocementation of sand was due to activity of urease-producing bacteria, producing calcite crystals under presence of calcium ions and urea. Pre-treatment of these bacterial cells by calcium ions increased the rate of sand biocementation and diminished its seepage by 2,9 times.
<b>Article history:</b> Received 08.12.2012 Received in revised form 15.12.2012 Accepted 21.12.2012	
<b>Corresponding author:</b>  E-mail: npnuht@ukr.net	

## ПРЕДОБРОБКА КЛІТИН УРЕАЗА-ПРОДУКУЮЧИХ БАКТЕРІЙ КАТІОНАМИ КАЛЬЦІЮ ДЛЯ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ ПІСКУ

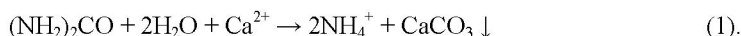
В.П. Стабніков

Національний університет харчових технологій

*Біотехнологія виробництва біоцементу для використання в будівництві та геотехніці розробляється як альтернатива традиційному цементу. Основою біоцементу є активність уреазо-продукуючих бактерій, які в присутності сечовини та іонів кальцію утворюють кристали кальциту, що зв'язують частинки ґрунту. В статті показано, що попередня обробка клітин цих бактерій іонами кальцію підвищує швидкість процесу біоцементування піску і зменшує коефіцієнт фільтрації в 2,9 разів.*

**Ключові слова:** уреазо-продукуючі бактерії, біоцементування, предобробка клітин

Біотехнологія виробництва біоцементу для використання в будівництві та геотехніці розробляється в останні 20 років в наукових лабораторіях різних країн як альтернатива традиційному цементу [1 – 3]. Основою для біоцементування є активність уреазо-продукуючих бактерій, які в присутності сечовини та іонів кальцію утворюють кристали кальциту згідно рівнянню:

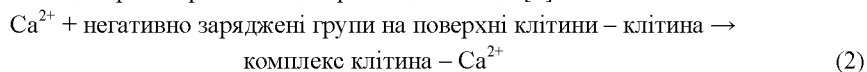


Активність уреазо-продукуючих бактерій викликає підвищення рН оточуючого середовища, що сприяє утворенню нерозчинного карбонату кальцію.

Показано, що уреазо-продукуючі бактерії або фермент уреазу можуть бути застосовані для зв'язування частинок ґрунту завдяки утворенню кальциту. Біоцементування може бути також використано для укріплення уклонів, запобігання ґрунтової ерозії, будівництва доріг, підвищення стійкості будівельних матеріалів, лікування тріщин у бетоні [1 – 3].

## МІКРОБІОЛОГІЯ

Відомо, що бактеріальні клітини мають негативний заряд, а хімічні групи, що обумовлюють його, можуть легко зв'язуватися з катіонами  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  або  $\text{Fe}^{3+}$  [4], роблячи клітини центрами кристалізації при біоцементации [5]:



У присутності карбонату на поверхні клітини починається кристалізація кальциту:



Вірогідно, що завдяки адсорбції бактеріальних клітин на поверхні частинок піску, на них також утворюються кристали кальциту, які зв'язують частинки піску.

Метою даної роботи було вивчення можливості підвищення ефективності біоцементации піску за рахунок попередньої обробки клітин уреазо-продукуючих бактерій розчином іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

Культуральну рідину (КР), тобто суспензію клітин алкалофільного штаму уреазо-продукуючих бактерій *Bacillus* sp. VS1 [6] з концентрацією 8,8 г сухої біомаси/л використовували як джерело уреазу. Бактерії вирощували в аеробних умовах до початку стаціонарної фази росту як описано раніше [7].

Для попередньої обробки бактеріальних клітин, 100 мл КР змішувалося з 10 мл розчину  $\text{CaCl}_2$ , 100 г/л. рН суміші доводили 1 N HCl до 7,0 і суспензію витримували 30 хв. Бактеріальні клітини видаляли центрифугуванням при 5000 g протягом 15 хв і ресуспендували в 110 мл 0,85 % розчину NaCl. Таж сама процедура з додаванням 10 мл води замість розчину  $\text{CaCl}_2$  була в контролі. Розмір клітин або їх агрегатів до і після обробки іонами кальцію вимірювали на Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, UK). Фотографія клітин та їх агрегатів була зроблена за допомогою електронного скануючого мікроскопа Zeiss EV050, UK.

Біоцементацию проводили з використанням двох компонентів: (а) розчин кальцію-сечовини, що містив 41 г/л  $\text{CaCl}_2$  та 45 г/л сечовини, рН доводили 1 N HCl до 7,0; (б) бактеріальна суспензія, 8,8 г/л.

