

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

УДИМОВИЧ ВІКТОР МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 606:631.461:[608.32:502/504

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ТА ЗАСТОСУВАННЯ
БІОЦЕМЕНТУ ДЛЯ ОХОРОНИ ДОВКІЛЛЯ

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Галузь знань 16 – Хімічна та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Удимович В.М.

Науковий керівник: Стабніков Віктор Петрович
доктор технічних наук, доцент

КИЇВ - 2022

АНОТАЦІЯ

Удимович В.М. «Розробка технології виробництва та застосування біоцементу для охорони довкілля» – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття освітньо-наукового ступеня доктор філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія». – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2022.

Новий напрям біотехнології - використання мікроорганізмів для потреб будівництва успішно розвивається у світі протягом останніх 15 років. Особливе місце серед нових будівельних матеріалів, посідає виробництво біоцементу та біозакріплювачів ґрунтів заснованого на використанні уреаза-продукуючих бактерій, які у присутності сечовини та іонів кальцію у лужному середовищі утворюють нерозчинні кристали кальциту. Перевага біоцементу перед традиційним цементом є низька в'язкість (в 30 – 300 разів менше в'язкості суспензії цементу), що забезпечує його здатність до глибокого проникнення в пори і тріщини ґрунту, бетону чи каменю (Ivanov та Stabnikov, 2017).

Використання біоцементу пропонується для широкого кола будівельних робіт і може бути новим, економічно ефективним рішенням в інженерії охорони довкілля та будівництва, особливо в галузі геотехнічної інженерії.

Недоліками біоцементатації є використання живих уреаза-продукуючих бактерій, які вносяться у довкілля (а в деяких біотехнологіях пропонують використовувати бактерії, що відносяться до умовно-патогенних), та вивільнення у атмосферу токсичного аміаку та можливе потрапляння іонів амонію у ґрунтові та поверхневі води.

Дисертаційна робота присвячена розробці способів підвищення екологічності процесу біоцементатації за рахунок використання нових біобезпечних джерел уреази, а також пошуку альтернативних способів проведення біоцементатації зі зниженим виділенням аміаку та амонію.

Показано, що одним із можливих шляхів підвищення біобезпеки біоцементациї може бути застосування кислої уреазы при використанні в якості джерела кальцію кісткового борошна, яке містить кальцій у формі гідроксиапатиту. Проведена селекція бактеріального штаму, що синтезував кислоту уреазы серед бактерій, що були виділені з кислого ґрунту. Штам з найбільшою уреазною активністю було ідентифіковано за допомогою ампліфікації та секвенування гену 16 рРНК як *Staphylococcus saprophyticus* AU1. Максимальна швидкість росту штаму AU1 становила 0,15 год.⁻¹, максимальне накопичення біомаси – 6,9 г/л сухої біомаси, а максимальна уреазна активність була 8,1 мМ прогідролізованої сечовини/хв. Найвища уреазна активність у штаму *Staphylococcus saprophyticus* AU1 спостерігалася в інтервалі рН від 4,5 до 5,5, поступово знижуючись при підвищенні рН. З метою забезпечення біобезпеки довкілля для біоцементациї запропоновано використання уреазоактивних інактивованих бактеріальних клітин після їх обробки 0,5% розчином натрію додецилсульфату протягом 120 хвилин. При проведенні біоцементациї, де в якості джерела кальцію використовували кісткове борошно, яке містить кальцій у формі гідроксиапатиту при зниженій кількості сечовини за допомогою інактивованих бактеріальних клітин водопроникність біоцементованого піску була $2 \cdot 10^{-5}$ м/с, що дозволяє застосувати біоцементацию такого типу для укріплення ґрунту з метою зниження його ерозії, наприклад після землетрусу, або для боротьби з пиловою ерозією для зниження атмосферного забруднення. Основною перевагою цього методу – це можливість знизити на 75% витрати сечовини та знизити за рахунок цього викиди амонію та аміаку у довкілля. Крім того вирішується проблема утилізації кісткових відходів і зменшується вартість матеріалів на біоцементацию.

Повністю біобезпечними продуцентами кислої уреазы можуть бути молочнокислі бактерії. Показана здатність молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* до синтезу кислої уреазы, що

робить їх перспективними мікробними агентами у процесах біоцементації. Вирощування *Lactobacillus reuteri* проводили на капустяному бульйоні. Максимальна уреазна активність бактерій *Lactobacillus reuteri* спостерігалася при рН 5,0. При проведенні біоцементації із застосуванням молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* пісок після 8 біообробок мав водопроникність $6 \cdot 10^{-5}$ м/с. Тому цей спосіб біоцементації можливо застосувати лише для укріплення ґрунту або для боротьби з пиловою ерозією.

Можливою заміною бактеріальної уреазы може бути уреаз рослинного походження. Скринінг насіння сільськогосподарських культур, які вирощуються в Україні, показав, що боби сої можливо використовувати як джерело уреазы для біоцементації у вигляді неочищеного водного екстракту із подрібненої маси самого насіння або пророщеного протягом 24 – 48 годин. Застосування неочищеного екстракту із насіння сої показало його ефективність для осадження карбонату кальцію із суміші розчинів кальцій хлориду та сечовини, а його використання при біоцементації піску дозволило знизити його водопроникність у 6000 разів і отримати значення, які відповідають водопроникності піску, біоцементованого за допомогою традиційно застосовуваних уреазы-продукуючих бактерій.

Ключові слова: біоцементація, біотехнологія, біобезпека, бактерії, агропромислові відходи, біосинтез, метаболіти, природоохоронна технологія, рослинна уреазы, охорона довкілля, біозакупорювання ґрунту, фізичні, хімічні і біологічні методи, чисті культури, біологічно активні речовини, рідкі живильні середовища, рН, джерела вуглецевого та азотного живлення, *Lactobacillus*, молочнокислі бактерії, ферменти, продуцент, мікроорганізми, мікробний синтез, *Bacillus*, пробіотичні мікроорганізми, поживне середовище, середовище росту, скринінг, *Streptococcus thermophilus*.

СПИСОК ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

Удимович, В.М. (2021). Молочнокислі бактерії як продуценти уреаз. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(3), 25-31. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-3-5>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України №975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus*, *Google Scholar*.

Удимович, В.М. (2021). Застосування біоцementeації в контексті вирішення екологічних питань. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(4), 63-82. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-4-8>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України №975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus*, *Google Scholar*.

Удимович, В.М. (2021). Загальна характеристика біоцementeації та параметри контролю. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(6), 30-42. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-6-5>

«Наукові праці Національного університету харчових технологій» включено у перелік наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України №975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus*, *Google Scholar*.

Тези доповідей у матеріалах конференцій

Удимович, В. & Стабніков, В. (2022). Необхідність контролю проведення біоцementeації для гарантованої біобезпеки довкілля. 88 *Міжнародна наукова*

конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (с. 325).

Удимович, В. & Стабніков, В. (2021). Мікробне осадження карбонат кальцію у природоохоронних біотехнологіях. 87 *Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (с. 423).*

Удимович, В. (2020). Використання молочнокислих бактерій з метою біоцементатації у природоохоронних технологіях. 86 *Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (с. 407).*

Удимович, В. (2019). Застосування біоцементатації, як різновиду біотехнології, у природоохоронних технологіях. 85 *Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (с. 516).*

Удимович, В. & Стабніков, В. (2020). Молочнокислі бактерії як продуценти кислої уреазы. *Матеріали IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (с. 37-38).*

SUMMARY

Udymovych V.M. "Development of technology for the production and application of biomement biosafe for the environment" - a qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

The dissertation for the educational and scientific degree of Doctor of Philosophy, specialty 162 Biotechnology and bioengineering. - National University of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2022.

A new area of biotechnology - the use of microorganisms for the needs of construction has been successfully developing in the world over the past 15 years. The production of biomement occupies a special place among new building materials by and soil enhancers based on the use of urease-producing bacteria, which, in the presence of urea and calcium ions in an alkaline medium, form insoluble calcite crystals. The advantage of biomement over traditional cement is its low viscosity (30–300 times less than the viscosity of a cement suspension), which ensures its ability to penetrate deeply into the pores and cracks of soil, concrete or stone (Ivanov and Stabnikov, 2017). The use of biomement is proposed for a wide range of civil engineering applications and may be a new cost-effective solution in environmental and construction engineering, especially in the field of geotechnical engineering.

The disadvantages of biocementation are the use of live urease-producing bacteria that are introduced into the environment (and some biotechnologies suggest using opportunistic bacteria), the release of toxic ammonia into the atmosphere and the possible release of ammonium ions into the ground and surface waters.

It has been shown that one of the possible ways to increase the biosafety of biocementation can be the application of acid urease when bone meal containing calcium in the form of hydroxyapatite is used as a source of calcium. A selection of a bacterial strain that synthesized acid urease was carried out among bacteria isolated from acidic soil.

The strain with the highest urease activity was identified by amplification and 16 rRNA gene sequencing as *Staphylococcus saprophyticus* AU1. The maximum growth rate of the AU1 strain was 0.15 h^{-1} , the maximum biomass accumulation was 6.9 g/L dry biomass, and the maximum urease activity was $8.1\text{ mM hydrolysed urea/min}$.

The highest urease activity in the *Staphylococcus saprophyticus* AU1 strain was observed in the pH range from 4.5 to 5.5, gradually decreasing with pH increasing. To ensure the biosafety of the environment, it was proposed to use for biocementation inactivated urease-active bacterial cells after their treatment with a 0.5% solution of sodium dodecyl sulfate for 120 minutes. When carrying out biocementation, where bone meal containing calcium in the form of hydroxyapatite was used as a source of calcium with a reduced amount of urea using inactivated bacterial cells, the water permeability of biocemented sand was $2 \times 10^{-5}\text{ m/s}$, which makes it possible to apply this type of biocementation to strengthen the soil . in order to reduce its liquefaction, for example after an earthquake or to control dust erosion to reduce atmospheric pollution. The main advantage of this method is the ability to reduce the consumption of urea by 75% and thereby reduce the release of ammonium and ammonia into the environment. In addition, the problem of bone waste disposal is solved and the cost of materials for biocementation is reduced.

Lactic acid bacteria can be completely biosafe producers of acid urease. The ability of lactic acid bacteria *Lactobacillus reuteri* and *Streptococcus thermophilus* to synthesize urease has been shown, which makes them promising microbial agents in biocementation processes. *Lactobacillus reuteri* was cultivated on cabbage broth. The maximum urease activity of *Lactobacillus reuteri* bacteria was observed at pH 5.0. When carrying out biocementation using *Lactobacillus reuteri*, sand after 8 biotreatments with lactic acid bacteria had a water permeability of $6 \times 10^{-5}\text{ m/s}$. Therefore, this method of biocementation can only be used to strengthen the soil or to prevent dust erosion.

It is possible to replace bacterial urease with plant-derived urease. Screening of seeds of agricultural crops grown in Ukraine showed that soybeans can be used as a

source of urease for biocementation in the form of a crude aqueous extract from the crushed mass of seeds or germinated within 24-48 hours. The use of a crude extract from soybean seeds showed its effectiveness for the precipitation of calcium carbonate from a mixture of solutions of calcium chloride and urea, and its use in the biocementation of sand made it possible to reduce its water permeability by 6000 times and obtain values corresponding to the seepage rates of sand biocemented with traditionally used urease-producing bacteria.

Key words: biocementation; biotechnology; biosafety; bacteria; agro-industrial waste; biosynthesis; metabolites; environmental technology; plant urease; environmental protection; soil biogrouting; physical, chemical and biological methods; pure cultures; biologically active substances; liquid culture media; pH; sources of carbon and nitrogen nutrition; *Lactobacillus*; lactic acid bacteria; enzymes; producer; microorganisms; microbial synthesis; *Bacillus*; probiotic microorganisms; nutrient medium; growth medium; screening; *Streptococcus thermophilus*

ЗМІСТ

ВСТУП	14
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД. БІОТЕХНОЛОГІЧНА ОСНОВА ОТРИМАННЯ БІОЦЕМЕНТУ	21
1.1. БіоцEMENT та шляхи підвищення біобезпеки біоцEMENTації	21
1.2. Характеристика процесу біоцEMENTації	31
1.3. Уреаза-продукуючі бактерії, що застосовуються для біоцEMENTації на теперішній час	35
1.4. Альтернативні шляхи біоцEMENTації	42
1.5. Підвищення біобезпеки біоцEMENTації за рахунок використання альтернативних джерел уреазы	44
1.5.1. Мікробні продуценти кислої уреазы	44
1.5.2. Молочнокислі бактерії як продуценти уреазы активної в кислому середовищі	46
1.5.3. Рослинна уреаза і її отримання	49
1.6. Висновки до розділу 1	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	52
2.1. Мікробні та рослинні джерела уреаз для біоцEMENTації	52
2.1.1. Уреаза-продукуючий штам бактерій і його вирощування	52
2.1.2. Селекція штаму бактерій, що синтезує кислотостійку уреазу	53
2.1.3. Характеристика чистої культури кислотостійкої уреазы- продукуючої бактерії та її ідентифікація	54
2.1.4. Визначення концентрації бактеріальних клітин висівом на тверді поживні середовища.....	55
2.2. Молочнокислі бактерії як продуценти уреазы	56
2.2.1. Молочнокислі закваски, що використовували як джерело уреазы	56
2.2.2. Культивування молочнокислих бактерій	57
2.3. Насіння рослин як джерело уреазы	58
2.3.1. Вибір насіння як потенційно можливе джерело уреазы	58

2.3.2. Насіння сої як джерело рослинної уреазы	58
2.4. Методи хімічного аналізу	59
2.4.1. Визначення рН	59
2.4.2. Визначення уреазної активності	59
2.4.3. Визначення фізіологічних характеристик продуцента кислоти уреазы	60
2.4.4. Визначення кількості осажденного кальцію та концентрації кальцію у розчинах	61
2.5 Фізичні методи дослідження	61
2.5.1. Вимірювання концентрації мікробної біомаси	61
2.5.2. Мікроскопія	61
2.5.3. Аналіз розподілення частинок піску та кісткового борошна за розмірами	62
2.6. Матеріали для біоцементации	62
2.7. Методи перевірки якості біоцементованих зразків	63
2.7.1 Визначення гідравлічної проникності	63
2.8. Постановка експериментів	64
2.8.1. Визначення уреазної активності у мікроорганізмів молочнокислих заквасок	64
2.8.2. Визначення уреазної активності екстрактів із пророщеного насіння	64
2.8.3. Використання рослинної уреазы для осаждения кальцію із розчинів	64
2.8.4. Біоцементация піску із застосуванням інактивованих клітин <i>Staphylococcus saprophyticus</i> AU1 з уреазною активністю	65
2.8.5. Біоцементация піску із застосуванням молочнокислих бактерій з уреазною активністю	66
2.8.6. Біоцементация піску із застосуванням рослинних екстрактів з уреазною активністю	67

2.9. Математичні методи обробки експериментальних даних	67
РОЗДІЛ 3. ПОШУК МІКРОБНОГО ДЖЕРЕЛА КИСЛОЇ УРЕАЗИ	
ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЙОГО ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ	68
3.1. Виділення та ідентифікація штаму - продуцента кислотостійкої уреази	68
3.2. Характеристика виділеного штаму уреазо-продукуючих бактерій <i>Staphylococcus saprophyticus</i> AU1	72
3.3. Зміна уреазної активності клітин <i>Staphylococcus saprophyticus</i> AU1 залежно від рН середовища	75
3.4. Зміна уреазної активності при інактивації клітин <i>Staphylococcus saprophyticus</i> AU1	76
3.5. Приготування розчину кісткового борошна	79
3.6. Біоцементация піску із застосуванням гідролізату кісткового борошна як джерела кальцію	81
3.7. Висновки до розділу 3	85
РОЗДІЛ 4. МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ – БІОБЕЗПЕЧНІ	
ПРОДУЦЕНТИ КИСЛОТОСТІЙКОЇ УРЕАЗИ ТА ЇХ	
ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ	87
4.1. Вибір молочнокислих бактерій – продуцентів кислоти уреазы	87
4.2. Вибір середовища для культивування молочнокислих бактерій для синтезу кислоти уреазы	90
4.3. Залежність активності уреазы, що синтезується <i>Lactobacillus reuteri</i> , від рН середовища	92
4.4. Показники росту та уреазної активності <i>Lactobacillus reuteri</i> та <i>Streptococcus thermophilus</i> при культивуванні на капустяному бульйоні ..	93
4.5. Біоцементация піску з використанням кісткового борошна як джерела кальцію та біомаси продуцента кислоти уреазы <i>Lactobacillus reuteri</i>	94
4.6. Висновки до розділу 4	95

РОЗДІЛ 5. НАСІННЯ РОСЛИН - БІОБЕЗПЕЧНІ ДЖЕРЕЛА	
УРЕАЗИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ	96
5.1. Вибір рослини, насіння якої можуть бути застосовані в Україні	
як безпечні джерела уреаз для біоцементациі	96
5.2. Вибір форми, в якій доцільно використовувати уреазу насіння	
для біоцементациі	97
5.3. Перевірка можливості застосування неочищених екстрактів із	
насіння сої як джерела уреаз для осадження карбонату кальцію	101
5.4. Біоцементация піску з використанням уреаз рослинного	
походження	103
5.5. Висновки до розділу 5	107
ВИСНОВКИ	108
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	110
ДОДАТКИ	133
ДОДАТОК А. Акт апробації результатів у навчальний процес	133
ДОДАТОК Б. Список публікацій за темою дисертації	135

ВСТУП

Актуальність роботи. Новий напрям біотехнології - використання мікроорганізмів для потреб будівництва успішно розвивається у світі протягом останніх 15 років. Це виробництво будівельного біопластику, головним чином полігідроксикарбоксидів, та домішок до цементу, таких як мікробні полісахариди ксантан, сукциноглюкан, курдлан та хітозан, які змінюють в'язкість, водоутримання, деформацію та плинність бетону (Ivanov та Stabnikov, 2017). Особливе місце серед нових будівельних матеріалів, посідає виробництво біоцементу та біозакріплювачів ґрунтів заснованого на використанні уреазо-продукуючих бактерій, які у присутності сечовини та іонів кальцію у лужному середовищі утворюють нерозчинні кристали кальциту. Перевага біоцементу перед традиційним цементом є низька в'язкість (в 30 – 300 разів менше в'язкості суспензії цементу), що забезпечує його здатність до глибокого проникнення у пори і тріщини ґрунту, бетону чи каменю (Ivanov та Stabnikov, 2017; Rosquoet та ін., 2002). Крім того в суспензії біоцементу, який є сумішшю солей та клітин бактерій, присутні частинки зі значно меншим розміром, 1 мкм, порівняно з традиційним цементом з частками розміром від 5 до 45 мкм, що теж сприяє легшому та глибшому проникненню біоцементу в оброблюваний матеріал.

Використання біоцементу пропонується для широкого кола будівельних робіт, і може бути новим, економічно ефективним рішенням в інженерії охорони довкілля та будівництва, особливо в галузі геотехнічної інженерії, а саме для укріплення ґрунту, запобігання розрідження ґрунту внаслідок землетрусу, боротьби з пилом та ерозією ґрунтів, фіксації хімічних, радіоактивних та мікробіологічних забруднювачів (Achal та ін., 2015; Bhutange та Latkar, 2020; Castro-Alonso та ін., 2019; Chou та ін., 2020; DeJong et al., 2013; Pacheco-Torgal та Jalali, 2013; Seifan та Berenjian, 2019). Роботи в цьому напрямку проводяться широко у світі. Серед провідних країн можна відзначити

Сполучені Штати Америки, Китай, Японію, Нідерланди, Сінгапур. В Україні дослідження по біоцементациі успішно проводяться в Національному університеті харчових технологій.

Основою виробництва біоцементу є застосування уреаз-продукуючих бактерій або ферменту уреаз. Застосування чистого ферменту є доволі високовартісним і не може бути широкомасштабним, тому саме мікробна біомаса з уреазною активністю найчастіше використовується в процесах біоцементациі. Мікроорганізми, що беруть участь в утворенні біоцементу, зазвичай є непатогенними, оскільки для біоцементациі найбільш придатні мікроорганізми, що легко витримують високі концентрації солей та лужне середовище, тобто галофільні і алкалофільні бактерії. Але наряду з використанням уреаз-продукуючих непатогенних бактерій існує значна кількість досліджень, в яких в якості джерела уреаз пропонують застосування умовно-патогенних бактерій, не ідентифікованих бактерії, які виділено із активного мулу очисних споруд, або стимульованих природних мікробних мешканців ґрунтів. Другою значною проблемою проведення масштабної біоцементациі є вивільнення до атмосфери токсичного аміаку, а також можливе потрапляння іонів амонію у ґрунтові та поверхневі води. Альтернативним типом біоцементациі є отримання біоцементу на основі фосфату кальцію, але для здійснення цього процесу потрібна уреаз, яка б була активна при кислому рН середовища.

Метою даної роботи було підвищення екологічності процесу біоцементациі за рахунок використання нових біобезпечних джерел уреаз, а також пошук альтернативних способів проведення біоцементациі зі зниженим виділенням аміаку та амонію.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) в рамках держбюджетної наукової тематики «Біотехнологічний потенціал

мікроорганізмів природних та техногенних екосистем» (2019 – 2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи є розробка нових підходів для підвищення біобезпеки біотехнології виробництва біоцементу при його застосуванні у природоохоронних технологіях та промисловості.

Основні задачі дослідження:

- 1) провести скринінг, виділення та ідентифікацію уреаза-продукуючих бактерій – продуцентів кислої уреазу для їх застосування в технології отримання біоцементу на основі фосфату кальцію з метою захисту довкілля від викидів аміаку;
- 2) провести скринінг продуцентів кислої уреазу серед біобезпечних штамів бактерій, а саме, молочнокислих бактерій;
- 3) підібрати дешеве середовище для вирощування біомаси молочнокислих бактерій з метою застосування їх біомаси в біоцементациї;
- 4) провести скринінг серед насіння сільськогосподарських культур як потенційне джерело уреазу;
- 5) визначити форму використання насіння як джерело уреазу;
- 6) визначити ефективність використання продуцентів кислої уреазу, а також рослинної уреазу для проведення біоцементациї.

Об'єкт дослідження – уреаза-продукуючі бактерії, які можуть бути застосовані для виробництва біоцементу на основі фосфату кальцію, а також рослинна уреаза.

Предмет дослідження – біотехнології одержання біобезпечного біоцементу.

Методи досліджень. Для реалізації поставлених завдань під час виконання дисертаційної роботи використано мікробіологічні, хімічні, фізико-хімічні, та інженерні методи досліджень. Методи були обрані так, щоб забезпечити достовірність отриманих результатів та висновків, а саме:

- виділення чистої культури бактерій, продукуючих кислоту уреазу,

проводили методом десятикратних розведень та мікробіологічним висівом на тверді середовища;

- для ідентифікації виділених штамів бактерій застосовували секвенування гену 16S рРНК та забарвлення клітин за Грамом;

- культивування бактерій проводили періодичним способом на поживних середовищах, що відповідають їх особливостям;

- морфологію бактеріальних клітин спостерігали за допомогою скануючого електронного мікроскопу;

- визначення активності уреазі бактерій та насіння, що є основою процесу біоцементзації, проводили за зміною електропровідності при гідролізі сечовини;

- визначення рН середовища проводили стандартним потенціометричним методом;

- для характеристики проходження процесу біоцементзації визначали кількість осажденного кальцію ваговим методом, а концентрацію розчиненого кальцію визначали титруванням з етилендіамінтетраацетатом;

- розмір частинок піску та кісткового борошна, що підлягали біоцементзації, визначали на аналізаторі розміру частинок;

- структуру кристалів карбонату кальцію, а також структуру матеріалу після біоцементзації вивчали методами електронної скануючої мікроскопії;

- оцінку ефективності біоцементзації проводили по зміні механічних властивостей матеріалів, яку оцінювали стандартним випробуванням на водонепроникність;

- статистичну обробку отриманих експериментальних даних проводили методами дисперсійного та кореляційного аналізів з використанням програм Microsoft Office Excel.

Наукова новизна отриманих результатів

Вивчені і запропоновані шляхи ведення біобезпечної біоцементзації, а саме:

- (а) проведено виділення та ідентифікацію штаму бактерій – продуцента кислоти уреазі;

(б) визначені параметри росту та проведене порівняння властивостей продуцента кислої уреазы з відомим українським штамом уреазы-продукуючих бактерій *Bacillus* sp. UVS5;

(в) вивчені властивості кислої уреазы, що дає змогу створити умови для її активності під час біоцементациї;

(г) вперше показана можливість застосування інактивованих клітин продуцента кислої уреазы для біоцементациї;

(д) виявлені штами молочнокислих бактерій здатних до синтезу кислої уреазы;

(е) вперше показана можливість використання молочнокислих бактерій в процесах біоцементациї;

(ж) проведено скринінг пророщеного насіння і паростків ряду вітчизняних сільськогосподарських культур та визначена перспективність використання пророщеного насіння української сої як джерела уреазы в процесах біоцементациї, а також вивчена уреазна активність в її екстрактах;

(з) показана можливість використання неочищеного екстракту з насіння сої для ведення осадження кальцію із розчину кальцію хлориду та сечовини.

Практичне значення отриманих результатів.

Для забезпечення біобезпеки процесу біоцементациї з точки зору запобігання внесення значної кількості живих клітин у довкілля запропоновано використання:

(а) інактивованих клітин бактерій – продуцентів кислої уреазы;

(б) використання як можливих біобезпечних джерел уреазы молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus*;

(в) використання як можливих біобезпечних джерел уреазы неочищених екстрактів з насіння сої, уреазна активність якого може бути порівняна з активністю бактерій, що застосовуються в процесах біоцементациї;

(г) вперше запропоновано отриманням біоцементу із кісткового борошна на основі інактивованої біомаси бактерій – продуцентів кислої уреазы;

(д) для зниження викидів аміаку та амонію у довкілля в процесі біоцементації вперше запропоновано застосування кислої уреазы, що знаходиться у інактивованих бактеріальних клітинах, або в клітинах молочнокислих бактерій.

Біобезпечне біотехнологічне виробництво біоцементів завдяки результатам наведеним в дисертації може знайти широке практичне застосування в Україні.

Результати роботи застосовуються при викладанні курсу «Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології» для підготовки здобувачів освітнього ступеня «Магістр».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем проаналізовано вітчизняну та іноземну літературу по темі дослідження, проведено експериментальні дослідження, узагальнено отримані результати та проаналізовано отримані дані у порівнянні з наявними в літературі. План експериментів, аналіз отриманих результатів, підготовка публікацій проходили за участю наукового керівника, доктора технічних наук, доцента Стабнікова Віктора Петровича.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на 85 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (2019); IX Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (2020); 86 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (2020); 87 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (2020); 88 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (2021).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 3 статті в наукових фахових виданнях України за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія», затверджених в Міністерстві освіти і науки України (3 в наукометричній базі Index Copernicus).

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 132 сторінках машинописного тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Матеріали та методи досліджень» (1 розділ), «Результати досліджень та обговорення» (3 розділи), «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 136 посилань, «Додатки». Робота містить 12 таблиць, 33 рисунки та 2 додатки.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.

БІОТЕХНОЛОГІЧНА ОСНОВА ОТРИМАННЯ БІОЦЕМЕНТУ

1.1. Біоцемент та шляхи підвищення біобезпеки біоцементациї

Традиційний цемент широко використовується у будівництві та для закріплення ґрунтів через його відносно низьку вартість та високу міцність. Виробництво цементу зростає у всьому світі на 0,8–1,2% на рік, а споживання очікується буде збільшеним до 3,7–4,4 млрд т у 2050 році (Benhelal та ін., 2013).

Недоліком цементу є висока в'язкість суспензії, що обмежує його застосування. Крім того, виробництво цементу потребує великих витрат електроенергії (приблизно 2,6% світового споживання енергії) та супроводжується виділенням 0,73 – 0,99 т CO₂ на тону утвореного цементу, що складає 8,0 - 8,6% глобальних антропогенних викидів вуглекислого газу (CO₂) (Aprianti, 2017; Miller та ін., 2018; Nie та ін., 2022). При цьому очікується, що викиди CO₂, що утворюються в результаті виробництва цементу, збільшаться до 260% у період з 1990 року до 2050 року (Cuzman та ін., 2015) і світові викиди будуть становити 2,34 млрд. т CO₂ у 2050 році (Mishra та ін., 2022).

Відомо, що потрапляння парникових газів у атмосферу обумовлює глобальне потепління, а зміна клімату визнана однією з найважливіших світових екологічних проблем. Тенденція до збільшення викидів вуглекислого газу у всьому світі та в провідних країнах безпосередньо пов'язана з виробництвом цементу, який вважається другим найбільш споживаним матеріалом у світі після води (Avramenko та ін., 2022; Imbabі та ін., 2012) (Рис. 1.1).

В останні роки у світі ведуться активні дослідження щодо виробництва альтернативного матеріалу – біоцементу, заснованого на використанні уреазо-продукуючих бактерій, які у присутності сечовини та іонів кальцію утворюють нерозчинні кристали кальциту, що адгезуються до твердої поверхні. Основна перевага біоцементу у порівнянні зі звичайним цементом є низька в'язкість біоцементного розчину, що дозволяє проникати в дрібні пори та мікроканали

ґрунту, та мікротріщини гірських порід та бетону. За рахунок активності уреаз-продукуючих бактерій відбувається гідроліз сечовини, що дає зростання рН та звільнення карбонат іонів:

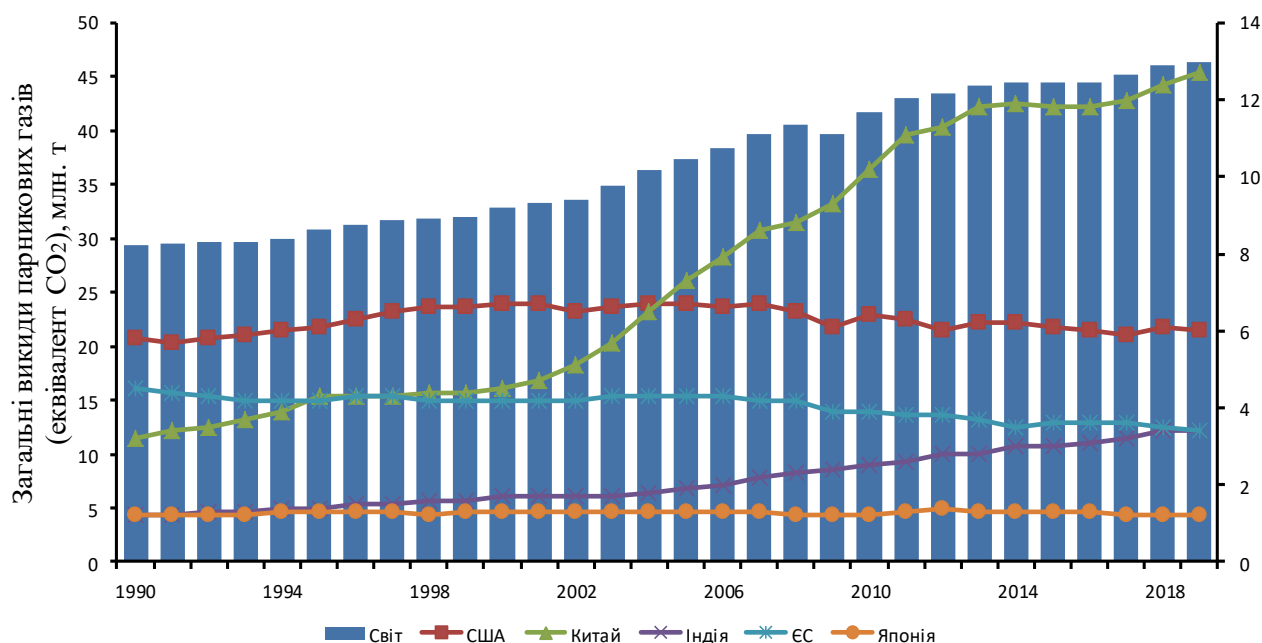


Рис.1.1. Загальні світові викиди парникових газів у США, Китаї, Індії, ЄС та Японії (Total Greenhouse Gas Emissions, 2022).

Діоксид вуглецю у воді переходить у карбонат-іон і в присутності іонів кальцію та високому рН утворює нерозчинний кальцій карбонат (Stocks-Fischer та ін., 1999):



Таким чином, біоцемент – це суміш по щонайменше трьох компонентів: (1) неорганічний компонент, який утворює карбонат кальцію, (2) компонент, який змінює рН та ініціює осадження карбонату кальцію, та (3) фермент або живі мікробні клітини, або неживі, але ферментативно активні мікробні клітини, що каталізують зміну рН при якому відбувається осадження карбонату кальцію. Неорганічний компонент – це розчинні солі кальцію, які перетворюються на нерозчинний компонент. Компонент, який змінює рН та постачає CO_2 для карбонізації – це сечовина, яка гідролізується під каталітичною дією уреазі мікробних клітин або ферменту уреазі.

