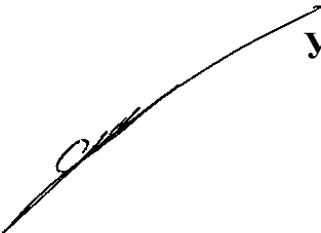


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний університет харчових технологій

СТАБНІКОВ ВІКТОР ПЕТРОВИЧ

УДК 579.66: 663.15: 691.33



**НАУКОВІ ЗАСАДИ СТВОРЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ
ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ОХОРОНІ ДОВКІЛЛЯ І ПРОМИСЛОВОСТІ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора технічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий консультант: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Іванов Володимир Миколайович**, Національний університет харчових технологій МОН України, радник ректора з науки та міжнародних грантів біотехнології та харчування

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник **Карпенко Олена Володимирівна**, Відділення фізико-хімії горючих копалин Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, завідувач відділу хімії і біотехнології горючих копалин

доктор технічних наук, старший науковий співробітник, **Циганков Сергій Петрович**, Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, заступник директора з наукової роботи

доктор технічних наук, доцент **Голуб Наталія Борисівна** Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського", професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики

Захист відбудеться «05» червня 2018 р. о 13³⁰ год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий «27» квітня 2018 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради



Н.О. Бублієнко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Біогеохімічну активність мікроорганізмів використовують у новому напрямі біотехнології – отримання та застосування біоцементуючих матеріалів для захисту навколишнього середовища та в промисловості (Ivanov and Stabnikov, 2017; Іванов та Стабніков, 2017).

Біоцемент розглядається як заміник цементу при укріпленні та гідроізоляції ґрунту чи тріщин в бетоні (DeJong та ін., 2013). Це зумовлено тим, що цемент на 80% по масі складається з часток з розмірами від 5 до 45 мкм, в той час як розмір частинок в суспензії біоцементу, який фізично є сумішшю солей і клітин бактерій, складає в середньому 2 мкм. Тому, суспензія біоцементу може проникати значно глибше в пори і тріщини ґрунту чи каменю. Цьому також сприяє те, що в'язкість біоцементу в 30 – 300 разів менш в'язкості суспензії цементу (Rosquoet та ін., 2002). Використання біоцементу може вирішити також багато питань охорони довкілля, особливо деконтамінації хімічно- та бактеріологічно забрудненого ґрунту завдяки агрегації частинок ґрунту, зменшення його водопроникності та іммобілізації забруднювачів.

Основою більшості біоцементів є гало- і алкалофільні уреаза-продукуючі бактерії, які утворюють кристали карбонату кальцію за присутності розчинених солей кальцію та сечовини (Bachmeier та ін., 2002; Stocks-Fischer та ін., 1999). Фізіологічні групи залізо-відновлювальних та денітрифікуючих бактерій також важливі в процесах біоцементзації ґрунту. Але до останнього часу не існувало системних знань щодо складу і властивостей мікробних агентів біоцементзації і не розроблено наукову біотехнологічну концепцію одержання та застосування біоцементу зі заданими властивостями. Для наукового розвитку та практичної реалізації біотехнологічних процесів мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію чи гідроксиду заліза потрібне фундаментальне дослідження цих біогеохімічних процесів, а також розробка біотехнологій їх застосування для захисту довкілля. Заміна традиційних закріплювачів ґрунтів біоцементом дасть змогу знизити собівартість технологій, зменшити забруднення довкілля, утилізувати активний мул – відхід очищення стічної води, а також відходи видобування карбонатів кальцію і залізної руди.

У зв'язку з цим, створення наукових засад біотехнологій біоцементзації є актуальним і дозволить розробити нові екологічно безпечні матеріали і технології, які знайдуть широке застосування в охороні довкілля і промисловості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота виконувалася згідно з Постановою Кабінету Міністрів України від 7 вересня 2011 р. № 942 «Про затвердження переліку пріоритетних тематичних напрямів наукових досліджень і науково-технічних розробок на період до 2015 року» в якому розвиток біотехнології, і особливо дослідження щодо отримання нових матеріалів, технології утилізації відходів та технології запобігання забрудненню водних об'єктів та атмосферного повітря були і залишаються найбільш важливими проблемами розвитку науково-технічного потенціалу України. Роботу виконано у рамках наукових напрямів кафедри біотехнології

та мікробіології Національного університету харчових технологій «Розробка високоефективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0114U003437).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка наукових засад біотехнологій виробництва біоцементу та їх застосування у природоохоронних технологіях та промисловості.

Для досягнення цієї мети потрібно було вирішити наступні задачі:

1) провести скринінг, виділення та ідентифікацію найбільш активних та біобезпечних штамів уреаз-продукуючих бактерій (УПБ) для проведення біоцементзації;

2) порівняти чисті та накопичувальні культури уреаз-продукуючих бактерій з точки зору їх ефективності та біобезпеки застосування під час біоцементзації;

3) дати порівняльну характеристику ефективності використання культуральної рідини, біомаси клітин і супернатанту УПБ як біологічного агента біоцементзації;

4) виявити підходи до інтенсифікації росту та уреазної активності бактерій і розробити біотехнологію виробництва біомаси УПБ для біоцементзації;

5) розробити шляхи інтенсифікації адсорбції бактеріальних клітин на поверхні матеріалу, що цементується;

6) вивчити біотехнологію поверхневої та глибинної біоцементзації ґрунту;

7) дослідити альтернативний спосіб біоцементзації ґрунту, який базується на використанні залізо-відновлювальних та уреаз-продукуючих бактерій;

8) вивчити новий спосіб біоцементзації ґрунту, який включає застосування денітрифікуючих та уреаз-продукуючих бактерій;

9) виявити залежності характеристик біоцементованого матеріалу від кількості осажденного карбонату кальцію або гідроксиду заліза;

10) дослідити процес і розробити біотехнологію гідроізоляції тріщин у камені для попередження міграції забруднювачів у довкілля;

11) вивчити процес і розробити біотехнологію біоцементзації поверхні піщаного ґрунту для гідроізоляції ставків вирощування водоростей або сховищ міських чи промислових відходів;

12) дослідити процес та розробити біотехнологію біоцементзації для зменшення вітрової та водної ерозії ґрунтів, а також іммобілізації хімічних та мікробних забруднювачів ґрунту;

13) дослідити процес та розробити біотехнологію біоцементаційної капсуляції м'якої глини – відходу екскавації в будівництві;

14) дослідити процес і розробити біотехнологію біоцементаційного покриття твердих матеріалів шаром карбонату кальцію для покращання їх колонізації епібіотою під час створенні штучних рифів.

Об'єкт дослідження – бактерії, які можуть бути застосовані для виробництва біоцементу.

Предмет дослідження – біотехнології одержання біоцементу, а також його застосування в охороні довкілля і промисловості.

Методи досліджень. Для виконання поставлених завдань під час виконання дисертаційної роботи використано мікробіологічні, мікроскопічні, хімічні, фізико-хімічні та інженерні методи досліджень, деталі яких наведені в розділі 2. Методи були вибрані таким чином, щоб забезпечити достовірність отриманих результатів та висновків, а саме:

- отримання накопичувальних культур уреаз-продукуючих та залізо-відновлювальних бактерій, виділення чистих культур уреаз-продукуючих бактерій та визначення кількості мікроорганізмів при культивуванні проводили методом граничних розведень та мікробіологічним висівом на тверді середовища;

- для ідентифікації виділених штамів бактерій застосовували секвенування гену 16S рРНК;

- визначення уреазної активності бактерій, яка важлива для процесу біоцементзації, проводили за підвищенням електропровідності при гідролізу сечовини;

- визначення рН, який залежить від гідролізу сечовини при біоцементзації та окисно-відновлювального потенціалу середовища проводили стандартними потенціометричними методами;

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

- концентрації нітрит- і нітрат- іонів для характеристики процесів денітрифікації, а також двовалентного та загального заліза при мікробіологічному відновленні заліза із залізної руди визначали стандартними колориметричними методами;

- концентрацію загального органічного вуглецю в процесах культивування бактерій визначали автоматичним аналізатором по утворенню CO₂;

- концентрації летких жирних кислот визначали для характеристики складу поживного середовища хроматографічним методом;

- вміст свинцю та фенантрени для вивчення ефекту біоцементзації на пригнічення розповсюдження пилу та асоційованих з них хімічних забруднювачів визначали атомно-адсорбційним та флуоресцентним спектральним аналізом;

- розмір бактеріальних клітин та бактеріальних агрегатів, який відіграє важливу роль в процесах біоцементзації як регулятор розподілення клітин по матеріалу, що підлягає обробці, визначали на аналізаторі розміру частинок;

- склад мінералів, що утворювалися в процесах біоцементзації, визначали за допомогою рентгенівської спектроскопії;

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

- обростання штучних коралів водною епібіотою вивчали методами флуоресцентної скануючої мікроскопії;

- структуру поверхні біоцементованих матеріалів вивчали методами атомної силової мікроскопії;

- оцінку ефективності біоцементзації проводили по зміні механічних властивостей матеріалів, яку оцінювали стандартним випробуваннями на необмежене стиснення та водопроникність;

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

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що накопичувальна культура галофільних, алкалофільних уреаз-продукуючих бактерій містить безпечні штами *Bacillus sp.* VS1 та *Yaniella sp.* VS8, і потенційно небезпечні штами *Staphylococcus sp.* VS21 та *Bacillus cereus* VS17.

Виділено та ідентифіковано шляхом секвенування гена 16S рРНК нові галофільні, алкалофільні уреаз-продукуючі бактерії *Bacillus sp.* VS1 та *Yaniella sp.* VS8, які можуть бути застосовані для біоцементзації.

Встановлено філогенетичну (за нуклеотидною послідовністю гена 16S рРНК) і фізіологічну (за уреазною активністю і питомою швидкістю росту) схожість штамів *Bacillus sp.*, які було виділено для уреолітичного осадження карбонату кальцію в помірно континентальному кліматі України, морському помірному кліматі Бельгії та вологому тропічному кліматі Південно-Східної Азії – Сінгапурі та Індонезії.

Для підвищення біобезпеки біоцементзації вперше показано можливість диференціальної інактивації життєздатності та уреазної активності клітин *Yaniella sp.* VS8.

Показано, що штам *Bacillus sp.* VS1 синтезує конститутивну уреазу, а синтез уреазі клітинами штаму *Yaniella sp.* VS8 індукується додаванням сечовини в середовище для вирощування уреаз-продукуючих бактерій.

Виявлено механізм біоцементзації на поверхні твердих матеріалів: седиментацію бактеріальних клітин на поверхню, адгезію клітин до поверхні, створення центрів кристалізації та кристалів карбонату кальцію й адгезію кристалів до поверхні.

Вперше показано роль сили тяжіння та обробки поверхні катіонами кальцію, магнію або заліза в адгезії клітин і кристалів карбонату кальцію.

Виявлено роль агрегації бактеріальних клітин для поверхневої біоцементзації.

Вперше визначено, що комбінація діяльності залізо-відновлювальних та уреаз-продукуючих бактерій веде до утворення гідроксиду заліза, який закупорює канали в пористому матеріалі.

Вперше показано, що послідовне біовідновлення нітрату денітрифікуючими бактеріями та гідроліз сечовини уреаз-продукуючими бактеріями зменшує витрати кальцію, оскільки приводить до осадження карбонату кальцію не в порах, які заповнюються азотом, а в мікроканалах матеріалу.

Виявлено залежність гідравлічної проникності та міцності на стиснення біоцементованого матеріалу від кількості осадженого карбонату кальцію чи гідроксиду заліза.

Показано можливість капсулювання м'якої глини шляхом біоцементзації. За допомогою методів атомної силової мікроскопії та скануючої електронної мікроскопії підтверджено, що біоцемент не реагує з глиною, а утворює капсули на поверхні глиняного агрегату.

Вперше показано, що поверхнева обробка забрудненого ґрунту малими дозами біоцементу може бути використана для контролю його вітрової та водної ерозії, що зменшує на більш як 90% виділення пилу, а також бактеріального і хімічних забруднювачів у довкілля.

Практичне значення одержаних результатів. Створено колекцію мікробних агентів біоцементзації із представників родів *Bacillus*, *Paracoccus*, *Stenotrophomonas*, *Yaniella*.

Розроблено і протестовано в пілотному виробництві біоцемент з УПБ *Bacillus sp.* VS1 та *Yaniella sp.* VS8 та оптимізовано середовище для промислового виробництва біоцементу. Дослідне біоцементування 1 м³ каменю та піску, а також пілотної моделі кам'яної споруди показало ефективність використання біоцементу для зменшення водопроникності не тільки піску, а і тріщин у кам'яних матеріалах.

Вперше розроблено спосіб інактивації бактеріальних клітин *Yaniella sp.* VS8 з селективним збереженням їх уреазної активності. Ця селективна обробка клітин включає їх інкубацію в 0,5% (мас/об) розчину поверхнево-активної речовини додецилсульфат натрію протягом декілька годин.

Розроблено біобезпечну біотехнологію виробництва біоцементу на основі застосування інактивованих клітин УПБ, які зберігають уреазну активність, для мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію. Біоцемент було протестовано для біоцементзації піску та каменю з тріщинами.