Вміст кальцію у піску після біоцементации визначали після екстракції кальцію 1 N розчином HCl стандартним методом з титруванням етилендіамінтетраацетатом [8].

Вимірювання коефіцієнта фільтрації проводили визначенням часу, яке було потрібно для витікання 20 мл води через зразок піску після біоцементации.

Ефективність акумуляції кальцію в піску визначали по різниці між концентрацією кальцію в розчині кальцій-сечовина та концентрацією кальцію в ефлюенті.

Пісок з діаметром часток менш ніж 1,18 мм, 40 мл, було насипано у три пластмасові колонки. 20 мл культуральної рідини, що була оброблена  $\text{CaCl}_2$ , було додано до колонки 1 до покриття поверхні піску; 20 мл КР без обробки  $\text{CaCl}_2$ , було додано до колонки 2 до покриття поверхні піску. Зразки піску з КР було залишено на 24 години. Після цього рідина була видалена самошливом і пісок в колонках 1 та 2 було оброблено розчином кальцій хлорид-сечовина, 20 мл, протягом 2 годин (розчин кальцій хлорид-сечовина рециркулювали 2 рази). Пісок у колонці 3 оброблювали лише розчином кальцій хлорид-сечовина без додавання уреазо-продукуючих бактерій. Обробку піску розчинами кальцій хлорид-сечовина повторювали 3 рази.

Даний експеримент було поставлено, щоб глибше вивчити механізм біоцементации. Для підвищення адсорбції клітин до частинок піску, бактеріальна суспензія була оброблена розчином катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  для зміни дзета-потенціалу клітинної поверхні з негативного ( $\text{RCOO}^-$ ) на позитивний ( $\text{RCOOCa}^+$ ). Оскільки поверхня піску має негативний заряд, *a priori* він буде краще зв'язуватися з позитивно зарядженими клітинами після обробки бактеріальних клітин іонами кальцію, але це треба було перевірити в експерименті.

Загальна ефективність преципітації кальцію в піску в експериментальних зразках була в межах від 96,6 % до 98,5 % від внесеного кальцію. Вона майже зовсім не залежала від попередньої обробки біомаси розчином кальцію (табл. 1).

Таблиця 1. Характеристика зразків піску у колонках

Параметр	Колонка		
	клітини оброблені CaCl <sub>2</sub>	необроблені клітини	без клітин
pH	8,9	9,1	7,2
Концентрація Ca <sup>2+</sup> в ефлюенте, г/л	0,7	0,4	26,2
Ефективність преципітації кальцію в піску, % від внесеного	97,3	98,5	0
Коефіцієнт фільтрації, м/с	2,0·10 <sup>-3</sup>	5,8·10 <sup>-3</sup>	1,1·10 <sup>-4</sup>

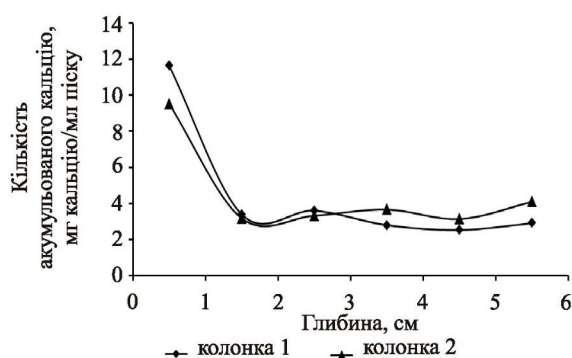


Рис. 1. Розподілення акумульованого кальцію в піску по глибині

кальцію, зменшувала коефіцієнт фільтрації в 2,9 разів (табл. 1). Зменшення коефіцієнта фільтрації пропорційно заповненню пор і каналів у піску, тобто швидкості біоцементатії. Можливою причиною збільшення швидкості біоцементатії у випадку проведення біоцементатії піску з клітинами уреаз-продукуючих бактерій, що було попередньо оброблено іонами кальцію, є збільшення центрів кристалізації кальциту