Схематична діаграма мікробно-індукованого осадження карбонату кальцію на поверхні частинок приведена на Рис. 1.2.

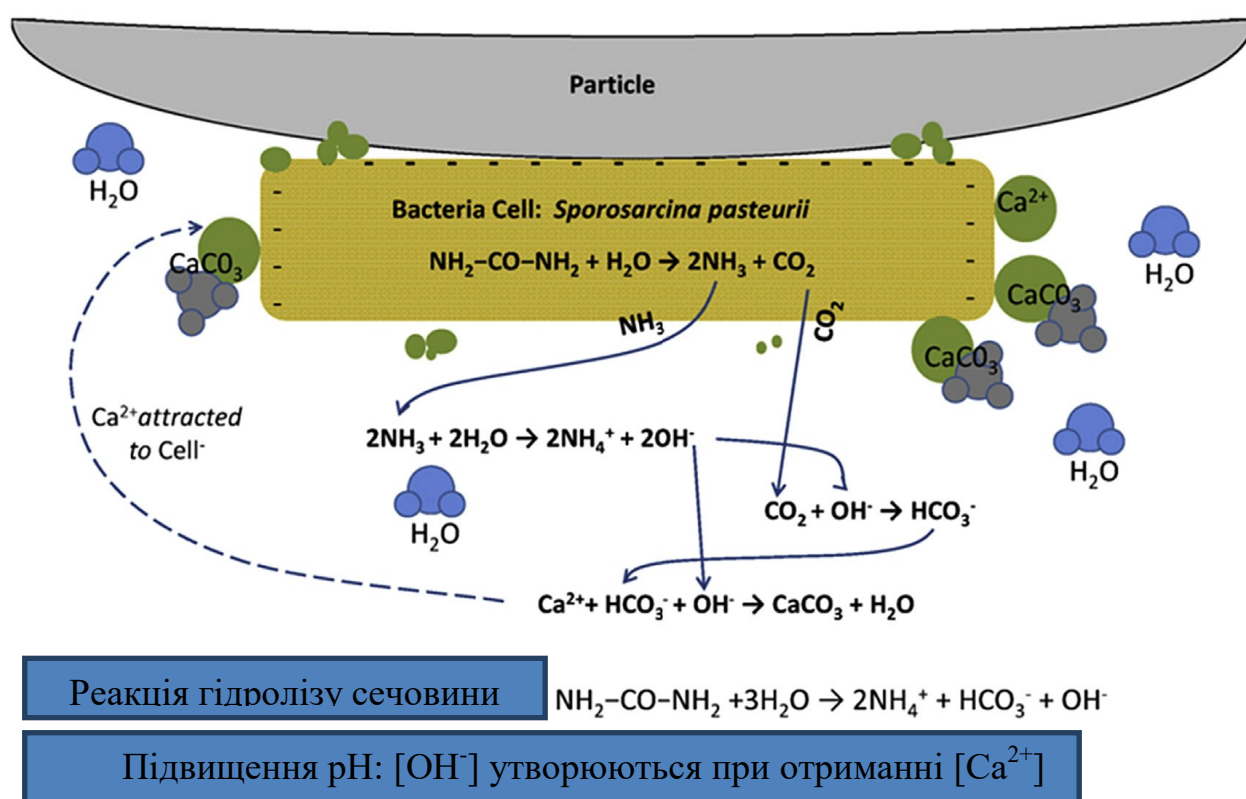


Рис. 1.2. Схематична діаграма мікробно-індукованого осадження карбонату кальцію на поверхні частинок (DeJong та ін., 2010).

Уреаза, карбамід-амідогідролаза, E.C.3.5.1.5, фермент класу гідролаз, є високо-молекулярним, нікель-вмісним багато-субодиничним ферментом, який здійснює гідролітичні розщеплення сечовини з утворенням аміаку і вуглекислого газу (Christians та Kaltwasser, 1986).

Для успішного проведення утворення карбонату кальцію важливу роль відіграє також і фермент карбоангідраза, що каталізує оборотну реакцію гідратації діоксиду вуглецю з утворенням бікарбонату (HCO_3^-) та протони. Пригнічення карбоангідрази уповільнює утворення іонів бікарбонату. Мікробна карбоангідраза сприяє відкладенню карбонатів, що відіграє важливу роль у формуванні та еволюції глобального вуглецевого циклу.

Біовідкладення мінералів - поширене явище в біологічному світі, опосередковане бактеріями, грибами, найпростішими і рослинами. У природі біомінералізація призводить до утворення більше шістдесяти різних біологічних мінералів, які існують як на позаклітинних або внутрішньоклітинних неорганічних кристалів. Карбонат кальцію є одним із тих мінералів, які природнім чином випадають в осад як побічний продукт мікробної метаболічної активності (Seifan та Berenjian, 2019). У природі ініціювати осадження карбонату можуть хемотрофні та фототрофні мікроорганізми, які утворюють іони карбонату через збільшення значення рН (Cacchio та ін., 2003; Castanier та ін., 1999; Wright та Oren, 2005). Виділяють три основні групи мікроорганізмів, що обумовлюють осадження карбонатів. Це фотосинтезуючі мікроорганізми такі як ціанобактерії та мікроводорості (Ariyanti та ін., 2012); сульфатредуючі бактерії (Warthman та ін., 2000) та деякі види мікроорганізмів, котрі беруть участь у кругообігу азоту, а саме азотфіксуючі бактерії, нітрифікуючі бактерії, денітрифікуючі бактерії та сапрофітні бактерії через процеси амоніфікації амінокислот, дисиміляційної редукції NO_3 і деградації сечовини чи сечової кислоти (Castanier та ін., 1999; Hammes та ін., 2002; Stocks-Fischer та ін., 1999). Утворення карбонату кальцію,

CaCO_3 , є одним із найбільш досліджених та вивчених процесів біомінералізації (Fernandez та ін., 2018; Bang та ін., 2010; Ronholm та ін., 2014).

Біоцемент вважається екологічним матеріалом, на створення якого надихнула сама природа (Achal, 2015). Цікавим прикладом природної біоцементатації на Україні може бути скала у селі Підкамень, Бродівського району, Львівської області. Це величезна скала висотою 16 м віком біля 11 мільйонів років. В місцях, де порушена зовнішня тверда кірка, проглядає чистий пісок (Рис. 1.3).



Рис. 1.3. Об'єкт природної біоцементатації: скала у селі Підкамень, Україна.

Біозакріплювачі ґрунту подібні біоцементу, але застосовуються у менших дозах, ніж біоцемент. Їх застосування має за мету зниження гідравлічної проникності ґрунту, або каміння чи бетону з тріщинами. Головною перевагою біоцементів та біозакріплювачів перед традиційними цементами та закріплювачами є низька в'язкість їх розчинів/суспензій завдяки чому біоцементи та біозакріплювачі можуть глибше проникати в пористі ґрунти, розщеплене каміння або бетон.

Показано, що біоцементация може бути широко застосована для геотехнологій та цивільного будівництва, а саме відновлення будівельних конструкцій, ліквідації тріщин у бетоні, будівництві доріг та тунелів, укріплення та закупорювання схилів, сільсько-господарських каналів (Achal та ін., 2010б; Castro-Alonso та ін., 2019; Jonkers та ін., 2010; Sharaky та ін., 2018; Vekariya та Pitroda, 2013; Tittelboom та ін., 2010), для закріплення ґрунтів та запобігання ґрунтової ерозії (Ali та ін., 2022; Burbank та ін., 2011; Choi та ін., 2020; Chu та ін., 2012; DeJong, 2010; De Muynck та ін., 2010a; Ivanov та Chu, 2008; Ivanov та Stabnikov, 2017; Wang та ін., 2017; Whiffin та ін., 2007), будівництва прудів для аквакультури або обробки стічних вод (Stabnikov та ін., 2011), конструювання покриття сільських доріг (Ardeshtana та ін., 2016), для реставрації архітектурних пам'яток (Bhutange та & Latkar, 2020; Marjadi, 2016; Raijiwala та ін., 2009), зменшення потенційного розрідження ґрунтів внаслідок сейсмічної активності (De Muynck та ін., 2010; Chu та ін., 2013), для деконтамінації хімічних, біологічних, радіологічних та ядерних забрудників ґрунтів та інфраструктури, покриття штучних коралових рифів та прибережних бетонних конструкцій (Jiang та ін., 2019; Ivanov та Stabnikov, 2017; Namdar-Khojasteh та ін., 2022). Біоцемент вважається потенційно стійким дизайнерським матеріалом, міцність на стиск якого складає 40% порівняно зі звичайним бетоном і використання якого рекомендовано для покращення оздоблення матеріалів та підвищення його естетики (Lee та ін., 2018).

Перевагами біоцементации є не тільки низька в'язкість та висока проникність біоцементного розчину у бетон або ґрунт, а також відносно низькі вартість та споживання енергії, а також зниження викидів парникових газів у атмосферу порівняно з виробництвом цементу (Achal, 2015). У дослідженнях Achal зі співавторами (2010a; b) біоцементация використовувалася спільно зі звичайним цементом для виготовлення цементних розчинів. Такі досліджувані зразки біоцементованого піску показали на 17–36% вищу міцність і стійкість до водонепроникності.

Мікробно-ініційоване осадження карбонату 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 (Ferrara та ін., 2018; Wang та ін., 2016). 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 та ін., 2008 a,b; 2010; 2011; Naouzi та Courcelles, 2018; Rodriguez-Navarro та ін., 2003). Щороку з'являється значна кількість публікацій щодо проведення досліджень по використанню мікроорганізмів для осадження карбонату кальцію для геологічного та будівельного застосування як показано в оглядах (DeJong та ін., 2013; Stabnikov та ін., 2015) та в монографії (Іванов, Стабніков, 2017).

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

Мікробно-ініційоване осадження карбонату кальцію 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 уреази; (5) активності карбоангідрази (Achal та ін.,

2015; Hammes and Verstraete, 2002; Hammes та ін., 2003; Ivanov та 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 (Achal та Pan, 2011; Achal та ін., 2009a; Castro та ін., 2016; Harkes та ін., 2010; McConnaughey та Whelan, 1997; Stocks-Fischer та ін., 1999; Sharma and Ramkrishnan, 2016; Van Paassen та ін., 2010; Whiffin, 2004; Whiffin та ін., 2007). Результати деяких досліджень зазначають, що біоцементация може успішно збільшувати міцність та в'язкість між частинками піску на відносно великих площах (DeJong та ін., 2010; 2013; Dhami та ін., 2013; Gao та ін., 2019; Ivanov та Chu, 2008; Van Paassen та ін., 2010), однак без можливості біоцементации мулистих піщаних і глинистих ґрунтів (He та ін., 2020).

Мікробне осадження кальциту наразі є найпопулярнішою методикою, що використовується для агрегації та зміцнення ґрунтів (Burbank та ін., 2011; DeJong та ін., 2013; Gurbuz та ін., 2015; Ivanov та Chu, 2008; Ivanov та Stabnikov, 2017; Kim та ін., 2016; Sotoudehfar та ін., 2016; Stabnikov та ін., 2011; 2013a,b; Whiffin та ін., 2017), або для іммобілізації ґрунтових забруднень (Gadd та Pan, 2016; Stabnikov та ін., 2013a; Warren та ін., 2001). Хоч його називають мікробно-індукованим осадженням карбонату кальцію (МІОКК), але б більш точним терміном буде «кристалізація карбонату кальцію, котра залежить від уреазної активності».

Можливості біоцементации можна продемонструвати обробкою методом мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію 1 м³ піску, який було перетворено на каміння при використанні бактерій *Bacillus* sp.VS1 (із Ivanov та Stabnikov, 2017) (Рис. 1.4).



Рис. 1.4. Пісок, який було штучно перетворено на камінь біоцементуванням за допомогою штаму уреаза-продукуючих бактерій *Bacillus* sp. VS1 (із Ivanov та Stabnikov, 2017).

Останнім часом біомінералізація успішно розпочинає впроваджуватися в процесі отримання будівельних матеріалів (De Muynck та ін., 2010, Ramachandran та ін., 2001; Cheng та ін., 2020) та видається перспективною у структурних та геотехнічних застосуваннях (Achal та ін., 2011; DeJong та ін., 2010; 2013; Iqbal та ін., 2021; van Tittelboom та ін., 2010). При цьому біомінералізація може бути двох видів: (а) біологічно контрольована мінералізація; (б) біологічно індукована мінералізація. При біологічно контрольованій мінералізації мінеральні складові зазвичай осідають всередині органічних матриць живих (мікробних) клітини, що дозволяє організмам здійснювати достатній рівень контролю при утворенні та накопиченні корисних копалин (Bazyliniski та Frankel, 2000). Під час біологічно індукованої мінералізації, навпаки, мікроорганізми виділяють один або декілька метаболічних продукти, що взаємодіють з іонами або сполуками у навколишньому середовищі, що в подальшому зазвичай призводить до осадження мінеральних частинок як результат утворення побічних продуктів метаболізму. Утворені подібним чином біомінерали, найімовірніше, є ненавмисним та неконтрольованим наслідком метаболічної активності, яка доволі часто призводить до вибіркової цементації, виробляючи відносно

нерозчинні органічні та неорганічні сполуки та їх з'єднання, а сам процес доволі часто називають біоцементуванням (Frankel та Bazyliński, 2003). Це твердження опирається на осадження карбонату кальцію, що викликане мікроорганізмами (мікробно-індуковане осадження кальцію, МІОК) (Rong та Qian, 2012). Застосування технології мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію було продемонстровано при відновленні та вилученні важких металів (Achal та ін., 2012 a,b,c), зміцненні ґрунту (Whiffin та ін., 2007), відновленні кам'яних матеріалів (Castanier та ін., 1999, Rodriguez-Navarro та ін., 2003, Stocks-Fischer та ін., 1999; Tiano та ін., 1999), очищенні стічних вод (Hammes та ін., 2002), ущільненні піску (Achal та ін., 2009;), зміцненні бетону (Achal та ін., 2011, De Muynck та ін., 2008, Ramachandran та ін., 2001), для боротьби з ерозією ґрунтів, пиловим забрудненням повітря та іммобілізації важких металів і радіоактивних елементів у ґрунті та ґрунтових водах (Jiang та ін., 2019; Stabnikov та ін., 2013; Tamayo-Figueroa et al., 2019; Tian та ін., 2018; Zomorodian та ін., 2019). Ефективність використання біоцементациї для боротьби з вітровою ерозією ґрунту підтверджено польовими випробуваннями на штучних насипах та голій піщаній землі у пустелі Улан-Бух, Нінся-Хуейський автономний район, Китай. Результати показали, що метод мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію може значно підвищити несучу здатність та опір вітрової ерозії поверхневого ґрунту за рахунок утворення ґрунтових кірок (Нао та ін., 2021). Запропоновано також проводити покриття біоцементом цеглин, що були вироблені із золи рисового лушпиння для підвищення їх міцності та зниження водопоглинання при використанні уреаз-продукуючих бактерій *Bacillus megaterium* (Dhami та ін., 2012) або виробляти з піску біоцементациєю за участю уреаз-продукуючих бактерій *Sporosarcina pasteurii* «біоцеглин», які задовольняли та відповідали би вимогам щодо міцності та водопоглинання, але в деякій мірі не повністю відповідали вимогам щодо сольової атаки та вогнестійкості (Cheng та ін., 2020).

1.2. Характеристика процесу біоцементзації

Мікробно-ініційоване осадження карбонату кальцію відбувається під час складних біохімічних реакцій, що регулюються двома важливими ферментами як уреаза та карбоангідраза, які виробляються мікроорганізмами і водночас також використовується і сечовина, як субстрат, а також кальцій як джерело мінералів. Уреаза є основним ферментом, що бере участь у процесі утворення біоцементу (Ivanov та Stabnikov, 2017; Krajewska, 2017). За активності уреазу 1 моль використаної сечовини призводить до утворення 1 моль аміаку та 1 моль карбамату, який спонтанно гідролізується з утворенням додаткових 1 моль аміаку та вуглецевої кислоти (Burne та Chen, 2000). Невдовзі утворюються бікарбонат та 2 моля іонів амонію та гідроксиду після врівноваження у воді, що призводить до збільшення значення рН та, зрештою, зміщує рівновагу бікарбонату, що призводить до утворення карбонат-іонів. Через збільшення рН у клітині для секреції карбонат-іонів необхідна значна концентрація позаклітинних іонів кальцію та низька концентрація позаклітинного протону. Доволі високе значення рН призводить в подальшому до утворення CO_3^{2-} із HCO_3^- (Knoll, 2003). В результаті концентрація карбонату збільшується, що викликає збільшення рівня перенасичення до осадження CaCO_3 навколо клітини при наявності розчинних іонів кальцію. Ще один фермент, що полегшує взаємоперетворення CO_2 та HCO_3^- і сприяє осадженню CaCO_3 - це карбоангідраза (Mobleу та Hausinger, 1989). Якщо HCO_3^- є джерелом розчиненого неорганічного вуглецю, карбоангідраза може пришвидшувати його перетворення в CO_2 (Li та ін., 2010).

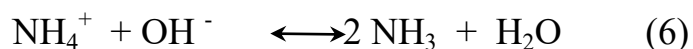
В майбутньому МІОК може використовуватися в об'ємі як єдиний цементуючий матеріал (біоцементация) або як поверхневий шар цементування (біоосадження). Біоцемент утворюється за рахунок МІОК у проміжках та порах частинок зернистого матеріалу за рахунок взаємодії рідини, що містить відповідні уреазу-продукуючі мікроорганізми, сечовину як субстрат та розчин кальцію (Achal та ін., 2015a, Rong та Qian, 2012). Фермент уреазу, котрий

продукується відповідними бактеріями, гідролізує сечовину і кальцій, що використовується як джерело енергії для утворення біоцементу. В подальшому біоцемент зв'язує між собою частинки разом, утворюючи тверде тіло. Даний процес може активно застосовуватися для стабілізації ґрунтів (Cheng та Cord-Ruwisch., 2012; Cheng та ін., 2013), при проведенні будівельних робіт (Mukherjee та ін., 2013), відновлення артефактів з каменю (Jimenez-Lopez та ін., 2007, Tiano та ін., 1999), герметизація водних каналів та тріщин у них (Tobler та ін., 2012).

У процесі біологічного осадження, шар карбонату біологічного походження осаджується на пористій основі, такій як цегла, цемент або цементний розчин. В цьому випадку МІОК осаджує кристали карбонату всередині поверхневих пор та тріщин, і таким чином запобігає потраплянню речовин та матеріалів у основу матеріалів, із зовні. Таким чином, поверхня з пористих матеріалів, таких як бетон або цегла може бути захищена від проникнення води або хімічних речовин при впливі атмосферних опадів (Phillips та ін., 2013). Біоосадження може проводитися за допомогою використання різноманітних мікроорганізмів, шляхів досягнення кінцевого результату (De Muynck та ін., 2008). Показано, що кількість карбонату кальцію, що може осаджуватися в камені залежить як від кількості клітин уреазо-продукуючих бактерій, що затримуються у камінні, так і концентрації сечовини та кальцію, що були витрачені на біоцементацию. Збільшення концентрації сечовини та кальцію та повторна обробка покращили стійкість вапняку до водопроникнення (De Muynck та ін., 2010б; Dick та ін., 2006).

Необхідно відзначити як недоліки процесу біоцементации, які в майбутньому можуть створити негативний ефект: (а) потенційна біологічна небезпека від запропонованих до використання уреазо-продукуючих бактерій та (б) утворення 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:



Ключовим моментом проведення біоцементації є уреаза, що застосовується у процесі перетворення піску на камінь. На сьогодні найбільш вивченими мікроорганізмами для проведення мікробно-індукованого осадження кальцію є різноманітні уреазо-продукуючі бактерії (Bibi та ін., 2018; Mujah та ін., 2017; Stabnikov та ін., 2013; Van Paassen, 2011; Whiffin, 2004; Whiffin та ін., 2007; Umar та ін., 2016). Існує думка, що всі бактерії на планеті є природними, отже перенесення певних їх представників у інші ареали існування не спричинить екологічних змін та ризиків у майбутньому (Fritzges, 2005). Однак, показана неможливість передбачення активності бактеріальної популяції, яка б була внесена до ґрунту, тому немає підстав для узагальнень, і у кожному конкретному випадку необхідно аналізувати модель внесення живих мікроорганізмів у довкілля та можливі ризики (Hokkanen та Lynch, 2003). З огляду на проблеми біологічного ризику, вважають, що бактерії, котрі пропонується використовувати при МІОК, необхідно обирати на основі аналізу біологічної безпеки не лише під час обробки досліджуваних об'єктів, але й після обробки, уникаючи використання генетично модифікованих організмів, або збудників, які можуть впливати на місцеву автохтонну мікрофлору (Umar та ін., 2016).

Однією з перешкод перед промисловим становленням та використанням мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію для біоцементування є доволі коштовне поживне середовище для накопичення уреазо-продукуючих 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 уреазо-продукуючих бактерій. При зміні режиму гідролізу активного мулу вдалося отримати середовище, яке відповідало вимогам отримання біомаси для масштабної біоцementeації при культивуванні уреазо-продукуючих бактерій з конститутивною уреазою (*Bacillus* sp. VS1) та індукцибельною уреазою (*Yaniella* sp. VS8) (Ivanov and Stabnikov, 2019; Stabnikov, 2016). Як дешеве середовище для вирощування *Sporosarcina pasteurii* пропонують застосування дешевих джерел поживних речовин та води, наприклад рідкі відходи молочних виробництв, лактозовмісний маточний сироп (Achal та ін., 2009а), молочну сироватку (Chararro та ін., 2021), дріжджовий екстракт та морську воду (Kahani та ін., 2020), та навіть витoki після виробництва біогазу на курячому посліді (Yoosathaporn та ін., 2016). Можливо проводити отримання та накопичення уреазо-продукуючих бактерій подачею сечовини до ґрунту (Al-Thawadi, 2013; Stabnikov та ін., 2013b). Потім відбувається відбір галофільних і лужнофільних уреазо-продукуючих бактерій або навіть автохтонних мікроорганізмів для відпрацювання біоцementeації за уреазної активності *in situ* (Burbank та ін., 2011, 2012; Hammes та ін., 2003). Відбір уреазо-продукуючих бактерій відбувається при використанні середовищ, що мають достатньо високу концентрацію солі та високі межі значення рН (Stabnikov та ін., 2013 b). Ці умови допомагають отримувати та накопичувати культури з високим рівнем активності уреазини, навіть у не асептичних умовах (Cheng та 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.

1.3. Уреаза-продукуючі бактерії, що застосовуються для біоцементації на теперішній час

Ґрунтові мікроорганізми утворюють одну з найпоширеніших мікробних екосистем на Землі (Coleman-Derr та ін., 2016; Mitchell та Santamarina, 2005; Wang та ін., 2020; Wu та ін., 2006; Umar та ін., 2016). Бактерії можуть вижити в середовищах із найрізноманітнішими показниками кислотності, солоності, температури та атмосферного тиску. Більшість видів бактерій виживають у місцях зі значеннями рН в межах 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).

Здатність утворювати фермент уреазу відзначена у багатьох видів бактерій, і бактерій родів *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Spolooactobacilus*, *Clostridium* та *Desulfotomaculum* використовуються для мікробно-ініційованого покращення ґрунту (Bachmeier та ін., 2002; Kucharski et al., 2006; Zhang et al., 2021). Синтез уреазы може бути індукцйбельним, наприклад, для *Proteus mirabilis*, або конститутивним як у *Sporosarcina pasteurii* та *Sporosarcina ureae*. Для багатьох мікроорганізмів синтез уреазы не залежить від присутності у середовищі азотистих компонентів та їх концентрації, в той час як для інших, він індукується присутністю в середовищі сечовини, а у інших мікроорганізмів, наприклад, у бактерій *Pseudomonas aeroginosa*, синтез уреазы репресується присутністю в середовищі амонію. Таким чином, уреазо-продукуючі бактерії залежно від реакції на концентрацію амонію в навколишньому середовищі, в цілому, можна розподілити на дві основні групи (Gat та ін., 2014): бактерії, в яких висока концентрація амонію пригнічує активність уреазы із подальшим низьким біоцементуючим ефектом, наприклад, *Bacillus megaterium*, та бактерії, в яких активність уреазы при високій концентрації амонію не зменшується, а навпаки, призводить до потужного біоцементуючого ефекту, наприклад, *Sporosarcina pasteurii*. Саме представники другої групи є найбільш доцільними для біоцементації за достатньої наявності концентрації сечовини, зменшуючи

потенційне потрапляння сечовини до ґрунту та ґрунтових вод (Удимович, 2021б). 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 та ін., 2012) та спричинити евтрофікацію якщо поживні речовини випадково потрапляють у навколишні водойми (Mujaah та ін., 2017). Біологічним агентом для мікробно-індукованого осадження кальцію може бути один штам селективно виділеної культури бактерій, що продукує уреазу (Ivanov та Stabnikov, 2017а, б), або штучно активізована природна мікрофлора з уреазною активністю (Burbank та ін., 2011; Rajasekar та ін., 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.

Біологічна безпека мікробних штамів, які використовуються при дослідженнях для подальшого практичного використання, зокрема в біоцементатії, зазвичай класифікується 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 (Стегній та ін., 2010).

Найчастіше для біоцементатії використовуються уреазу-продукуючі бактерії *Sporosarcina pasteurii* (раніше *Bacillus pasteurii*), які відносяться до групи RG1 (біологічно безпечні) (Bang та ін., 2001; Bachmeier та ін., 2002; Keykha та ін., 2018; Mortensen та DeJong, 2011; Whiffin та ін., 2007). Хоча існує велика різноманітність мікроорганізмів з уреазною активністю, найбільш часто для біоцементатії застосовуються представники саме роду *Bacillus* (Achal та ін.,

2010a; 2015a; Wong, 2015), такі як *Bacillus sphaericus* (нині *Lysinibacillus sphaericus*) (De Muynck та ін., 2010б; 2013; Hammes та ін., 2003; Namdar-Khojasteh та ін., 2022; Sahoo та ін., 2016), *Bacillus fusiformis* (нині *Lysinibacillus fusiformis*) (Leeprasert та ін., 2022), *Bacillus megaterium* (Bang та ін., 2001; Dhami та ін., 2014; Jiang et al., 2016), *Bacillus lentus* (Sarda та ін., 2009), *Bacillus pseudofirmus* та *Bacillus cohnii* (Jonkers та ін., 2010), *Bacillus subtilis* (Reddy та ін., 2010), *Bacillus mycoides* (Elmanama та Alhour, 2013), *Bacillus pumilus* (Daskalakis та ін., 2015), *Bacillus licheniformis* (Vahabi та ін., 2015), *Bacillus halodurans* (Zhang та ін., 2019), *Bacillus thuringiensis* (Dhami та ін., 2013) та *Bacillus* sp. (Stabnikov та ін., 2011).

Існує багато умовно-патогенних та патогенних видів, які є галотолерантними та лужнофільними, і мають значну уреазну активність. Штам грампозитивних бактерій, що активно продукують уреазу, *Staphylococcus succinus* був виділений з води Мертвого моря (34% солоності) (Stabnikov та ін., 2013), проте штами *Staphylococcus succinus* можуть бути гемолітичними та токсигенними (Novakova та ін., 2006, Zell та ін., 2008). Уреазо-продукуюча активність властива бактеріям *Helicobacter pylori*, що інфікують шлунок і дванадцятипалу кишку і можуть завдавати непоправної шкоди здоров'ю (Graham та Miftahussurur, 2018). Однак в роботі (Dosier, 2014) бактерії *Helicobacter pylori* розглядаються як можливий біологічний агент біоцементациї. До групи RG2 (умовно-патогенні) зазвичай можна віднести уреазо-продукуючі бактерії, що пропонуються для використання у біоцементуючих процесах різними авторами: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* (Khanafari та ін., 2011; Whiffin та ін., 2007), *Bacillus cereus* (Bottone, 2010; Han та ін., 2013; Maheswaran та ін., 2014), *Staphylococcus aureus* (Varalakshmi, 2014; Zaghloul та ін., 2021) та *Klebsiella pneumoniae* (Hait та ін., 2018; Varalakshmi, 2014; Zaghloul та ін., 2021). Деякі автори проводили виділення активних уреазо-продукуючих бактерій для подальшого застосування в процесах біоцементациї із активного мулу очисних

споруд (Al-Thawadi, 2012; Varalakshmi та Devi, 2014; Xu та ін., 2017), при цьому ризик виділення умовно-патогенних штамів досить великий.

Для проведення мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію пропонують застосовувати не лише чисті культури мікроорганізмів, а й змішані або накопичувальні бактеріальні культури (Al-Thawadi, 2012; Hammes та ін., 2003). Наприклад, застосування змішаної культури уреолітичних та неуролітичних бактерій дало змогу підвищити ефективність мікробно-ініційованого осадження CaCO_3 , можливо за рахунок створення додаткових центрів кристалізації завдяки адгезії неуролітичних бактерій (Gat та ін., 2014). Крім того, вартість процесу отримання біоцементу буде знижено при використанні накопичувальної мікробної культури з уреазною активністю в порівнянні з чистою культурою уреаз-продукуючих бактерій. Штами бактерій, які застосовуються при біоцементзації або укріпленні ґрунту, повинні бути алкалофільними та гало толерантними (Удимович, 2021в). Ці особливості уреаз-продукуючих бактерій дозволяє проводити їх вирощування в періодичних або навіть при безперервних процесах в нестерильних умовах (Cheng та Cord-Ruwisch, 2013). Але поряд з уреаз-продукуючими бактеріями можуть також розвиватися небажані мікроорганізми, в тому числі умовно патогенні. В деяких роботах запропоновано навіть використати для біоцементзації активний мул очисних споруд, який штучно збагачують уреаз-продукуючими бактеріями нестерильним культивуванням при початковому значенні рН 10,0 та внесенням в поживне середовище хлориду амонію, 5 г/л, та сечовини 10 г/л (Yang та ін., 2020). Використовуючи цей метод можливо зменшити вартість приготування біомаси уреаз-продукуючих бактерій на 30%, але питання біобезпеки у цьому випадку не приймається до уваги.

Уреаз-продукуючі бактерії можливо знайти в ґрунті, який містить сечовину, яка попадає до ґрунту як добриво або продукт азотного обміну ссавців, а конститутивний синтез уреаз є загально-розповсюдженою властивістю багатьох штамів ґрунтових бактерій. Саме тому ґрунт може бути

вихідним матеріалом для виділення мікробних продуцентів уреаз (Burbank та ін., 2012b; Hammes та ін., 2003a). Показана можливість проведення укріплення ґрунту за рахунок активації присутніх у ньому уреаз-продукуючих бактерій при внесенні поживних речовин і проведення його примусової аерації (Burbank та ін., 2011; 2012a). Внесення меляси або дріжджового екстракту у прибережний пісок із напівзасушливого середовища для активації природних уреаз-продукуючих бактерій призвело до зміни композиції природної мікробної популяції, збагаченню її представниками роду *Bacillus*, та значному підвищенню уреазної активності (Gat та ін., 2016). Проведення укріплення ґрунту за рахунок активації присутніх в ньому уреаз-продукуючих бактерій використано також в роботах Gomez та ін. (2018) та Rajasekar та ін. (2017). Але цей спосіб не передбачає умов біобезпеки для довкілля.

Ghosh зі співавторами (2005) описали спосіб підвищення міцності цементно-піщаного розчину мікробіологічно індукованим мінералом. Термофільний анаеробний мікроорганізм *Shewanella sp.*, виділений з гарячого джерела, вирощували у рідкому середовищі, клітини відділяли, ресуспендували в воді і вносили у будівельний розчин (цемент і пісок у співвідношенні 1:3 (ваг/ваг) у кількості 105 клітин/мл. Внесення клітин бактерій сприяло підвищенню міцності за рахунок зростання наповнювача у порах цементно-піщаної матриці. Автори припустили, що покращення міцності, ймовірно, відбувається за рахунок відкладення на поверхні частинок піску клітин мікроорганізмів, які закупорюють пори цементно-піщаної матриці. Таким чином, додавання лише самих мікробних клітин підвищує міцність цементованого піску, причому підвищення міцності відбувається за рахунок зростання наповнювача у порах цементно-піщаної матриці, що було показано за допомогою скануючої електронної мікроскопії. Ramachandran зі співавторами використовували уреаз-продукуючі бактерії *Bacillus pasteurii* для закупорювання тріщин в бетоні. Тріщини, заповнені бактеріями та піском, продемонстрували значне збільшення значень міцності на стискування та

жорсткості порівняно з тріщинами без клітин. Скануючі електронні мікрофотографії показали, що мікробіологічне осадження кальциту відбувалося переважно поблизу ділянок поверхні тріщини, де спостерігалось щільне зростання кристалів кальциту, оточених клітинами і навіть мертві клітини можуть залишитися в цементно-піщаній матриці як органічні волокна і підвищити тим самим міцність бетону (Ramachandran та ін., 2001).