Вперше розроблено два нових ефективних способи біоцементзації:

1) біотехнологію отримання рідкого біоцементу з дешевої сировини (залізної руди) та органічних відходів (целюлоза муніципальних твердих відходів, рідка фракція метантенків, харчові відходи) на основі біовідновлення оксиду заліза(III) залізо-відновлювальними бактеріями до розчинного заліза(II). Біозакупорювання пористого ґрунту базується на подальшому окисленні заліза(II) за умови підвищення рН та осадженні утвореного гідроксиду заліза(III) в порах за участі уреаз-продукуючих бактерій;

2) біотехнологію біозакупорювання/біоцементзації пористого ґрунту, яка ґрунтується на послідовному біохімічному відновленні нітрату денітрифікуючими бактеріями та ферментативному гідролізі сечовини за допомогою УПБ. Нові біотехнології можуть знайти застосування для герметизації ставків, каналів і тунелів у піску, пористих ґрунтах та тріщин у гірських породах.

Протестовані практично можливі шляхи використання поверхневої та при-поверхневої біоцементзації в природоохоронних технологіях: для гідроізоляції ставків для вирощування водоростей під час отримання

біодизелю; як економічного способу боротьби з вітровою та водною ерозією ґрунтів; для переробки м'якої глини в твердий будівельний матеріал та в екологічній інженерії берегових захисних споруд і штучних рифів за рахунок їх поверхневої біоцементації, яка сприяє колонізації поверхонь цих споруд епібіотою. Подібна біотехнологія поверхневої та при-поверхневої біоцементації може бути застосована також для зміцнення гребель і ґрунтових доріг.

Біотехнологічне виробництво біоцементів завдяки результатам наведеним в дисертації може стати новим напрямом мікробіологічної промисловості України.

Результати роботи застосовуються у викладанні курсів з біотехнології в різних університетах світу, для чого використовують підручники "Environmental Microbiology for Engineers, 2nd edition", Francis & Taylor, USA, та монографію "Construction Biotechnology: Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes", Springer, USA, які включають матеріали дисертації.

Особистий внесок здобувача. Концепція роботи, розробка і виконання програми експериментальних досліджень та аналіз отриманих результатів належать автору. Особисто або за безпосередньої участі автора підготовлено всі публікації з теми дисертації. Частина публікацій підготовлено спільно з експертом з мікробіології довіклля д.б.н. В. Івановим та експертами з вивчення різних геотехнічних показників біоцементованих матеріалів проф. Джиан Чу, Др. Бинг Ли, Др. Мариам Наеми, (Наньянський Технологічний Університет, Сінгапур), які є співавторами відповідних публікацій.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на Інтернаціональній конференції «Витягнення Поживних Речовин з Водних Потоків» (Канада, 2009), 2-й Міжнародній конференції «Екологічно-Раціональні Матеріали та Технології в Будівництві» (Італія, 2010), Міжнародній конференції «Пустелі, Посушлива Земля та Дезертифікація» (Ізраїль, 2010), Конференції Американського Суспільства Цивільних Інженерів «Досягнення в Геотехнічній Інженерії» (США, 2011), Інтернаціональної конференції «Досягнення в Геотехнічній Інженерії» (Австралія, 2011), 2-й Міжнародній конференції «Геотехніка, Будівельні Матеріали та Охорона Довкілля» (Малайзія, 2012), 2-му Північно- та Східно-Європейському Конгресі з Харчової Науки (Київ, 2013), XIII з'їзді Товариства мікробіологів України (Україна, 2013), 2-й Міжнародній конференції «Мікробіологія та Імунологія – Перспективи Розвитку в ХХІ Столітті» (Україна, 2016), 8 Європейському конгресі «Наука щодо Харчових Продуктів для Добробуту Людей» (Україна, 2016), 18-й Інтернаціональній Конференції «Бетон, Будівельна та Геотехнічна Інженерія» (Італія, 2016), Конференції Південно-Східної Азії по Тунелям та Підземному Простору (Малайзія, 2017), Будівельному Конгресі України 2017 (Україна, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 42 наукові роботи, в тому числі: монографія «Construction Biotechnology: Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes», видавництво Springer, що включає 14 глав; 4 глави в книгах «Handbook of Environment and Waste

Management. Air and Water Pollution Control», World Scientific Publishing Co.; «Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering», видавництво Springer; «Biopolymers and Biotech Admixtures for Ecoefficient Construction Materials» видавництво Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 23 наукових журнальних статей, з яких 18 – в міжнародних наукових журналах (15 в наукометричній базі Scopus, 2 – в Наукометричній базі Google Scholar та 1 у іноземному онлайн журналі), 5 – в наукових фахових виданнях, затверджених в Міністерстві освіти і науки України (4 в наукометричній базі Index Copernicus), подана заявка на 1 міжнародний патент. Індекс Гірша згідно Google Scholar (h-індекс) – 16; індекс цитування – 761; i10-індекс – 22.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на ... сторінках машинописного тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Результати досліджень та обговорення» (6 розділів), «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 410 посилань, «Додатки». Робота містить 21 таблицю, 116 рисунків та 7 додатків, в яких наведено результати пілотних випробувань біоцементатії сипучих та твердих матеріалів і розрахунки економічної ефективності застосування біоцементу в природоохоронних технологіях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Огляд літератури

Проаналізовано сучасні літературні джерела, присвячені дослідженням з біотехнології отримання біоцементу, подано класифікацію біоцементатійних процесів, викладено основні принципи процесу мікробного утворення мінералів, які зв'язують частинки ґрунту, дана характеристика бактеріальних штамів уреаз-продукуючих бактерій та умов формування кальцій-вмісного біоцементу та наведено приклади використання мікробно-ініційованого утворення кальциту у геотехніці та охороні довкілля. Розглянуто перспективи застосування мікробного біоцементу в інженерії довкілля, створенні природоохоронних технологій. Визначено актуальні напрями досліджень.

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень

Культивування штамів мікроорганізмів. Накопичувальні та чисті культури уреаз-продукуючих алкалофільних та галотолерантних бактерій вирощували в колбах та різних типах ферментерів на триптон-соєвому (ТС) поживному середовищі з додаванням сечовини, 20 г/дм³, NaCl, 20 г/дм³ та pH індикатора фенол червоний, 10 мг/дм³.

Штам *Bacillus megaterium* DSMZ 90 вирощували в рідкому середовищі ТС при 30°C на качалці при 150 об/хв протягом 48 год та використовували як модель бактеріологічного забрудника піщаного ґрунту.

Штам *Paracoccus denitrificans* DSMZ 413 асептично вирощували при 30°C протягом 3-5 діб на середовищі зі складом, г/дм³: сухе ТС середовище, 5; етанол, 8; KNO₃, 10; NH₄Cl, 1; дистильована вода, 1 дм³; pH 7,0. Склянки з бактеріальними суспензіями обробляли азотом протягом 5 хв для створення анаеробних умов.

Селекцію асоціації целюлозо-зброджувальних та залізо-відновлювальних бактерій (ЗВБ) проводили в анаеробній камері Bacton Anaerobic Environmental Chamber (Sheldon Manufacturing, Inc., USA), заповненій такою сумішшю газів, об/об: N₂, 95%; H₂, 2,5%; CO₂, 2,5%, в рідкому середовищі, що містило гематитову залізну руду, 100 г/дм³, мікрокристалічну целюлозу, 30 г/дм³, дріжджовий екстракт, 5 г/дм³, CaCO₃, 20 г/дм³.

Ідентифікація штамів мікроорганізмів. Для ідентифікації штамів використовували полімеразну ланцюгову реакцію для ампліфікації гена 16S рибосомальної РНК за допомогою еубактеріальних праймерів 27F, 530F, 926F, 519R, 907R і 1492R. Отримані продукти ампліфікації були очищені та секвеновані за допомогою капілярного аналізатору ABI PRISM3730xl DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Часткові послідовності нуклеотидів були зібрані для створення повної послідовності нуклеотидів і вона була порівняна з іншими послідовностями, які представлені в базі даних Національного центру біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnological Information, NCBI, USA) при використанні комп'ютерної пошукової програми BLAST.

Хімічні та біохімічні методи дослідження. Уреазну активність визначали за допомогою кондуктометра як кількість амонію, що утворилася в 1М розчині сечовини за хвилину. Кількість утвореного карбонату кальцію вимірювали фільтрацією та висушуванням за температури 60°C. Концентрацію кальцію визначали стандартним методом з титруванням етилендіамінтетраацетатом. Концентрацію загального заліза у розчинах визначали за допомогою емісійного спектрометра з індуктивно зв'язаною плазмою Optima 2000 DV. Вимірювання вмісту летких кислот проводили на рідинному хроматографі HPLC Series 200 з іонізаційним детектором. Вміст важких металів після кислотного озолення зразка визначали за допомогою емісійного спектрометра з індуктивно зв'язаною плазмою Optima 2000 DV. Вимірювання поглинання фенантрени в екстрактах крижаної оцтової кислоти в УФ-ділянці проводили за фіксованої довжини хвилі 252 нм у кварцових кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см.

Фізичні методи дослідження. Концентрацію біомаси визначали за оптичної щільності суспензії на УФ спектрофотометрі за 600 нм. Вміст сухих речовин визначали стандартним методом після фільтрації та висушування зразка до постійної маси за температури 105°C. Аналіз розподілу бактеріальних клітин, їх агрегатів та частинок проводили на Mastersizer 2000 аналізаторі розміру частинок (Malvern Instruments Ltd, UK). XRD (рентгенівська дифракція) для визначення мінералів виконували на Bruker D8 Advance X-ray дифрактометрі. Механічні та геотехнічні показники біоцементованих зразків (такі, як гідравлічна проникність, випробування на необмежене стиснення, визначення граничної міцності, випробування на чотирьох точковий вигин) виконували стандартними методами, прийнятими в геотехніці.

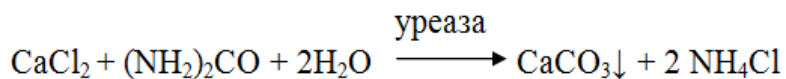
Мікроскопія зразків. Світову мікроскопію проводили за допомогою стереомікроскопа SZX9 (Olympus, Japan). Морфологію бактеріальних клітин, мікроструктуру поверхонь чи форму кристалів вивчали за допомогою скануючого електронного мікроскопа (SEM) Zeiss EV050 та Leica Stereoscan

420. Вивчення зразків сухої біоцементованої глини, які були запилені платиною, проводили на аналітичному автоемісійному растровому електронному мікроскопі з надвисокою роздільною здатністю JSM-7600 (JEOL USA, Inc., USA). Біоплівки на поверхні спостерігали за допомогою конфокального скануючого флуоресцентного мікроскопа Fluoview300 (Olympus, Japan). Атомно-силову мікроскопію (АСМ) поверхонь було проведено на AFM XE-100 (Park Systems Inc., Santa Clara, CA, USA).

Статистичний аналіз та математичне моделювання. Досліди проводили в трьох та більше повторюваннях. Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel. Математичне моделювання процесів глибинної та поверхневої біоцементатації включало динаміку та статику адсорбції клітин на поверхні, опис специфічній ферментативній активності та динаміку і статику продукування біоцементуючих мінералів бактеріями.

Розділ 3. Вибір біоагенту та біотехнології його отримання для біоцементатації

Одними з найважливіх задач у розробці біотехнологій виробництва біоцементу та його застосування у природоохоронних технологіях та промисловості були скринінг, виділення, ідентифікація, та культивування найбільш активних та біобезпечних штамів уреаз-продукуючих бактерій (УПБ) для проведення біоцементатації за реакцією:



Мікробіологічний аналіз накопичувальної культури УПБ. Проводили аналіз мікробіологічного складу накопичувальної культури УПБ, яку підтримували в лабораторії протягом року в нестерильних умовах. Концентрація NaCl в середовищі була 2% (мас/об) і кінцеве рН культуральної рідини – на рівні 8,8 – 9,2. Середня уреазна активність накопичувальної культури була близько 5,7 мМ гідролізованої сечовини/хв. Максимальна кінцева концентрація клітин у накопичувальних культурах $8,7 \cdot 10^8$ кл/см³. Проведення біоцементатації/біозакупорювання піску з використанням цієї накопичувальної культури знизило гідравлічну проникність піску з $5,0 \cdot 10^{-5}$ м/с до $3,8 \cdot 10^{-7}$ м/с та забезпечило його міцність за одноосного стиснення 1400 кПа за умови вмісту карбонату кальцію 9% (мас/об). Ця накопичувальна культура була придатна до біоцементатації/біозакупорювання піску з технічної точки зору, проте її біобезпечність не було визначено. Для характеристики біобезпечності цієї накопичувальної культури проводили її мікробіологічний аналіз.

Накопичувальна культура УПБ містила чотири штами, які відрізнялися за величиною, формою, кольором, контуром краю, характером поверхні колоній, що росли на твердому середовищі у чашках Петрі: *Yaniella* sp. VS8 (група ризику 1), *Bacillus* sp. VS1 (99% філогенетична схожість до *Sporosarcina*

pasteurii, група ризику 1), *Staphylococcus sp.* VS21 (рівень біобезпечності 2) та *Bacillus cereus* VS17 (вид включає опортуністичні патогени людини). Доля штамів становила 55, 30, 10 та 5 % колоній для штамів VS8, VS1, VS21 та VS17, відповідно. Таким чином, накопичувальна культура УПБ може містити бактерії, які є опортуністичними і навіть реальними патогенами. Тому тільки чисті та біологічно безпечні бактеріальні культури можуть бути рекомендовані для практичних процесів біозакупорювання та біоцементациї.