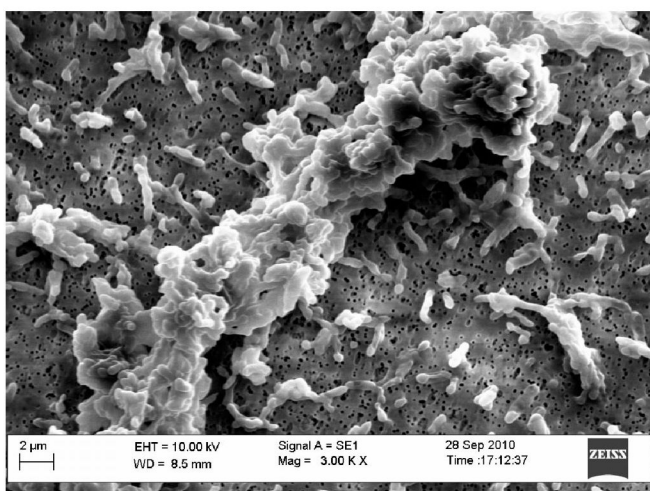


Рис. 3. Поодинокі та агреговані клітини *Bacillus sp. VS1*

завдяки більш ефективній адсорбції клітин на піску. Іншою можливою причиною є створення клітинних агрегатів при обробці бактеріальної суспензії іонами кальцію, які утворюють більший градієнт рН і карбонату в точці адсорбції на поверхні піску ніж поодинокі клітини. Середній розмір часток (клітин) без обробки іонами кальцію був 1 мкм, в той час як після обробки іонами кальцію розмір часток (клітинних агрегатів) був 10 мкм (середнє значення) при найбільшому значенні 400 мкм.

Характер розподілення кальцію залишався незмінним для експериментальних зразків піску. Зміна кількості акумульованого кальцію по глибині обробленого піску показана на рис. 1.

Кінцеве рН в ефлюенті практично не відрізнялося для експериментальних колонок, незалежно від використання попередньої обробки клітин розчином кальцію і була в межах від 8,6 до 9,1 (табл. 1).

Коефіцієнт фільтрації було виміряний після третьої обробки піску. Попередня обробка культуральної рідини розчином

кальцію, зменшувала коефіцієнт фільтрації в 2,9 разів (табл. 1). Зменшення коефіцієнта фільтрації пропорційно заповненню пор і каналів у піску, тобто швидкості біоцементатії. Можливою причиною збільшення швидкості біоцементатії у випадку проведення біоцементатії піску з клітинами уреаз-продукуючих бактерій, що було попередньо оброблено іонами кальцію, є збільшення центрів кристалізації кальциту

**Висновок**

Попередня обробка культуральної рідини розчином кальцію не впливала на ефективність акумуляції карбонату кальцію у піску, але збільшувала швидкість біоцементації і зменшувала коефіцієнт фільтрації біоцементованого піску в 2,9 разів. Тому ця обробка рекомендується для збільшення швидкості біоцементації ґрунту.

**Література**

1. *Ivanov V., Chu J.* Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ // *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. — 2008. — v. 7, № 2. — P. 139 – 153.
2. *DeJong J.T., Mortensen B.M., Martinez B.C., Nelson D.C.* Bio-mediated soil improvement // *Ecological Engineering*. — 2010. — v.36, № 2. — P. 97 – 210.
3. *De Muynck W., De Belie N., Verstraete W.* Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering* // 2010. — v. 36, № 2. — P. 118 – 136.
4. *Schultze-Lam S., Fortin D., Davis B. S., Beveridge T.J.* Mineralization of bacterial surfaces // *Chemical Geology*. — 1996. — v. 132, № 1 – 4. — P. 171 – 181.
5. *Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S.* Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub> // *Soil Biology and Biochemistry*. — 1999. — v. 31, № 11. — P. 1563 – 1571.
6. *Chu J., Stabnikov V., Ivanov V.* Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil // *Geomicrobiology Journal*. — 20126. — v 29. — P. 544 – 549.
7. *Stabnikov V., Chu J., Naeimi M., Ivanov V.* Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement // *Cement and Concrete Research*. — 2011. — v. 41, № 11. — 1143 – 1149.
8. *American Public Health Association.* Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. — 1998. — 20<sup>th</sup> edn, American Public Health Association. — Washington DC, USA.

**ПРЕДОБРАБОТКА КЛЕТОК УРЕАЗА-ПРОДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ КАТИОНАМИ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ БИОЦЕМЕНТИРОВАНИЯ ПЕСКА**

**В.П. Стабников**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Биотехнология производства биоцемента для использования в строительстве и геотехнике разрабатывается как альтернатива традиционному цементу. Основой биоцементирования является активность уреазы-продуцирующих бактерий, которые в присутствии мочевины и ионов кальция образуют кристаллы кальцита, связывающих частицы грунта. В статье показано, что предварительная обработка клеток этих бактерий ионами кальция повышает скорость процесса биоцементирования песка и уменьшает коэффициент фильтрации в 2,9 раза.*

**Ключевые слова:** уреазы-продуцирующие бактерии, биоцементация, предобработка клеток