Для забезпечення біобезпеки внесення великої кількості сторонньої мікробної культури в ґрунт можливо застосовувати проведення інактивації бактеріальних клітин за умови, що вони зберігають свою уреазну активність. Так, показана можливість застосування клітин уреазо-продукуючих бактерій *Yaniella* sp. VS8, які були інактивовані витримкою в 0,5% (мас/об) розчині сурфактанту натрій додецил сульфату, для конструювання методом біоцементзації модельного ставка для аквакультури (Stabnikov та ін., 2016).

Для отримання непатогенних мікробних продуцентів уреазы можна проводити їх виділення, нових штамів з місць із екстремальними умовами, які зазвичай вважаються несприятливими для мікробного росту, наприклад із спелеотиму із печер Колумбії (García та ін., 2016), або вапнякової печери Саравака, Малайзія (Omorgie та ін., 2018), вапняного ґрунту із Андхра-Прадеш, Індія (Dhami та ін., 2013) чи сильнолужних зразків цементу (Achal та ін., 2010a). Показана також можливість використання штамів грибів *Penicillium chrysogenum* (Fang та ін., 2018), *Aspergillus* sp. та *Fusarium oxysporum* для осадження карбонату кальцію для біоцементзації ґрунту (Dhami та ін., 2017).

Існують роботи, в яких для біоцементзації був застосований безпосередньо фермент уреазы (Almajed et al., 2019; Jiang et al., 2016; Nematі та Voordouw, 2003; Nematі та ін., 2005; Neupane та ін., 2015; Yasuhara та ін., 2012). Наприклад, використання уреазы для біологічно індукованої цементзації при усуненні тріщин у будівельних матеріалах (De Muynck та ін., 2010a), або для біозакріплення піску (Almajed et al., 2019). Але мікробна уреазы досить високовартісна і не може бути застосована при масштабній біоцементзації. Крім

того, бактеріальні клітини з уреазною активністю адсорбуються на поверхні матеріалу, що обробляється, тим самим створюють центри кристалізації для осаження карбонату кальцію (Stocks-Fischer та ін., 1999; Gat та ін., 2014). Khodadadi зі співавторами (2017) зазначили, що саме вартість ферменту уреазини є однією з основних перешкод для його застосування на практиці. Комерційно доступний фермент уреазини дороговартісний насамперед тому, що він виробляється у невеликих кількостях в очищеній формі для чутливих застосувань (наприклад, дослідження, харчова промисловість та для медичних цілей), в той час як при масштабній біоцементации потребують втрат уреазини в кілограмовому масштабі. Отже, зниження вартості ферменту уреазини має важливе значення для практичного застосування його для біоцементации.

Уреаза-продукуючі бактерії є основою процесу біоцементации. Такі бактерії повинні бути нешкідливими для людини та довкілля; їх клітини повинні бути здатними утворювати агрегати і мати високу здатність до адгезії до поверхні що обробляється; бути галотолерантними, оскільки мають бути активними в середовищі із високою концентрацією солей; синтезувати фермент уреазини, який має бути активним у лужному середовищі при значенні рН в межах 8,5 – 9,2 (Stabnikov та ін., 2013). Найчастіше для біоцементации використовують штам уреазини-продукуючих бактерій *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 (Mortensen та DeJong, 2011; Tobler та ін., 2014; Whiffin та ін., 2007). Останнім часом проводяться дослідження по використанню для біоцементации мутантних штамів уреазини-продукуючих бактерій, зокрема мутантів *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859, що були оброблені плазмовим струменем (Han та ін., 2021) або мутантних штамів бактерій роду *Bacillus*, які були отримані обробкою ультрафіолетовим випромінюванням (Achal та ін., 2009б; Li та ін., 2014; Noor та ін., 2021).

В багатьох роботах по біоцементации використовують штам *Bacillus* sp.VS1 (Chu та ін., 2012; Stabnikov та ін., 2011; 2016), найближчою філогенетичною послідовністю гену 16S рибосомальної РНК (ідентичність

99%) якого є *Bacillus pasteurii*, який згідно з технічними правилами для біологічних агентів відноситься до групи ризику 1 (відсутня або низька індивідуальна та суспільна небезпека, включає мікроорганізми, що потенційно не є збудниками хвороб людини та тварин) (Стегній та ін., 2010). Близьким до штаму *Bacillus* sp.VS1 (ідентичність 99%), є штам VUK5, який було виділено з садового ґрунту України (Stabnikov та ін., 2013; Стабніков, 2014).

Таким чином, важливішим фактором для використання біоцементациї в промислових масштабах – це біобезпека джерела уреазы та її доступність.

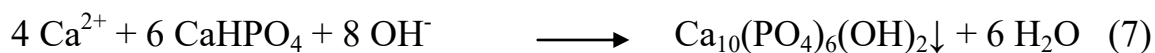
1.4. Альтернативні шляхи біоцементациї

По темі біоцементациї щорічно друкується кілька сотень наукових статей, що свідчить про все зростаючий інтерес до цього напрямку розвитку біотехнології (Ivanov та ін., 2019a; Omoregie та ін., 2020). Одна з причин, яка заважає широкомасштабному застосуванню цієї біотехнології, пов'язана з вивільненням в процесі біоцементациї в атмосферу токсичного газоподібного аміаку в атмосферу, а також можливе потрапляння іонів амонію в ґрунтові та поверхневі води (Gowthaman та ін., 2020; Ivanov та ін., 2019a). При проведенні традиційної мікробно-ініційованої біоцементациї рН середовища, в якому відбувається біоцементация, досягає значень 8,5 – 9,5 за рахунок вивільнення іонів амонію та токсичного аміаку (рівняння 1 та 6). Відомо, що 99% вивільненого азоту буде знаходитися у формі іонів амонію NH_4^+ при значенні рН 7,3, але якщо значення рН перевищує 7.5, спостерігається різка зміна у бік утворення газоподібного NH_3 (Gowthaman та ін., 2021; Whiffin, 2004). Щоб запобігти забрудненню ґрунту іонами амонію запропоновано декілька способів, що передбачають додаткову обробку для їх видалення, зокрема додавання цеоліту (Keykha та ін., 2019), утримання іонів амонію біля катоду при електробіоцементациї ґрунту (Keykha та Asadi, 2017), осадження іонів амонію у вигляді струвіту (Mohsenzadeh та ін., 2021; Yu та ін., 2020), промивання біоцементованої піщаної колони для видалення водорозчинного

амонію (Lee та ін., 2019) та адсорбція видаленого амонію сірчаною кислотою. (Ivanov та Stabnikov, 2017). Але питання викиду аміаку остається не вирішеним. Перспективною високоекологічною альтернативою зниження викиду токсичного аміаку в навколишнє середовище може бути проведення біоцементації на основі фосфату кальцію (Ivanov та ін., 2019a). Фосфат кальцію, аналогічний карбонат кальцію, є перспективним конструктивним матеріалом із достатніми характеристиками міцності. Використання сполук фосфату кальцію для покращення ґрунту має суттєві переваги, такі як (а) фосфати кальцію є нетоксичними та екологічно чистими матеріалами. Фосфати кальцію, як відомо, є основними складовими кісток та зубів хребетних, включаючи більшість твердих тканин людини (Toshima et al., 2014), що доводить безпечність їх внесення у ґрунт; (б) розчинність фосфоровмісних сполук кальцію залежить від рН оточуючого середовища, тому при кислому рН у ґрунті вони можуть знаходитися у нерозчинному стані (Ivanov та ін., 2019a; (Kawasaki and Akiyama, 2013); (в) утворений у ґрунті фосфат кальцію може слугувати фосфоровмісним добривом для сільськогосподарських рослин (Akiyama та Kawasaki, 2012).

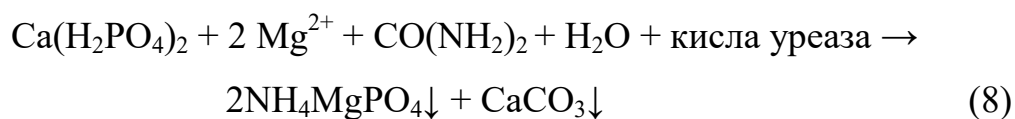
Біозакріплення ґрунту може бути проведено на основі осадження сполук фосфату кальцію при утворенні нерозчинних та міцних кристалів гідроксіапатиту (Akiyama та Kawasaki, 2012; Yu та Jiang, 2018) з неорганічних (Dilrukshi та ін., 2015; 2016; 2018) або органічних фосфатів (Roeselers та van Loosdrecht, 2010). Фосфат кальцію вважається перспективним конструктивним матеріалом з досить високими показниками міцності. Фосфати кальцію є нетоксичними та екологічно чистими матеріалами (Kohn та ін., 2002), які входять як основні компоненти до складу кісток і зубів хребетних, включаючи людину (Toshima та ін., 2014).

Отримання фосфат кальцію може відбуватися за рівнянням (7) (Ivanov та ін., 2019a):



Осадження по цьому методу може відбуватися завдяки ензиматичному гідролізу сечовини, при якому рН підвищується від 4,4 до 7,0. Економічною перевагою гідроксіапатитового біорозчину є можливість використання як вихідної сировини кісткового борошна, що отримують з кісток худоби і застосовують частково як компонент корму чи добриво, але близько половини кісток, що залишаються після переробки м'яса, спалюють, як правило, у цементних печах (Moller, 2015).

Більш екологічно безпечним є також альтернативний процес біоцементациї, який комбінує осадження струвіту (NH_4MgPO_4) та карбонату кальцію при використанні потрійного суперфосфату та солі магнію, що дозволяє запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку в атмосферу в процесі біоцементациї:



Для виконання цих типів біоцементациї потрібно застосування уреаз, яка б була б активною при кислому рН середовища.

1.5. Підвищення біобезпеки біоцементациї за рахунок використання альтернативних джерел уреаз

1.5.1. Мікробні продуценти кислої уреаз

Кислототолерантні уреаз часто виявляють у ентеропатогенів, резистентність яких до солянокислого шлункового соку ґрунтується на їхній здатності гідролізувати сечовину. Деякі бактеріальні штами здатні продукувати кислотостійку уреазу. Наприклад, *Edwardsiella ictaluri* росте при рН в межах

від 5 до 7, але не може рости при рН 5 без сечовини. Активність уреазы виявлялася тільки при рН 5. Таким чином, автори припустили, що уреазу відіграє важливу роль у внутрішньоклітинному виживанні та реплікації *Edwardsiella ictaluri*, можливо за рахунок нейтралізації кислого середовища фагосоми (Booth та ін., 2009). Показано, що стійкість *Yersinia enterocolitica* до кислоти *in vitro* залежала від концентрації сечовини в середовищі, та була максимальною в присутності сечовини не менше 0,3 мМ (De Konong-Ward та Robins-Browne, 1995). Кислотостійка уреазу переважно є внутріклітинним ферментом. Так, позаклітинна уреазу *Helicobacter pylori* проявляла активність при рН в межах від 5,0 до 8,5, а внутріклітинна уреазу при значенні рН від 2,5 до 6,5 (Scott та ін., 1998). Кисла уреазу, що синтезувалася *Enterobacter* sp. R-SYB082, проявляла максимальну активність при 35°C та рН 4,5, яка дорівнювалась 109 мікромоль сечовини/мг.хв і була здатна розкласти сечовину у ферментованих напоях та харчових продуктах (Yang та ін., 2010).

Продуценти кислої уреазы виявлені серед грибів роду *Aspergillus*, наприклад *Aspergillus nidulans* (Creaser та Porter, 1985), *Aspergillus tamari* (Zawada та Sutcliffe, 1981) та *Aspergillus niger* (Smith та ін., 1993). Найбільш активна очищена уреазу з *Aspergillus niger* NRRL 003 (4126 разів) також мала низьку питому активність 1341 ммоль сечовини/хв·мг білка. Вона була активна у широкому діапазоні рН в межах від 5 до 10 з оптимальним значенням рН 8,0 (Smith та ін., 1993). Очищена кисла уреазу, що синтезувалася *Arthrobacter mobilis* SAM 0752 показала високу максимальну питому активність 2370 мкмоль сечовини/хв·мг при 37°C та рН 4,2 (Miyagawa та ін., 1999). Для порівняння, уреазу, що синтезується *Bacillus pasteurii* DSM 33 (*Bacillus pasteurii* ATCC 11859), бактерії, що часто використовуються для виробництва уреазы, очищена в 34 рази, мала максимальну питому активність 996,5 мкмоль сечовини/хв/мг при 30°C (Christi, 1986).

1.5.2. Молочнокислі бактерії як продуценти уреазы активної в кислому середовищі

Утворення уреазы для деяких бактерій розглядається як відповідь на стрес, що викликається низьким рН зовнішнього середовища (Cotter та Hill, 2003). Молочнокислі бактерії, які широко використовуються при приготуванні йогуртів та інших ферментованих молочних продуктів, застосовують уреазну активність для нейтралізації утворених кислот, а також для залучення діоксиду вуглецю і амонію, що утворилися при гідролізі сечовини в деяких біосинтетичних шляхах (Monnet та ін., 2005).

Показано, що *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (LoCascio та ін., 2010) та ротові бактерії *Streptococcus salivarius* (Chen та Burne, 2003) утворюють активну уреазу. Деякі молочнокислі бактерії, що є пробіотиками також мають уреазну активність (Mora та Arioli, 2014). До таких бактерій відносяться *Lactobacillus reuteri* (Wilson та ін., 2014), а також пробіотик *Streptococcus salivarius* strain K12 (Power та ін., 2008). В слині сечовина присутня в концентрації 3–10 мМ, і слугує джерелом азоту для деяких видів ротової мікробіоти, таких як *Streptococcus salivarius* та *Streptococcus vestibularis*. Відомо, що багато штамів молочнокислих бактерій, які використовуються у виробництві молочних продуктів, мають уреазну активність, наприклад штам *Streptococcus thermophilus*, на застосуванні якого засновано виробництво йогуртів (Arioli та ін., 2007; 2009; 2017) чи інший штам *Streptococcus thermophilus*, основна культура молочнокислих бактерій, яка використовується для виробництва йогурту та сиру (Scala та ін., 2019).

Хоч у статті Hols зі співавторами (2005) було сказано, що *Streptococcus thermophilus* - єдина молочнокисла бактерія, що виявляє уреазну активність, в теперешній час така здатність виявлена у значної кількості штамів, на яких засновано виробництво багатьох молочних продуктів. Відомо, що *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (LoCascio та ін., 2010), ротові бактерії *Streptococcus salivarius* (Chen та Burne, 2003) та деякі пробіотичні молочнокислі

бактерії, такі як *Lactobacillus reuteri* (Wilson та ін., 2014 року), мають уреазну активність.

Пошуки мікроорганізмів, що продукують кислу уреазу, була викликана необхідністю її застосування у виноробстві для зниження вмісту сечовини у вині та інших алкогольних напоях, тобто в середовищі з кислим рН. Уреаза, яка була активна при кислому рН в діапазоні 2,0 – 4,0 вперше було виявлено у *Lactobacillus* sp. японськими дослідниками у 1988 році (Fidaleo та ін., 2006; Ough та Trioli, 1988). Уреаза, яка синтезувалася *Lactobacillus fermentum* була частково очищена, охарактеризована та названа кислою уреазою (Takebe та Kobashi, 1988). В подальших дослідженнях була показана можливість застосування деяких штамів молочнокислих бактерій родів *Lactobacillus* або *Streptococcus* для отримання кислих уреази (Kakimoto та ін., 1992). Перелік молочнокислих бактерій, які можна використовувати для отримання кислої уреазу, включав представників таких видів як *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ruminis*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*. Показано, що штам молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* 100-23С, який синтезував уреазу, мав високу стійкість до кислотності середовища та може існувати навіть при рН 3,5 (Wilson та ін., 2014). Комерційні кислі уреазу технічної чистоти в даний час отримують з *Lactobacillus fermentum* (Takeda Chemical Industries Ltd., Осака, Японія; Nagase Biochemicals Ltd., Осака, Японія; Toyo Jozo Co., Токіо, Японія та Enzyme Development Corp., Нью-Йорк) або *Arthrobacter mobilis* (Suntory Ltd., Осака, Японія). Кислотні уреазу знаходять практичне застосування. Наприклад, кислотні уреазу, що продукуються штамми роду *Lactobacillus*, застосовуються для зниження концентрації сечовини у вині, запобігаючи утворенню етилкарбамату, потенційного канцерогену (Famuyiwa та Ough, 1991; Kakimoto та ін., 1989).

Прикладом кислої уреазу може бути уреазу, яка була отримана при культивуванні штаму *Enterobacter* sp. R-SYB082, який синтезує кислу уреазу з

активністю 3,84 ммоль сечовини/мл культуральної рідини (Yang та ін., 2008). Фермент очищали до електрофоретичної гомогенності з використанням осадження етанолом, Superdex 200 та Mono Q з кратністю очищення 21,1 та виходом 49%. Активність очищеного ферменту була оптимальною при значенні рН 4,5 та 35°C. Температурна стабільність була нижчою за 55°C, а стабільність рН становила 4,0 ~ 5,0. Максимальна питома активність очищеного ферменту складала 109 ммоль сечовини/г•хв при 35°C і рН 4,5. Кисла уреаза, що синтезувалася *Lactobacillus reuteri* показувала найвищу активність при рН 2 за температури 65°C (Kakimoto та ін., 1990). Штам молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* NZ8ure при культивуванні на оптимізованому середовищі синтезував кислу уреазу з активністю 12 Од/мл (активність на вихідному середовищі була 1,8 Од/мл) (Yang та ін., 2015). Приклади деяких молочнокислих бактерій, які були використані для синтезу кислої уреазу наведено в Таблиці 1.1.

Таблиця 1.1. Молочнокислі бактерії – продуцента кислої уреазу

Молочнокислі бактерії	Літературне джерело
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Kakimoto та ін., 1990; Wilson та ін., 2014
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Ough та Trioli, 1988; Takebe та Kobashi, 1988
<i>Streptococcus salivarius</i>	Chen та Burne, 2003; Power та ін., 2008
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Arioli та ін., 2007; 2009; 2017; Monnet та ін., 2005; Zotta та ін., 2008
<i>Lactococcus lactis</i>	Yang та ін., 2015
<i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>Streptococcus mitior</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. salivarius</i>	Kakimoto та ін., 1992

Таким чином, згідно з літературними даними деякі молочнокислі бактерії мають уреазну активність і уреазу зберігає активність при кислому рН.

1.5.3. Рослинна уреазна і її отримання

Для отримання біоцементу більшість дослідників використовують бактеріальну біомасу з уреазною активністю оскільки застосування ферменту уреазу є дороговартісним. Можливою заміною бактеріальної уреазу може бути уреазу рослинного походження (Dilruksh та Kawasaki, 2016; Ivanov та ін., 2019). Декілька рослин дуже багаті на уреазу, у тому числі окремі сорти бобових, дині та гарбуза. Відомо використання jack bean (*Canavalia ensiformis*) для отримання рослинної уреазу та промислове отримання в Японії уреазу із *Canavalia adans* (Kakimoto та ін., 1992). Автори зазвичай пропонують використання місцевих рослинних матеріалів, для отримання екстрактів, що мають уреазну активність для подальшого їх використання в якості джерела уреазу при біоцементатії. Наприклад показана можливість застосування неочищених екстрактів із насіння кавуна (*Citrullus lanatus*), які вважаються відходами харчових виробництв (Al Imran та ін., 2021; Dilruksh та ін., 2018), із подрібненого зовнішнього листя капусти та соєвої м'якоті (Baiq та ін., 2020), та бобів Джека (*Canavalia gladiata*) (Tirkolaei та ін., 2020) для проведення біоцементатії. Уреазу може бути виділена не тільки з насіння рослин, але і з його листя, стебла та коріння. Деякі види рослин, з яких можна отримувати фермент уреазу наведені у таблиці 1.2.

Таблиця 1.2. Активність уреазу різних рослин

Назва рослин	Уреазна активність	Одиниці вимірювання	Література
Джек біб (<i>Canavalia ensiformis</i>)	2700-3500	мМ сечовини/хв·мг	Krajewska, 2009
Соя звичайна (<i>Glycine max</i>)	650-800		
Голубиний горох (<i>Cajanus cajan</i>)	3120		

Щавель кислий (<i>Rumex Acetosa</i>)	15,0	μг NH ₄ ⁺ N / год·г	Watanabe та ін., 1983
Мечовий біб (<i>Canavalia gladiata</i>)	251,2		
Лохина високоросла (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	0,9		
Огірок звичайний (<i>Cucumis sativus</i>)	57,1		
Гарбуз мускатний (<i>Cucurbita moschat</i>)	105		
Полинь японська (<i>Artemisia japonica</i>)	31,1		
Горох посівний (<i>Pisum sativum</i>)	0,45	ммол/мг	El-Hefnawy та ін., 2014
Сирійський мескит (<i>Prosopis farcta</i>) (бобові)	0,04	мм/мг	Abdulameer, 2014
Екстракт із гороху (<i>Cicer arietinum</i> L.)	0,03	мм/мл	Pervin та ін., 2009
Екстракт із насіння гарбуза	0,01	мм/мл	Al Imran та ін., 2021

Автори вважають, що використання екстракту із рослин з уреазною активністю може бути корисним як екологічно безпечний і стійкий метод для численних біогеотехнічних застосувань, таких як покращення ґрунтів, ліквідація розрідження ґрунту внаслідок землетрусу, для захисту берегів від ерозії (Dilruksh та Kawasaki, 2016; Ivanov та ін., 2019) .

При використанні як джерела уреазі екстракту стручкової квасолі для біоцементації річкового піску (біоцементуючий розчин містив хлорид кальцію, та розчин сечовини) (Park та ін., 2014). Міцність на стиск піску, обробленого

рослинним екстрактом після 3 діб обробки, збільшилася в 10 разів до 317 кПа порівняно з піском без рослинного екстракту і була подібна до міцності, зацементованого 4% портландцементом.

Висвітлені дані свідчать, що процес біоцементатації повинен проводитися з дотриманням правил біобезпеки. Для біоцементатації рекомендовано застосовувати уреаз-продукуючі бактерії, які відносяться до групи ризику 1. Пошуки біобезпечних джерел уреаз для біоцементатації можна вести серед мікроорганізмів, що використовуються у харчових технологіях, зокрема, молочнокислих бактерій, або уреаз рослинного походження, зокрема уреаз насіння сільськогосподарських рослин.

Висновки до розділу 1

1. Мікробно-ініційоване осадження кальцію - це процес, який став привабливим альтернативним методом біоцементатації у будівельній та геотехнічній інженерії з використанням уреаз-продукуючих бактерій. Отримання біоцементу відбувається при температурі довкілля, вимагає значно менших витрат енергії, а також забезпечує зниження викидів парникових газів у атмосферу у порівнянні із традиційним цементом.

2. Існує два суттєвих недоліки в технології біоцементатації, які стосуються (а) потенційної біологічної небезпеки від використання уреаз-продукуючих бактерій та (б) утворення амонію з подальшим виділенням аміаку, що має негативний вплив на навколишнє середовище.

3. Подальші дослідження в галузі біоцементатації повинні проводитися у напрямку його біобезпечного застосування, а саме (а) в пошуках альтернативних біобезпечних джерел уреаз та (б) зниження утворення аміаку при реалізації процесу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Мікробні та рослинні джерела уреаз для біоцементаци

2.1.1. Уреаза-продукуючий штам бактерій і його вирощування

В роботі використовували уреаз-продукуючу бактерію (УПБ) *Bacillus* sp. VUK5, яка була виділена з піщаного садового ґрунту, в який вносили в якості добрива сечовину, Київ, Україна (Stabnikov та ін., 2013; Стабніков, 2014;). Український штам *Bacillus* sp. VUK5 є алкалофільними, галотолерантними, аеробними та спороутворюючими грам-позитивними паличками. Штам вирощували на поживному середовищі з наступним складом: триптичний соєвий бульйон (Tryptic Soy Broth, TSB) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), 30 г; сечовина, 20 г; NaCl, 100 г; NiCl₂·6H₂O, 24 мг; фенол червоний, 10 мг; дистильована вода 1 дм³. Індикатор фенол червоний (фенолсульфоталеїн) додавали в середовище для детекції розвитку уреаз-продукуючих бактерій: його колір є жовтим при рН 6,8, але поступово змінюється на червоний, якщо рН підвищується до 8,2 і стає яскраво рожевим (пурпурним) при рН вище, ніж 8,2. Усі компоненти середовища, за винятком сечовини, стерилізували при 121°C протягом 15 хвилин. Концентрований розчин сечовини, 100 г/дм³, стерилізували фільтрацією через нітроцелюлозний фільтр з порами розміром 0,22 мкм для запобігання розкладання сечовини під час термічної стерилізації, і додавали 20 см³/дм³ у стерильне середовище (TSB). 2 см³ концентрованого розчину мікроелементів додавали до стерильного середовища TSB. Концентрований розчин мікроелементів мав наступний склад: ZnSO₄·7H₂O, 0,1 г; MnSO₄·H₂O, 0,085 г; H₃BO₃, 0,06 г; CoCl₂·6H₂O, 0,02 г; CuCl₂, 0,004 г; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,04 г; FeCl₂, 0,3 г; деіонізована вода, 1 дм³. рН доводили до 2,0 1N HCl.

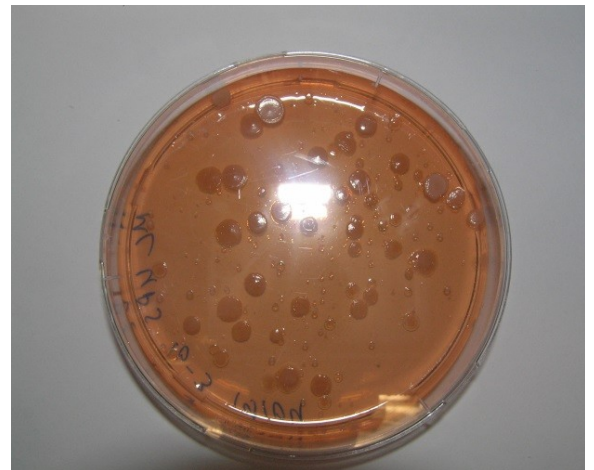


Рис. 2.1. Червоний колір показує підвищення рН до 8.2 середовища в якому відбувається ріст уреаз-продукуючих бактерій

2.1.2. Селекція штаму бактерій, що синтезує кислотостійку уреазу

Як можливі джерела мікроорганізмів, що синтезують кислотостійку уреазу, використовували зразки кислого ґрунту в який вносили в якості добрива сечовину, взятий під хвойними деревами, Київ, Україна. Поживне середовище для вирощування накопичувальної культури мало наступний склад: триптичний соєвий бульйон, 30 г/л, сечовина, 20 г/л, NaCl, 15 г/л, $MnSO_4$, 12 мг/л, $NiCl_2$, 24 мг/л, бромкрезол пурпурний, 20 мг/л, фосфатний буфер (K_2HPO_4 , 14,8 г/л, KH_2PO_4 , 124,4 г/л), 800 мл, рН 5,8. Фосфатний буфер нейтрального рН у початковій фазі росту додавали у кількості 30% від необхідної буферної ємності для підтримки бактерій та гідролізу сечовини, але при цьому спостерігалось підвищення рН до 8,2, що свідчить про уреазну активність бактеріальної культури. Як індикатор рН використовували бромкрезоловий пурпурний: його забарвлення жовто-зелене при рН від 5,4 до 6,8 і фіолетове при рН > 6,8. Усі компоненти цього середовища, крім сечовини, стерилізували при 121°C протягом 15 хвилин. Вихідний розчин сечовини, 100 г/л фосфатного буфера, готували та стерилізували фільтруванням через нітроцелюлозну

мембрану Whatman™ з порами 0,2 мкм для запобігання втратам сечовини при автоклавуванні.

Культивування накопичувальної культури проводили в 70 мл цього середовища в колбах на 300 мл на качалці при 200 об/хв при 25°C протягом 72 годин. Зміна кольору середовища з жовто-зеленого на фіолетовий свідчила про присутність бактерій, що синтезують кислотостійку уреазу. рН культуральної рідини з колб з найбільш інтенсивним фарбуванням становив 9,2. Отриману накопичувальну культуру використовували для виділення чистих культур. Робили десятикратні розведення стерильним 1,5% розчином NaCl. Розведення від 100 до 10^{-7} розподіляли у чашках Петрі з затверділим рідким середовищем, що описано вище. В рідке середовище вносили 2,0% Vacto Agar (Difco). Чашки Петрі інкубували після посіву при кімнатній температурі протягом 2 діб. Поодинокі колонії, зростання яких змінило колір середовища з жовто-зеленого на фіолетовий, виділяли та тестували на уреазну активність. Колонію на чашці Петрі з найвищою уреазною активністю виділяли для подальшого дослідження. Поодинокі колонії, зростання яких змінило колір навколишнього середовища з жовто-зеленого на фіолетовий, виділяли та тестували на уреазну активність.

2.1.3. Характеристика чистої культури кислотостійкої уреазо-продукуючої бактерії та її ідентифікація

Морфологію бактеріальних клітин спостерігали за допомогою скануючого електронного мікроскопу Zeiss EV050, Великобританія. Забарвлення за Грамом виконували користуючись набором для фарбування за Грамом.

Майже повнорозмірний ген 16S рРНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з прямим праймером 27F та зворотнім праймером Universal 1492R (Lane, 1991). Очищені продукти ПЛР секвенували з використанням секвенатора ABI PRISM 3730xlDNA та готового реакційного набору ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing. Праймери 27F, 530F,

926F, 519R, 907R та 1492R використовували для секвенування обох ланцюгів гена 16S рРНК (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.1. Праймери, що були застосовані при ідентифікації продуцента кислої уреазы

Праймер	Послідовність нуклеотидів
27F	5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'
530F	5'- GTGCCAGCMGCCGCGG-3'
926F	5'-AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG-3'
519R	5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'
907R	5' -CCG TCH ATT CMT TTR AGT TT-3'
1492R	5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Отримані продукти ПЛР були очищені та секвеновані за допомогою капілярного аналізатора ABI PRISM3730xl DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) та набору реактивів BigDye Terminator Cycle Sequencing ready-reaction kit (Applied Biosystems). Прямі та зворотні послідовності, отримані на аналізаторі ABI 3730 XL для AU1, були вирівняні за допомогою BioEdit версії 7.1.9. Послідовності були остаточно зібрані для отримання повнорозмірної послідовності, і повнорозмірна послідовність була порівняна з іншими послідовностями, доступними в базі даних NCBI Genbank, з використанням BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.1.4. Визначення концентрації бактеріальних клітин висівом на тверді поживні середовища

Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) в експерименті з інактивацією клітин *Staphylococcus saprophiticus* AU1 обробкою додецилсульфатом визначали висівом 0,1 см³ суспензії бактеріальних клітин із її десятикратних стерильних розведень на чашці Петрі, що були заповнені

агаризованим середовищем - триптичним соєвим агаром. Підрахування кількості КУО проводили після інкубації чашок Петрі при 30°C протягом 2 діб.

2.2. Молочнокислі бактерії як продуценти уреаз

2.2.1. Молочнокислі закваски, що використовували як джерело уреаз

При виборі в якості продуцентів уреаз молочнокислих бактерій, проводили оцінку молочнокислих заквасок по наявності уреазної активності. В експерименті використовували декілька заквасок з наступним складом молочнокислих бактерій (потенційні продуценти уреаз виділено жирним шрифтом) (Таблиця 2.2).

Таблиця 2.2. Молочнокислі закваски та їх мікробний склад

Молочнокисла закваска або пробіотик	Мікроорганізми закваски або пробіотика
Ротен (Reuten, Medibase), Італія	<i>Lactobacillus reuteri</i> LR92
БиоГая (BioGaia, Farmasierra), Швеція	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938
Оптілакт Плюс (ТОВ «Фарма Старт»), Україна	<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1, <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>
Фітнес ТМ «Milk Day» (Державне дослідне підприємство Інституту продовольчих ресурсів НААН України), Україна	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> .
Імпровіт йогурт (Державне дослідне підприємство)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> .