Скринінг уреазо-продукуючих спороутворюючих бактерій для біоцементациї. Найважливішим компонентом біоцементу є бактеріальна біомаса здатна до адсорбції на поверхні частинок і уреазно активна в умовах високої концентрації солі кальцію і лужного рН. Виділення чистих культур бактерій для біоцементациї проводили з накопичувальних культур, в яких рН було вище за 9. Галофільні та алкалофільні штами *Bacillus sp.* VS1 (ізольований з піщаного ґрунту Сінгапуру) та *Bacillus sp.* VUK5 (ізольований з садового ґрунту України) показали найбільшу уреазну активність і були обрані для наступних досліджень. Повна послідовність нуклеотидів гену 16S рРНК штаму VS1 була депонована під номером JF896459, а штаму VUK5 – під номером KC464455 в ГенБанку Національного центру Біотехнологічної інформації. Секвенування гену 16S рРНК показало їх 99% філогенетичну схожість, а також їх схожість з штамми, які були ізольовані для проведення уреолітичного мікробного осадження карбонату кальцію у Бельгії (Hammes та ін., 2003) та Індонезії (Lisdiyanti та ін., 2011). Штам *Bacillus sp.* VS1 мав максимальну питому швидкість росту $0,10 \text{ год}^{-1}$ та уреазну активність $6,2 \text{ mM}$ прогідролізованої сечовини/хв (Рисунок 1а), а штам *Bacillus sp.* VUK5, який був ізольований в Україні, мав максимальну питому швидкість росту $0,09 \text{ год}^{-1}$ та уреазну активність $8,8 \text{ mM}$ /хв (Рисунок 1б).

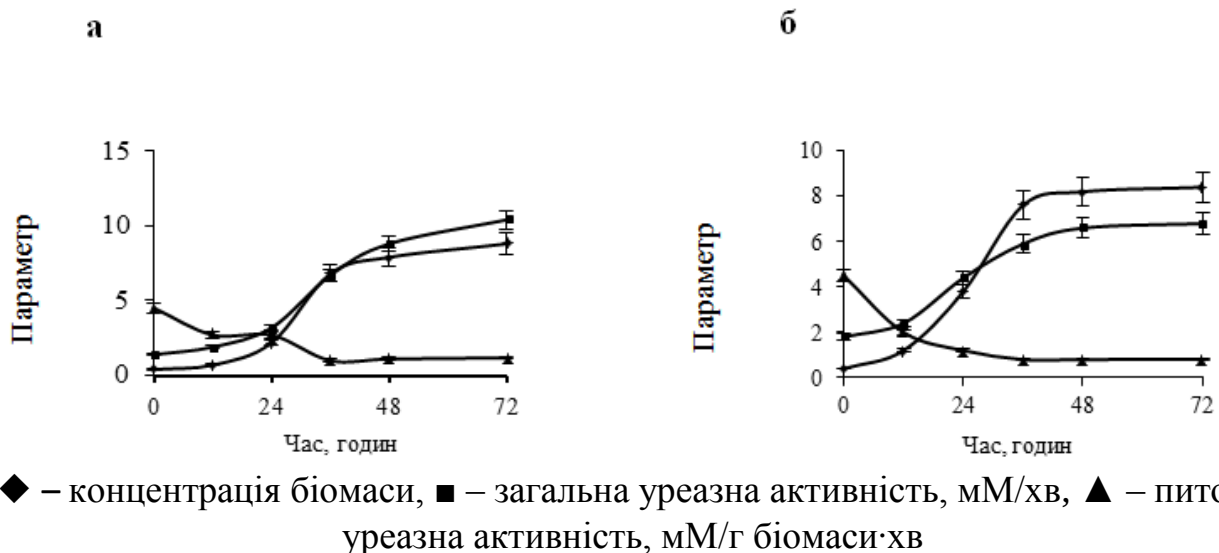


Рисунок 1 – Періодичний ріст штамів VS1 (а) та UK5 (б).

Межа міцності біоцементованого піску зі застосуванням штамів *Bacillus sp.* VS1 або VUK5 становила 765 кПа та 845 кПа, відповідно, за умови вмісту осадженого кальцію 2,3%.

Підвищення біобезпеки за умови використання процесів мікробного біозакупорювання та біоцементатії. Алакофільні уреаз-продукуючі бактерії широко використовують у лабораторіях світу для біоцементатії. Для підвищення біобезпеки біоцементатії розробляли технологію інактивації бактеріальних клітин зі зберіганням уреазної активності. Досліджували короточасний вплив ультразвуку, розчинів етанолу та 0,5% розчину аніоногенної поверхнево-активної речовини додецілсульфату натрію (SDS) на виживання клітин і зберігання уреазної активності. Частина клітин спороутворюючих бактерій *Bacillus sp.* VS1, вірогідно бактеріальні спори, залишалися живими за всіх способів обробки. Але для *Yaniella sp.* VS8 найкращі результати з інактивацією клітин та збереженням уреазної активності були отримані у випадку застосування SDS. Інкубація бактеріальних клітин *Yaniella sp.* VS8 в 0,5% розчині SDS протягом 120 хв не залишала живих клітин, але знижувала уреазну активність тільки на 35%, з 4,9 до 3,2 мМ/хв (Таблиця 1).

Таблиця 1 – Вплив способу обробки бактеріальних клітин на їх уреазну активність і виживання

Спосіб обробки	Уреазна активність*, мМ/хв при інкубації в розчині 1М сечовини, хв		КУО/см ³ *
	5	30	
Контроль	4,9	2,3	$5,2 \cdot 10^8$
Ультразвук, 30 с	3,8	2,2	$4,0 \cdot 10^8$
Ультразвук, 60 с	3,3	-	$8,5 \cdot 10^7$
Ультразвук, 300 с	3,2	1,1	$2,1 \cdot 10^7$
Етанол, 25% (об/об)	7,6	7,7	$8,9 \cdot 10^2$
Етанол, 50% (об/об)	6,0	6,9	$5,4 \cdot 10^2$
Етанол, 70% (об/об)	3,2	3,5	$4,9 \cdot 10^2$
0,5 % SDS, 10 хв	2,1	8,9	$7,8 \cdot 10^2$
0,5 % SDS, 30 хв	2,5	7,5	$1,0 \cdot 10^1$
0,5 % SDS, 120 хв	3,2	6,5	менш 1

(*) Точність вимірювань становила менш як 10%.

Середня уреазна активність для тривалої інкубації інактивованих клітин і необроблених клітин в 1М розчині сечовини були майже однакові (Таблиця 2).

Таблиця 2 – Уреазна активність після інкубації бактеріальних клітин в 1М розчині сечовини

Клітини УПБ	Уреазна активність*, мМ/хв, за час контакту з 1М розчином сечовини, хв					
	5	30	60	100	200	960
Живі необроблені клітини	4,95	2,28	2,19	1,97	0,96	0,21
Інактивовані клітини	3,20	6,49	6,34	5,63	3,92	0,29

(*) Точність вимірювань становила менш як 10%.

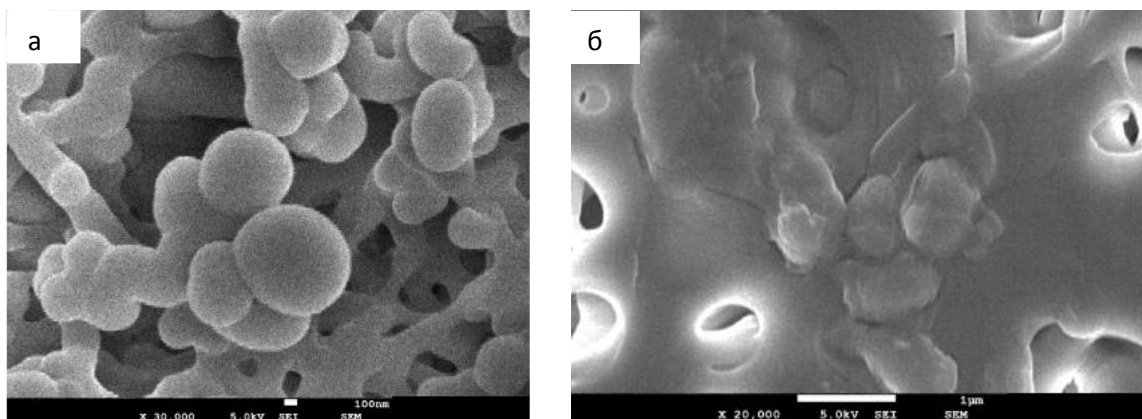
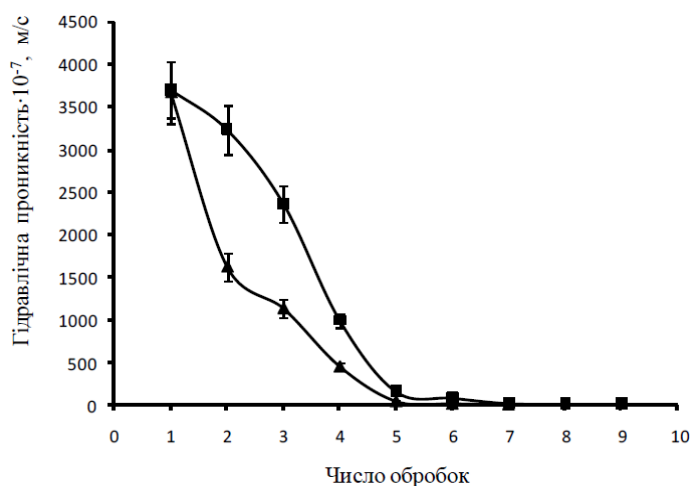


Рисунок 2 – СЕМ зображення необроблених (а) та оброблених розчином додецилсульфату натрію (б) клітин *Yaniella sp.* VS8.

Зміна гідравлічної проникності піщаних колонок при використанні для їх біозакупорювання інактивованих клітин *Yaniella sp.* VS8 в порівнянні з живими бактеріями наведена на Рисунку 3.



▲ – із застосуванням живих клітин, ■ – інактивованих клітин зі збереженою уреазною активністю

Рисунок 3 – Гідравлічна проникність піщаних колонок з проведенням біоцементації штамом *Yaniella sp.* VS8.

Як видно зі зміни гідравлічної проникності, біозакупорювання у пазі використання інактивованих клітин уреаз-активних клітин відбувалося повільніше порівнянно з живими клітинами *Yaniella sp.* VS8 (Рисунок 3). Можливою причиною цього є слабша адгезія на частках піску руйнованих бактеріальних клітин порівнянно з цілими клітинами. Гідравлічна проникність знизилася з $5,2 \cdot 10^{-4}$ м/с до нуля в контролі з живими клітинами за умови вмісту CaCO_3 12 % (мас/мас) і до $7,5 \cdot 10^{-7}$ м/с в експерименті з інактивованими клітинами УПБ після 7 обробок. Таким чином, найбільша біобезпчність процесу біоцементації може бути забезпечена інактивацією бактеріальних клітин *Yaniella sp.* VS8 в розчині SDS із зберіганням їх уреазної активності.

Динаміка уреазної активності штамів *Bacillus sp.* VS1 та *Yaniella sp.* VS8. Було встановлено, що уреаза УПБ штаму *Bacillus sp.* VS1 має конститутивний характер, а уреаза штаму *Yaniella sp.* VS8 є індукцибельним ферментом (Таблиця 3).

Таблиця 3 – Уреазна активність штамів *Yaniella sp.* VS8 та *Bacillus sp.* VS1

Час контакту клітин з розчином 1М сечовини, хв	Середня уреазна активність, мМ прогідролізованої сечовини/хв за час контакту при рості на середовищі з дріжджовим екстрактом					
	<i>Yaniella sp.</i> VS8			<i>Bacillus sp.</i> VS1		
	А	Б	В	А	Б	В
0-5	0	12,8	0	13,2	12,9	12,8
0-30	0,3	4,7	0,2	11,1	9,9	10,1
0-180	1,8	3,1	1,7	7,2	6,6	6,3
0-360	1,5	1,9	1,7	1,5	1,6	1,8

Примітка. А – немає внесення сечовини чи NH_4Cl в середовище, Б – внесення сечовини в середовище, В – внесення NH_4Cl в середовище.

Біозакупорювання піщаної колонки в експерименті за умови використання клітин *Yaniella sp.* VS8 з індукцибельною уреазою, які були отримані під час вирощування на середовищі без сечовини, і біоцементуючого розчину 1,5М сечовини та 1,5М CaCl_2 проходило повільніше, особливо на початку обробки піску, порівнянно з використанням клітин *Yaniella sp.* VS8, вирощених на середовищі з сечовиною. Однак, гідравлічна проникність в експерименті знизилась від $4,8 \cdot 10^{-4}$ м/с до $5 \cdot 10^{-7}$ м/с, що є достатньою для застосування закріпленого піску. Таким чином виявлено що культивування штаму *Yaniella sp.* VS8, який синтезував індукцибельну уреазу, також можна проводити без додання сечовини, оскільки синтез уреазы може бути індукований в розчині для біоцементациї, який містить CaCl_2 та сечовину.

Використання відходів для виробництва біоагенту для біоцементациї. Собівартість промислового біоцементу залежить від економічної ефективності виробництва бактеріальної біомаси для біоцементациї. Більшість дослідників застосовують для вирощування уреаз-продукуючих бактерій висококоштовні мікробіологічні середовища з додаванням сечовини після її холодної стерилізації фільтрацією. Для зменшення собівартості біоцементу визначали дешевше середовище та біотехнології для виробництва біомаси УПБ в промисловому масштабі. Для вирощування уреаз-продукуючих бактерій найчастіше застосовують дріжджовий екстракт і триптозний соєвий бульйон. Перевіряли чи можна замінити це середовище гідролізатом активного мулу (ГАМ). Сечовину не вносили в середовища під час вирощування *Bacillus sp.* VS1, але вносили в концентрації 10 г/дм³ під час вирощування *Yaniella sp.* VS8 (Таблиця 4).