Інституту продовольчих ресурсів НААН України», Україна	
Біфідосан (ТОВ НВП «Аріадна»), Україна.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Йогурт (ТОВ НВП «Аріадна»), Україна	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>

2.2.2. Культивування молочнокислих бактерій

Сухе знежирене молоко розчиняли в дистильованій воді для приготування 8% розчину, розливали по 100 мл у плоскодонні колби ємністю 250 мл і стерилізували методом тиндалізації (Удимович, 2021а). Сечовину, 20 г, розчиняли в 100 мл дистильованої води, і отриманий розчин стерилізували методом холодної фільтрації через мембранний фільтр з діаметром пор 0,25 мкм. Розчин сечовини вносили по 10 мл на 100 мл молока.

Подрібнену свіжу капусту, 200 г, вносили у 1 л водопровідної води, кип'ятили протягом 15 хв, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, фільтрат розводили водопровідною водою у два рази. У фільтрат вносили, г/л: глюкоза, 20; пептон, 10; карбонат кальцію, 10 (Удимович, 2021а). Отримане поживне середовище нагрівали до кипіння, витримували 10 хв, розливали у колби об'ємом 250 мл і стерилізували протягом 20 хв при температурі $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Молочнокислі закваски, зокрема, Ротен (Р), Оптілакт (О), Фітнес (Ф), Імпрівіт (І), Біфідосан (Б) і Йогурт (Й) вносили в колби (0,1 г в одну колбу) зі стерильним молоком і молоком, в яке був доданий розчин сечовини (С). Стерильне молоко (М) без внесення закваски слугувало контролем. Колби

інкубували в термостаті за температури 37°C 96 годин зі стерильним відбором проб для вимірювання рН через кожні 24 години. Досліди проводили в трьох повторях, показано середнє арифметичне.

2.3. Насіння рослин як джерело уреаз

2.3.1. Вибір насіння як потенційно можливе джерело уреаз

Для визначення можливості використання насіння сільськогосподарських культур в якості джерела уреаз проводили пророщування насіння сочевиці зеленої, гороху, квасолі білої, квасолі чорної, сої, гарбуза, кавуна та дині водно-повітряним способом (Stabnikova та ін, 2021). Насіння замочували протягом 48 годин: період перебування у воді становив 6 годин, за цим наставало 6 годинне перебування насіння на повітрі), а потім проводили саме пророщування протягом 96 годин при періодичному обризкуванні водою для попередження пересихання насіння.

Насіння разом із ростками або проростки розтирали у ступці, відважували 0,5 г розтертого насіння з ростками або проростків і змішували наважку з 10 мл води водопровідної у скляному стакані (концентрація отриманого екстракту 50 г/л) і визначали уреазну активність.

До 45 мл 1М розчину сечовини (наважку карбаміду у 18 г розчинили у 300 мл дистильованої води, після чого профільтрували розчин через фільтрувальний папір) додавали 5 мл екстракту насіння з проростками. Уреазну активність визначали кондуктометрично зміною електропровідності розчину 1М сечовини при додаванні екстракту з насіння або проростків.

2.3.2. Насіння сої як джерело рослинної уреаз

Насіння сої було обрано як найбільш перспективне рослинне джерело уреаз (Рис. 2.2).



Рис.2.2. Насіння сої, 96 годин пророщування.

Для встановлення характеру накопичення уреазы в рослинній біомасі відбирали зразки зерен на 24, 72 та 96 год пророщення. Значення уреазної активності визначали як у подрібненому вихідному насінні, суміші біомаси насіння разом з проростками та в водному екстракті. Для отримання екстракту, 10% водну суспензію подрібненого насіння разом з проростками перемішували 30 хвилин при 150 об/хв, центрифугували при 5000 об/хв (лабораторна центрифуга ОПн–8, Київ, Україна) та віддаляли центрифугат. Визначення уреазної активності проводили як в гомогенізованому матеріалі, так і екстракті після видалення рослинної біомаси.

2.4. Методи хімічного аналізу

2.4.1 Визначення рН

рН вимірювали на рН-метр Eutech instruments рН 2700. рН-метр з діапазоном вимірювання від -2 до 20 рН з роздільною здатністю 0,1/0,01/0,001 рН. Має точність $\pm 0,002$ рН. Робочий діапазон температури від 0°C до 32°C.

2.4.2. Визначення уреазної активності

Уреазну активність визначали користуючись портативним кондуктометром TDS-3: проводили визначення кількості вивільненого амонію

по калібрувальному графіку (Рис.2.3) за зміною електричної провідності розчину, мкСм/см, внаслідок гідролізу сечовини під дією ферменту уреаз. Молярна концентрація NH_4^+ (Y) лінійно корелювала ($R^2 = 0.999$) зі зміною електричної провідності розчину (ΔX) в мкСм/см за 5 хвилин. Уреазна активність (УА) визначалась як кількість амонію, що утворилася в 1М розчині сечовини за хвилину.

Уреазну активність також вимірювали за утворенням амонію, яке визначали за методом Несслера (АНРА, 1999).

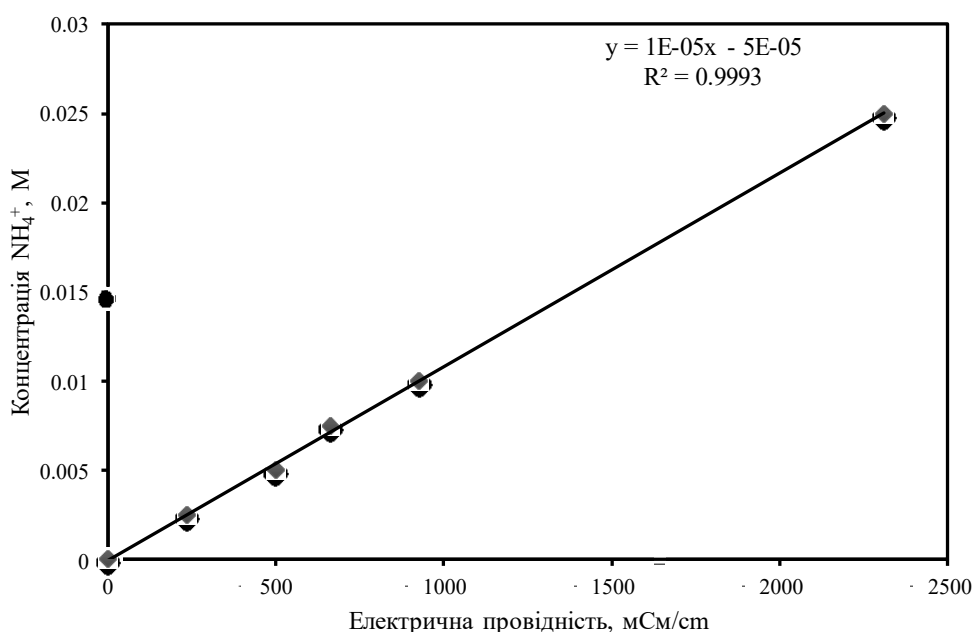


Рис. 2.3. Калібрувальний графік для визначення уреазної активності.

2.4.3. Визначення фізіологічних характеристик продуцента кислоти уреаз

Питому швидкість росту визначали за рівнянням:

$$\mu = (\ln X_1 - \ln X_0) / (t_1 - t_0) ,$$

де X_1 та X_0 - концентрації біомаси на час t_1 та t_0 відповідно.

2.4.4 Визначення кількості осадженого кальцію та концентрації кальцію у розчинах

Кількість утвореного карбонату кальцію вимірювали фільтрацією та висушуванням при 60°C. Концентрацію кальцію визначали стандартним методом АРНА 2340С з титруванням етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА) (АРНА, 1999). Рідкий зразок, 50 см³, вносили в конічну колбу, додавали 1 см³ буферного розчину для підтримки рН 10,0 та декілька краплин індикатору Еріохром чорний Т. Зразок титрували 0,01 М розчином ЕДТА допоки колір не змінювався з пурпурного на синій.

2.5 Фізичні методи дослідження

2.5.1 Вимірювання концентрації мікробної біомаси

Протягом культивування бактерій концентрацію біомаси визначали по калібрувальному графіку за оптичною щільністю. Вимірювання оптичної щільності проводили на фотоелектроколориметрі при 590 нм і концентрацію біомаси визначали за допомогою калібрувального графіку. Вміст абсолютно сухої біомаси (АСБ) бактерій визначали стандартним методом після фільтрації та висушування зразка до постійної маси при температурі 105°C до постійної маси.

2.5.2 Мікроскопія

Для вивчення мікробіологічних та фізичних об'єктів використовували різні методи мікроскопії. Забарвлення за Грамом проводили з використанням стандартного набору барвників. Мікробіологічні об'єкти та біоцементований пісок спостерігали у біокулярному мікроскопі в прохідному світлі MBL 2000 компанії A.KRÜSS Optronic GmbH.

Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ) проводилася за допомогою Zeiss EV050, Великобританія. Зразки фіксували в 2% глютаральдегіді протягом 2 годин, тричі промивали 0,1 М какодилатним буфером протягом 20 хвилин,

проводили покрокову дегідrataцію витримкою в 50, 70, 85 та 95% (об/об) розчинах етанолу протягом 10 хвилин, висушували в 100% етанолі на вакуумній сушарці Polavon E3100, Quorum Technologies, UK, та потім покривали методом напилення Au-Pt за допомогою Emitech SC7620, Quorum Technologies, UK.

2.5.3. Аналіз розподілення частинок піску та кісткового борошна за розмірами

Розподіл частинок за розміром та середній розмір частинок вимірювали за допомогою Bettersizer S3 Plus аналізатору розміру частинок (Bettersize Instruments, Dandong, China). Для кожного зразка було проведено 3 вимірювання для визначення середнього розміру частинок. Проводили визначення також максимального розміру 10% (D10), 50% (D50) та 90% (D90) усіх частинок.

2.6. Матеріали для біоцементатії

Пісок. Річковий пісок просіювали через металеве сито з діаметром отвору пор 0.5 мм (Рис. 2.4).



Рис. 2.4. Просіяний пісок.

Кісткове борошно (Виробник: ТзДВ "Лисичанський желатиновий завод") з вмістом вологі 5%, білку 6,8%, ліпідів, 1,8%, кальцію, 29.3%, фосфору, 13,4% (Рис. 2.5)



Рис. 2.5. Кісткове борошно

Розчинення кісткового борошна проводили згідно з (Gowthaman та ін., 2021). Кісткове борошно, 50 г, вносили при перемішуванні в 200 мл дистильованої води та поступово додавали 60 мл, соляну кислоту, 2 М HCl (5 мл за хвилину). Процес гідролізу тривав 80 хвилин. Залишки кісткового борошна відфільтровували і отриманий розчин використовували у подальших дослідженнях.

2.7. Методи перевірки якості біоцементованих зразків

2.7.1. Визначення гідравлічної проникності

Для визначання водопроникності оброблених зразків піску самопливом подавали 0,1 - 0,2 дм³ водопровідної води з 1 дм³ ємності з водою при практично постійному гідравлічному тиску 0,5 м води. Це вимірювання було близьким до ASTM D2434 – 68 (2006) «Стандартний метод вимірювання водопроникності сипкого ґрунту».

Гідравлічну проникність піску в колонках вимірювали при постійному натиску 0,5 м. Гідравлічна проникність піску, P , в піщаній колонці розраховували згідно рівнянню 2.2:

$$P = V/t \times A \text{ м/с}, \quad (2.2)$$

де – V – об'єм розчину 2% NaCl, який використовували при визначенні водопроникності піщаної колонки для запобігання осмотичного шоку у галотолерантних мікроорганізмів;

t – час, за який рідина проходить через пісок;

A – площа поперечного перетину колонки.

2.8. Постановка експериментів

2.8.1. Визначення уреазної активності у мікроорганізмів

молочнокислих заквасок

Для визначення наявності уреазної активності у мікроорганізмів молочнокислих заквасок порошок Ротен (Р), Опілакт (О), Фітнес (Ф), Імпровіт (І), Біфідосан (Б) та Йогурт (Й) вносили в колби (0,1 г в одну колбу) зі стерильним молоком і молоком, в яке було додано розчин сечовини (С). Стерильне молоко (М) без внесення закваски слугувало контролем. Колби інкубували в термостаті при 37°C. Перше вимірювання значення рН проводили через 2 години після початку інкубації, інкубацію проводили 96 годин зі стерильним відбором проб для визначення рН через кожні 24 години.

2.8.2. Визначення уреазної активності екстрактів із пророщеного насіння

Насіння пророщували протягом 3 діб, готували гомогенізовану масу з насіння та паростків на 24, 48 та 96 годину пророщування - обробка в блендері протягом 2 хвилин для руйнування рослинних клітин та тканин для екстрації ферменту, ретельно перемішували, готували екстракти з різним вмістом гомогенізованої маси (10, 20 та 40 % ваг/об), відділяли екстракт і визначали в ньому уреазну і питому уреазну активності.

2.8.3. Використання рослинної уреазы для осадження кальцію із розчинів

Проводили пророщення повітряно-зрошувальним способом насіння сої до отримання паростків довжиною 10-15 мм. Отримували 10 % екстракти (2,5 г на 25 мл) із насіння сої та пророщеного насіння сої і застосовували їх для

визначення ефективності осадження кальцію у еквімолярних розчинах CaCl_2 та сечовини з концентрацією 0,3 М, 0,5 М, 0,7 М, 1 М та 1,5 М. Для підтвердження можливості використання уреазі насіння сої для біоцементатії проводили осадження CaCO_3 із розчинів хімічних сполук, які застосовуються для мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію, при додаванні водних екстрактів із насіння сої чи із пророщеного насіння сої. У пропіленові трубки вносили по 20 мл суміші еквімолярних розчинів CaCl_2 та сечовини з різною молярною концентрацією, додавали по 5 мл екстракту з уреазаною активністю на трубку і інкубували при 30°C протягом 48 годин. Частину трубок встановлювали на лабораторний шейкер при 150 об/хв і перемішували протягом 4 годин кожену добу.

Оцінка осаджування проводилася як візуально, так і за визначенням кількості осадженого кальцію. Концентрацію розчиненого кальцію в надосадовій рідині визначали титрування з індикатором еріохромом чорним. По різниці між початковим (розрахунковим) вмістом кальцію та залишковим у розчині визначали кількість осадженого кальцію та розраховували відсоток осадження.

2.8.4. Біоцементатія піску із застосуванням інактивованих клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1 з уреазаною активністю

Просіяний річковий пісок вносили у колонки об'ємом 50 мл (висота 7 см, діаметр 3 см) у кількості 60 г та обережно ущільнювали. Підготовлені колонки закріплювали на лабораторних штативах (Рис. 2.6).

Суспензію інактивованих бактеріальних клітин, 20 мл, повільно подавали у колонку, закривали вихід ефлюенту з колонки і витримували 2 год для адсорбції клітин. Культуральну рідину самоплином відділяли з колонки, пісок в колонці промивали 20 мл дистильованої води, і проводили біоцементатію подачею по 20 мл біоцементуючого розчину протягом 24 год (один цикл

біообробки). В якості джерела розчиненого кальцію у біоцементуючому розчині використовували кислотний гідролізат кісткового борошна, в якому кальцій міститься у вигляді фосфоровмісної сполуки. Для зниження водопроникності піску цикл біоцементзації повторювали 8 разів. В якості контролю використовували колонку, в яку подавали розчин кальцію, але без сечовини.



Рис. 2.6. Колонки з піском для проведення біоцементзації.

2.8.5. Біоцементация піску із застосуванням молочнокислих бактерій з уреазаною активністю

Біоцементацию піску із застосуванням в якості джерела кальцію гідролізату кісткового борошна, а як джерела кислої уреазы біомаси молочнокислих бактерій, проводили за описом експерименту, який подано у підрозділі 2.8.4. Молярне співвідношення кальцію до сечовини було 0,25. Ефективність процесу біоцементации оцінювали за зміною водопроникності піску після 8 поетапних біообробок.

2.8.6. Біоцементация піску з застосуванням рослинних екстрактів з уреазаною активністю

Пісок, 60 г, поміщали в колонки об'ємом 50 мл і внутрішнім діаметром 30 мм. В якості джерела уреазы використовували екстракти із соєвих бобів (як пророщених, так і не пророщених). Перед початком проведення біоцементации визначали швидкість проходження води у кожному шприці як нульова точка. Екстракти, 10 мл, повільно додавали до піску для запобігання утворення в ньому порожнин. Пісок інкубували 2 години, потім зливали самопливом. Наступним етапом була подача розчину кальцій хлористого та сечовини у різних співвідношеннях у кількості 20 мл на одну колонку. Після повного заповнення піску зверху повинен залишитись розчин висотою 2 - 5 мм. Розчини для цементации були з різним співвідношенням CaCl_2 : сечовина, а саме: 0,5 М : 0,5 М ; 0,7 М : 0,7 М; 1,5 М : 1,0 М. Після інкубації протягом 24 год для кристалізації кальциту, а розчин, що залишився, зливали самопливом. Для посилення ефекту біоцементации обробку проводили багаторазово, а ефект біоцементування оцінювали по зміні водопроникності піску.

2.9. Математичні методи обробки експериментальних даних

Дослідження проводили в трьох та більше повторях. Статистичну обробку отриманих результатів експериментів здійснювали за спеціальними комп'ютерними програмами для персональних ЕОМ. Дані представлені як середнє арифметичне $\pm$ стандартне відхилення.

РОЗДІЛ 3. ПОШУК МІКРОБНОГО ДЖЕРЕЛА КИСЛОЇ УРЕАЗИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЙОГО ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ

3.1. Виділення та ідентифікація штаму - продуценти кислотостійкої уреази

Уреаза (К.С.3.5.1.5) є ферментом, який розкладає сечовину на аміак і вуглекислий газ і широко поширений в природному світі, включаючи рослини, тварини і мікроорганізми. Уреази, що застосовуються в процесах біоцementeації в теперішній час мають оптимальні значення рН реакції в діапазоні від нейтрального до лужного, і не тільки лабільні і схильні до дезактивації в кислому середовищі, але і навіть не каталізують реакцію гідролізу сечовини, особливо, якщо температура навколишнього середовища вища за кімнатну температуру. Найчастіше біоцемент одержують шляхом осадження карбонату кальцію при лужному значенні рН. Однак застосування кислої уреазы може бути корисним за певних умов навколишнього середовища, коли початковий рН низький, наприклад, при використанні бікарбонату кальцію як джерела кальцію чи при отриманні кальцій фосфату. Метою даного дослідження був вибір мікробного продуцента кислотостійкої уреазы для її застосування у біоцементации.

Як інокулят для отримання накопичувальної культури бактерій, які б продукували кислоту уреазы, використовували кислий ґрунт, що відбирали під соснами і в який попередньо вносили сечовину. 10 г ґрунту вносили в 30 мл фізіологічного розчину (0,85% розчину NaCl), ретельно перемішували і відстоювали. Надосадова рідина слугувала вихідним матеріалом для отримання накопичувальної культури. Накопичувальні культури вирощували на поживному середовищі, склад якого наведено у розділі 2 з початковим рН 5,8 при додаванні в якості індикатора зміни рН бромкрезоловий пурпурний: при рН від 5,4 до 6,8 середовище в його присутності має жовто-зелений колір, а при проходженні гідролізу сечовини і підвищенні рН колір змінюється на

фіолетовий, вказуючи, що $\text{pH} > 6,8$. Накопичувальна культура, в якій колір змінився найшвидше і був найбільш інтенсивний, була використана для подальшої селекції чистих культур бактерій з кислотою уреазою (Рис. 3.1).

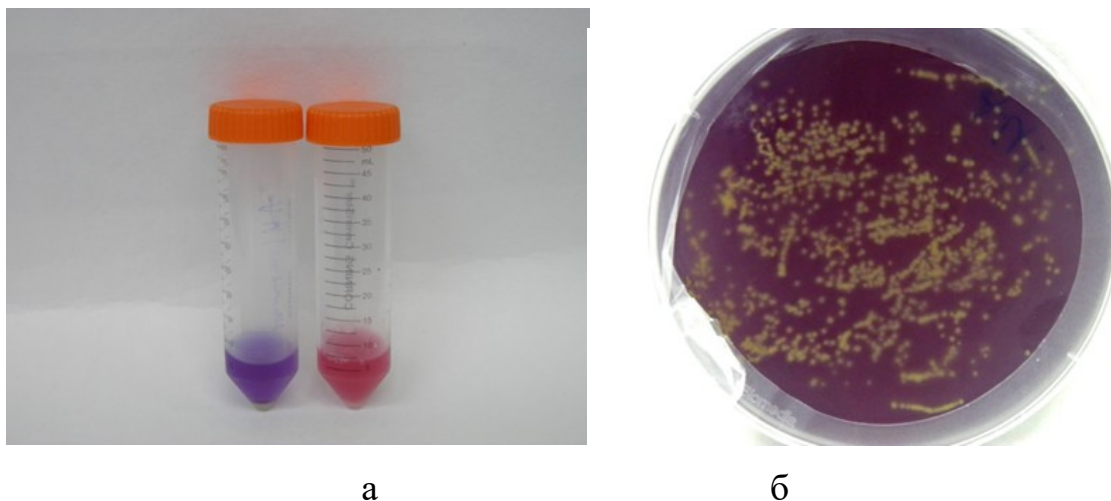


Рис. 3.1. Ріст продуцента кислотостійкої уреазу в рідкому середовищі (а, ліва пробірка) та на твердому середовищі в присутності індикатора бромкрезоловий пурпурний (б).

pH культуральної рідини з колби, де колір був найбільш інтенсивним було 9,2. Десятикратні розведення стерильним 1,5% розчином NaCl розподіляли на тверде середовище у чашках Петрі та інкубували після посіву при кімнатній температурі протягом 2 діб. Поодинокі колонії, колір середовища біля яких змінився з жовто-зеленого на фіолетовий, виділяли у чисті культури і перевіряли на уреазну активність при вирощуванні на рідкому середовищі в аеробних умовах в періодичному режимі культивування в колбах на качалці при кімнатній температурі протягом 4 діб. Уреазна активність штамів, що були виділені з накопичувальної культури, показана на рисунку 3.2.

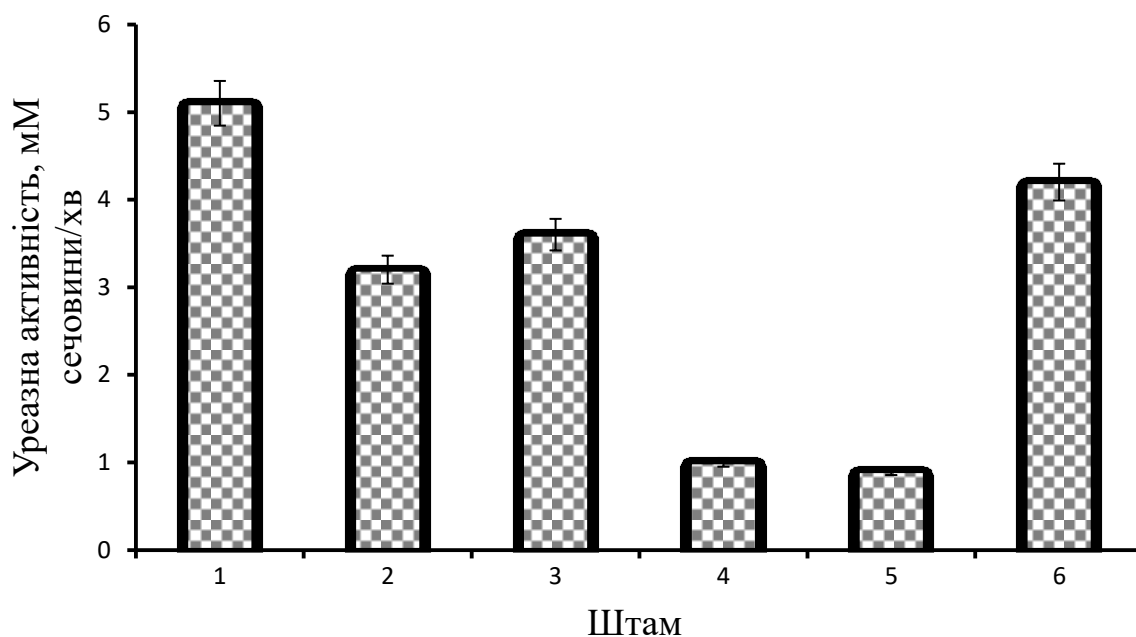


Рис. 3.2. Уреазна активність виділених штамів, що продукують кислу уреазу.

Штам AU1 з найвищою уреазною активністю було відібрано для подальших досліджень. Штам було ідентифіковано за допомогою ампліфікації та секвенування гену рРНК. Часткові послідовності нуклеотидів були об'єднані для отримання повної послідовності нуклеотидів гену 16S рРНК. Штам AU1 був представлений неспороутворюючими грампозитивними шароподібними клітинами. Визначення найближчих сусідніх філогенетичних послідовностей гена 16S рРНК штаму AU1 за допомогою програми пошуку BLAST проти відомих видів у базі даних Національного центру біотехнологічної інформації показало, що він є представником роду *Staphylococcus*: спорідненні штами в базі даних *Staphylococcus saprophyticus* ZK-3 (ідентичність 100%); *Staphylococcus sp.* WW60 (ідентичність 100%) та *Staphylococcus saprophyticus* T86 (ідентичність 100%); (Рис. 3.3).

GCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAG
GAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCT
ATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATTTGGAACCGC
ATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCCGTATTA
GCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGG
TTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACGTGTAAGTAACTGTGCACG
TCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTC
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGAAGCTGATGTGCG
AAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAAACCTTACCAAATCTTGACATC
CTTTGAAAACCTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCG
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAA
GTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAACACACCGCCCGTCAC
ACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATTTATGGAGCTAGCCGT
CGAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAATCTAA

Рис. 3.3. Повна послідовність нуклеотидів гену 16S рНК штаму AU1.

Морська бактерія *Staphylococcus saprophyticus*, продуцент алкалофільної протеази з широким діапазоном температурної активності (10 - 80 °C) була ідентична (99%) до *Staphylococcus saprophyticus* ZK3, *Staphylococcus* sp. WW60 (99%) (Uttatree & Charoenpanich, 2018), *Staphylococcus* sp. WW60 відноситься до

ендофітних бактерій із сильною активністю проти дріжджів роду *Candida* (Das та ін., 2019).

Зображення клітин штаму AU1, що було отримано за допомогою електронного скануючого мікроскопу (SEM), представлена на рисунку 3.4.

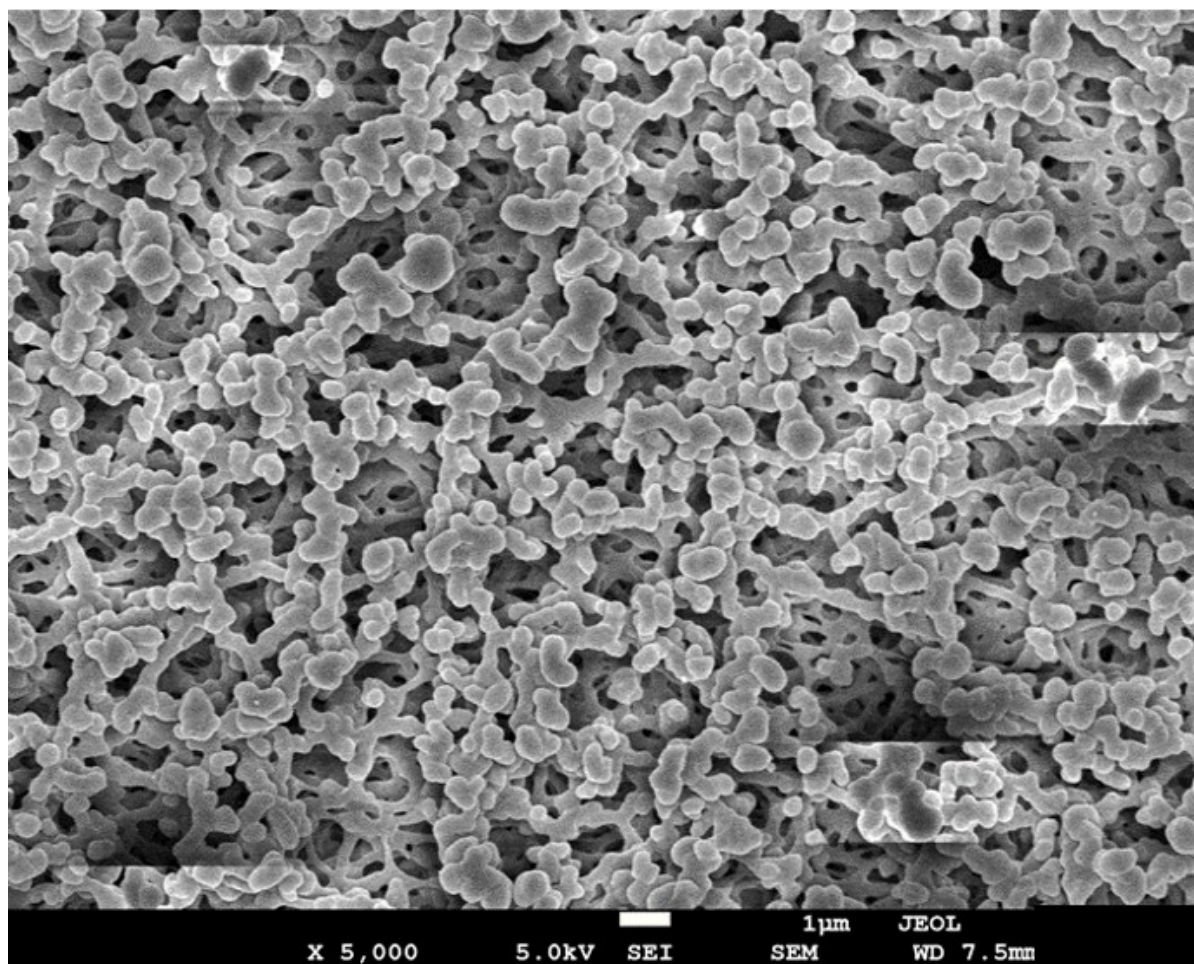


Рис. 3.4. СЕМ зображення клітин у кислотостійкого штаму уреазопродукуючих бактерій *Staphylococcus saprophyticus* AU1.

3.2. Характеристика виділеного штаму уреазо-продукуючих бактерій *Staphylococcus saprophyticus* AU1

Проводили вирощування виділеного штаму *Staphylococcus saprophyticus* AU1 та порівняння його уреазної активності з відомим українським штамом *Bacillus* sp. UK5. Штам UK5 був виділений з садового піщаного ґрунту, в який

вносили добриво, що мало сечовину і його можливість застосування в якості джерела уреазу при біоцементзації було показано в роботах (Стабніков, 2014; Stabnikov та ін., 2014). Клітини уреазо-продукуючого штаму UK5 - спороутворюючі, грампозитивні, паличкоподібні. Зображення клітин штаму UK5, що було отримано за допомогою електронного скануючого мікроскопу (SEM), представлено на рисунку 3.5.

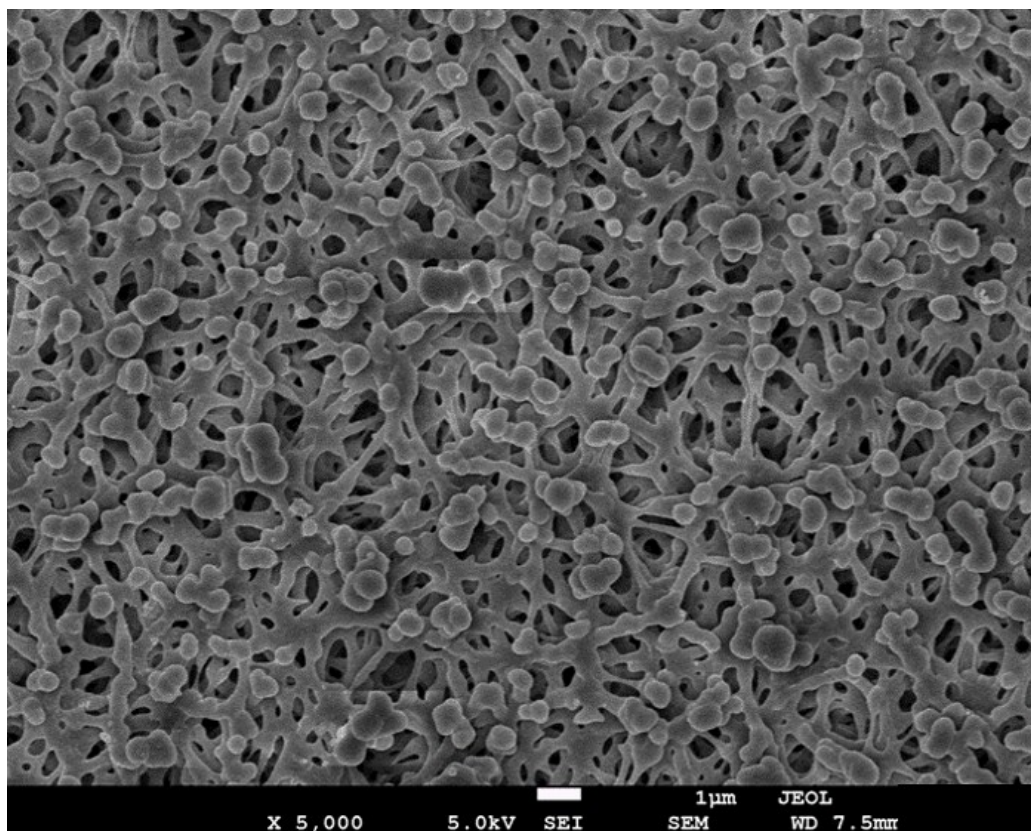


Рис. 3.5. СЕМ зображення клітин уреазопродукуючих бактерій штаму *Bacillus* sp. UK5.

Штами UK5 та AU1 вирощували на відповідних поживних середовищах, які описані в розділі 2. Початкове значення рН середовища для штаму UK5 було 7,2 та 5,8 для штаму AU1. Вирощування проводили в умовах аерації на качалці протягом 3 діб. Криві росту та зміни уреазної активності під час культивування цих двох культур показані на рис. 3.6.

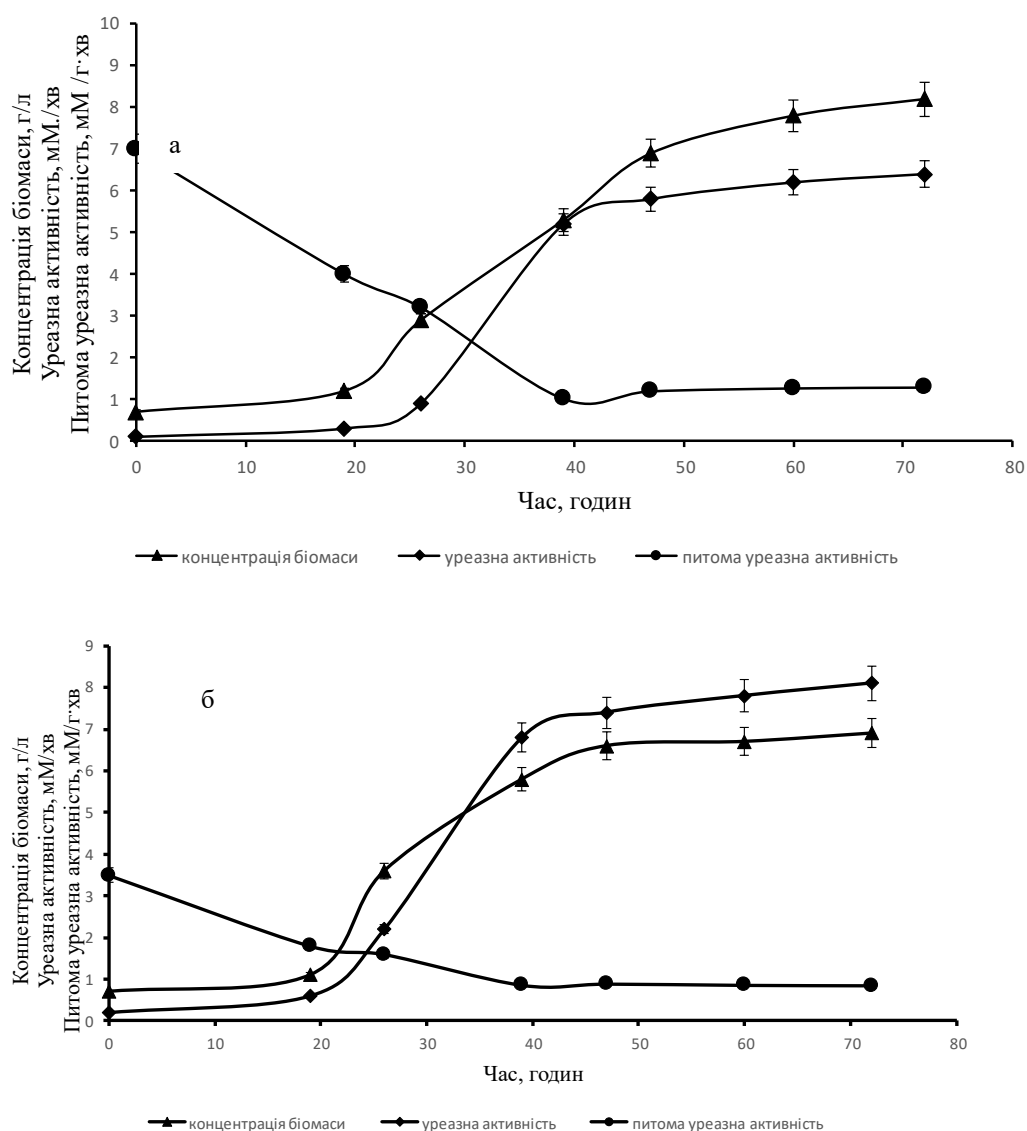


Рис. 3.6. Зміна концентрації біомаси, г сухої біомаси/л (▲), уреазної активності, мм/хв (■) та питомої уреазної активності (●), протягом періодичного культивування *Bacillus* sp. UK5 (а) та *Staphylococcus saprophyticus* AU1 (б).

При періодичному культивуванні в умовах аерації штамп UK5 показав максимальну швидкість росту $0,11 \text{ год}^{-1}$ і максимальне накопичення біомаси 8,2 г/л сухої біомаси після 3 діб культивування, а максимальна уреазна активність була 6,4 мм прогідролізованої сечовини/хв (Рис. 5а), в той час як максимальна

швидкість росту штаму AU1 становила $0,15 \text{ год}^{-1}$, максимальне накопичення біомаси – $6,9 \text{ г/л}$ сухої біомаси, а максимальна уреазна активність була $8,1 \text{ мМ}$ прогідролізованої сечовини/хв (Рис. 5б). Таким чином, кислотостійкий штам AU1 мав максимальне накопичення біомаси на 19% нижче, максимальну швидкість росту на 36,3 % вищу, а максимальну уреазну активність культуральної рідини на 26,5 % вище ніж ті ж самі показники для штаму UK5. Значення уреазної активності, що отримані для кислотостійкого штаму AU1 близькі також і до уреазної активності інших штамів, що застосовуються для біоцementeації, наприклад, *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 - $13,3 \text{ мМ}$ прогідролізованої сечовини/хв (Whiffin, 2004) та штам *Bacillus* sp., виділений з ґрунту в Австралії - 3 мМ прогідролізованої сечовини/хв для (Al-Thawadi та Cord-Ruwisch, 2012). Саме ці ж уреазні активності використовувалися при біоцementeації піску при застосуванні чистого ферменту уреаз: уреазна активність становила від $2,5 \text{ мМ/хв}$ до $10,5 \text{ мМ/хв}$ (Almajed et al., 2019) та 5.9 мМ/хв (Jiang et al., 2016).

3.3. Зміна уреазної активності клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1 залежно від pH середовища

Визначали залежність активності кислої уреаз *Staphylococcus saprophyticus* AU1 від pH середовища в діапазоні 4,0 – 8,0 (Рис. 3.7).

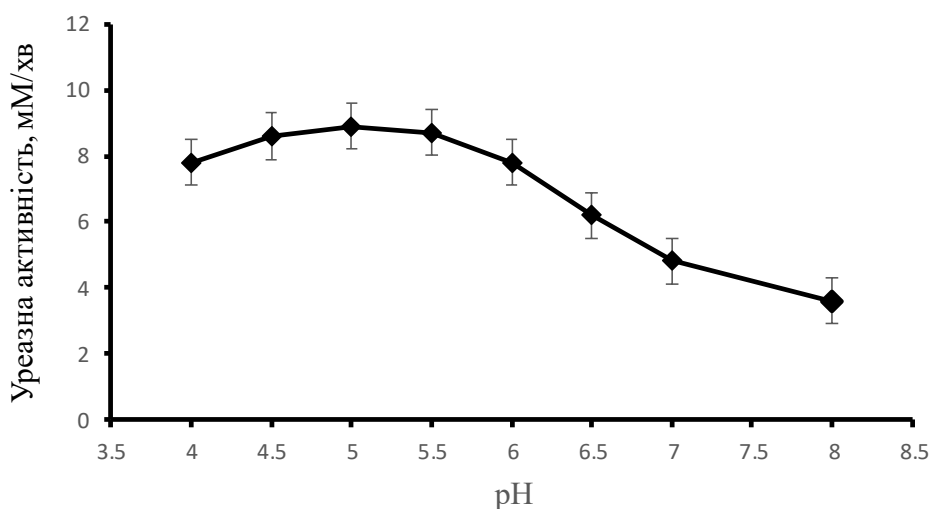


Рис. 3.7. Уреазна активність *Staphylococcus saprophyticus* AU1 залежно від рН середовища.

Найвища уреазна активність спостерігалася в інтервалі рН від 4,5 до 5,5, поступово знижуючись при підвищенні рН. Оптимальним значенням рН для дії кислих уреаз згідно з літературними даними було 4,5 для уреаз, продуцентом якої був штам *Enterobacter* sp. R-SYB082 (Yang та ін., 2010); 4,2 для уреаз, що продукувалася штамом *Arthrobacter mobilis* SAM 0752 (Miyagawa та ін., 1999). Комерційно доступна уреаза Nagapshin, що випускається Nagase Chemtex Corporation (Кіото, Японія) і була застосована у роботі (Gowthaman та ін., 2021), була активна в діапазоні рН від 4,0 до 8,0 з оптимумом дії при рН 5,0.

3.4. Зміна уреазної активності при інактивації клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1

Відомо, що штами *Staphylococcus saprophyticus* присутні в різних природних об'єктах, таких як морські осади в Таїланді (Uttatree та Charoenpanich, 2018), морські осади та водорості із Середземного моря, Єгипет (Zaghloul та ін., 2021), корейська папороть *Dryopteris uniformis* (Das та ін., 2019). Але в той же час відомо, що деякі штами *Staphylococcus saprophyticus* є частою причиною інфекцій сечовивідних шляхів (Lawal та ін., 2021). Як показано в роботі (Stabnikov та ін., 2016) з метою забезпечення біобезпеки довкілля можливо використовувати при біозакупорюванні ґрунту інактивовані бактеріальні клітини бактерій *Yaniella* sp. VS8, які мали уреазну активність. Застосування інактивованих клітин бактерій було запропоновано з метою дотримання біобезпеки довкілля. Використання чистого ферменту уреаз при проведенні масштабної біоцементзації дороговартісне, крім того застосування бактеріальних клітин має такі переваги як створення центрів кристалізації карбонату кальцію в оброблюваних матеріалах за рахунок адгезованих бактеріальних клітин на його поверхнях. При порівнянні ефективності таких

методів інактивації клітин бактерій *Yaniella* sp., заснованих на розриві клітинної мембрани, як обробка суспензії клітин ультразвуком; інкубація протягом 1 години в розчинах етанолу, та інкубація в розчині натрію додецилсульфату з кінцевою концентрацією 0,5% (мас/об), було показано, що (1) обробка ультразвуком (750 ватт; 20 мегагерц; амплітуда 50%) протягом 30 с, 60 с та 300 с не забезпечувала інактивації клітин; (2) інкубація клітин бактерій в 25% (об/об), 50% (об/об) та 70% (об/об) розчинах етанолу суттєво знижувало концентрацію живих клітин з $5,2 \cdot 10^8$ КУО/см³ до $4,9 \cdot 10^2$ КУО/см³, в той час як (3) обробка 0,5% розчином додецилсульфату протягом 120 хвилин забезпечувала повну інактивацію клітин, які зберігали при цьому уреазну активність. Інактивуюча дія додецилсульфату була підтверджена скануючою електронною мікроскопією, яка показала руйнування оброблених бактеріальних клітин уреазо-продукуючих бактерій. Ґрунтуючись на приведених даних, для інактивації клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1 було запропоновано використання натрію додецилсульфату, інгібуюча дія якого на бактерії заснована на розчиненні клітинної мембрани (Kramer та ін., 1984; Hansen та ін., 2011). Розрахункову кількість натрій додецилсульфату вносили у клітинну суспензію з рН 5,0 і витримували при кімнатній температурі. Дані про витримування бактеріальної суспензії *Staphylococcus saprophyticus* в 0,5% розчині натрію додецилсульфату наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Вплив часу обробки клітин бактерій *Staphylococcus saprophyticus* AU1 в 0,5 % розчині натрію додецилсульфату на їх уреазну активність та виживаність

Час інкубації, хвилин	Уреазна активність, мМ прогідролізованої сечовини/хв при інкубації в розчині 1М сечовини, хв*		КУО/см ^{3**}
	5	30	
0	7,7	4,8	$1,2 \cdot 10^8$

10	4,2	7,7	$2,9 \cdot 10^2$
30	3,8	6,9	$0,7 \cdot 10^1$
60	3,4	5,9	6,0
90	3,3	5,7	0

* точність вимірювань складала менш 10%.

** точність вимірювань складала менш 20%.

Інкубація бактеріальної суспензії *Staphylococcus saprophyticus* AU1 суттєво знижувала концентрацію живих клітин і витримка протягом 40 хвилин дозволила провести повну інактивацію. Уреаза активність знижувалася, але залишилася досить високою – відсоток втрат при обробці протягом 40 хвилин становив 26% від початкової (Таблиця 3.1). Повна інактивація клітин бактерій *Yaniella* sp.VS8 при обробці 0,5% розчином натрію додецилсульфату спостерігалася після 120 хвилин витримки бактеріальної суспензії (Stabnikov та ін., 2016). Згідно з даними таблиці, уреаза активність у оброблених клітин зростала з часом інкубації в розчині 1М сечовини, що свідчить про конститутивний характер синтезу уреаз у *Staphylococcus saprophyticus*, яка стає більш доступною при розриві клітини. Про це також свідчать дані по зміні уреазаї активності протягом інкубації в 1М розчині сечовини (Таблиця 3.2).

Таблиця 3.2. Уреаза активність (УА) для різного часу інкубації бактеріальних клітин в 1М розчині сечовини

Клітини <i>S. saprophyticus</i> AU1	УА*, мМ прогідролізованої сечовини/хв за час контакту з 1М розчином сечовини, хв					
	5	30	60	90	120	150
Живі необроблені	7,7	4,8	3,9	3,6	3,0	2,1
Інактивовані після інкубації в	3,3	5,7	6,9	5,7	3,9	2,3

0,5% розчині натрію додеціл сульфату протягом 90 хвилин						
---	--	--	--	--	--	--

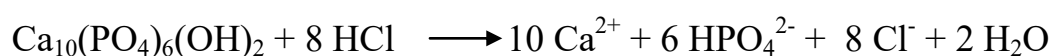
* точність вимірювань складала менш 10%.

Таким чином, найбільш відповідний метод для інактивації бактеріальних клітин при зберіганні їх уреазної активності це інкубація бактеріальної суспензії в 0,5% розчині натрію додецилсульфату протягом 90 хвилин, що забезпечить біобезпеку при застосуванні клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1 для біоцементзації.

Бактерії *Staphylococcus saprophyticus* AU1 стерильно вирощували в рідкому середовищі, виготовленого на основі триптичного соєвого бульйону (розділ 2) на качалці при 200 об/хв при кімнатній температурі. Інактивацію клітин проводили додаванням 0,5% (мас/об) додецилсульфату і витримуванням 90 хвилин. Оброблені клітини відділяли центрифугуванням при 5000 rpm протягом 10 хвилин, ресуспендовали у 2% (мас/об) розчині NaCl та використовували для біоцементзації просіяного річкового піску.

3.1.5. Приготування розчину кісткового борошна

В якості джерела кальцію використовували кісткове борошно. Розчинення кісткового борошна проводили згідно з (Gowthaman та ін., 2021). Кісткове борошно, 50 г, вносили при перемішуванні в 200 мл дистильованої води і додавали поступово 60 мл, соляну кислоту, 2 М HCl (5 мл за хвилину). Як показано в роботі Gowthaman та ін. (2021) кальцій та фосфор присутні в кістковому борошні у вигляді гідроксиапатиту $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Проводили солянокислотне розчинення кісткового борошна (гідроксиапатиту кістки) згідно рівняння:



В процесі розчинення вимірювали рН і концентрацію Ca^{2+} (Рис. 3.8).

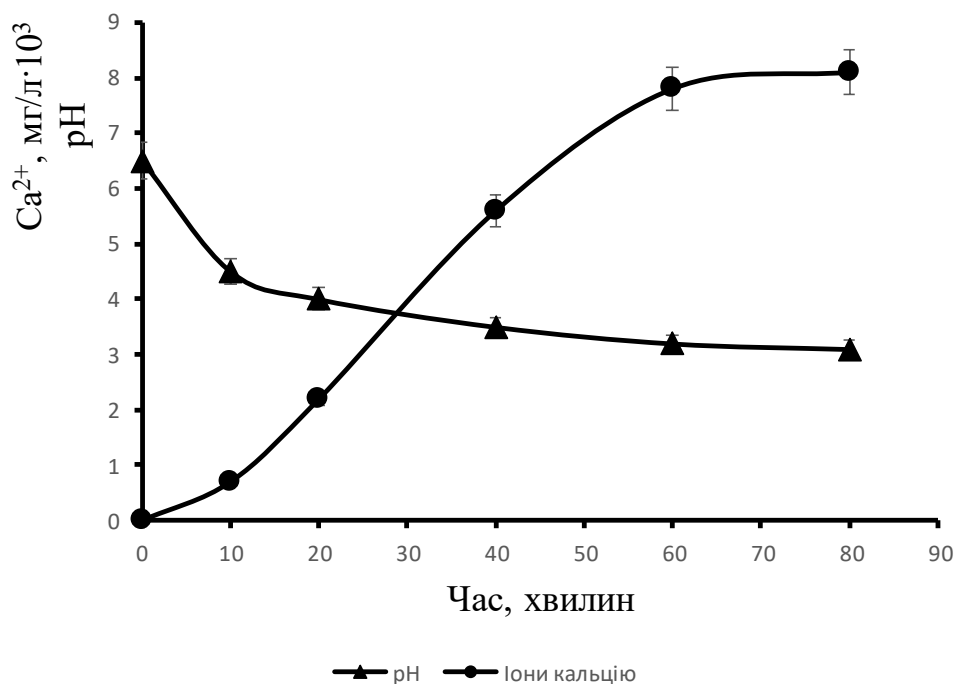


Рис. 3.8. Зміна рН та концентрації кальцію в процесі розчинення кісткового борошна в соляній кислоті.

Кінцеве значення рН після 80 хвилин розчинення кісткового борошна становило 3.5, а концентрація іонів кальцію 7800 мг/л. Залишки кісткового борошна відфільтровували і отриманий розчин використовували у подальших дослідженнях. Показники відфільтрованого розчину гідролізату українського кісткового борошна були схожі з тими, що було отримані у роботі японських дослідників: 8800 мг/л іонів кальцію та значення рН 3,4 (Gowthaman та ін., 2021).

3.6. Біоцементация піску з застосуванням гідролізату кісткового борошна як джерела кальцію

Проводили перевірку можливості використання кісткового борошна як джерела кальцію для біоцементации із застосуванням інактивованих клітин продуцента кислотостійкої уреазы.

Кісткове борошно є одним з відмінних та недорогих джерел кальцію та неорганічного фосфату і його можливо використовувати як цементуючий матеріал замість хлориду кальцію. Для використання кісткового борошна в якості компонента для утворення біоцементу проводили його попереднє розчинення у розбавленій соляній кислоті (постановка експерименту описана в розділі 2). Розчинене у кислоті кісткове борошно разом із сечовиною та джерелом кислої уреазы вводили у пісок для проведення біоцементации. Утилізація кісткових відходів м'ясопереробних виробництв для інженерно-геологічних практик при використанні сечовини та кислої уреазы для регулювання рН це нова ідея, яка була запропонована Івановим В.М. під час його візиту до Японії у Відділ інженерії стійких ресурсів, Інженерний факультет, Університет Хоккайдо, Саппоро, для проведення сумісних досліджень.

Компонентами для біоцементации були: (а) гідролізат кісткового борошна, (б) суспензія інактивованих клітин продуцента кислотостійкої уреазы, та (в) сечовина. Проводили біоцементацию піску при співвідношенні концентрацій іонів кальцію та сечовини згідно таблиці 3.3.

Таблиця 3.3. Варіанти біоцементации піску

Зразок	Концентрація Ca^{2+} , г/л	Концентрація сечовини, г/л	Молярне співвідношення
1	7,8	1,8	0,25

2	7,8	3,9	0,50
3	7,8	5,7	0,75

Для біоцементації використовували просіяний річний пісок. Розподіл частинок за розміром та середній розмір частинок вимірювали за допомогою Bettersizer S3 Plus аналізатору розміру частинок (Bettersize Instruments, Dandong, China) (Рис. 3.9).

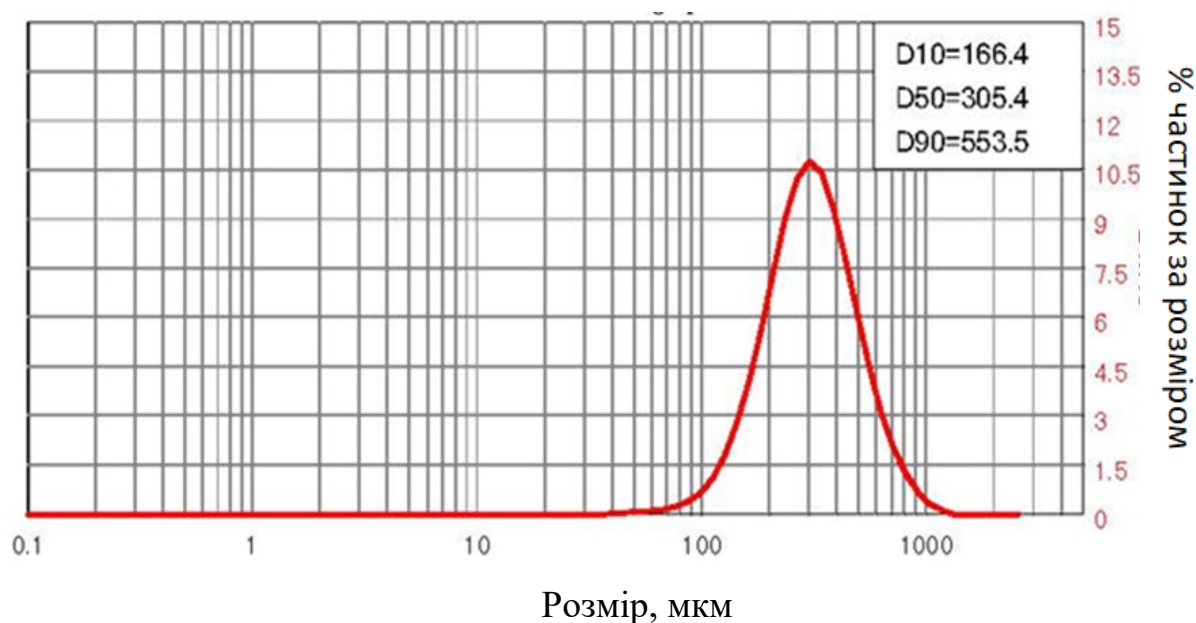


Рис. 3.9. Розподілення часток просіяного піску за розміром

Таблиця 3.4. Розподілення часток просіяного піску за розміром

Д, мкм	0,000- 200,0	200,0- 300,0	300,0- 400,0	400,0- 500,0	500,0- 600,0	600,0- 700,0	700,0- 800,0	800,0- 900,0	900,0- 1000	1000- 1500
%	18,12	30,31	23,74	13,47	7,22	3,44	1,86	0,99	0,50	0,35

Таким чином, основні фракції піску мали частинки з розміром від 200 до 300 мкм (30,31%) та розміром від 300,0 до 400 мкм (23,74). $D_{10}=166.4$ мкм; $D_{50}=305.4$ мкм; $D_{90}=553.5$ мкм, тобто 10% піску мала частинки менше 166.4 мкм, 50% менше 330 мкм і 90% менше 1600 мкм. Пісок за розміром частинок

класифікується на тонкий - розмір частинок досягає 700-1000 мкм; дрібний - розмір часток досягає 1000-1500 мкм; дрібний пісок - розмір частинок досягає 1500-2000 мкм; середній пісок – розмір часток сягає 2000 – 2500 мкм. Тобто пісок, який застосовували для біоцементзації був тонким. Для порівняння в дослідженнях по біоцементзації зазвичай використовуються: сортований пісок ASTM (Американське суспільство з випробування матеріалів) з середнім розміром частинок 400 мкм; стандартний пісок з частинками округлої форми (Societe Nouvelle du Littoral, FranceCep) з середнім розміром частинок 420 мкм; стандартний пісок Ottawa з середнім розміром 300 мкм при варіації розміру частинок від 150 мкм до 1180 мкм.

Пісок, 60 г, поміщали в колонки об'ємом 50 мл і внутрішнім діаметром 30 мм. Суспензії інактивованих бактеріальних клітин, 20 мл повільно подавали у колонку. Пісок з інактивованими клітинами витримували 2 год для адсорбції клітин, а потім суспензію самопливом спускали. Пісок промивали 20 мл дистильованої води. Після самопливного видалення води подавали у колонки по 20 мл біоцементуючого розчину згідно з таблицею 3.3. Інкубацію проводили 24 год, а залишки розчину самопливом видаляли. Для підвищення міцності обробленого піску біоцементуючий розчин вприскували у кожну колонку 8 разів. Контролем був зразок, в якому подавали розчин кальцію, але без сечовини. Як показали результати по акумуляції кальцію, в контрольному зразку кальцій не затримувався у піску, а вимивався із нього. Таким чином, лише у присутності сечовини при підвищенні рН за рахунок її ферментативного гідролізу розчинений кальцій перетворюється у нерозчинний кальцій фосфоровмісну сполуку, яка заповнює пори піску і скріплює його. Таким чином, незначна кількість кальцію при біоцементзації такого типу буде осаджуватися у формі карбонату кальцію, а основна маса буде осаджуватися як кальцій фосфоровмісна сполука, що дозволяє зменшити кількість сечовини, що застосовується для біоцементзації, і, як наслідок, суттєво зменшити потрапляння

у довкільля амонію та аміаку. Зміна водопроникності піску показана на рисунку 3.10.

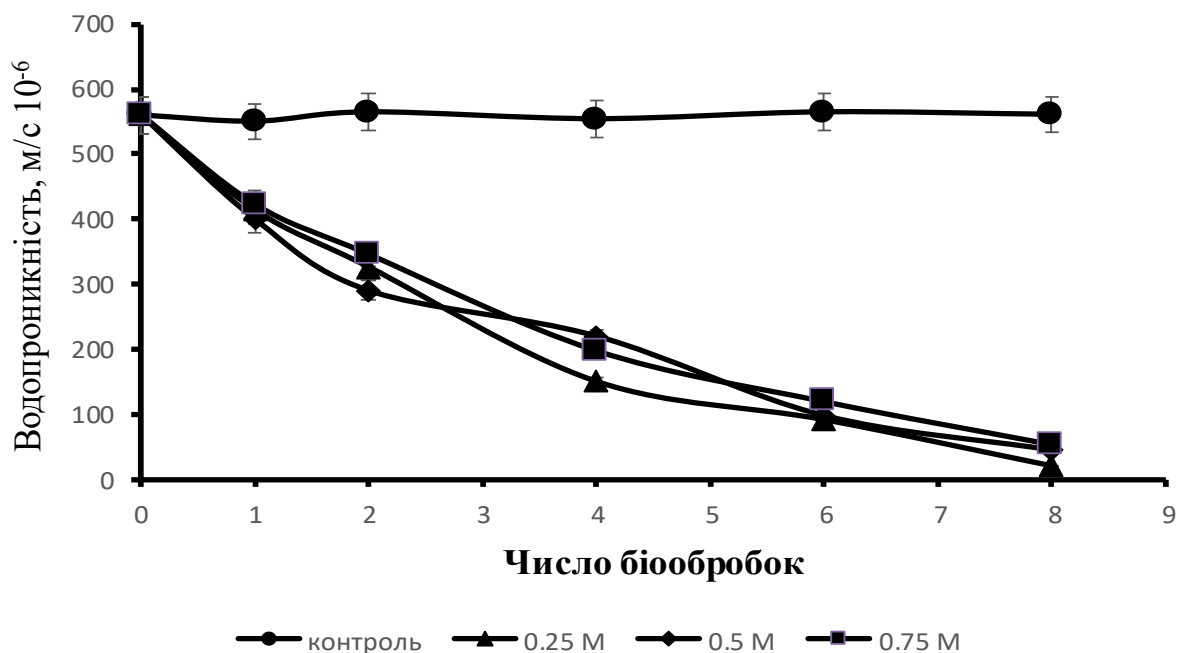


Рис. 3.10. Зміна водопроникності піску в процесі біоцементатації зі застосуванням гідролізату кісткового борошна та зниженої кількості сечовини (0,25 М; 0,5 М та 0,75 М), гідроліз якої проходив під дією інактивованих клітин бактерій – продуцентів кислої уреаз.

Пісок, який був біоцементований запропонованим методом, немає тієї міцності, як при звичайній біоцементатації за рахунок утворення карбонату кальцію, а його водопроникність знизилась лише до $2 \cdot 10^{-5}$ м/с, коли при біоцементатації вона зазвичай складає порядку $1 \cdot 10^{-6}$ м/с. Проводити більшу кількість біообробок недоцільно, але отримані дані дають змогу застосувати біоцементатацію такого типу для укріплення ґрунту з метою зниження його ерозії, наприклад після землетрусу, або для боротьби з пиловою ерозією для зниження атмосферного забруднення (Stabnikov та ін., 2013). Основною

перевагою цього методу – це можливість значно знизити на 75% викиди амонію та аміаку у довкілля. Отриманий біоцементований пісок показано на рис. 3.11.



Рис. 3.11. Пісок, після біоцементациї зі застосуванням гідролізату кісткового борошна та зниженої кількості сечовини (0,25 М), гідроліз якої проходив під дією інактивованих клітин бактерій – продуцентів кислої уреаз.

Таким чином, порівняно із загальноприйнятим методом біоцементациї на основі мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію, використання кісткового борошна як джерела кальцію при застосуванні кислотостійкої уреаз пропонує значні екологічні та економічні переваги, а саме: (а) зниження потрапляння до навколишнього середовища амонію і токсичного аміаку; (б) зниження витрат на матеріали, а також (в) вирішується проблема утилізації кісткових відходів для поліпшення якості ґрунту.

3.7. Висновки до розділу 3

1. Проведена селекція бактеріального штаму, що синтезував кислотну уреазу

серед бактерій, що були виділені з кислого ґрунту. Штам з найбільшою уреазною активністю було ідентифіковано за допомогою ампліфікації та секвенування гену *rRNA* як *Staphylococcus saprophyticus* AU1.

2. Вивчені фізіологічні властивості штаму: максимальна швидкість росту штаму AU1 становила $0,15 \text{ год}^{-1}$, максимальне накопичення біомаси – 6,9 г/л сухої біомаси, а максимальна уреазна активність була 8,1 мМ прогідролізованої сечовини/хв. Найвища уреазна активність у штаму *Staphylococcus saprophyticus* AU1 спостерігалася в інтервалі рН від 4,5 до 5,5, поступово знижуючись при підвищенні рН.

3. З метою забезпечення біобезпеки довкілля для біоцементатації запропоновано використання інактивованих бактеріальних клітин, які зберігали уреазну активність. Повна інактивація клітин спостерігалася при обробці клітин 0,5% розчином натрію додецилсульфату протягом 90 хвилин.

4. При біоцементатації в якості джерела кальцію використовували кісткове борошно, яке містить кальцій у формі гідроксиапатиту при зниженій кількості сечовини за допомогою кислої уреазы, а саме інактивованих бактеріальних клітин. Водопроникність біоцементованого піску була $2 \cdot 10^{-5} \text{ м/с}$, що дає змогу застосувати біоцементатацію такого типу для укріплення ґрунту з метою зниження його розрідження, наприклад після землетрусу, або для боротьби з пиловою ерозією для зниження атмосферного забруднення.

5. Основною перевагою цього методу – це можливість значно знизити на 75% витрати сечовини та знизити за рахунок цього викиди амонію та аміаку у довкілля. Крім того вирішується проблема утилізації кісткових відходів і зменшується вартість матеріалів на біоцементатацію.