Концентрація клітин УПБ *Yaniella sp.* VS8 під час росту на ГАМ була майже такою самою як концентрація клітин у середовищі з 4% дріжджового екстракту.

Таблиця 4 – Використання гідролізованого активного мулу для культивування УПБ

Середовище	<i>Yaniella sp.</i> VS8		<i>Bacillus sp.</i> VS1	
	УА, мМ/хв	КУО/см ³	УА, мМ/хв	КУО/см ³
Дріжджовий екстракт	11,3	$1,1 \cdot 10^8$	11,2	$1,8 \cdot 10^9$
ГАМ	7,5	$6,2 \cdot 10^8$	3,6	$1,2 \cdot 10^8$
ГАМ + NiCl ₂	7,5	$5,7 \cdot 10^8$	3,7	$1,4 \cdot 10^8$
ГАМ + NiCl ₂ + глюкоза	8,2	$8,1 \cdot 10^8$	4,5	$7,2 \cdot 10^8$

Проте, уреазна активність була нижчою, ніж на середовищі з дріжджовим екстрактом. Вирощування *Yaniella sp.* VS8 та *Bacillus sp.* VS1 для масштабної біоцементатії можна проводити за використання дешевого середовища, що має за основу гідролізований активний мул очисних споруд.

Розділ 4. Підвищення ефективності біоцементатії

Для підвищення ефективності біоцементатії бактеріями вивчали біоцементуючу ефективність культуральної рідини, біомаси клітин і супернатанту суспензії УПБ, а також шляхи інтенсифікації адсорбції бактеріальних клітин на поверхні піску.

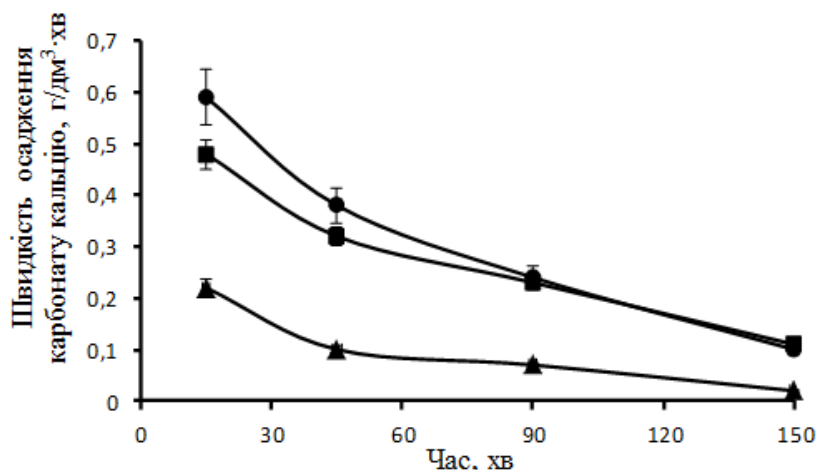
Підвищення уреазної активності біоагенту біоцементатії. Клітини УПБ виділяли від супернатанту центрифугуванням, а потім ресуспендували в 2% розчині NaCl. Уреазну активність фракцій показано в Таблиці 5.

Таблиця 5 – Уреазна активність культуральної рідини, супернатанту та клітин УПБ

Об'єкт дослідження	Уреазна активність, мМ прогідролізованої сечовини /хв	
	<i>Bacillus sp.</i> VS1	<i>Yaniella sp.</i> VS8
Культуральна рідина	$10,5 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,7$
Супернатант	$3,3 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$
Ресуспендовані клітини бактерій	$5,9 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,5$
Клітини бактерій сконцентровані у 2 рази	$10,8 \pm 1,1$	$9,4 \pm 0,7$
Клітини бактерій сконцентровані у 4 рази	$19,2 \pm 1,2$	$18,4 \pm 0,9$

Таким чином, виявлено що уреазна активність зв'язана в значній мірі з клітинами бактерій, тому їх концентрування дозволяє значно підвищити уреазну активність, а значить і швидкість біоцементатії.

Біоцементуюча ефективність культуральної рідини, супернатанту та біомаси клітин УПБ. Початкова швидкість осадження карбонату кальцію з розчинів кальцію хлориду та сечовини у разі застосування культуральної рідини, суспензії відмитих бактеріальних клітин або супернатанту становила 0,59, 0,48 та 0,20 г/дм³·хв (середнє значення), відповідно (Рисунок 4).



● – у культуральній рідині, ■ – в суспензії відмитих бактеріальних клітин, ▲ – в супернатанті

Рисунок 4 – Швидкість осадження карбонату кальцію з суміші розчинів хлориду кальцію та сечовини, г/дм³·хв.

Швидкості осадження кальцію показано для часових інтервалів 0-30, 30-60, 60-120 та 120-180 хв, тобто кожна точка на рисунку відповідає середині цих часових інтервалів. Кількість осадженого карбонату кальцію становило 60,2, 57,3, та 29,2 г у разі застосування культуральної рідини, суспензії відмитих клітин та супернатанту, відповідно. Межа міцності під час стискання вологих зразків піску, оброблених культуральною рідиною, суспензією відмитих бактеріальних клітин або супернатантом була 537, 518 та 199 кПа, відповідно. Таким чином, кращим вибором для біоцементациї є культуральна рідина УПБ чи суспензія відмитих клітин бактерій.

Інтенсифікація адсорбції бактеріальних клітин на поверхні піску за рахунок його обробки різними катіонами. Важливим етапом у процесі біоцементациї є адсорбція клітин УПБ на поверхні часток піску, які надалі відіграють роль центрів утворення кристалів кальциту. Ефективність адсорбції бактеріальних клітин на зернах піску можливо підвищити проведенням попередньої обробки піску різними катіонами (Таблиця 6). Обробка піску катіонами кальцію, алюмінію та заліза підвищувала адсорбцію бактеріальних клітин на часинках піску від 29 до 37% порівнянно з необробленим піском.

Таблиця 6 – Ефективність адсорбції бактеріальних клітин на частинках піску після попередньої обробки піску різними катіонами

Розчин для обробки піску	Ефективність сорбції клітин, % від початковій кількості клітин у суспензії, на частинках піску з розмірами, мм		
	0,2 – 0,6	0,6 – 1,2	> 1,2
Вода	70 ± 5	68 ± 3	65 ± 6
Розчин з Ca ²⁺	96 ± 2	94 ± 5	82 ± 3
Розчин з Fe ³⁺	90 ± 5	89 ± 2	80 ± 4
Розчин з Al ³⁺	92 ± 2	90 ± 4	84 ± 4

Агрегація бактеріальних клітин. Обробка культуральної рідини розчином кальцію сприяла створенню агрегатів клітин УПБ розміром до 100 мкм та їх затриманню у поверхневому шарі піску. Це обумовлювало більш інтенсивне утворення кристалів карбонату кальцію у верхньому шарі піску тобто поверхневу біоцементацию. Така обробка верхнього шару піску зменшувала гідравлічну проникність у 2,9 разів порівнянно з біоцементациєю в масі піску за тієї ж кількості осажденного карбонату кальцію. Тому обробка суспензії бактерій іонами кальцію рекомендується для проведення поверхневої біоцементации ґрунту.

Параметри біоцементованого піску залежно від вмісту осаженного карбонату кальцію. Межа міцності під час стиснення, S , (Рисунок 5а) та водопроникність, k , (Рисунок 5б) біоцементованого піску лінійно залежали від вмісту осаженного кальцію, C (% мас/мас від сухого обробленого піску)

$$S = 366 C, \text{ кПа}; (R^2 = 0,98),$$

$$k = 507 - 403C, 10^{-7} \text{ м/с}; (R^2 = 0,98).$$

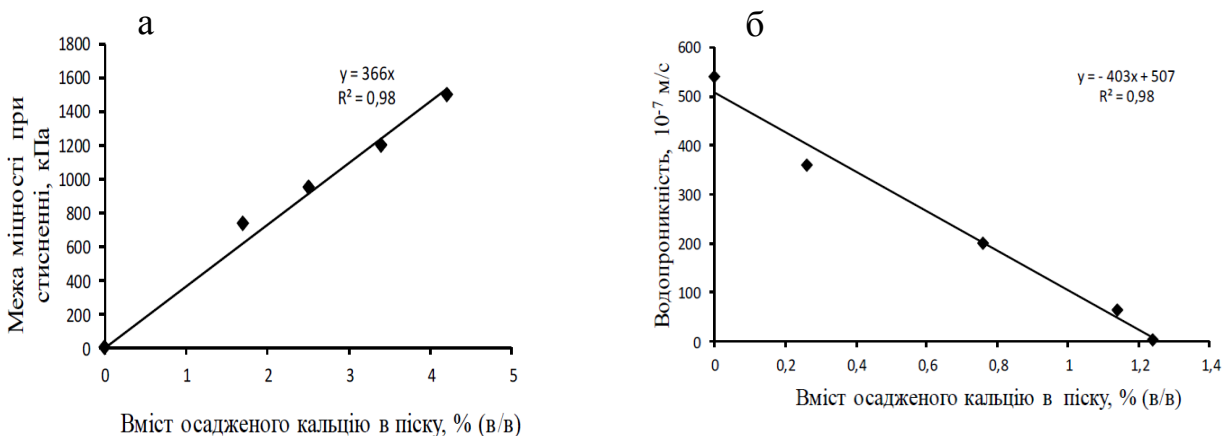
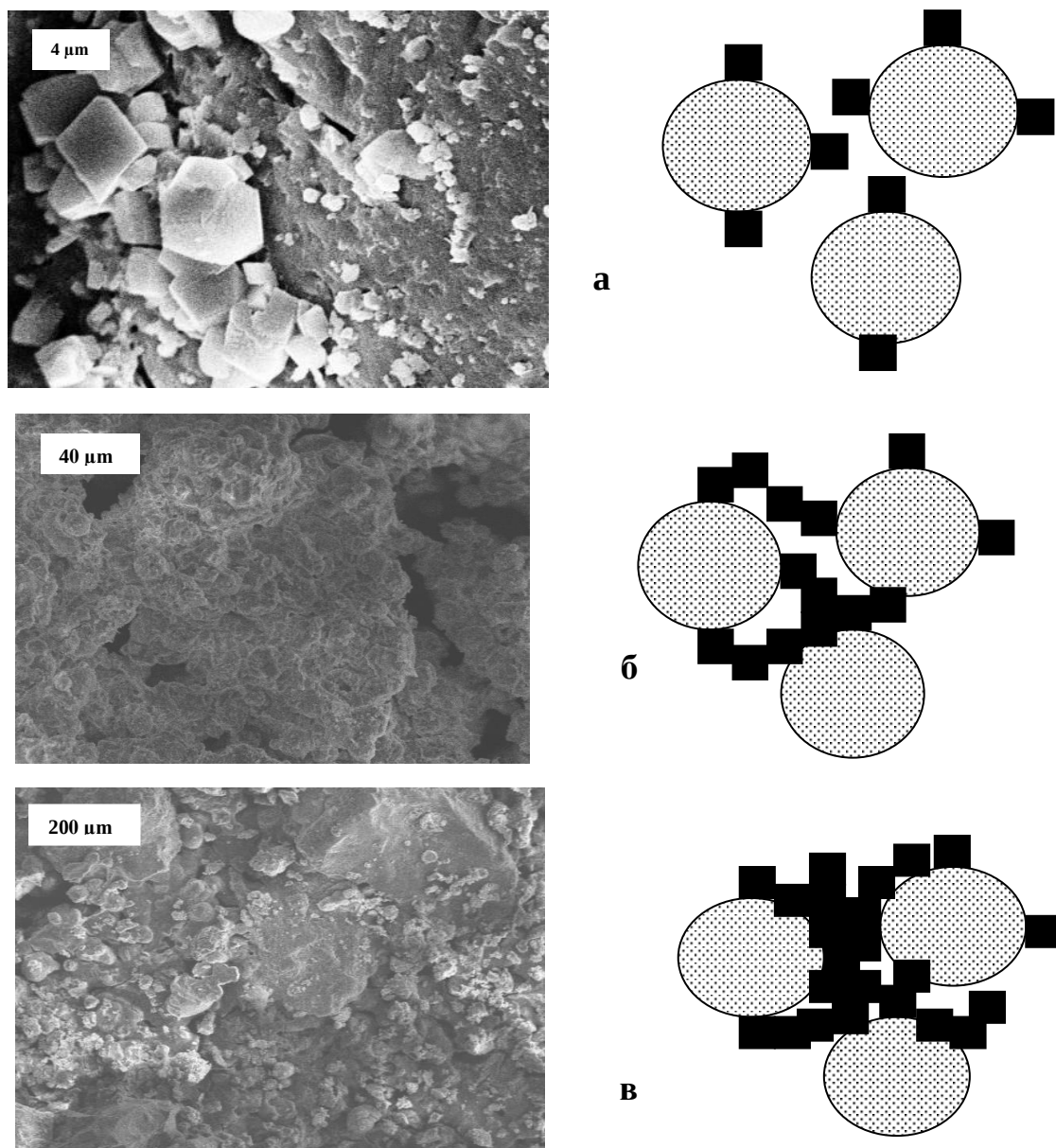


Рисунок 5 – Вплив вмісту осаженного кальцію. на межу міцності піску під час стиснення (а) та водопроникність біоцементованого піску (б).