РОЗДІЛ 4. МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ – БІОБЕЗПЕЧНІ ПРОДУЦЕНТИ КИСЛОТОСТІЙКОЇ УРЕАЗИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ

4.1. Вибір молочнокислих бактерій – продуцентів кислої уреаз

Молочнокислі бактерії широко використовуються у харчовій промисловості і біобезпека їх застосування не викликає жодного сумніву. Водночас в літературі є дані про здатність молочнокислих бактерій до синтезувати уреазу, які зберігали активність у кислому середовищі. Це стосується *Lactobacillus* sp., що синтезувала уреазу, котра була активна при кислому рН в діапазоні 2,0 – 4,0 (Fidaleo та ін., 2006; Ough та Trioli, 1988); *Lactobacillus fermentum* (Takebe та Kobashi, 1988); деяких штамів молочнокислих бактерій родів *Lactobacillus* або *Streptococcus* (Kakimoto та ін., 1992); штамів *Lactobacillus reuteri*, які синтезували уреазу, що була активна навіть при рН 3,5 (Wilson та ін., 2014) та рН 2,0 (Kakimoto та ін., 1990), та штаму молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* NZ8ure (Yang та ін., 2015). Тому проводилися дослідження можливості застосування як продуцентів кислої уреазу для біоцementeації саме молочнокислих бактерій (Удимович та Стабніков, 2020).

Оскільки лактобактерії є ауксотрофними мікроорганізмами, при їх вирощуванні треба використовувати збагачені поживні середовища з різноманітним складом як природного походження, так і синтетичного. Зазвичай при вирощуванні молочнокислих бактерій використовують такі поживні середовища як м'ясо-пептонне середовище (МРС) або глюкозо-пептонне середовище. Дороговартісне глюкозо-пептонне середовище потребує додавання макро- та мікроелементів і найчастіше використовується в лабораторних дослідженнях. Середовище МРС має всі необхідні сполуки для достатнього росту молочнокислих бактерій, але є дороговартісним, що не дає змоги його використовувати у промислових масштабах. Можливим поживним

середовищем для вирощування молочнокислих бактерій може бути капустяний бульйон або ж середовище на основі сухого знежиреного молока. Проводили відбір молочнокислих бактерій що мають уреазну активність при кислому рН для вирощування їх на живильному середовищі, яке б могло знайти використання у промисловому масштабі, а саме на знежиреному молоці.

Проводилась оцінка молочнокислих заквасок щодо наявності у них уреазної активності при їх вирощуванні на знежиреному молоці. Як джерело молочнокислих бактерій використовували комерційно доступні закваски та пробіотичні препарати. Ймовірними продуцентами кислої уреазу у складі досліджених заквасок були: *Lactobacillus reuteri* LR92 (пробіотик Ротен); *Streptococcus thermophilus* (Оптілакт Плюс); *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Фітнес ТМ «Milk Day»); *Streptococcus thermophilus* (Імпровіт йогурт); *Lactococcus lactis* (Біфідосан); *Streptococcus thermophilus* (Йогурт).

Зміни рН в середовищах з молочнокислими заквасками показані на Рис. 4.1 - 4.3.

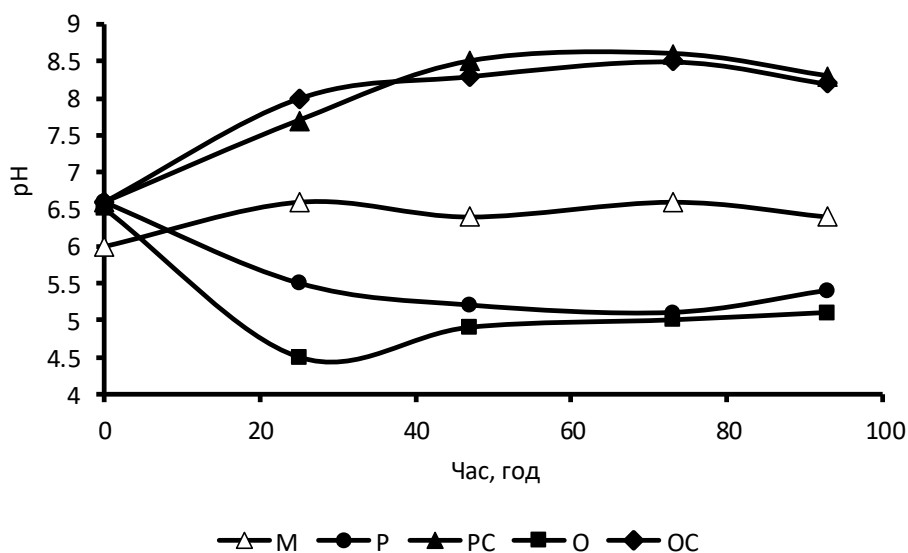


Рис. 4.1. Зміни рН у зразках: контроль (молоко, М, Δ); Ротен (Р, ●); Ротен+сечовина (МРС, ▲); Оптілакт (МО, ■); Оптілакт+сечовина (МОМ, ◆).

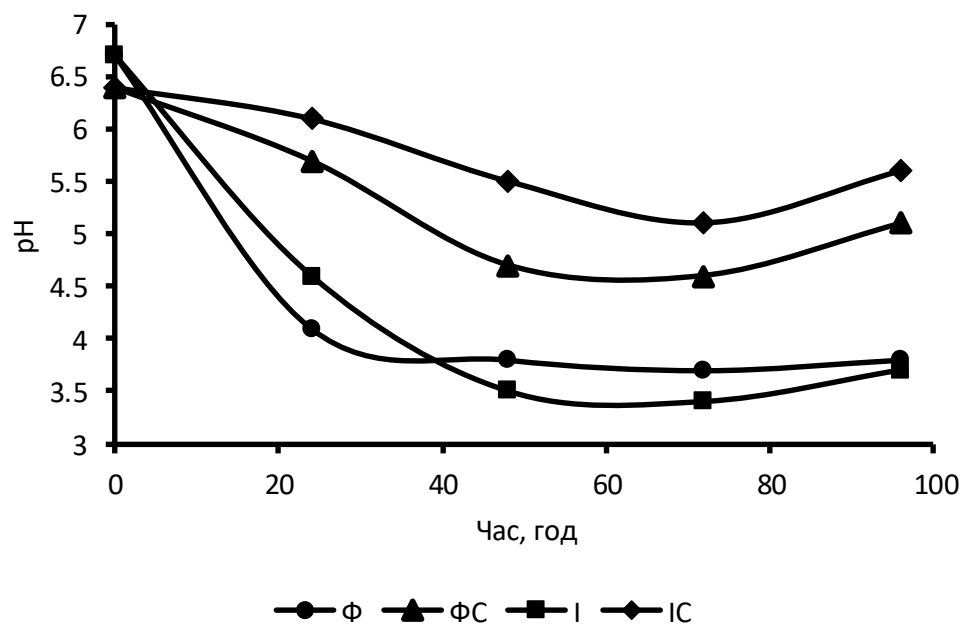


Рис. 4.2. Зміни рН у зразках: Фітнес (Ф, ●); Фітнес+сечовина (ФС, ▲); Імпровіт (І, ■); Імпровіт +сечовина (ІС, ◆).

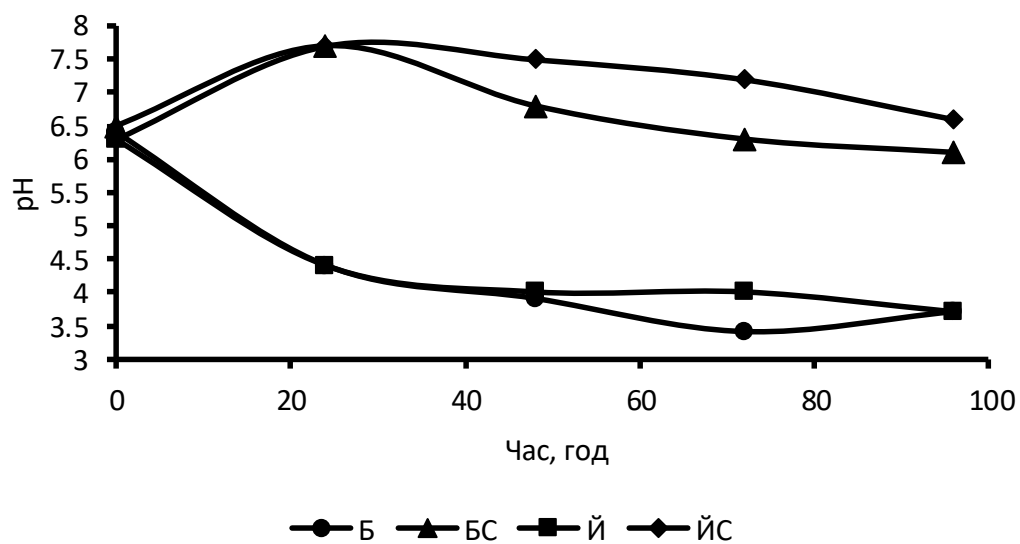


Рис. 4.3. Зміни рН у зразках: Біфідосан (Б, ●); Біфідосан +сечовина (БС, ▲); Йогурт (Й, ■); Йогурт +сечовина (ЙС, ◆).

Зміни рН в контролі (молоко без закваски) не відбувалося, залишаючись із середнім значенням 6,5, в той час як рН в молоці із заквасками знижувалося і досягало до 72 години інкубації в колбах з Ротен - 5,1, Оптілакт - 5,0, Фітнес - 3,7, Імпровіт - 3,4, Біфідосан - 3,4, і Йогурт - 4,0. Подальше деяке підвищення рН до 96 годинах було викликано, найімовірніше, частковим лізисом бактеріальних клітин. В колбах, в які було внесено розчин сечовини, значення рН до 72 години інкубації склали: з Ротен - 8,6, Оптілакт - 8,5, Фітнес - 4,6, Імпровіт - 5,1, Біфідосан - 6,3, і Йогурт - 7,2.

Згідно з отриманими даними досліджені закваски молочнокислих бактерій мали різну уреазну активність. рН не змінювалось у контрольних зразках молока із сечовиною, рН знижувалося у зразках молока із внесеними заквасками і підвищувалося у зразках молока із заквасками при додаванні сечовини, що свідчить про наявність уреазної активності у молочнокислих бактерій, які розкладають сечовину і, внаслідок вивільнення іонів амонію, підвищується рН середовища. Для подальших досліджень було обрано препарати «Ротен» (*Lactobacillus reuteri* LR92, він же *L. reuteri* DSM 26866) (Pourmirzaiee та ін., 2020) та «Оптілакт Плюс» (*Streptococcus thermophilus*).

4.2. Вибір середовища для культивування молочнокислих бактерій для синтезу кислої уреаз

При культивуванні молочнокислих бактерій на молоці утворюється згусток, що ускладнює виділення мікробної біомаси для використання при біоцементатії в якості джерела уреаз. На практиці для вирощування молочнокислих бактерій застосовують капустяний бульйон (КБ) (Удимович, 2021а). Проводили визначення можливості культивування продуцентів кислої уреаз на капустяному бульйоні у порівнянні зі знежиреним молоком (Рис. 4.4).

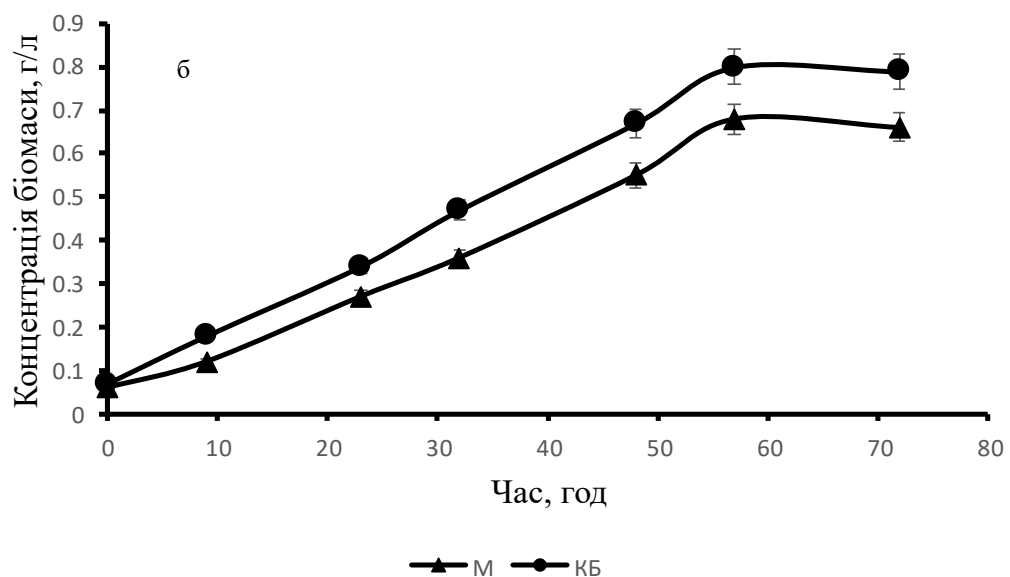
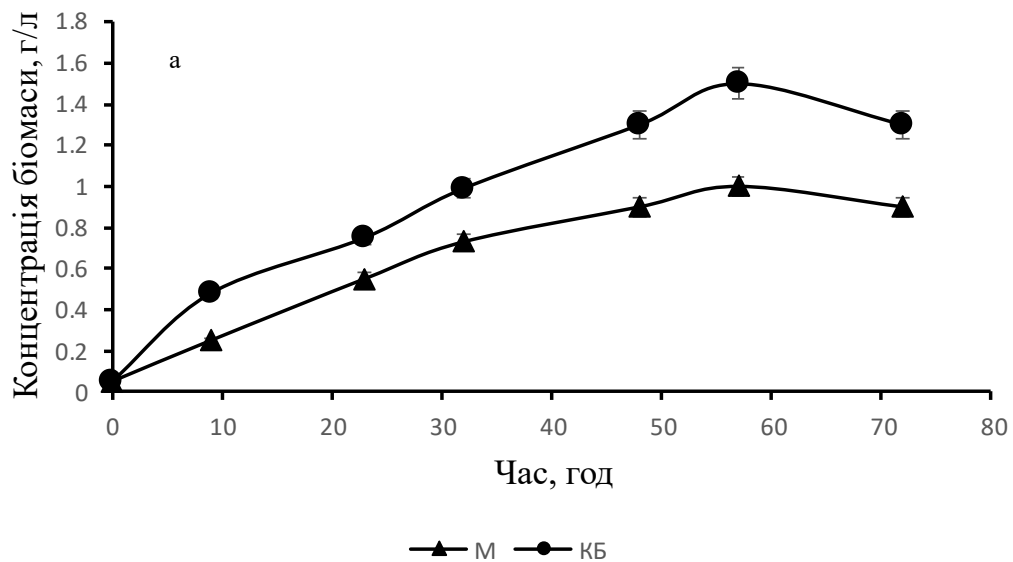


Рис. 4.4. Ріст молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* на знежиреному молоці (М) та капустяному бульйоні (КБ).

Як видно, капустяне середовище навіть краще відповідало потребам молочнокислих бактерій і концентрація біомаси була вище при культивуванні його з використанням як бактерій *Lactobacillus reuteri*, так і *Streptococcus thermophilus*. Накопичення біомаси було трохи вище у *Lactobacillus reuteri* ніж у *Streptococcus thermophilus*.

4.3. Залежність активності уреаз, що синтезуються *Lactobacillus reuteri*, від рН середовища

Перевірка активності уреаз, що синтезувалася *Lactobacillus reuteri* проводилася додавання клітин молочнокислих бактерій до 1М розчину сечовини, рН якої коригувалася 1 N HCl. Згідно з результатами найвища уреазна активність спостерігалася при значенні рН 5,0 (Рис. 4.6), що узгоджується з даними, які були отримані для *Lactobacillus fermentum* (Kakimoto та ін. 1990) та *Lactococcus lactis* (Yang та ін., 2014).

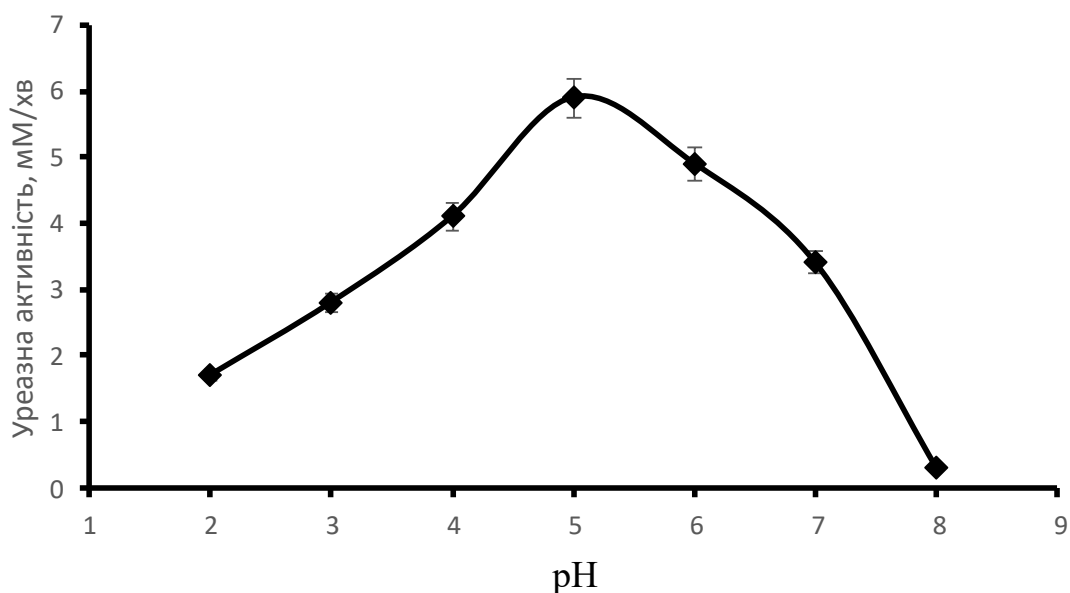


Рис. 4.6. Активність уреаз *Lactobacillus reuteri* залежно від рН середовища.

Уреаза *Lactobacillus reuteri* була активна в діапазоні рН від 3,0 до 7,0 (уреазна активність була 4.1 мМ/хв та 3.4 мМ/хв відповідно), її значення різко падало при рН вище 7,0 і складало 0.3 мМ/хв при рН 8,0. Максимальна уреазна активність, 5,9 мМ/хв, спостерігалася при рН 5,0.

4.4. Показники росту на уреазній активності *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* при культивуванні на капустяному бульйоні

Наступним етапом було порівняння максимальної активності уреазы при рості цих двох культур на капустяному бульйоні при коригуванні рН на рівні 5,0 (Рис. 4.5).

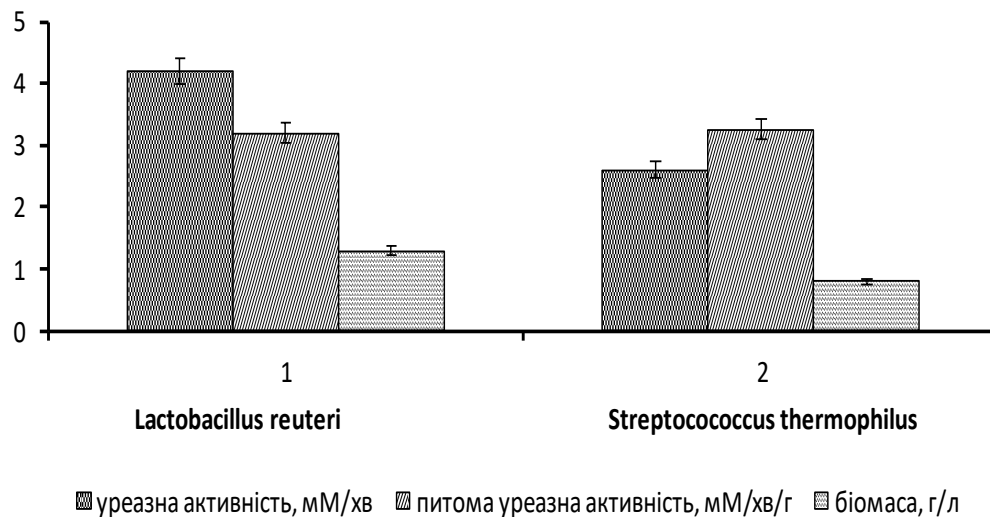


Рис. 4.6. Показники росту та уреазної активності *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* при культивуванні на капустяному бульйоні.

Показники росту та уреазної активності визначалися на 72 годину вирощування молочнокислих бактерій на капустяному бульйоні. Уреазна активність бактерій *Lactobacillus reuteri* складала 4,2 мМ/хв, що було на 61,5 % вище ніж у *Streptococcus thermophilus*, а концентрація біомаси, г абсолютно сухої біомаси на л культуральної рідини була 1,3, що на 62,5 % вище ніж у *Streptococcus thermophilus*. Питома уреазна активність у двох досліджуваних культур була майже однаковою: 3,20 мМ/хв/г та 3,25 мМ/хв/г у *L. reuteri* та *S. thermophilus* відповідно. Отже, показники як росту, так і накопичення уреазної активності, в цілому, були кращі у *Lactobacillus reuteri*, тому для подальших досліджень було обрана саме ця культура молочнокислих бактерій.

Кислу уреазу, що продукують молочнокислі бактерії, для біоцементатії можливо використовувати у вигляді: (а) безпосередньо культуральна рідина з

живими клітинами молочнокислих бактерій; (б) живі клітини молочнокислих бактерій, що були виділені центрифугуванням, седиментацією, флокуляцією або фільтрацією; (в) висушеної культуральної рідини або висушених клітин уреаз-продукуючих бактерій.

4.5. Біоцементация піску з використанням кісткового борошна як джерела кальцію та біомаси продуцента кислої уреаз *Lactobacillus reuteri*

Біоцементацию піску із застосуванням в якості джерела кальцію кісткового борошна, а як джерела кислої уреаз біомаси молочнокислих бактерій, проводили за планом, який описано у розділі 3.6. Молярне співвідношення кальцію до сечовини було 0,25, тобто на 75% менше, ніж при традиційному мікробно-ініційованому осадженні карбонату кальцію, що дало змогу зменшити викиди амонію та аміаку у навколишнє середовище. Ефективність процесу біоцементации оцінювали по зміні водопроникності піску після 8 поетапних біообробок (Рис. 4.7).

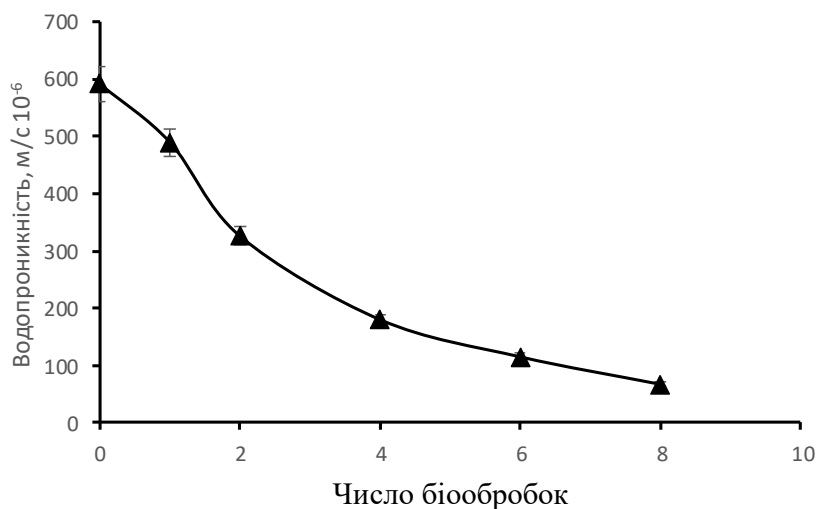


Рис. 4.7. Зміна водопроникності піску в процесі біоцементации зі застосуванням гідролізату кісткового борошна та зниженої кількості сечовини (0,25 М), гідроліз якої проходив під дією молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* – продуцентів кислої уреаз.

Як і при біоцементациі кислою уреазою бактерією *Staphylococcus saprophyticus* (розділ 3.6), пісок після 8 біообробок молочнокислими бактеріями мав схожу водопроникність $6 \cdot 10^{-5}$ м/с. Тому цей спосіб біоцементациі можна застосувати лише для укріплення ґрунту або для боротьби з пиловою ерозією. Основною перевагою цього методу – це можливість значно знизити на 75% викиди амонію та аміаку у довкілля, та повна біобезпека за рахунок застосування молочнокислих бактерій пробіотичного призначення.

4.6. Висновки до розділу 4

1. Показана здатність молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* до синтезу кислої уреазы, що робить їх перспективними мікробними агентами у процесах біоцементациі.

2. Показана можливість отримання біомаси молочнокислих бактерій – продуцентів кислої уреазы на капустяному бульйоні та вивчені особливості її дії залежно від рН середовища. Максимальна уреаза активність бактерій *Lactobacillus reuteri* спостерігалася при рН 5,0.

3. Біобезпечні молочнокислі бактерії *Lactobacillus reuteri* та *Streptococcus thermophilus* продукують уреазы, які можуть бути активними в кислих умовах і можуть знайти використання для проведення біобезпечного укріплення ґрунтів, що дозволяє крім того запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку у довкілля.

4. Оскільки водопроникність піску при проведенні біоцементациі з використанням кісткового борошна в якості джерела кальцію при застосуванні кислої уреазы молочнокислих бактерій після 8 біообробок мав водопроникність $6 \cdot 10^{-5}$ м/с, цей спосіб біоцементациі можливо застосувати лише для укріплення ґрунту або для боротьби з пиловою ерозією.

РОЗДІЛ 5. НАСІННЯ РОСЛИН - БІОБЕЗПЕЧНІ ДЖЕРЕЛА УРЕАЗИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ

5.1. Вибір рослини, насіння якої можуть бути застосовані в Україні як безпечні джерела уреази для біоцементації

Для отримання біоцементу більшість дослідників використовують бактеріальну біомасу з уреазною активністю оскільки застосування ферменту уреази є дороговартісним. Можливою заміною бактеріальної уреази може бути уреаза рослинного походження (Dilruksh та Kawasaki, 2016; Ivanov та ін., 2019).

Основна роль уреаз у рослин полягає в тому, щоб дозволити організму використовувати сечовину як джерело азоту. Відомо, що декілька сімейств звичайних рослин дуже багаті на уреазу, у тому числі окремі сорти квасолі, дині та гарбуза, та навіть сімейства соснових (Das та ін., 2002). Відомо використання jack bean (боби джек) (*Canavalia ensiformis* та *Canavalia adans*) для промислового отримання рослинної уреази (Kakimoto та ін., 1992). Існують дослідження, де в якості вихідного матеріалу, що мають уреазну активність, вивчаються листя рослин, а не їх насіння, наприклад листя шовковиці (*Morus alba*) (Hirayama та ін., 2000), листя пшениці та сої (Hogan та ін., 1983). Кожна уреаза, що виділена із рослин, має свої відмінності та умови для оптимальної активності. Наприклад, максимальна каталітична активність уреази з бобів джека проявляється при 65°C та значеннях pH в межах 6,0-7,0 (Dilruksh та Kawasaki, 2016); уреаза, що була виділена з насіння нуту (*Cicer arietinum* L.) мала максимальну активність при температурі 55°C та pH 7,2 (Pervin та ін., 2013), а з насіння гороху (*Pisum Sativum* L) при 40°C та pH 7,5 (El-Hefnawy та ін., 2014).

Для дослідження було обрано насіння сільськогосподарських культур, які вирощуються в Україні. Проводили вимірювання уреазної активності в екстрактах пророщеного насіння з паростками, а також саме у паростках, які

були відділені від насіння. Уреазна активність деяких рослинних матеріалів наведена у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1. Уреазна активність пророщеного насіння та паростків сільськогосподарських рослин

Рослина	Уреазна активність, мМ прогідролізованої сечовини/хв·г	
	пророщене насіння	паростки
Сочевиця зелена	0,29	0,31
Гарбуз	0,23	Н/В*
Квасоля біла	0,26	0,24
Квасоля чорна	0,29	0,20
Соя	0,84	0,55
Кавун	0,54	0,43
Диня	0,56	0,39

* Н/В – не визначали.

Уреазна активність пророщеного насіння була декілька вище, ніж у паростків. За рівнем синтезу уреазы пророщене насіння досліджуваних рослин розташовувалося наступним чином: насіння сої, дині, кавуна, сочевиці зеленої, квасолі чорної, квасолі білої та гарбуза. Пророщене насіння сої показало найвищу уреазну активність. Уреазну активність пророщеного насіння дині, сочевиці зеленої, квасолі чорної, квасолі білої та гарбуза складала 66%, 64%, 35%, 35%, 31% та 27% від уреазної активності пророщеного насіння сої відповідно.

5.2. Вибір форми, в якій доцільно використовувати уреазу насіння для біоцементації

В роботі японських вчених найвищу уреазну активність серед різного насіння показало насіння кавуна (Dilruksh та Kawasaki, 2016). В наших дослідях

найвищу уреазну активність серед досліджуваних рослинних матеріалів показало пророщене насіння сої, 0,84 мМ прогідролізованої сечовини/хв·г. Це значення нижче активності уреаз-продукуючих бактерій, які зазвичай застосовуються в процесах біоцементації, але для біоукріплення ґрунтів, для боротьби з вітровою чи пиловою ерозією їх використання є доцільним, оскільки показано, що поверхнева обробка забрудненого ґрунту малими дозами біоцементу ефективна для контролю його вітрової та водної ерозії і значно зменшує виділення пилу, а також бактеріального і хімічних забруднювачів у довкілля (Нао та ін., 2021; Namdar-Khojasteh та ін., 2022; Stabnikov та ін., 2013б). Тим більш, вважається, що при біоцементації висока уреазна активність не є необхідною, оскільки процес утворення кристалів карбонату кальцію повинен проходити повільно, послідовно заповнюючи пори та порожнини у матеріалі, що цементується (Ivanov та Stabnikov, 2017).

Для встановлення характеру накопичення уреаз в рослинній біомасі проводили пророщення соєвих бобів та відбирали зерна на 24, 72 та 96 годин пророщення. Значення уреазної активності визначали як у подрібненому вихідному насінні, гомогонезованій масі насіння разом з проростками та в водному екстракті, який отримували після видалення суспендованої маси центрифугуванням. Для приготування екстрактів використовували різну кількість гомогонезованої маси насіння з проростками, а саме у пропорціях, г маси до 10 мл дистильованої води: 1 (10%); 2 (20 %) та 4 (40 %).

Отримані дані відносно уреазної активності гомогонезованої маси пророщеного насіння сої та екстракту, отриманого після видалення рослинної маси центрифугуванням наведено на Рис. 5.1.

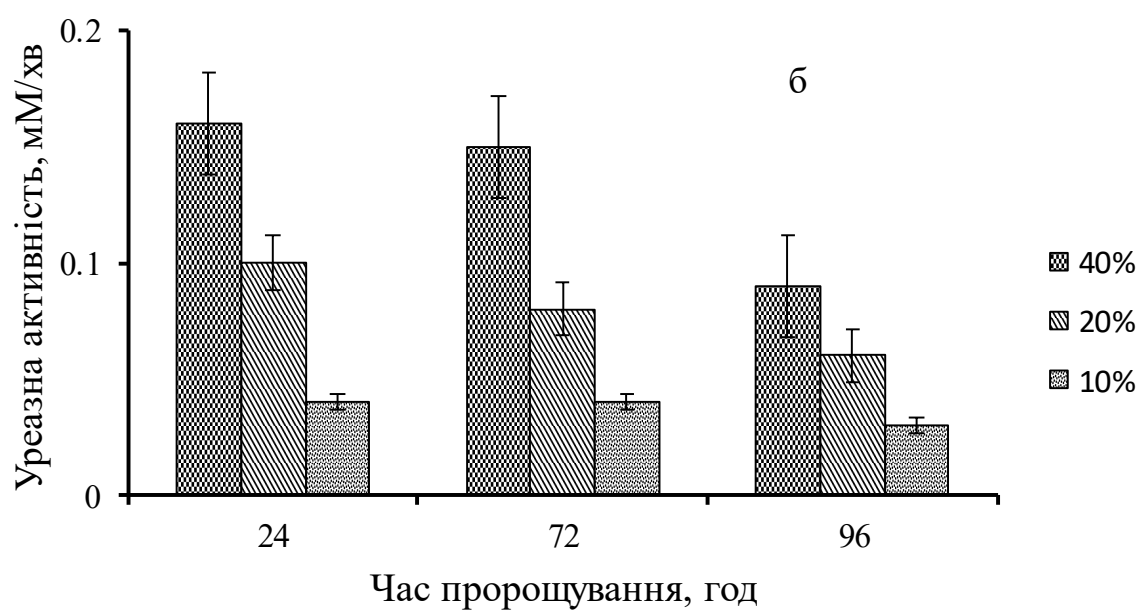
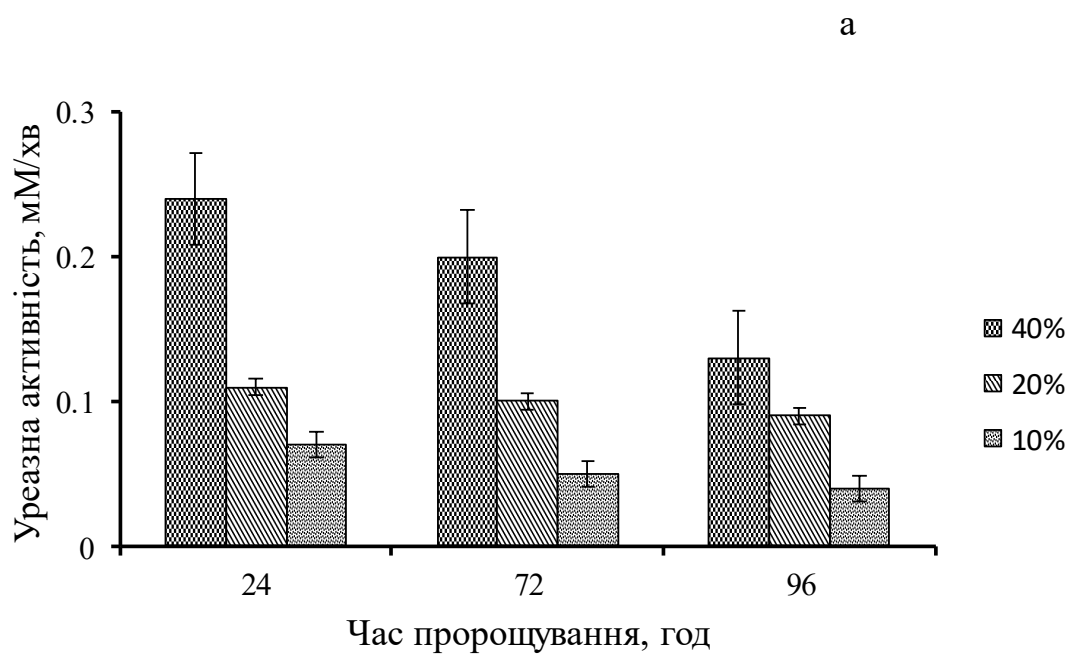


Рис. 5.1. Уреаза активність гомогенозованої маси пророщеного насіння сої (а) та екстракту, отриманого після видалення рослинної маси центрифугуванням (б).

Як видно з наведених даних уреазна активність гомогенізованої маси вище ніж активність чистих екстрактів і активність як гомогенізованої маси, так і в екстракті вище на початку пророщування. Так, не спостерігалось значної зміни активності при пророщуванні 24 – 72 години, але вона зменшилася на 30 - 80 % на 96 годину пророщування. При пророщуванні гороху (*Cicer arietinum* L.) була виявлена інша закономірність – уреазна активність підвищувалася у пророщеному насінні і була максимальною в екстракті на 192 годину пророщування, 0,03 мМ/мл, а потім знижувалася (Pervin та ін., 2009).

Зміна питомої активності гомогенізованої маси сої та екстракту залежно від часу пророщування наведена у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2. Питома уреазна активність гомогенізованої маси сої та екстракту залежно від часу пророщування

Маса насіння, взятого для приготування екстракту, г/100 мл	Питома уреазна активність, мМ/хв•г		
	Час пророщування, год		
	24	72	96
Гомогенізована маса			
40	0,6 ± 0.05	0,5 ± 0.03	0,3 ± 0.02
20	0,6 ± 0.03	0,5 ± 0.02	0,5 ± 0.02
10	0,7 ± 0.05	0,5 ± 0.05	0,4 ± 0.03
Екстракт			
40	0,4 ± 0.02	0,4 ± 0.02	0,2 ± 0.01
20	0,5 ± 0.05	0,4 ± 0.04	0,3 ± 0.01
10	0,4 ± 0.01	0,4 ± 0.04	0,3 ± 0.02

Питома уреазна активність залишалася майже постійною протягом 24 – 72 годин пророщування і знижувалася на 96 годину. В порівнянні з літературними даними відносно уреазної активності рослин можна вважати питому уреазну

активність екстракту з насіння сої відносно високою. Наприклад уреазна активність вихідного екстракту з листя шовковиці (*Morus alba* L.), яку використовували для отримання очищеної рослинної уреазы складала 0,064 мМ/хв (Hirayama та ін., 2000), а активність екстракту насіння гарбуза, який використовували у роботі (Al Imran та ін., 2021), складала 0,01 мМ/хв.

Згідно отриманих даних гомогенізована маса насіння мала вищу уреазну активність ніж чистий екстракт, але внесення великої маси рослинного матеріалу при біоцементатії може завадити протіканню процесу, тому можливість застосування гомогенізованої маси, в подальшому неочищений екстракт, треба було перевіряти експериментально.

5.3. Перевірка можливості застосування неочищених екстрактів із насіння сої як джерела уреазы для осадження карбонату кальцію

Для підтвердження можливості використання уреазы насіння сої для біоцементатії проводили осадження CaCO_3 із розчину хімічних сполук, які застосуються для мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію, а саме суміші еквімолярних розчинів CaCl_2 та сечовини, при додаванні водних екстрактів із насіння сої чи з пророщеного насіння сої.

У пропіленові трубки вносили по 20 мл суміші еквімолярних розчинів CaCl_2 та сечовини з різною молярною концентрацією (таблиці 5.3 та 5.4). Готували 10 % екстракти (2,5 г на 25 мл) із насіння сої та пророщеного насіння сої без центрифугування, додавали у кількості 5 мл на трубку і інкубували при 30°C протягом 48 годин. Частину трубок переносили на лабораторний шейкер при 150 об/хв і перемішували протягом 4 годин кожную добу. Осадження карбонату кальцію визначали візуально (Рис. 5.2) та титруванням з індикатором еріохромом чорним (таблиці 5.3 та 5.4).

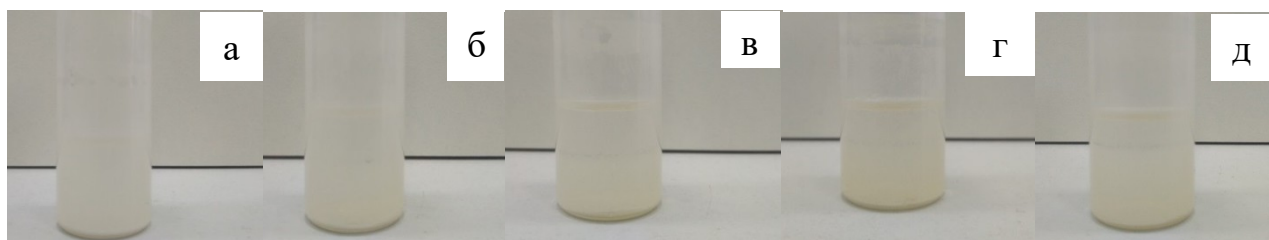


Рис.5.2. Осадження карбонату кальцію при використанні уреазі з пророщеного насіння сої при перемішуванні в еквімолярних розчинах хлористого кальцію та сечовини, М: а- 0,3; б – 0,5; в – 0,7; г – 1,0; д – 1,5.

Таблиця 5.3. Осадження кальцію при використанні неочищених екстрактів з насіння сої (без перемішування)

CaCl ₂ : Сечовина	Початкова концентра- ція Ca ²⁺ , г/л	Осаджений Ca ²⁺ при використанні екстракту з			
		насіння		пророщеного насіння	
		г/л	%	г/л	%
0,3 М:0,3 М	12	11,87	98,92	11,78	98,17
0,5 М:0,5 М	20	16,04	80,2	17,10	85,5
0,7 М:0,7 М	28	17,35	61,96	19,23	68,68
1,0 М:1,0 М	40	21,18	52,95	22,32	55,80
1,5 М:1,5 М	60	23,47	39,12	24,79	41,32

Концентрацію розчиненого кальцію в надосадовій рідині визначали титрування з індикатором еріохромом чорним. По різниці між початковим (розрахунковим) вмістом кальцію та залишковим у розчині визначали кількість осадженого кальцію та розраховували відсоток осадження (таблиці 5.3 та 5.4). Як видно осадження кальцію відбувалося краще при застосуванні неочищених екстрактів із пророщеного насіння і при проведенні періодичного перемішування розчинів, але ця різниця була незначною і складала не більше ніж декілька відсотків.

Таблиця 5.4. Осадження кальцію при використанні неочищених екстрактів з насіння сої (з перемішуванням)

CaCl ₂ : Сечовина	Початкова концентра- ція Ca ²⁺ , г/л	Осаджений Ca ²⁺ при використанні екстракту з			
		насіння		пророщеного насіння	
		г/л	%	г/л	%
0,3 М:0,3 М	12	10,63	88,58	11,92	99,30
0,5 М:0,5 М	20	10,35	51,75	17,67	88,35
0,7 М:0,7 М	28	13,69	48,89	29,19	72,11
1,0 М:1,0 М	40	22,12	55,3	23,73	59,33
1,5 М:1,5 М	60	25,81	41,68	25,21	42,02

Кількість осадженого кальцію збільшувалася при підвищенні його початкового значення, але відсоток видалення, навпаки, зменшувався. Тому при проведенні поетапного біоукріплення ґрунту чи біоцементзації не варто використовувати еквімолярні співвідношення хлористого кальцію та сечовини вище 1,5.

5.4. Біоцементация піску з використанням уреазі рослинного походження

Для біоцементзації використовували просіяний через металеве сито з діаметром отвору 0,5 мм річковий пісок. Характеристика піску наведена в розділі 3.6.

Saruto (2004) 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. Коефіцієнт водопроникності (кількість води, що проходить) доцільно використовувати зазвичай для пористих середовищ. Біоцементацию просіяного піску проводили у шприцах довжиною 10 см та діаметром 3 см. В кожний

шприц засипали пісок в кількості 60 г. Як джерело уреазі використовували неочищені екстракти з насіння та пророщеного насіння. Ефективність біоцементзації оцінювали по зміні водопроникності обробленого піску. Нульовою точкою слугувала швидкість проходу воду у піску перед початком біоцементзації. Циклів біоцементзації було 8 і вони склалися з наступних етапів: повільна подача неочищеного екстракту, 10 мл; витримка протягом 2 годин; подача розчинів кальцій хлористого та сечовини з різним співвідношенням CaCl_2 : сечовина, а саме: 0,5 М : 0,5М; 0,7 М : 0,7 М; 1,5 М : 1,0 М. Після кожної біоцементзації пісок витримували 24 години для випадіння кристалів карбонату кальцію і проводили визначення водопроникності піску. Результати представлені на рис. 5.3 та 5.4.

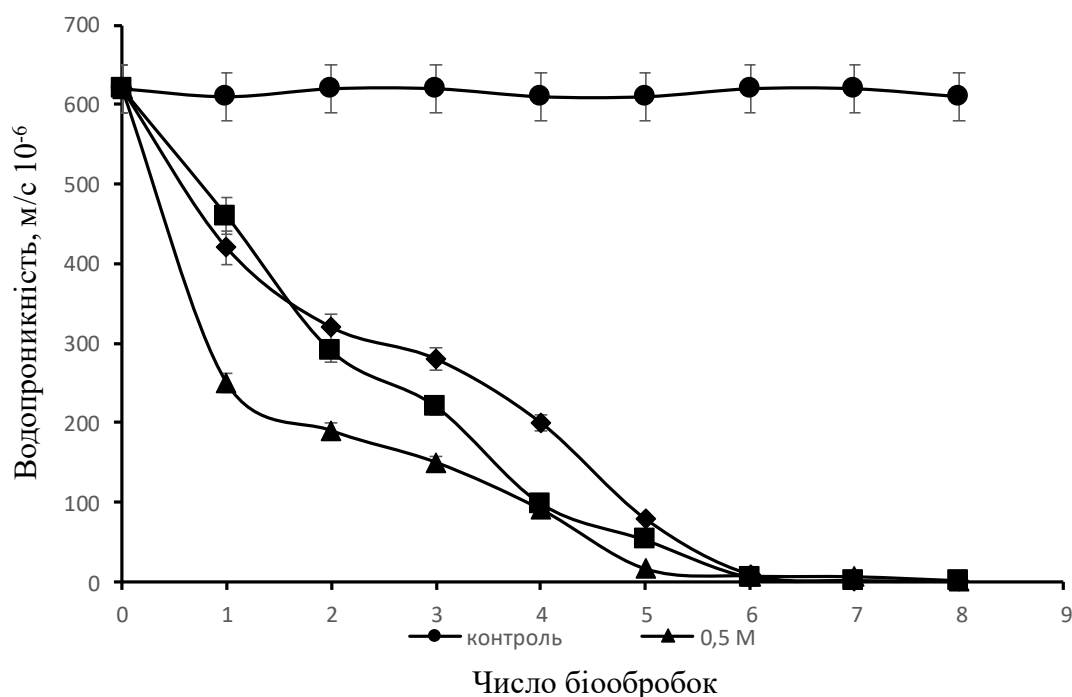


Рис. 5.3. Зміна водопроникності біоцементованого піску при використанні екстракту з пророщеного зерна: ● - контроль; ▲ - пісок, який оброблявся 0,5 М розчином сечовини та кальцію хлористого; ■ - пісок, який оброблявся 1,0 М розчином сечовини та кальцію хлористого; ◆ - пісок, який оброблявся 1,5 М розчином сечовини та 1 М розчином кальцію хлористого.

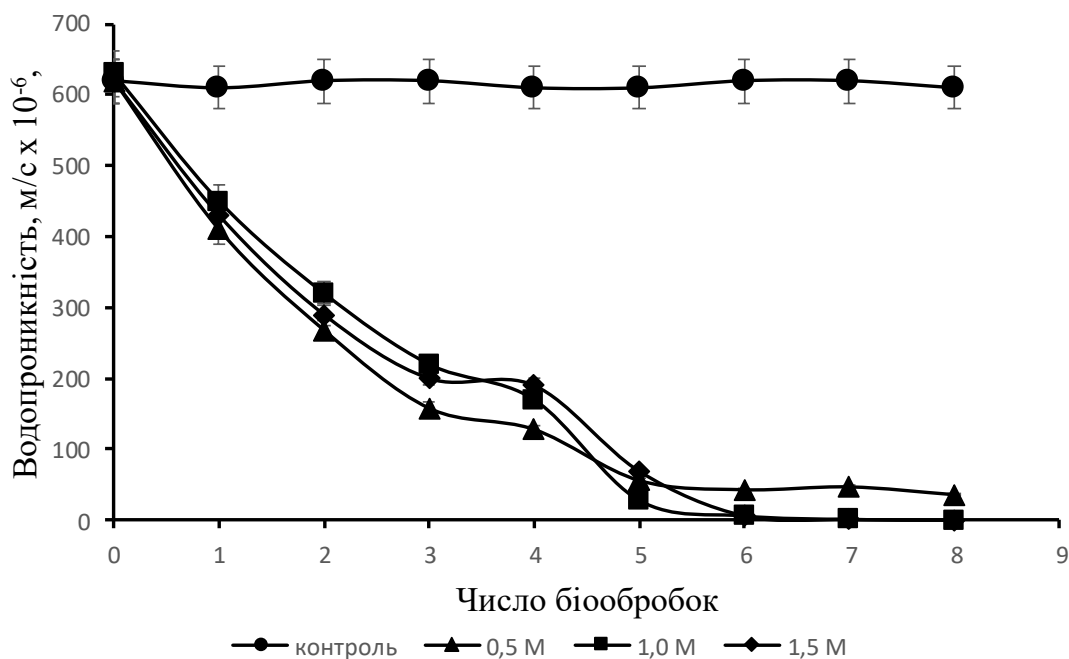


Рис. 5.4. Зміна водопроникності біоцементованого піску при використанні екстракту з непророщеного зерна: ● - контроль; ▲ - пісок, який оброблявся 0,5 М розчином сечовини та кальцію хлористого; ■ - пісок, який оброблявся 1,0 М розчином сечовини та кальцію хлористого; ◆ - пісок, який оброблявся 1,5 М розчином сечовини та 1 М розчином кальцію хлористого.

В цілому, при біоцементзації піску рослинною уреазою водопроникність знизилася з $6 \cdot 10^{-4}$ м/с до $1 \cdot 10^{-6}$ м/с, тобто знижувалась у 600 разів. Отримані значення відповідають швидкостям просочування піску, біоцементованого за допомогою традиційно застосовуваних уреаз-продукуючих бактерій (Ivanov та Stabnikov, 2017), а також зі швидкостями просочування з реально існуючих ставків для розведення аквакультур (Teichert-Coddington та ін., 1988, 1989; Weisburd та Laws, 1990). Таким чином, видно, що за рахунок дії рослинної уреазы в результаті утворення карбонату кальцію, CaCO_3 , відбувається заповнення пор в сипучому піску, зв'язування частинок піску, зниження водопроникаючої здатності та, як наслідок, підвищення їх міцності. Подібні результати були отримані в роботі японських вчених (Al Imran та ін., 2021), які

використали подрібнене і змішане насіння кавуна (як сухе, так і пророщене) як джерело ферменту уреазы для біоцементатії піску при нейтральному рН (~7) та температурних умовах (30 °C).

Біоцементатія при використанні неочищеного екстракту з насіння сої проходила якнайшвидше при використанні низькоконцентрованих розчинів кальцій хлориду та сечовини і водопроникності, але оптимальним необхідно вважати використання 1М розчинів, що забезпечувало більш низьку остаточну водопроникність зразків піску. Фотографії біоцементованого піску показані на рис 5.5.

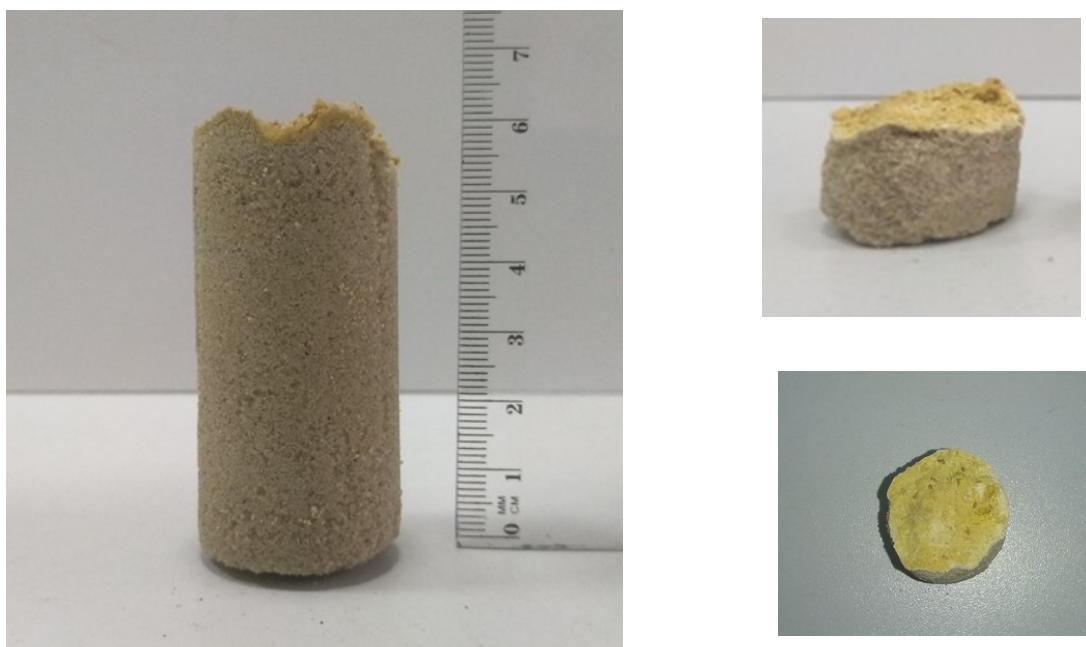


Рис. 5.5. Пісок після біоцементатії з використанням уреазы насіння сої.

Переваги цього методу проведення біоцементатії незаперечні: (а) відпадає потреба у вирощуванні мікробного продуцента, тобто технологія значно спрощується; (б) неочищений екстракт можна приготувати безпосередньо перед його застосуванням; (в) вартість процесу біоцементатії значно знижується, оскільки немає потреби в поживному середовищі для вирощування

бактерій, витрат електроенергії на аерацію в процесі вирощування, використання висококваліфікованого персоналу для отримання мікробної біомаси з уреазною активністю; (д) повністю вирішується одна із важливих проблем біоцементатації – у довкілля не надходять клітини продуцента уреаз, а водний розчин гомогенізованої рослинної біомаси не потребує додаткових визначень його біобезпеки. Цей метод біоцементатації може знайти застосування як екологічно чистий та стійкий метод для вирішення численних геотехнічних завдань, таких як наприклад, зміцнення ґрунту, ліквідація наслідків розрідження ґрунту при землетрусах, для захисту ґрунтів від ерозії, атмосфери від пилу, тощо.

5.5. Висновки до розділу 5

1. Скринінг насіння сільськогосподарських культур, які вирощуються в Україні, показав, що боби сої можливо використовувати як джерело уреаз для біоцементатації у вигляді неочищеного водного екстракту із подрібненої маси самого насіння або пророщеного протягом 24 – 48 годин.

2. Застосування неочищеного екстракту із насіння сої показало його ефективність для осадження карбонату кальцію із суміші розчинів кальцій хлориду та сечовини.

3. Використання неочищеного екстракту сої при біоцементатації піску дозволило знизити його водопроникність у 6000 разів і отримати значення, які відповідають швидкостям просочування піску, біоцементованого за допомогою традиційно використовуваних уреаз-продукуючих бактерій.

ВИСНОВКИ

1. В роботі розроблено підходи до створення біобезпечної біоцементациї за рахунок використання біобезпечних джерел уреаз та зниження викидів амонію та аміаку у довкілля при проведенні біоцементациї в умовах кислотного середовища.
2. Проведена селекція, ідентифікація та вивчення фізіологічних властивостей штаму бактеріального штаму *Staphylococcus saprophyticus* AU1, що синтезував кислу уреазу.
3. З метою забезпечення біобезпеки довкілля для біоцементациї запропоновано використання інактивованих клітин штаму AU1. Для інактивації клітини обробляють 0,5% розчином натрію додецилсульфату протягом 120 хвилин, при чому уреазна активність клітин зберігається.
4. Використання кислої уреаз у вигляді інактивованих бактеріальних клітин *Staphylococcus saprophyticus* AU1 дозволяє проводити біоцементацию при застосуванні в якості джерела кальцію кісткового борошна при зниженій кількості внесеної сечовини. Біоцементация такого типу може бути застосована для укріплення ґрунту з метою зниження його розрідження або для боротьби із пиловою ерозією для зниження атмосферного забруднення.
5. Основною перевагою цього методу – це можливість значно знизити на 75% витрати сечовини та знизити за рахунок цього викиди амонію та аміаку у довкілля. Крім того вирішується проблема утилізації кісткових відходів і зменшується вартість матеріалів на біоцементацию.
6. В якості повністю біобезпечного продуцента кислої уреаз запропоновано використання молочнокислих бактерій *Lactobacillus reuteri*. Вивчені особливості її вирощування та уреазної активності залежно від рН середовища. Максимальна уреазна активність бактерій *Lactobacillus reuteri* спостерігалася при рН 5,0.

7. Біобезпечні молочнокислі бактерії *Lactobacillus reuteri* можуть знайти використання для проведення укріплення ґрунтів, що дозволяє запобігти утворенню вільного амонію та вивільнення аміаку у довкілля.

8. Проведено скринінг насіння сільськогосподарських культур, які вирощуються в Україні. Показано, що боби сої як біобезпечне джерело уреаз, можливо використовувати для біоцементації у вигляді неочищеного водного екстракту із подрібненої маси самого насіння або пророщеного протягом 24 – 48 годин.

9. Використання неочищеного екстракту насіння сої при біоцементації піску дозволило знизити його водопроникність у 6000 разів. Ці значення відповідають швидкостям водопровідності піску біоцементованого за допомогою традиційно застосовуваних уреаз-продукуючих бактерій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

Стабніков, В.П. (2012). Біотехнологія будівельних процесів і матеріалів. *Наукові Праці НУХТ*, 47, 29–31.

Стабніков В.П. (2014). Виділення та характеристика українського штаму уреаз-продукуючих бактерій для біотехнологічного виробництва біозакріплювача ґрунту. *Наукові праці НУХТ*, 20(1), 24–29.

Стегній, Б.Т., Куцан, О.Т., Герілович, А.П., Головка, А.М., Рубленко, М.В. & Бісюк, І.Ю. (2010). Біобезпека та біозахист: Світовий досвід, проблеми в Україні та шляхи їх вирішення. *Ветеринарна Медицина*, 94, 5–12.

Удимович, В.М. & Стабніков, В.П. (2020). Молочнокислі бактерії як продуценти кислої уреаз. Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції: матеріали ІХ Міжнародної науково-технічної конференції. Київ: НУХТ.

Удимович, В.М. (2021а). Молочнокислі бактерії як продуценти уреаз. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(3), 25-31. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-3-5>

Удимович, В.М. (2021б). Застосування біоцементациї в контексті вирішення екологічних питань. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(4), 63-82. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-4-8>

Удимович, В.М. (2021в). Загальна характеристика біоцементациї та параметри контролю. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*, 27(6), 30-42. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-6-5>

Abdel-Aleem, H., Dishisha, T., Saafan, A., AbouKhadra, A.A. & Gaber, Y. (2019). Biocementation of soil by calcite/aragonite precipitation using *Pseudomonas azotoformans* and *Citrobacter freundii* derived enzymes. *RSC Advances*, 9(31), 17601-17611. <https://doi.org/10.1039/c9ra02247c>

Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.S. & Reddy, M.S. (2009a). Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by

Sporosarcina pasteurii. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 433–438. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0514-7>

Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P.S. & Reddy, M.S. (2009b). Strain improvement of *Sporosarcina pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 981–988. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0578-z>

Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M.S. (2010a). Characterization of two urease-producing and calcifying *Bacillus* sp. isolated from cement. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11), 1571–1576. <https://doi.org/10.4014/jmb.1006.06032>

Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M.S. (2010b). Microbial concrete: Way to enhance the durability of building structures. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 23, 730–734. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0000159](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000159)

Achal, V., Mukherjee, A. & Reddy, M.S. (2011). Effect of calcifying bacteria on permeation properties of concrete structures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1229–1234. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0901-8>

Achal, V. (2015a). Production of bacteria for structural concrete. In F. Pacheco-Torgal, J. A. Labrincha, M. V. Diamanti, C.P. Yu, H. K. Lee (Eds.), *Biotechnologies and biomimetics for civil engineering*, pp. 309–323. Springer International Publishing.

Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., & Zhang, Q. (2015b). Biomineralization for sustainable construction - A review of processes and applications. *Earth-Science Reviews*, 148, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.05.008>

APHA. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, 1999.

Al Imran M., Nakashima K., Evelpidou N., & Kawasaki S. (2021). Improvement of using crude extract urease from watermelon seeds for biocementation technology. *Geomate Journal*, 20(78), 142–147. <https://geomatejournal.com/geomate/article/view/197>

Al-Thawadi, S. (2012). Calcium carbonate crystals formation by ureolytic bacteria isolated from Australian soil and sludge. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 2(1), 12–26. [https://www.academia.edu/8004358/ Calcium_Carbonate_Crystals_Formation_by_Ureolytic_Bacteria_Isolated_from_Australian_Soil_and_Sludge](https://www.academia.edu/8004358/Calcium_Carbonate_Crystals_Formation_by_Ureolytic_Bacteria_Isolated_from_Australian_Soil_and_Sludge)

Al-Thawadi, S.M., Cord-Ruwisch, R. & Bououdina, M. (2013). Consolidation of sand particles by aggregates of calcite nanoparticles synthesized by ureolytic bacteria under non-sterile conditions. *International Journal of Green Nanotechnology*, 2, 141-146. <https://doi.org/10.1080/19430892.2012.654741>

Ali, M.F., Mukhtar, H. & Dufossé, L. (2022). Microbial calcite induction: a magic that fortifies and heals concrete. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-03941-2>

Almajed, A., Tirkolaei, H.K., Kavazanjian, E. & Hamdan, N. (2019). Enzyme induced biocementated sand with high strength at low carbonate content. *Scientific Reports*, 9, 1135. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38361-1>

Akiyama, M. & Kawasaki, S. (2012). Novel grout material comprised of calcium phosphate compounds: in vitro evaluation of crystal precipitation and strength reinforcement. *Engineering Geology*, 125, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2011.11.011>

Anitha, V., Abinaya, K., Prakash, S., Rao, A.S & Vanavil, B. (2018). *Bacillus cereus* KLUVAA mediated biocement production using hard water and urea. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(2) 257-266. <https://hrcak.srce.hr/file/299118>

Aprianti, E. (2017). A huge number of artificial waste material can be supplementary cementitious material (SCM) for concrete production—a review, part II. *Journal of Cleaner Production*, 142, 4178–4194. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.115>

Ardeshana, A.B., Pitroda J.R. & Digvijaysinh, R. (2016). A critical literature review on gainful utilization of bacteria in construction industry. *International*

Journal of Emerging Technologies and Applications in Engineering, Technology and Sciences, 9(1).

Ariyanti, D., Handayani, N.A. & Hadiyanto, H. (2012). Feasibility of using microalgae for biocement production through biocementation. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 2(111), 1– 4. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000111>

Arioli S., Monnet C., Guglielmetti S., Parini C., De Noni I., Hogenboom J., Halami P.M., Mora D. (2007) Aspartate biosynthesis is essential for the growth of *Streptococcus thermophilus* in milk, and aspartate availability modulates the level of urease activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5789–5796. <https://doi.org/10.1128/AEM.00533-07>

Arioli S., Roncada P., Salzano A.M., Deriu F., Corona S., Guglielmetti S., Bonizzi L., Scaloni A., Mora D. (2009). The relevance of carbon dioxide metabolism in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology*, 155(6), 1953–1965. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024737-0>

Arioli, S., Della Scala, G., Remagni, M.C., Stuknyte, M., Colombo, S., Guglielmetti, S., De Noni, I., Ragg, E. & Mora, D. (2017). *Streptococcus thermophilus* urease activity boosts *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* homolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 17(247), 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.006>

Avramenko, M., Nakashima, K. & Kawasaki, S. (2022). State-of-the-art review on engineering uses of calcium phosphate compounds: An eco-friendly approach for soil improvement. *Materials*, 15, 6878. <https://doi.org/10.3390/ma15196878>

Bachmeier, K.L., Williams, A.E., Warmington, J.R. & Bang, S.S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 171–181. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(01\)00393-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(01)00393-5)

Baiq, H.S., Yasuhara, H., Kinoshita, N., Putra, H., Johan, E. (2020). Examination of calcite precipitation using plant derived urease enzyme for soil

improvement. *International Journal of GEOMATE*, 19(72), 231–237.
<https://geomatejournal.com/geomate/article/view/1>

Bang, S.S., Lippert, J.J., Yerra, U., Mulukutla, S. & Ramakrishnan, V. (2010). Microbial calcite, a bio-based smart nanomaterial in concrete remediation. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 1(1), 28–39.
<https://doi.org/10.1080/19475411003593451>

Benhelal, E., Zahedi, G., Shamsaei, E. & Bahadori, A. (2013). Global strategies and potentials to curb CO₂ emissions in cement industry. *Journal of Cleaner Production*, 51, 142–161. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.10.049>

Bhutange, S. & Latkar, M. (2020). Microbially induced calcium carbonate precipitation in construction materials. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32(5), 03120001. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0003141](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0003141)

Booth, N.J., Beekman, J.B. & Thune, R.L. (2009). *Edwardsiella ictaluri* encodes an acid-activated urease that is required for intracellular replication in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) macrophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6712–6720. <https://doi.org/10.1128/AEM.01670-09>

Burbank, M., Weaver, T., Green, T., Williams, B. & Crawford, R. (2011). Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soil. *Geomicrobiology Journal*, 28(4), 301–312.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2010.499929>

Burbank, M.B., Weaver, T.J., Williams, B.C. & Crawford, R.L. (2012a). Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29 (4), 389–395.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2011.575913>

Burbank, M., Weaver, T., Lewis, R., Williams, T., Williams, B. & Crawford, W. (2012b). Geotechnical tests of sands following bioinduced calcite precipitation catalyzed by indigenous bacteria. *Journal of Geotechnical & Geoenvironmental Engineering*, 139(6), 928–936. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0000781](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0000781)

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), 85–98. <https://doi.org/10.1080/01490450303883>

Caputo, M. & Plastino, W. (2004). Diffusion in porous layers with memory. *Geophysical Journal International*, 158, 385-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.2004.02290.x>

Castanier, S., Le, G., Metayer-Levrel, G. & Perthuisot, J.P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126(1- 4), 9–23. [https://doi.org/10.1016/S0037-0738\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0037-0738(99)00028-7)

Castro-Alonso, M.J., Montanez-Hernandez, L.E., Sanchez-Munoz, M.A., Macias Franco, M.R., Narayanasamy, R. & Balagurusamy, N. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Frontiers in Materials*. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>

Chaparro, S., Rojas, H.A., Caicedo, G., Romanelli, G., Pineda, A., Luque, R. & Martínez, J.J. (2021). Whey as an alternative nutrient medium for growth of *Sporosarcina pasteurii* and its effect on CaCO₃ polymorphism and fly ash bioconsolidation. *Materials (Basel)*, 14(10), 2470. <https://doi.org/10.3390/ma14102470>

Chen, Y.M. & Burne, R.A. (2003). Identification and characterization of the nickel transport system for urease biogenesis in *Streptococcus salivarius* 57.1. *Journal of Bacteriology*, 185(23), 6773–6779. <https://doi.org/10.1128/jb.185.23.6773-6779.2003>

Cheng, L., Kobayashi, T., & Shahin, M.A. (2020). Microbially induced calcite precipitation for production of “bio-bricks” treated at partial saturation condition. *Construction and Building Materials*, 231, 117095. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117095>

Choi, S.G., Chang, I., Lee, M., Lee, J.H., Han, J.T. & Kwon, T.H. (2020). Review on geotechnical engineering properties of sands treated by microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and biopolymers. *Construction and Building Materials*, 246, 118415. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118415>

Christians, S. & Kaltwasser, H. (1986). Nickel-content of urease from *Bacillus pasteurii*. *Archives of Microbiology*, 145(1), 51–55.