Стадії біоцементации. Фотографії піску після біоцементации, отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопа (СЕМ), наведено на Рисунок 6. Біоцементацийний процес складався з адгезії бактеріальних клітин та формування кристалів на поверхні піску (Рисунок 6а), закупорювання каналів між зернами піску (Рисунок 6б) та заповнення пор кристалами карбонату кальцію (Рисунок 6в). Кристали кальциту осаджувались не в рідині в порах піску, а безпосередньо на його поверхні (Рисунок 7а, б). Бактеріальні клітини або молекули уреаз, прикріплені до зерен піску, слугували центрами кристалізації. В результаті акумуляції осадів відбувалося закупорювання пор піску.



— піщані частинки



— кристали кальциту

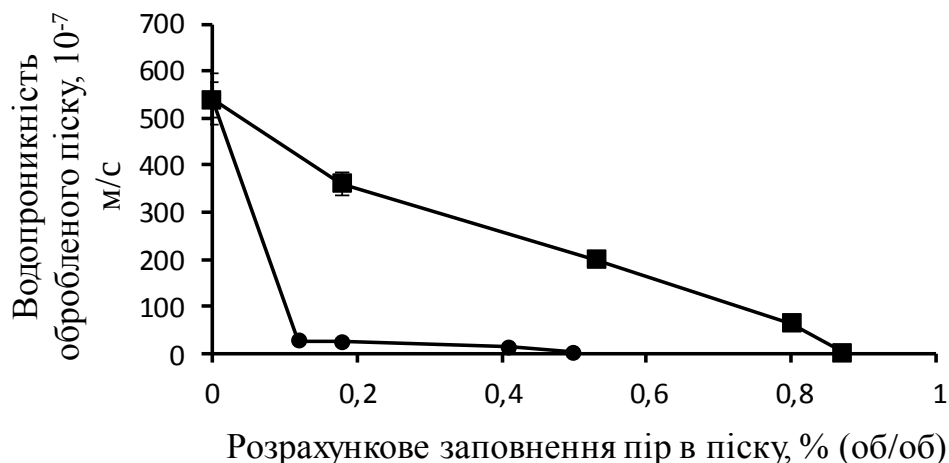
Рисунок 6 – СЕМ зображення мікробно-ініційованої кристалізації карбонату кальцію на піску (зліва) та схема стадій процесу (справа): а) адсорбція клітин та формування кристалів на поверхні піску; б) закупорювання каналів між зернами піску; та в) заповнення пор кристалами карбонату кальцію.

Розділ 5. Модифіковані способи біоцементзації

Основним способом біоцементзації є процес, що на мікробному уреолітичному осадженні карбонату кальцію. Але інші способи можуть також бути корисними для різноманітних практичних біотехнологій. Попередній теоретичний аналіз показав що найбільш ефективними та практично корисними можуть бути два нових способи біоцементзації ґрунту чи інших твердих матеріалів: 1) спосіб, який базується на послідовному використанні залізо-відновлювальних та уреаза-продукуючих бактерій; 2) спосіб, який включає

послідовне застосування денітрифікуючих та уреаз-продукуючих бактерій. Ці способи вивчали експериментально.

Порівняння кальцій - або залізовмісних закріплювачів пористого ґрунту. Застосування розчинних солей кальцію чи хелатів заліза, сечовини та УПБ *Bacillus sp.* VS1 дало змогу знизити водопроникність піску з $5,4 \cdot 10^{-5}$ до $1,4 \cdot 10^{-7}$ м/с, навіть за умови вмісту осаджених металів у піску менш за 1,5% (мас/мас) і у разі заповнення пор утвореними осадами менш як 1% (об/об) (Рисунок 7).



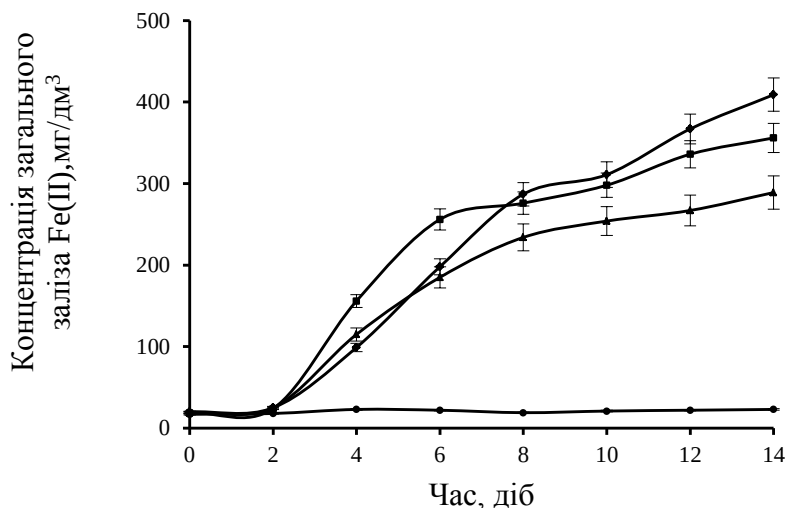
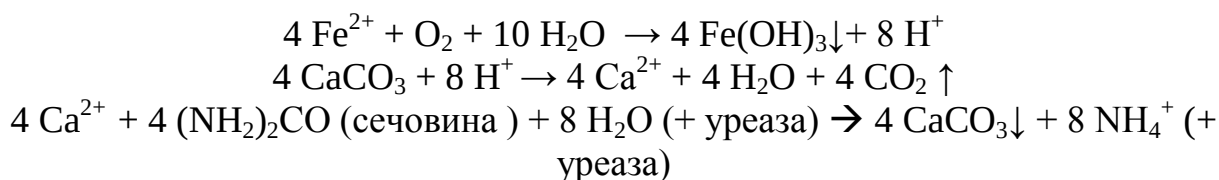
■ – в присутності катіонів кальцію, ● – заліза

Рисунок 7 – Зниження водопроникності піску як результат біоакупорювання пір піску.

Дані показують що залізовмісний біозакріплювач більш ефективний для зниження водопроникності ґрунту ніж кальцієвмісний закріплювач.

Виробництво та використання залізовмісного біозакріплювача ґрунту із залізної руди та целюлози. Розчин залізовмісного біозакріплювача ґрунту можна отримати під час відновлення залізної руди органічними сполуками завдяки активності анаеробних залізо-відновлювальних бактерій (ЗВБ). Досліджували застосування двох накопичувальних культур ЗВБ та чистої культури (ЧК) ЗВБ *Stenotrophomonas maltophilia* штам ВК. Усі культури мали коротку фазу адаптації, й біовідновлення оксиду Fe(III) спостерігалось вже на третю добу культивування. Максимальні концентрації загального двовалентного заліза на 14-ту добу періодичного вирощування становили 409, 356 та 289 мг/дм³, а максимальні швидкості утворення Fe(II) з оксиду Fe(III) – 49,5, 50,0 та 35 мг/дм³·добу для ЧК, НК1 та галотолерантної НК2, відповідно (Рисунок 8).

Використання біозакріплювача, отриманого під час відновлення оксиду тривалентного заліза ЗВБ за анаеробної ферментації целюлози в присутності карбонату кальцію, приводить до біоакупорювання пористого ґрунту за рахунок окислення і гідролізу Fe²⁺, осадження гідроксиду Fe³⁺ та кальциту, що може бути описано так:



● – за відсутності посівного матеріалу, ■ – накопичувальна культура 1; ▲ – накопичувальна культура 2; ◆ – чиста культура *Stenotrophomonas maltophilia* штам ВК

Рисунок 8 – Зміна концентрації загального Fe(II) протягом експериментів з різним посівним матеріалом ЗВБ.

Кінцевий продукт – агрегований пісок, схожий на природний камінь червоний пісковик (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Пісок після біоакупорювання в результаті діяльності УПБ і ЗВБ у присутності залізної руди, целюлози, карбонату кальцію, та сечовини.

Таким чином, показана можливість біоцементації піску за допомогою залізо-відновлювальних, целюлозо-ферментуючих та уреаза-продукуючих бактерій з використанням оксиду заліза (III) руди та целюлози. Це може знайти застосування в Україні де є значні ресурси як відходів добування гематитової залізної руди, так і целюлозовмісних сільськогосподарських відходів.

Комбінація біоцементації з біохімічним відновленням нітрату для біозакупорювання пористого ґрунту. Мікробно-ініційоване осадження карбонату кальцію з розчинної солі кальцію і сечовини потребує значних витрат сировини і супроводжується виділенням аміаку у навколишнє середовище. Для зменшення витрат хімічних реагентів і запобігання вивільнення значних кількостей аміаку в довкілля вивчали можливість застосування цього процесу в комбінації з біохімічним процесом денітрифікації. Передбачалося утворення мікропухирців біогазу у порах піску завдяки денітрифікації та іммобілізація цих мікропухирців в порах за рахунок біоцементації каналів між порами піску. За одночасної інжекції суспензії клітин денітрифікуючих бактерій *Paracoccus denitrificans* DSMZ 413 та УПБ *Bacillus* sp. VS1 у суміш середовищ для денітрифікації та біоцементації не відбувалося утворення біогазу, а також підвищення рН та осадження CaCO_3 . Можливою причиною є припинення активності денітрифікуючих бактерій завдяки осадженню фосфатів і сульфатів з середовища іонами кальцію. Експериментально доведено, що присутність у середовищі іонів кальцію в концентрації вищій за 0,1М припиняло процес денітрифікації у піску.

Ефективність послідовної денітрифікації та біоцементації оцінювали обробкою піщаних колонок за безперервної подачі спочатку середовища для денітрифікації, а потім розчину для біоцементації. Безперервна подача денітрифікуючого середовища відбувалася зі швидкістю, що забезпечувала час гідравлічного утримання для бактерій та середовища в порах піску приблизно 25 годин. Ця обробка зменшила гідравлічну проникність піску від $2,6 \cdot 10^{-4}$ до $2,1 \cdot 10^{-6}$ м/с на 14 добу (Рисунок 10).

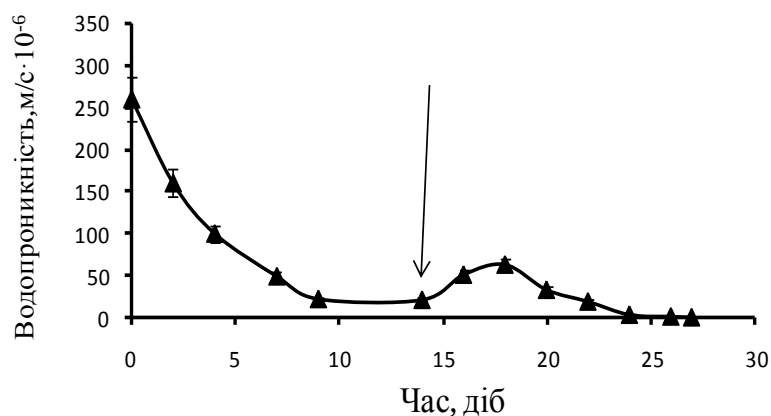


Рисунок 10 – Зміна водопроникності піску протягом його обробки бактеріями *P. denitrificans* (від 1 до 14 діб), а потім бактеріями *Bacillus* sp.VS1 (від 14 до 27 діб). Стрілкою показано початок обробки піску клітинами штаму *Bacillus* sp.VS1 у розчині для біоцементації.

Після додаткових 13 діб безперервного біозакупорювання/біоцементації зі швидкістю потоку, яка забезпечувала час гідравлічного утримання 25 годин, гідравлічна проникність піску зменшувалася до $2,0 \cdot 10^{-7}$ м/с (Рисунок 10). Початкове рН середовища було 6,8...7,2, кінцеве – 8,2...8,8 протягом як

денітрифікації, так і біоцементатії. Мікроскопія показує що пухирі біогазу, які утворилися під час денітрифікації, залишалися у піску після біоцементатії.

Біоцементатія піску відбувалася по-різному у разі подачі суспензії УПБ для біозакупорювання/біоцементатія знизу або зверху колонки: після подачі суспензії УПБ знизу, максимальний вміст осажденного кальцію був біля 13% (мас/мас), але знижувався майже до нуля на відстані 10 см від місця інжекції зі значенням середнього геометричного для цих 10 см 8,0% (мас/мас) (Рисунок 11). Причиною цього може бути адсорбція клітин УПБ поблизу точки інжекції.

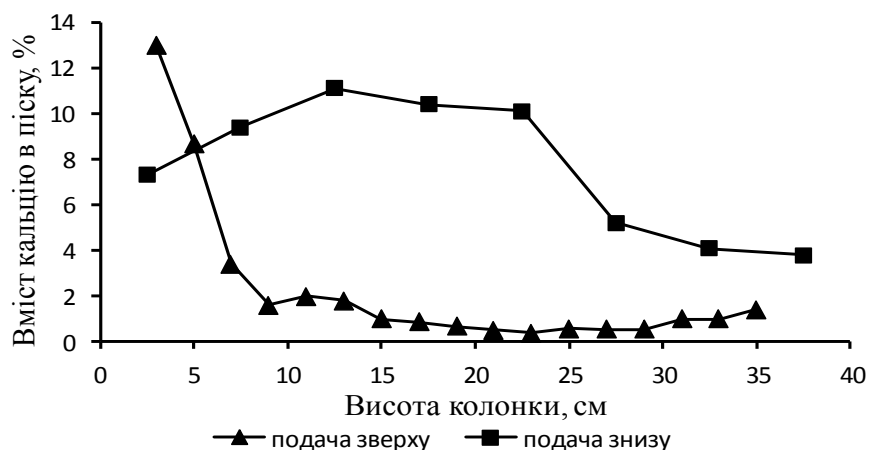


Рисунок 11 – Розподіл вмісту осажденного кальцію по висоті піщаної колонки у разі подачі суспензії УПБ зверху (▲) або знизу (■) колонки.