Chu, J., Stabnikov, V. & Ivanov, V. (2012). Microbially induced calcium carbonate precipitation on surface or in the bulk of soil. *Geomicrobiology Journal*, 29(6), 544–549. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.592929>

Chu, J., He, J. & Ivanov, V. (2013). Mitigation of liquefaction of saturated sand using biogas. *Geotechnique*, 63(4), 267-275. <https://doi.org/10.1680/geot.SIP13.P.004>

Cotter, P.D. & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429- 453. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.3.429-453.2003>

Creaser, E.H. & Porter, R.L. (1985). The purification of urease from *Aspergillus nidulans*. *International Journal of Biochemistry*, 17(12), 1339–1341. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(85\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0020-711x(85)90057-6)

Cuzman, O. A., Richter, K., Wittig, L. & Tiano, P. (2015). Alternative nutrient sources for biotechnological use of *Sporosarcina pasteurii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 897-906. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1844-z>

Das, N., Kayastha, A.M. & Srivastava, P.K. (2002). Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L) seeds. *Phytochemistry*, 61(5), 513-521. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00270-4)

Das, G., Park, S., Choi, J. & Baek, K.H. (2019). Anticandidal potential of endophytic bacteria isolated from *Dryopteris uniformis* (Makino). *Jundishapur Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.5812/jjm.69878>

DeJong, J.T., Mortensen, B.M., Martinez, B.C. & Nelson, D.C. (2010). Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.029>

DeJong, J.T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., van Paassen, Al Qabany A., Aydilek, A., Bang, S.S., Burbank, M., Caslake, L., Chen, C.Y., Cheng, X., Chu, J., et al. (2013). Biogeochemical processes and geotechnical applications: Progress, opportunities and challenges. *Geotechnique*, 63(4), 287–301. <https://doi.org/10.1680/geot.SIP13.P.017>

De Muynck, W., De Belie, N. & Verstraete, W. (2010a). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*, 36(2), 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.02.006b>

De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N., Verstraete, W. (2010b) Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Journal of Ecological Engineering*, 36(2), 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.03.025>

De Muynck, W., Verbeken, K., De Belie, N. & Verstraete, W. (2013). Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1335–1347. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3997-0>

Dhami, N.K., Reddy, M.S. & Mukherjee, A. (2012). Improvement in strength properties of ash bricks by bacterial calcite. *Ecological Engineering*, 39, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.11.011>

Dhami, N.K., Quirin, M.E.C. & Mukherjee, A. (2017). Carbonate biomineralization and heavy metal remediation by calcifying fungi isolated from karstic caves. *Ecological Engineering*, 103, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.03.007>

Dhami, N.K., Reddy, M.S. & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites.

Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(5), 707-714.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1212.11087>

Dilrukshi R.A.N., Watanabe J., & Kawasaki S. (2015). Sand cementation test using plant-derived urease and calcium phosphate compound. *Materials Transactions*, 56(9), 1565-1572. <https://doi.org/10.2320/matertrans.M-M2015818>

Dilrukshi R.A.N. & Kawasaki, S. (2016). Effective use of plant-derived urease in the field of geoenvironmental/geotechnical engineering. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 6, 207. <https://doi.org/10.4172/2165-784X.1000207>

Dilrukshi, R.A.N., Watanabe, J. & Kawasaki, S. (2016). Strengthening of sand cemented with calcium phosphate compounds using plant-derived urease. *International Journal of GEOMATE*, 11(3), 2, 2461-2467. <https://geomatejournal.com/geomate/article/view/2740/2321>

Dilrukshi, R.A.N., Nakashima K. & Kawasaki, S. (2018). Soil improvement using plant-derived urease-induced calcium carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 58(4), 894-910. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.04.003>

EL-Hefnawy, M.E., Sakran, M., Ismail, A.I. & Aboelfetoh, E.F. (2014). Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds. *BMC Biochemistry*, 15, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-15-15>

Fang, C., Kumari, D., Zhu, X. & Achal, V. (2018). Role of fungal-mediated mineralization in biocementation of sand and its improved compressive strength. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 133, 216-220. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.07.013>

Famuyiwa, O.O. & Ough, C.S. (1991). Modification of acid urease activity by fluoride ions and malic acid in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 79–80.

Fernández, 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 Endo, K., Kogure, T., Nagasawa, H. (Eds.),

Biomineralization. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1002-7_4

Fidaleo, M., Esti, M. & Moresi, M. (2006). Assessment of urea degradation rate in model wine solution by acid urease from *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6226–6235. <https://doi.org/10.1021/jf060934s>

Fritzges, M. (2005). Biologically induced improvements of the response of sands to monotonic and impact loading. MS Thesis. Amherst, MA, USA: Department of Civil and Environmental Engineering, University of Massachusetts Amherst.

Gat D., Ronen Z. & Tsesarsky M. (2016). Soil bacteria population dynamics following stimulation for ureolytic microbial-induced CaCO_3 precipitation. *Environmental Science & Technology*, 50, 616-621. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04033>

Garcia, G.M., Marquez, G. M. & Moreno, H.C. (2016). Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiological Research*, 182, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.006>

Ghosh, P., Mandal, S., Chattopadhyay, B.D. & Pal, S. (2005). Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research*, 35(10), 1980-1983. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2005.03.005>

Gomez, M.G., Graddy, C.M.R., DeJong, J.T., Nelson, D.C. & Tsesarsky, M. (2018). Stimulation of native microorganisms for biocementation in samples recovered from field-scale treatment depths. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 144, 04017098. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0001804](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0001804)

Gowthaman, S., Yamamoto, M., Nakashima, K., Ivanov, V. & Kawasaki, S. (2021). Calcium phosphate biocement using bone meal and acid urease: An eco-friendly approach for soil improvement. *Journal of Cleaner Production*, 128782. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128782>

Graham, D.Y. & Miftahussurur, M. (2018). *Helicobacter pylori* urease for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A mini review. *Journal of Advanced Research*, 13, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.01.006>

Hait, S., Chemburkar, G., Murlidhar, D., Almeida, U., Fernandez, R., Amonkar, V. & Chakraborty, P. (2018). Strengthening water retention capacity of marine soft clay using bio-cement. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 6(3), 93-98. <https://doi.org/10.12691/aees-6-3-4>

Han, P.P., Geng, W.J., Li, M.N., Jia, S.R., Yin, J.L. & Xue, R.Z. (2021). Improvement of biomineralization of *Sporosarcina pasteurii* as biocementing material for concrete repair by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 1311-1322. <https://doi.org/10.4014/jmb.2104.04019>

Hamzah, N.A. (2014). Main properties of urease partially purified from seeds of Syrian mesquite (*Prosopis farcta*). *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, 3(22), 1071-1079. <https://www.researchgate.net/publication/328538682>

Hansen, J.S., Vararattanavech, A., Plasencia, I., Greisen, P.Jr., Bomholt, J., Torres, J., Emnéus, J. & Hélix-Nielsen, C. (2011). Interaction between sodium dodecyl sulfate and membrane reconstituted aquaporins: A Comparative Study of Spinach SoPIP2;1 and E. coli AqpZ. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1808 (10), pp 2600–2607.

Hao, M., Gao, Y., He, J., Yongshuai, Q., & Lei, H. (2021). Microbially induced carbonate precipitation for wind erosion control of desert soil: Field-scale tests. *Geoderma*, 383, 114723. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2020.114723>

Haouzi, F.Z. & Courcelles, B. (2018). Major applications of MICP sand treatment at multi-scale levels: A review. In Conference Proceedings GeoEdmonton 2018: the 71st Canadian Geotechnical Conference and the 13th Joint CGS/IAH-CNC Groundwater Conference. Edmonton, 453 Alberta, Canada.

Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H. & Nakamura, M. (2000). Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*, 53(3), 325-330. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(99\)00521-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(99)00521-x)

Hogan, M.E., Swift, I.E. & Done, J. (1983).. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. *Phytochemistry*, 22(13), 663–667. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86958-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86958-7)

Hokkanen, H.M.T. & Lynch J.M. (2003). Biological control: Benefits and risks. Cambridge University Press.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P. & Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 435-463. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.008>

Iqbal, D.M., Wong, L.S. & Kong, S.Y. (2021). Bio-Cementation in construction materials: A Review. *Materials (Basel)*, 14(9), 2175. <https://doi.org/10.3390/ma14092175>

Imbabi, M.S., Carrigan, C. & McKenna, S. (2012). Trends and developments in green cement and concrete technology. *International Journal of Sustainable Built Environment*, 1, 194–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbsbe.2013.05.001>

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), 139–153. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9126-3>

Ivanov V., Stabnikov V. (2017). Construction Biotechnology: Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes. Green Energy and Technology, Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1445-1>

Ivanov, V., Stabnikov, V. & Kawasaki, S. (2019a). Ecofriendly calcium phosphate and calcium bicarbonate biogrouts. *Journal of Cleaner Production*, 218, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.315>

Ivanov, V., Stabnikov, V., Stabnikova, O. & Kawasaki, S. (2019b). Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 26. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-5862-598-9>

Ivanov, V. & Stabnikov V. (2020) Microbially-mediated decontamination of CBRN agents on land and infrastructure using biocementation. In A. Sidorenko, H. Hahn (Eds.), *Functional Nanostructures and Sensors for CBRN Defence and Environmental Safety and Security*. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 233-244. <https://doi.org/10.1007/978-94-024-1909-2>

Jiang, N.J., Liu, R., Du, Y.J. & Bi, Y.Z. (2019). Microbial induced carbonate precipitation for immobilizing Pb contaminants: Toxic effects on bacterial activity and immobilization efficiency. *The Science of the Total Environment*, 672, 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.294>

Jiang, N.J., Yoshioka, H., Yamamoto, K. & Soga, K. (2016). Ureolytic activities of a urease-producing bacterium and purified urease enzyme in the anoxic condition: implication for subseafloor sand production control by microbially induced carbonate precipitation (MICP). *Ecological Engineering*, 90, 96-104, [10.1016/j.ecoleng.2016.01.073](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.073)

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, 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>

Kahani, M., Kalantary, F., Soudi, M.R., Pakdel, L., & Aghaalizadeh, S. (2020). Optimization of cost effective culture medium for *Sporosarcina pasteurii* as biocementing agent using response surface methodology: Up cycling dairy waste and

seawater. *Journal of Cleaner Production*, 253, 120022.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120022>

Kakimoto, S., Sumino, Y., Akiyama, S. & Nakao, Y. (1990). Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(4), 1119—1125.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869440>

Kakimoto, S., Sumino, Y. & Suzuki, T. (1992). Acid urease and production thereof. United States Patent US5093255A. <https://patentimages.storage.googleapis.com/5f/ef/04/787f5cfd420497/US5093255.pdf>

Kawasaki S. & Akiyama M. (2013). Effect of addition of phosphate powder on unconfined compressive strength of sand cemented with calcium phosphate compound, *Materials Transactions*, 54(11), 2079-2084.
<https://doi.org/10.2320/matertrans.M-M2013827>

Khodadadi T.H., Kavazanjian, E., van Paassen, L., & DeJong, J. (2017). Bio-grout materials: A review. *Grouting*, 1–12.
<https://www.researchgate.net/publication/318256473>

Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1-3), 9-21.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>

Krajewska, B., (2017). Urease-aided calcium carbonate mineralization for engineering applications: a review. *Journal of Advanced Research*, 13, 59-67.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.009>

Kramer, V.C., Nickerson, K.W., Hamlett, N.V. & O'Hara, C. (1984). Prevalence of extreme detergent resistance among the *Enterobacteriaceae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(5), 711–713. <https://doi.org/10.1139/m84-106>.

Kucharski, E.S., Cord-Ruwisch, R., Whiffin, V.S. & Al-Thawadi, S. (2006) Microbial biocementation. Patent, WO2006066326.
<http://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/9464>

Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, 115—175.

Lawal, O.U., Barata, M, Fraqueza, M.J., Worning, P., Bartels, M.D., Goncalves, L., Paixão, P., Goncalves, E., Toscano, C., Empel, J., Urbaś, M., Domínguez, M.A., Westh, H., de Lencastre, H. & Miragaia, M. (2021). *Staphylococcus saprophyticus* from clinical and environmental origins have distinct biofilm composition. *Frontiers in Microbiology*, 12, 663768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663768>

Lee, C., Lee, H. & Kim, O.B. (2018). Biocement fabrication and design application for a sustainable urban area. *Sustainability*, 10(11), 4079. <https://doi.org/10.3390/su10114079>

Leeprasert, L., Chonudomkul, D. & Boonmak, C. (2022). Biocalcifying Potential of ureolytic bacteria isolated from soil for biocementation and material crack repair. *Microorganisms*, 10, 963. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050963>

Li, H., Song, Y., Li, Q., He, J. & Song, Y. (2014). Effective microbial calcite precipitation by a new mutant and precipitating regulation of extracellular urease. *Bioresource Technology*, 167, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.011>

LoCascio, R.G., Desai, P., Sela, D.A., Weimer, B. & Mills, D.A. (2010). Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. infantis as revealed by comparative genomic hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7373–7381. <https://doi.org/10.1128/AEM.00675-10>

Marjadi, D.S. (2016). Conservation and restoration of cultural heritage: A biotechnological approach. *Advances in Applied Science Research*, 7(4), 159-167.

Miller, S.A., Horvath, A. & Monteiro, P.J. (2018). Impacts of booming concrete production on water resources worldwide. *Nature Sustainability*, 1, 69. <https://doi.org/10.1038/s41893-017-0009-5>

Mishra, U.C., Sarsaiya, S. & Gupta, A. (2022). A systematic review on the impact of cement industries on the natural environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 18440–18451. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18672-7>

Monnet, C., Mora, D. & Corrieu, G. (2005). Glutamine synthesis is essential for growth of *Streptococcus thermophilus* in milk and is linked to urea catabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3376-3378. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3376-3378.2005>

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), 524–537. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1225866>

Namdar-Khojasteh, D., Bazgir, M., Babaheidari, S.A.H. & Asumadu-Sakyi A.B. (2022). Application of biocementation technique using *Bacillus sphaericus* for stabilization of soil surface and dust storm control. *Journal of Arid Land*, 14, 537–549. <https://doi.org/10.1007/s40333-022-0017-9>

Nie, S., Zhou, J.; Yang, F., Lan, M., Li, J., Zhang, Z. & Sanjayan, J.G. (2022). Analysis of theoretical carbon dioxide emissions from cement production: Methodology and application. *Journal of Cleaner Production*, 334, 130270. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130270>

Noor, E. S.A.T., Kiohadeja, T.M.E. & Abdelraouf, A.E. (2021). Isolation, identification and growth conditions of calcite producing bacteria from urea-rich soil. *African Journal of Microbiology Research*, 15(1), 37-46. <https://doi.org/10.5897/AJMR2020.9445>

Park, S., Choi, S., & Nam, I. (2014). Effect of plant-induced calcite precipitation on the strength of sand. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 26, 06014017. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0001029](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001029)

Pervin, S., Sana N.K., Jahan, Md.G.S., Khan, Md.M.H., Karim, Md.R., Sarkar, B.C. & Shaha, R.K. (2009). Partial purification and characterization of urease from

germinating chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. *Research & Reviews in BioSciences*, 3(1), 27-33.

Pervin, M., Jahan, M.G., A.Y.K.Md., M.R., Sana, N.K., Rahman, M.H., & Shaha, R.K. (2013). Effects of some environmental Variables on urease in germinating chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9, 345-356.

Power, D.A., Burton, J.P., Chilcott, C.N., Dawes, P.J. & Tagg, J.R. (2008). Preliminary investigations of the colonization of upper respiratory tract tissues of infants using a pediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27(12), 1261-1263. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0569-4>

Pourmirzaiee, M.A., Famouri, F., Moazeni, W., Hassanzadeh, A. & Hajihashemi, M. (2020). The efficacy of the prenatal administration of *Lactobacillus reuteri* LR92 DSM 26866 on the prevention of infantile colic: a randomized control trial. *European Journal of Pediatrics*, 179(10), 1619-1626. <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03641-4>

Omoregie, A.I., Ginjom, R.H., & Nissom, P.M. (2018). Microbially induced carbonate precipitation via ureolysis process: A mini-review. *Transactions on Science and Technology*, 5, 245-256. <http://tost.unise.org/pdfs/vol5/no4/5x4x245-256.pdf>

Ough, C.S. & Trioli, G. (1988). Urea removal from wine by an acid urease. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 303-307.

Raijiwala, D.B., Hingwe, P.S. & Bhabhor, V.K. (2009). Bacterial concrete - an ideal concrete for historical structures. In Grantham, M., Salomi, V., Majorana, C. (Eds.), *Concrete Solutions*. CRC Press, pp. 185–190.

Rajasekar, A., Xian, J., Moy, C.K.S. & Wilkinson, S. (2017). Stimulation of indigenous carbonate precipitating bacteria for ground improvement. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science*, 68, 012010. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/68/1/012010>

Ramachandran, S.K., Ramkrishnan, V. & Bangm S.S. (2001). Remediation of concrete using microorganisms, *ACI Materials Journal*, 98(1), 3–9.

Ronholm, J., Schumann, D., Sapers, H.M., Izawa, M., Applin, D., Berg, B., Mann, P., Vali, H., Flemming, R.L., Cloutis, E.A. & Whyte, L.G. (2014). A mineralogical characterization of biogenic calcium carbonates precipitated by heterotrophic bacteria isolated from cryophilic Polar Regions. *Geobiology*, 12(6), 542-56. <https://doi.org/10.1111/gbi.12102>

Rosquoet, F., Alexis, A., Khelidj, A. & Phelipot-Mardelé, A. (2003). Experimental study of cement grout: Rheological behavior and sedimentation. *Cement and Concrete Research*, 33(5), 713-722. [https://doi.org/10.1016/S0008-8846\(02\)01036-0](https://doi.org/10.1016/S0008-8846(02)01036-0)

Sahoo, K., Sathyan, A.K., Kumari, C., Sarkar, P., & Davis, R. (2016). Investigation of cement mortar incorporating *Bacillus sphaericus*. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7, 105 - 91. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1205157>

Scala, G.D., Volontè, F., Ricci, G., Pedersen, M.B., Arioli, S. & Mora, D. (2019). Development of a milk-based medium for the selection of urease-defective mutants of *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 308, 108304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108304>

Seifan, M. & Berenjian, A. (2019). Microbially induced calcium carbonate precipitation: a widespread phenomenon in the biological world. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 4693–4700. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09861-5>

Sharaky, A.M., Mohamed, N.S., Elmashad, M.E., & Shredah, N.M. (2018). Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of sandy soil. *Construction and Building Materials*, 190(30), 861-869. <https://doi.org/10.1016/J.CONBUILDMAT.2018.09.159>

Stabnikov, V. (2016). Production of bioagent for calcium-based biocement. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 5(2), 60–69. <http://www.lifescienceglobal.com/pms/index.php/ijbwi/article/view/4025>

Stabnikov, V., Chu, J., Naeimi, M. & Ivanov, V. (2011). Formation of water-impermeable crust on sand surface using biocement. *Cement and Concrete Research*, 41(11), 1143–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2011.06.017>

Stabnikov, V., Chu, J., Ivanov, V. & Li, Y. (2013a). Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013. 29(8), 1453–1460. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1309-1311>

Stabnikov, V., Chu, J., Myo, A.N. & Ivanov, V. (2013b). Immobilization of sand dust and associated pollutants using bioaggregation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(9), 1631–1700. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1631-0>

Stabnikov, V., Ivanov, V. & Chu, J. (2015). Construction biotechnology: a new area of biotechnological research and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1881-7>

Stabnikov, V., Ivanov, V. & Chu, J. (2016). Sealing of sand using spraying and percolating biogrouts for the construction of model aquaculture pond in arid desert. *International Aquatic Research*, 8(3), 207–216. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40071-016-0136-z>

Stocks-Fischer, S., Galinat, J.K. & Bang, S.S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO_3 . *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563–1571. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6)

Takebe, S. & Kobashi, K. (1988). Acid urease from *Lactobacillus* of rat intestine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(2), 693–699. <https://doi.org/10.1248/cpb.36.693>

Tamayo-Figueroa, D.P., Castillo, E., & Brandão, P.F. (2019). Metal and metalloid immobilization by microbiologically induced carbonates precipitation.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35, 1-10.
<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2626-9>

Teichert-Coddington, D.R., Stone, N. & Phelps, R.P. (1988). Hydrology of fish culture ponds in Gualaca, Panama. *Aquacultural Engineering*, 7 (5), pp 309–320.
[https://doi.org/10.1016/0144-8609\(88\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0144-8609(88)90013-1)

Teichert-Coddington, D.R., Peralta, M. & Phelps, R.P. 1989). Seepage reduction in tropical fish ponds using chicken litter. *Aquacultural Engineering*, 8(3), 147–154. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(89\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0144-8609(89)90024-1)

Tian, K., Wu, Y., Zhang, H., Li, D., Nie, K. & Zhang, S. (2018). Increasing wind erosion resistance of aeolian sandy soil by microbially induced calcium carbonate precipitation. *Land Degradation and Development*, 29(12), 495–503.
<https://doi.org/10.1002/ldr.3176>

Tirkolaei, H.K., Javadi, N., Krishnan, V., Hamdan, N. & Kavazanjian, E. (2020). Crude urease extract for biocementation. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32(12). [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0003466](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0003466)

Toshima, T., Hamai, R., Tafu, M., Takemura, Y., Fujita, S., Chohji, T., Tanda, S., Li, S., & Qin, G.W. (2014). Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2, 52–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jascer.2014.01.004>.

Total Greenhouse Gas Emissions (kt of CO₂ equivalent) from The World Bank: Data. <https://data.worldbank.org/indicator/EN.ATM.GHGT.KT.CE>

van Tittelboom, K.V., De Belie, N., De Muynck, W. & Verstraete, W. (2010). Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research*, 40(1), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2009.08.025>

Varalakshmi, V., & Devi, A. (2014). Isolation and Characterization of Urease Utilizing Bacteria to Produce Biocement. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8, 52-57. <https://doi.org/10.9790/2402-084252>

Vekariya, M.S. & Pitroda, J. (2013). Bacterial concrete: New era for construction industry. *International Journal of Engineering Trends and Technology*,

4(9), 4128–4137. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1087.8217&rep=rep1&type=pdf>

Wang, Z., Zhang, N., Cai, G., Jin, Y., Ding, N. & Shen D. (2017). Review of ground improvement using microbial induced carbonate precipitation (MICP). *Marine Georesources and Geotechnology*, 35(8), 495–503. <https://doi.org/10.1080/1064119X.2017.1297877>

Warthman, R., Van Lith, Y., Vasconcelos, C., Mckenzie, J.A. & Karpoff, A.M. (2000). Bacterially induced dolomite precipitation in anoxic culture experiment. *Geology*, 28(12), 1091–1094. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2000\)28<1091:BIDPIA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2000)28<1091:BIDPIA>2.0.CO;2)

Watanabe, Y., Sarumaru, H., & Shimada, N. (1983). Distribution of urease in the higher plants. *Chiba University Faculty of Horticulture*, 32, 37-4357.

Weisburd, R.S.J. & Laws, E.A. (1990). Free water productivity measurements in leaky mariculture ponds. *Aquacultural Engineering*, 9(6), 377–403. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(90\)90028-X](https://doi.org/10.1016/0144-8609(90)90028-X)

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

Whiffin, V.S., van Paassen, L.A. & Harkes, M.P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24 (5), 417–423. <https://doi.org/10.1080/01490450701436505>

Wilson, C.M., Loach, D., Lawley, B., Bell, T., Sims, I., O'Toole, P.W., Zomer, A. & Tannock G.W. (2014). *Lactobacillus reuteri* 100-23 modulates urea hydrolysis in the murine stomach. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(19), 6104–6113. <https://doi.org/10.1128/AEM.01876-14>

Wong, L.S. (2015). Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus *Bacillus*: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 93, 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.019>

Wright, D.T. & Oren, A. (2005). Nonphotosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporates through time. *Geomicrobiology Journal*, 22 (1–2), 27–53. <https://doi.org/10.1080/01490450590922532>

Uttatree, S. & Charoenpanich J. (2018). Purification and characterization of a harsh conditions-resistant protease from a new strain of *Staphylococcus saprophyticus*. *Agriculture and Natural Resources*, 52(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.001>

Xu, G., Li, D., Jiao, B., Li, D., Yin, Y., Lun, L.; Zhao, Z. & Li, S. (2017). Biomineralization of a calcifying ureolytic bacterium *Microbacterium* sp. GM-1. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.10.008>

Yang, Y., Chu, J., Cao, B., Liu, H. & Cheng, L. (2020). Biocementation of soil using non-sterile enriched urease-producing bacteria from activated sludge. *Journal of Cleaner Production*, 262, 121315. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121315>

Yang, L., Wang, S. & Tian Y. (2010). Purification, properties, and application of a novel acid urease from *Enterobacter* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 303–313. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8159-6>

Yang, Y., Kang, Z., Zhou, J., Chen, J. & Du, G. (2015). High-level expression and characterization of recombinant acid urease for enzymatic degradation of urea in rice wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 301-308. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5916-z>

Yoosathaporn, S., Tiangburanatham, P., Bovonsombut, S., Chaipanich, A. & Pathom-Aree, W. (2016). A cost effective cultivation medium for biocalcification of *Bacillus pasteurii* KCTC 3558 and its effect on cement cubes properties. *Microbiological Research*, 186-187, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.010>

Zaghloul, E.H., Ibrahim, H.A.H. & El-Badan, D.E. (2021). Production of biocement with marine bacteria; *Staphylococcus epidermidis* EDH to enhance clay

water retention capacity. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 47(1), 53-59.
<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.005>

Zhang, J., Shi, X., Chen, X., Huo, X. & Yu, Z. (2021). Microbial-induced carbonate precipitation: A review on influencing factors and applications. *Advances in Civil Engineering*, 9974027. <https://doi.org/10.1155/2021/9974027>

Zhang, Z., Ding, Y. & Qian, S. (2019). Influence of bacterial incorporation on mechanical properties of engineered cementitious composites (ECC). *Construction and Building Materials*, 196, 195–203.
<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.11.089>

Zomorodian, S.M.A Ghaffari, H. & O’Kelly, B.C. (2019). Stabilisation of crustal sand layer using biocementation technique for wind erosion control. *Aeolian Research*, 40, 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.aeolia.2019.06.001>

Zotta, T., Ricciardi, A., Rossano, R. & Parente, E. (2008). Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 25(1), 113-119.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.001>

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А.

Акти апробації результатів у навчальний процес

Міністерство освіти і науки України
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ:
Проректор з наукової роботи НУХТ
Сергій ТОКАРЧУК
«12» 05 2022 р.



АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських і дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів
Замовник Національний університет харчових технологій

(найменування організації, установи)

Шевченко О.Ю.

(П.І.Б. керівника)

Дійсним актом підтверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Розробка технології виробництва та застосування біоцементу для охорони довкілля», що виконувалась згідно наукового проекту «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем» (№ державної реєстрації 0119U001485, 2019-2023 рр).

виконаної на кафедрі біотехнології і мікробіології

(найменування кафедри)

виконуваної з 2018 по 2022

(термін виконання)

впровадженні у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології

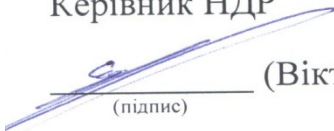
- Вид впровадження результатів:** Біоцементация піску з використанням уреазі рослинного походження.
- Форма впровадження:** модулі початкових дисциплін «Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології» для підготовки здобувачів освітнього ступеня «Магістр» за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».
- Новизна результатів науково-дослідних робіт:** Новий напрям біотехнології - використання мікроорганізмів для потреб будівництва успішно розвивається у світі протягом останніх 15 років. Перевага біоцементу перед традиційним цементом є низька в'язкість (в 30 – 300 разів менше в'язкості суспензії цементу), що забезпечує його здатність до глибокого проникнення в пори і тріщини ґрунту, бетону чи каменю. Крім того в суспензії біоцементу, який є сумішшю солей та

клітин бактерій, присутні частинки з значно меншим розміром, 1 мкм, порівняно з традиційним цементом з частками від 5 до 45 мкм, що теж сприяє легшому та глибшому проникненню біоцементу в оброблюваний матеріал. Основою виробництва біоцементу є застосування уреаз-продукуючих бактерій або ферменту уреаз. Застосування неочищеного екстракту із насіння сої показало його ефективність для осадження карбонату кальцію із суміші розчинів кальцій хлориду та сечовини.

4. **Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР:** Результати наукових досліджень увійшли до курсів лекцій з навчальних дисциплін «Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології» та «Природоохоронні біотехнології».

5. **Соціальний і науково-технічний ефект:** Встановлена можливість використання неочищеного екстракту із насіння сої, яка вирощується в Україні, що є біобезпечним способом біоцементатації. Використання неочищеного екстракту сої при біоцементатації піску дозволило знизити його водопроникність у 6000 разів і отримати значення, які відповідають швидкостям водопроникності піску, біоцементованого за допомогою традиційно використовуваних уреаз-продукуючих бактерій. При використанні цієї технології відпадає необхідність дороговартісного культивування продуцента уреаз та з'являється можливість готувати екстракт безпосередньо на місці проведення обробки ґрунту.

Керівник НДР



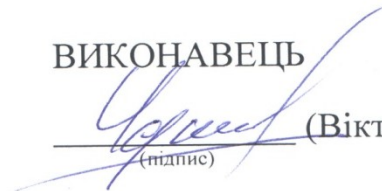
(Віктор СТАБНІКОВ)

(підпис)

(ім'я, прізвище)

«26» листопада 2022 р.

ВИКОНАВЕЦЬ



(Віктор УДИМОВИЧ)

(підпис)

(ім'я, прізвище)

«26» листопада 2022 р.

ДОДАТОК Б.

Список публікацій за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях України

Удимович, В.М. (2021). Молочнокислі бактерії як продуценти уреаз. *Наукові Праці Національного Університету Харчових Технологій*, 27(3), 25-31. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-3-5>

Удимович, В.М. (2021). Застосування біоцementeації в контексті вирішення екологічних питань. *Наукові Праці Національного Університету Харчових Технологій*, 27(4), 63-82. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-4-8>

Удимович, В.М. (2021). Загальна характеристика біоцementeації та параметри контролю. *Наукові Праці Національного Університету Харчових Технологій*, 27(6), 30-42. <https://doi.org/10.24263/2225-2924-2021-27-6-5>

Тези доповідей у матеріалах конференцій

Удимович, В. & Стабніков, В. (2022). Необхідність контролю проведення біоцementeації для гарантованої біобезпеки довкілля. 88 Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (с. 325).

Удимович, В. & Стабніков, В. (2021). Мікробне осадження карбонат кальцію у природоохоронних біотехнологіях. 87 Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (с. 423).

Удимович, В. (2020). Використання молочнокислих бактерій з метою біоцementeації у природоохоронних технологіях. 86 Міжнародна наукова конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (с. 407).

Удимович, В. (2019). Застосування біоцementeації, як різновиду біотехнології, у природоохоронних технологіях. 85 Міжнародна наукова

конференція молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (с. 516).

Удимович, В. & Стабніков, В. (2020). Молочнокислі бактерії як продуценти кислої уреазы. *Матеріали IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (с. 37-38).*