Однак, після подачі УПБ зверху колонки вміст кальцію в біоцементованому піску розподілявся від 5 до 11% по всьому його об'єму зі значенням середнього геометричного 8,4% для 40 см піщаної колонки (Рисунок 11). Це зумовлюється рівномірною адсорбцією клітин у колоні завдяки високий швидкості потоку рідини по всій її висоті. Середній вміст CaCO_3 8,0–8,4% (мас/мас) в обох випадках забезпечував гідравлічну проникність приблизно $1 \cdot 10^{-7}$ м/с і був значно нижче за вміст 22% (мас/мас), необхідний для біозакупорювання у разі використання тільки біоцементатії. Доза осажденного Са у випадку денітрифікації та утворення тонкого шару біоцементованого піску була $12,8 \text{ кг Са/м}^2$ поверхні піску, але у випадку денітрифікації та біоцементатії цілого об'єму піску в колонці була приблизно $53,8 \text{ кг Са/м}^2$ поверхні піску, тобто майже у 4 рази вищою. Таким чином, комбінація денітрифікації та біоцементатії в тонкому шарі піску є найбільш економічним шляхом зменшення гідравлічної проникності водонасиченого піску.

Розділ 6. Мікробно-ініційоване осадження кальцію на поверхні або в об'ємі ґрунту

Велике практичне значення має те, як відбувається біоцементатія – на поверхні, чи в об'ємі ґрунту, і як контролювати ці процеси. Було виявлено, що у разі проведення біоцементатії за підтримки рівня розчину CaCl_2 та сечовини вище поверхні піску на 2 см, кальцій в основному осаджувався у верхньому шарі піску та формував кірку кальциту (Рис. 12).

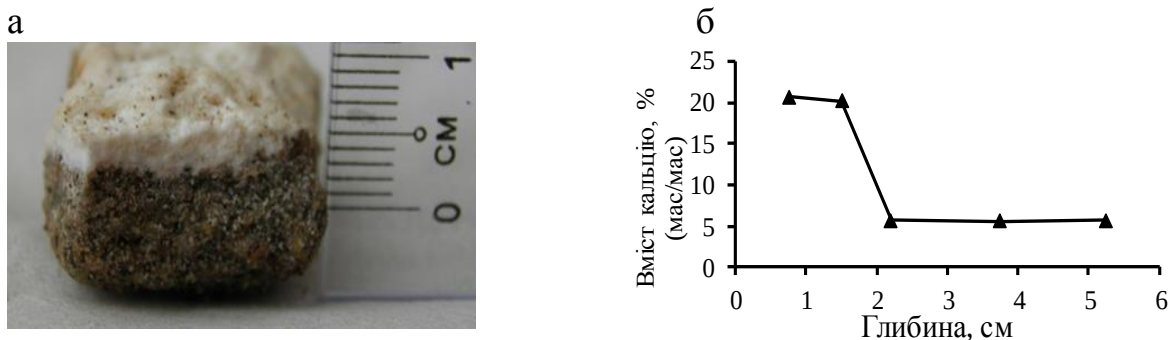


Рисунок 12 – Зразок піску після біоцементації з рівнем біоцементуючого розчину над поверхнею піску (а); розподіл кальцію в піску по глибині (б).

У разі проведення біоцементації за умови підтримки рівня розчину CaCl_2 та сечовини на рівні поверхні піску, кальцій осаджувався майже рівномірно по глибині піску, хоч вміст кальцію поступово зменшувався з глибиною (Рисунок 13). Водопроникність ґрунту залежала від кількості проведених біообробок. Вона знижувалась до $1,6 \cdot 10^{-7}$ м/с (або 14 мм/добу) після 6 обробок для обох типів проведення біоцементації (Рисунок 14). Ґрунт із таким значенням водопроникності можна використовувати в конструюванні ставків для вирощування аквакультури.

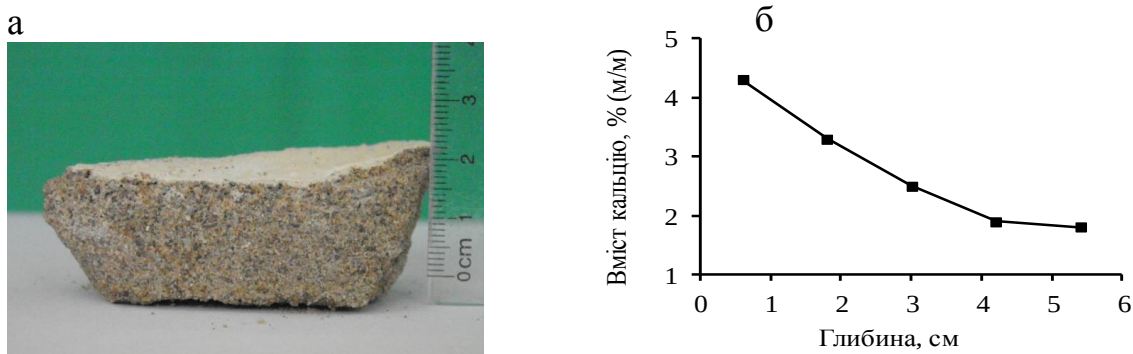
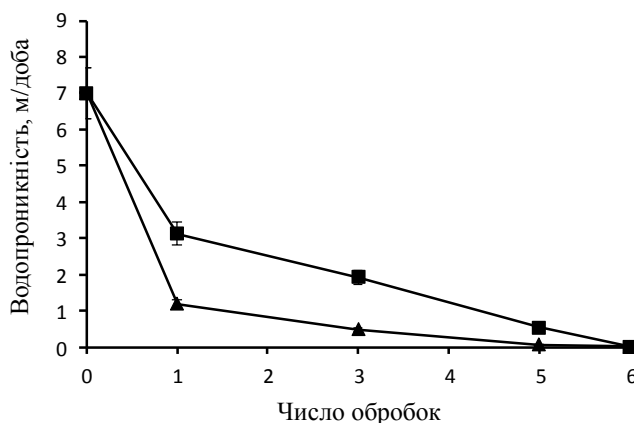


Рисунок – 13. Зразок піску після біоцементації з рівнем біоцементуючого розчину на рівні поверхні піску (а); розподіл кальцію в піску по глибині (б).

Отже, тип мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію визначається рівнем розчину CaCl_2 та сечовини відносно поверхні піску, що підлягає біоцементації. Якщо рівень розчину знаходиться над поверхнею, біоцементація найбільш активно відбувається на поверхні піску, що приводить до формування тонкої, але міцної кірки. Межа міцності на вигин поверхневого кіркового шару, що утворився під час поверхневої біоцементації, становила 35,9 МПа. Це значення можна порівняти зі значенням міцності вапняку, тобто кірковий шар має не тільки низьку гідравлічну проникність, що забезпечує його водотривкість, але також і достатню міцність для запобігання ерозії берегів або нестабільності схилів.



▲ – біоцементация з рівнем розчину солі кальцію вище або ■ – на рівні поверхні піску

Рисунок 14 – Вплив числа обробок на водопроникність піску.

Проведення поверхневої біоцементации для утворювання тонкої кірки з низькою водопроникністю може знайти застосування для гідроізоляції ставків або сховищ міських чи промислових відходів у піщаному ґрунті, запобігання ерозії берегів або нестабільності схилів та іммобілізації забруднювачів.

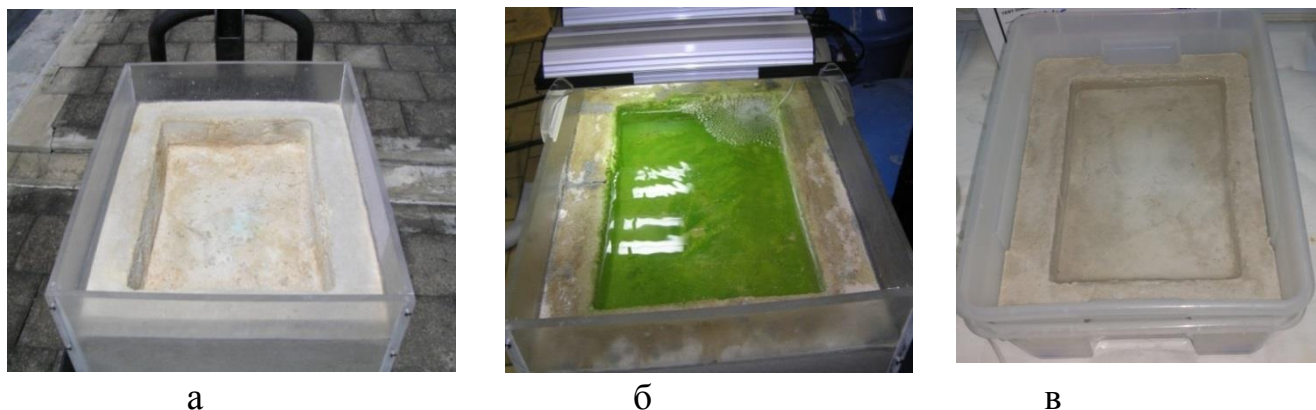
Розділ 7. Застосування біоцементации в природоохоронних технологіях

Відомо, що біотехнології біоцементации мають практичне значення для багатьох напрямів людської діяльності, таких, як закріплення ґрунтів у будівництві, боротьба з ерозією сільськогосподарських ґрунтів, виробництво нових будівельних матеріалів, реставрація пам'яток культури, ліквідація тріщин у бетоні, будівництво доріг. Задачею наших досліджень біоцементации було виявлення і експериментальна перевірка можливих напрямів застосування біоцементации в природоохоронних технологіях.

Використання біоцементации для гідроізоляції ставків у піщаному ґрунті. Новим застосуванням біоцементации, яке ще не було вивчено, може стати герметизація ставків для вирощування аквакультури або сховищ міських чи промислових відходів у піщаному ґрунті. Відомо, що високе водопросочування з таких об'єктів є проблемою для довкілля.

Реагенти для обробки піску включали: 1) суспензію клітин штаму *Bacillus* sp. VS1 з уреазною активністю 2,7 мМ гідролізованої сечовини/хв (9,7 г сечовини/дм³·год); 2) розчин зі вмістом хлориду кальцію 82,5 г/дм³ (0,75М) та сечовини 90 г/дм³ (1,5М). Обробку піску проводили послідовно 5 разів. Фото збудованого ставка представлено на Рисунку 15а.

Водопроникність піску знизилася з 10⁻⁴ м/с до 10⁻⁷ м/с за умови середнього вмісту осадженого кальцію 2,1 кг/м² піску. Необроблений пісок не мав міцності, а пісок після біоцементации мав межу міцності на вигин за чотирьох точковому тесту до 256 кПа та межу міцності під час одноосного стиснення до 932 кПа. Ґрунт з такою міцністю на вигин можна застосовуватися для укріплення схилів або стінок ставків, знижуючи вартість інженерних робіт.



а

б

в

Рисунок 15 – Модельний ставок створений біоцементациєю піску з застосуванням живих клітин *Bacillus sp.* VS1 (а); культивування водоростей у модельному ставку (б); ставок, сконструйований за умови використання ініктивованих, але уреаза активних клітин *Yaniella sp.* VS8 (в).

Такі ставки можна використовувати для вирощування водоростей з метою отримання біодизелю. Наприклад, зелені мікрроводорості *Chlorella sorokiniana*, які широко застосовують для виробництва біодизелю, автотрофно вирощували у модельному ставку (Рисунок 15б) щоб оцінити придатність ставка для інженерії водяних екосистем. Початкова концентрація біомаси водоростей у модельному ставку становила $0,5 \text{ г/дм}^3$ і зростала до $1,7 \text{ г/дм}^3$ після 7 діб культивування. Максимальна продуктивність становила $9,7 \text{ г/м}^2 \cdot \text{добу}$, а максимальна швидкість росту водоростей була $0,13 \text{ доба}^{-1}$.

Високий вміст кальцію та вуглецю в матеріалі, що заповнював простір між зернами піску (Рисунок 16) вказує на утворення карбонату кальцію.

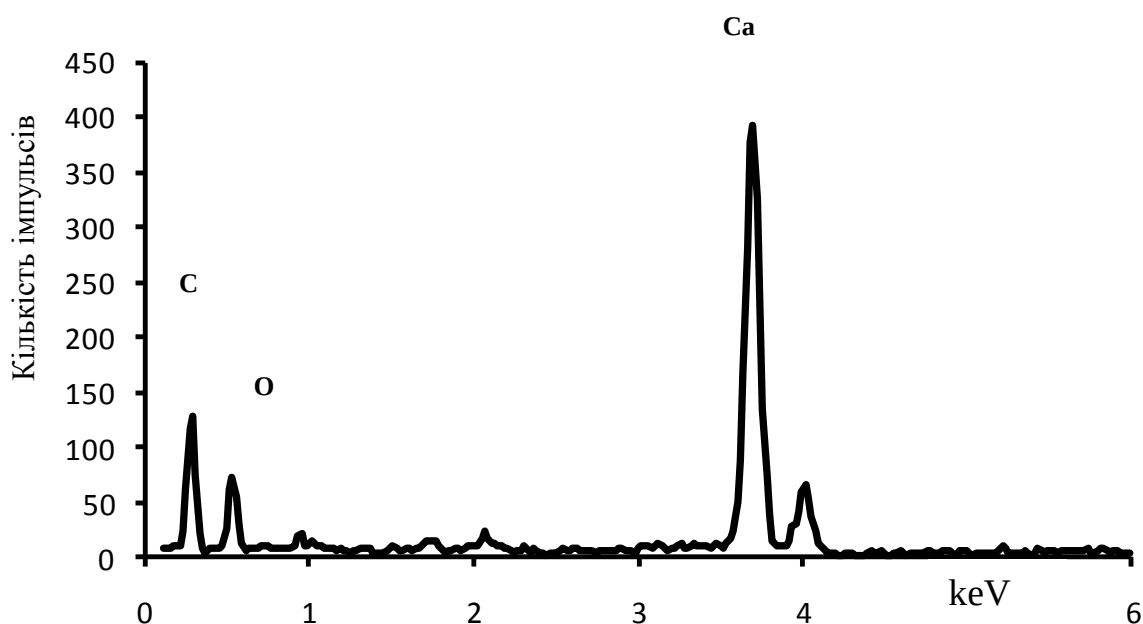


Рисунок 16 – ЕРС спектр матеріалу між зерен піску.

На прикладі конструювання ставка у піску з метою забезпечення біобезпеки біоцементациі показана можливість використання інактивованих клітин УПБ

Yaniella sp. VS8, оброблених SDS (Рисунок 15в). В результаті біообробки гідралічна проникність піску знизилася від $5,2 \cdot 10^{-4}$ до $7,7 \cdot 10^{-7}$ м/с.

Таким чином, живі клітини *Bacillus* sp. VS1 чи інактивовані, але уреаза активні клітини *Yaniella* sp. VS8 можна використовувати для біоцементативної гідроізоляції ставків або сховищ відходів у піщаному ґрунті.

Використання біоцементативної боротьби з вітровою та водною ерозіями ґрунтів. Вітрова та водна ерозії хімічно, бактеріологічно та радіоактивно забруднених ґрунтів є одними з важливіших проблем охорони довкілля, оскільки призводять до забруднення атмосфери, поверхневих вод, створюють значні проблеми і небезпеку для людини та довкілля. Тому досліджували ефект біоцементативної утворення агрегатів частинок пилу і запобігання повітряного розсіювання піщаного пилу та асоційованих з ним модельних хімічних і бактеріологічних забрудників.

Розмір 90% частинок у надтонкому піску збільшувався від 29 мкм до 181 мкм після біоагрегації. Показано, що біоагрегація частинок внаслідок проведення біоцементативної на поверхні тонкого піску за умови дози 16 г Са/м^2 та дози реагентів $0,1 \text{ кг/м}^2$ може знизити розсіювання піщаного пилу на 99,8%, а асоційованих з ним модельних хімічних і бактеріологічних забрудників, таких як фенантрен (модель поліциклічних ароматичних сполук), нітрат свинцю (модель важких металів) і бактеріальні клітини *Bacillus megaterium* (модель бактеріологічного забруднення ґрунту), на 92,7, 94,4 та 99,8%, відповідно (Таблиця 7).

Таблиця 7 – Вплив поверхневої біоцементативної на розповсюдження піщаного пилу та асоційованих з ним забрудників під дією вітрової ерозії

Досліди	Кількість піщаного пилу, видаленого з повітряним потоком, мг	Кількість забрудника, видалена з піщаним пилом		
		Фенантрен, мкг	Pb ²⁺ , мкг	КУО, кл/см ³
Контроль	196	400	602	$2,8 \cdot 10^6$
Експеримент	0,2	7,3	5,6	0,2

Показано, що біоагрегація піску може бути також використана для зменшення його водної ерозії та вивільнення асоційованих з ним хімічних і бактеріологічних забруднювачів у довкілля. Навіть малі дози осажденного кальцію, $6,4 \text{ г/м}^2$ поверхні піску, зменшували його винос на 73,2%, а також розповсюдження асоційованих з ним модельних хімічних забрудників – фенантрени та нітрату свинцю і бактеріологічного модельного забрудника піску – клітин *Bacillus megaterium* - на 61,3, 74,2 та 99,5%, відповідно (Таблиця 8).

Таким чином, біоагрегація піску може бути також використана для зменшення вітрової та водної ерозії ґрунтів та вивільнення хімічних та бактеріологічних забруднювачів ґрунту у довкілля.

Таблиця 8 – Вплив біоцементациї на зменшення розповсюдження піщаного пилу та асоційованих з ним модельних забрудників під дією водної ерозії

Досліди	Кількість пилу, видаленого з водою, мг	Кількість забрудника, видалена разом з піщаним пилом		
		Фенантрен, мкг	Pb ²⁺ , мкг	КОУ, кл
Контроль	488	879	1562	$1,5 \cdot 10^6$
Експеримент	131	380	403	$0,7 \cdot 10^4$

Використання біоцементациї для капсулювання м'якої морської глини. Морська глина є відходом під час землечерпання або днопоглиблювальних роботах на морських узбережжях, що потребує захоронення. Наша наукова ідея полягала в біотехнологічному трансформуванні м'якої морської глини в твердий матеріал шляхом мікробного капсулювання її агрегатів кальцитом. Біокапсулювання проводили змішуванням м'якої морської глини з сухою біомасою уреаза-продукуючих бактерій та наступною обробкою агрегатів глини розчином хлориду кальцію та сечовини. Така обробка утворювала механічно міцні частинки, які зберігали свої властивості у воді. Структура частинок після біоцементациї складалася з оболонки кристалів кальциту (Рисунок 17а), що покривала ядро з морської глини (Рисунок 17б).

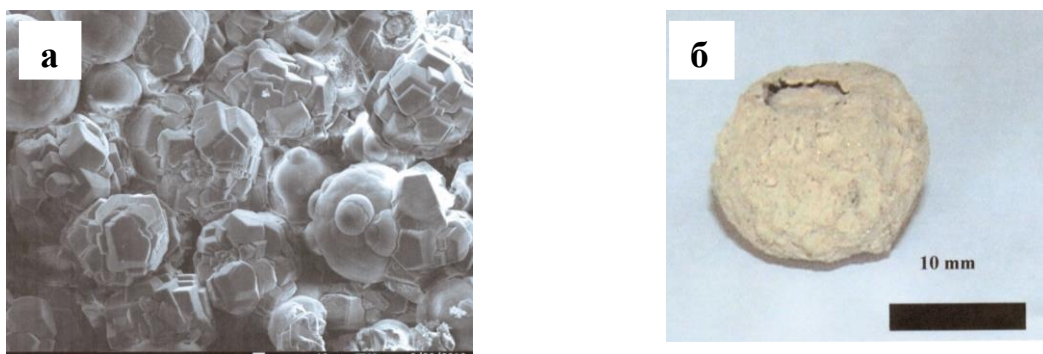


Рисунок 17 – Призматичні кристали кальциту та сферичні кристали ватериту на оболонці агрегатів глини після біоцементациї (а); сферичні агрегати глини, які покриті оболонкою з карбонату кальцію (б).

Капсульовані агрегати глини містили до 15% (мас/мас) осадженого кальцію завдяки формуванню оболонок з карбонату кальцію. Біокапсуляція агрегатів морської глини розміром 5 мм підвищила межу міцності на стиснення до 2175 кПа, що дозволяє їх використання як наповнювач для рекультивації земель. Біотехнологічне капсулювання м'якої морської глини може бути розглянуто як альтернатива традиційному дорогому закріпленню її цементом.

Біоцементацийне покриття твердих матеріалів. Показана можливість покриття поверхні твердих матеріалів, таких як бетон, граніт, базальт, скло, пластмасові волокна і плоскі матеріали із пластмаси, а також поверхні наземних рослин шаром карбонату кальцію завдяки його мікробно ініційованому осадженню з розчинної солі кальцію та сечовини.

Біоцементацийне покриття поверхні бетону забезпечить його захист від карбонатної корозії в морській воді та ліквідації тріщин (Рисунок 18а), а біоцементацийне покриття поверхні цегли призводить до зменшення водопоглинання і підвищення її морозостійкості (Рисунок 18б).

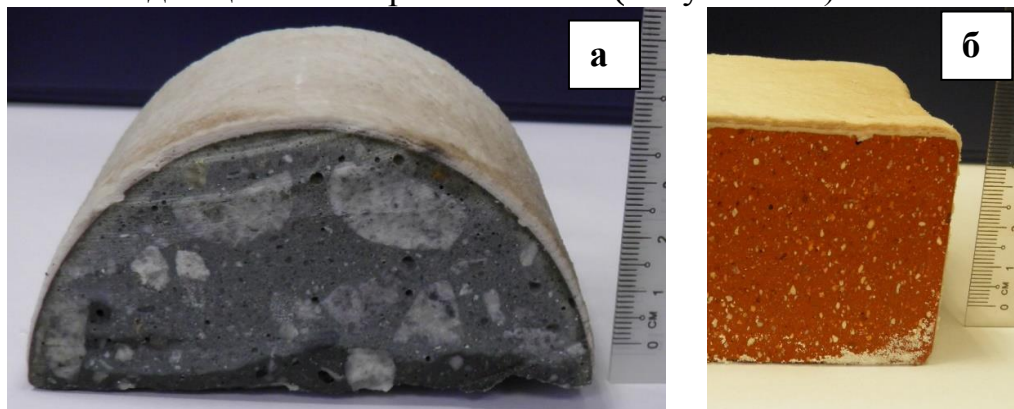


Рисунок 18 – Біотехнологічне покриття шаром карбонату кальцію поверхні бетону (а) чи цегли (б).

Таке покриття бетонних споруд, які використовують для захисту берегів, покращить їх колонізацію морською та прісноводною епібіотою та якість води в прибережних районах. Тому досліджували ефект біоцементациї на утворення такого покриття.

Дослідження механізму біоцементацийного покриття. Розуміння механізму біопокриття важливе для оптимізації процесу. Вихідна ідея була така – біоцементацийне покриття утворюється завдяки формуванню кристалів карбонату кальцію поблизу від поверхні з преципітацією кристалів на поверхні під силою тяжіння. В цьому разі кількість карбонату кальцію на поверхні залежить від кута між вектором сили тяжіння і площини поверхні. В наших експериментах товщина біоцементацийного покриття значно залежала від кута між вектором сили тяжіння і площини поверхні, що видно на Рисунку 18а. Осадження карбонату кальцію на вертикальній площині було в середньому тільки 3% від осадження на горизонтальній площині (Рисунок 19).

Таким чином показано, що для ефективного біопокриття поверхонь шаром карбонату кальцію кут між вектором сили тяжіння і площиною поверхні має бути якнайближче до 90° .

Біоцементациї для створення штучних коралів. Біотехнологічне покриття кальцитом поверхні штучних коралів із пластику (Рисунок 20) чи наземних рослин (Рисунок 21а) шаром карбонату кальцію за умови застосування уреаз-продукуючих бактерій, біоцементуючого розчину хлориду кальцію та сечовини є технологічно можливим рішенням створення і реставрації коралових рифів для рекреаційних цілей у туристичних зонах та для підтримки біологічного різноманіття.

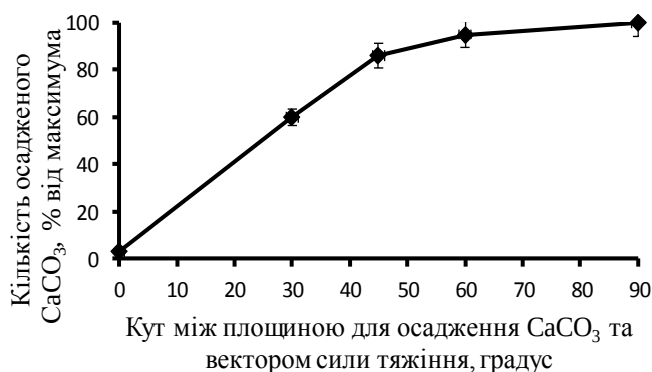


Рисунок 19 – Залежність осадження карбонату кальцію від кута між вектором сили тяжіння і площиною поверхні.



Рисунок 20 – Біотехнологічне покриття шаром карбонату кальцію поверхні штучних коралів із пластику.

У разі розташування наземних рослин (Рисунок 21а) з покриттям із кальциту (Рисунок 21б) в морській або прісній воді відбувалася їх колонізації личинками коралових поліпів або мікроскопічними водоростями (Рисунок 21в).

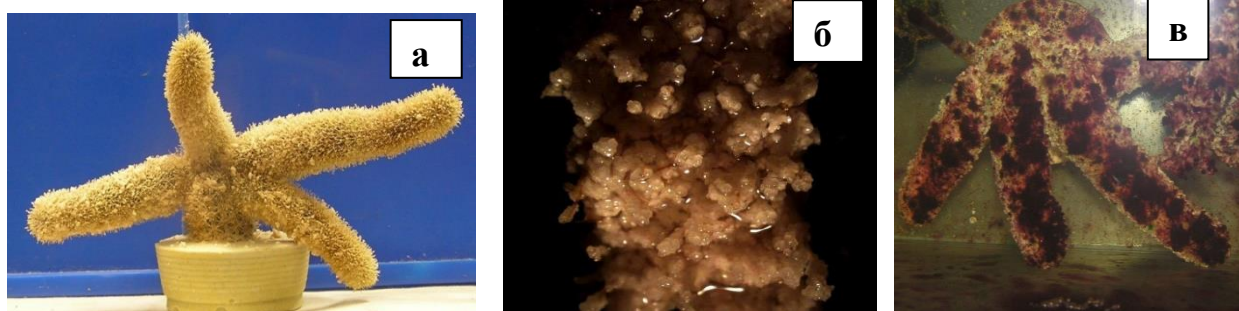
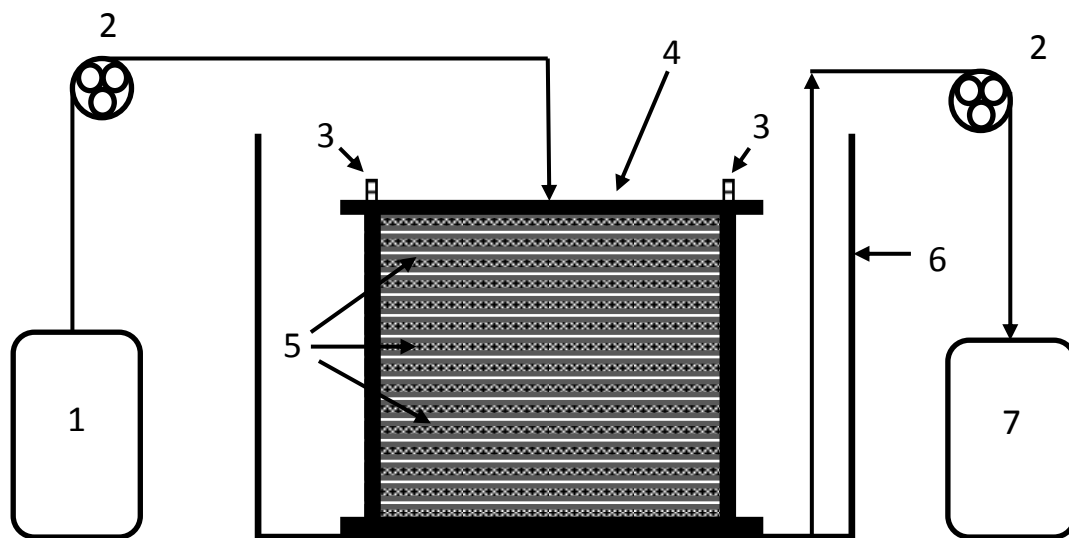


Рисунок 21 - Кактус *Arthrocerus spinosissimus* після покриття шаром карбонату кальцію (а); утворення кристалів на поверхні кактуса (б); поверхня після 6 тижнів колонізації поверхні фотосинтетичними мікроорганізмами в морській воді (в).

Отже, біоцементация може бути використана для покриття різних поверхонь шаром карбонату кальцію для різноманітних природоохоронних технологій.

Пілотний тест біотехнологічної гідроізоляції тріщин у камені. Ця гідроізоляція важлива в охороні довкілля для попередження міграції забруднювачів у ґрунтову та поверхневу воду від сховищ виробничих відходів, промислових підприємств чи забрудненого ґрунту. Пілотний тест, що моделює гідроізоляцію тріщин у камені, було виконано з використанням 18 гранітних плит розміром $0,4 \times 0,4 \times 0,02$ м (Рисунок 22). Біоцементуючий розчин і бактеріальну суспензію інактивованих але уреаза-активних клітин *Yaniella sp.* VS8 закачували в центральний отвір, потім рідина протікала через 200 – 400 мкм щілини між плитами.



1 – ємкість для розчину біоцементції; 2 – перистальтичні насоси; 3 – фіксація рами; 4 – сталева рама; 5 – 18 гранітних плит, 17 з них мають отвір у центрі; 6 – пластиковий корпус; ємкість для витоку.

Рисунок 22 – Схема тестової установки для вивчення біотехнології гідроізоляції тріщин у камені.

Після семи обробок виток з щілин між гранітними плитами зменшився з 1000 до $0,65 \text{ см}^3/\text{годину}$ (Рисунок 23). Відсутність зниження проникності рідини протягом більшості часу обробки, а потім швидке зниження проникності можна пояснити довгим формуванням вузьких каналів на поверхні каменю і швидким закупорюванням цих каналів кристалами карбонату кальцію, як показано на Рисунку 24.

Таким чином, пілотна біотехнологічна гідроізоляція тріщин у твердому матеріалі показала що спосіб може знайти застосування в охороні довкілля для попередження міграції забруднювачів у ґрунтову та поверхневу воду від сховищ відходів або промислових підприємств.



Рисунок 23 – Виток з установки для вивчення біотехнології гідроізоляції тріщин в камені.

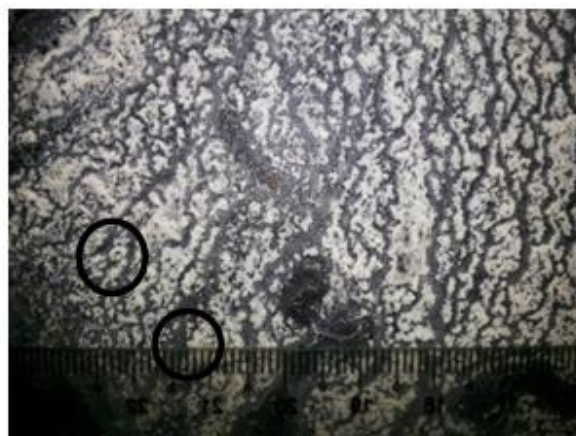


Рисунок 24 – Формування радіальних каналів та їх закупорювання при біотехнологічній гідроізоляції щілин між плитами каменю.

Пілотний тест біоцементатації каменю і піску. Пілотна біоцементатація плит каменю показало можливість їх гідроізоляції в горизонтальному положенні. Для демонстрації ефективності біоцементатації в системі, що моделює розподіл тріщин у різних напрямках, було проведено пілотне випробування біоцементатації 1м³ суміші каміння та піску (Рисунок 25) з використанням уреазо-продукуючих бактерій *Bacillus sp.* VS1 методом інжекції.



Рисунок 25 – Зразок 1 м³ суміші каміння та піску після біоцементатації.

Вапнякове каміння масою від 300 г до 5 кг, загальною масою 1400 кг, було покладено в 1м³ пластиковий контейнер шарами, а простір між камінням засипано піском, 640 кг (400 дм³). Біоцементатація суміші каміння та піску знизилася її водопроникність з $4,8 \cdot 10^{-5}$ до $4,2 \cdot 10^{-8}$ м/с при максимальному вмісті осадженого карбонату кальцію 9% (мас/мас).

Таким чином, пілотний тест показав, що можлива біотехнологічна гідроізоляція тріщин у твердому матеріалі, що може знайти застосування в

охороні довкілля для попередження міграції забруднювачів у ґрунтову та поверхневу воду від сховищ твердих відходів.

Економічна доцільність застосування біоцементациї. Використання біоцементациї для зниження розповсюдження пилу на ґрунтових дорогах замість застосування такого хімічного реагенту як хлорид кальцію дає змогу зменшити вартість знепилювання та економію від 2216 000 до 3416 000 грн на 1 км². Економічна ефективність від використання біоцементу та біоцементациї для герметизації ставків або звалищ твердих відходів порівняно з традиційними гідроізоляційними матеріалами становить від 390000 до 3830000 грн на 1 га водної поверхні ставка або території звалища.

Соціальне значення застосування біоцементациї. Соціальний ефект досліджень полягає в захисті шляхом біоцементациї (1) повітря від потрапляння в нього пилу та зв'язаних з ним хімічних та бактеріологічних забруднювачів; (2) водойм від забруднення їх пилом внаслідок ерозії ґрунту чи витоком хімічних забруднень із звалищ твердих відходів; (3) прибережних бетонних споруд для покращання їх колонізації екобіотою; (4) виготовлення штучних коралів для туристичних об'єктів, що захищає природні рифові екосистеми. Створення наукових засад біотехнології біоцементациї розкриває можливість створення нової галузі мікробіологічної промисловості – біотехнології будівельних матеріалів, що сприяє збільшенню робочих місць та зайнятості населення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та практично вирішено важливе науково-технічне завдання, що полягає у розробленні наукових засад створення біотехнологій біоцементациї для використання в охороні довкілля і промисловості.

1. Виділено три найбільш активні і біобезпечні штами галотолерантних та алакалофільних уреаз-продукуючих бактерій для проведення біоцементациї: *Bacillus sp.* VS1, *Bacillus sp.* VUK5 та *Yaniella sp.* VS8. Штам *Bacillus sp.* VS1 мав максимальну питому швидкість росту 0,1 год⁻¹ та уреазну активність 6,2 мМ/хв.

2. Філогенетичний аналіз штамів з накопичувальної культури уреаз-продукуючих бактерій яку вирощували за рН більш як 8,5 та концентрації солей вище 50 г/дм³ показав наявність опортуністичних або реальних патогенів з родів *Bacillus* та *Staphylococcus*. Це вимагає використання безпечних чистих культур уреаз-продукуючих бактерій як інокуляту під час виробництва бактеріальної біомаси для біоцементациї пористих матеріалів.

3. Порівняння культуральної рідини уреаз-продукуючих бактерій, біомаси клітин і супернатанту за показниками уреазної активності та швидкості осадження карбонату кальцію показало що від 56 до 87% уреазної активності та швидкості осадження карбонату кальцію зв'язано з біомасою бактерій, тому її концентрування дозволяє значно підвищити швидкість біоцементациї.

4. Показано, що уреаз-продукуючі бактерії з конститутивною уреазою (штам *Bacillus sp.* VS1) та індукцибельною уреазою (штам *Yaniella sp.*

VS8) можна вирощувати на дешевому середовищі – гідролізаті активного мулу міських очисних споруд. Для підвищення біобезпеки процесу біоцементзації можна використовувати обробку біомаси бактеріальних клітин штаму *Yaniella sp.* VS8 в 0,5% розчині додецилсульфату натрію, який повністю інактивує клітини при збереженні їх уреазної активності.

5. Адсорбція клітин уреаз-продукуючих бактерій на поверхні частинок піску забезпечує утворення та адгезію кристалів кальциту. Попередня обробка піску катіонами кальцію, алюмінію та заліза підвищувала адсорбцію бактеріальних клітин на частинках піску від 29 до 37% порівняно з необробленим піском.

6. Для поверхневої біоцементзації та формування кірки товщиною декілька міліметрів треба вести біоосадження кальциту з розчину та проводити попередню обробку суспензії бактеріальних клітин катіонами кальцію, що сприяє утворенню агрегатів біомаси розміром до 100 мкм та їх затриманню у поверхневому шарі піску. Для формування біоцементованого шару товщиною декілька сантиметрів треба використовувати розпилення бактеріальної суспензії та розчину солі кальцію та сечовини на поверхню. Для біоцементзації в об'ємі матеріалу потрібні 5-10 циклів послідовних інжекцій не агрегованих клітин і розчину солі кальцію та сечовини для заповнення об'єму пор та мікроканалів карбонатом кальцію.

7. Для біоцементзації пористих матеріалів можна замінити іони кальцію на розчинні іони двовалентного заліза, які утворюються з оксиду заліза (гематиту залізної руди) та продуктів бродіння целюлози завдяки активності анаеробних залізо-відновлювальних бактерій.

8. Новий спосіб зниження водопроникності ґрунту включає послідовну денітрифікацію і біоцементацию у разі застосування чистих культур денітрифікуючих та уреаз-продукуючих бактерій. Пухирі біогазу, які утворюються з нітрату та етанолу в водонасиченому піску, нестабільні, але можуть бути стабілізовані в порах піску завдяки осадженню карбонату кальцію за умови використання уреаз-продукуючих бактерій. Ця біотехнологія може знайти застосування під час герметизації ставків, каналів і тунелів у піску, пористих ґрунтах, а також тріщин у гірських породах.

9. Характеристики біоцементованого піску залежать від кількості осадженого карбонату кальцію або гідроксиду заліза, а також від типу біоцементзації. У процесі біоосадження карбонату кальцію межа міцності біоцементованого піску під час стиснення (S) та його водопроникність (k) лінійно залежали від вмісту осадженого карбонату кальцію, C (% від маси сухого піску що біоцементується)

$$S = 366 C, \text{ кПа}; (R^2 = 0,98), \quad k = 507 - 403C, 10^{-7} \text{ м/с}; (R^2 = 0,98)$$

Бактеріальне отримання розчиненого заліза і його використання для біозакріплення піску дало змогу знизити водопроникність піску з $5,4 \cdot 10^{-5}$ до $1,4 \cdot 10^{-7}$ м/с за вмісту осадженого заліза у піску менш ніж 1,5% від маси сухого піску. Також послідовна денітрифікація та біоцементация у водонасиченому піску зменшила гідравлічну проникність піску до $2 \cdot 10^{-7}$ м/с за вмісту осадженого карбонату кальцію 8,0 – 8,4% від маси сухого піску, в той час як

такий рівень біоцементатації без денітрифікації потребує осадження щонайменше 22% від маси сухого піску.

10. Пілотна біоцементатація тріщин у камені з використанням уреазо-продукуючих бактерій *Yaniella sp.* VS8 зменшила протікання води через блок 18 гранітних плит з 1000 до 0,65 см³/год. Пілотні випробування інжекційної біоцементатації суміші каміння та піску (масою приблизно 2000 кг) з використанням уреазо-продукуючих бактерій *Bacillus sp.* VS1 показала найвищу межу міцності біоцементованого матеріалу 1400 кПа та водопроникність $4,2 \cdot 10^{-8}$ м/с за вмісту карбонату кальцію 9% (мас/мас). Ці технології можуть знайти використання в охороні довкілля для попередження міграції забруднювачів від сховищ відходів або промислових підприємств.

11. Біотехнологія поверхневої біоцементатації дозволяє отримати на поверхні піску кірку з межею міцності на стиснення 36 МПа, що дорівнює міцності вапняку. Цей процес може знайти застосування для герметизації ставків, сховищ міських або промислових відходів у піщаному ґрунті. Модельний ставок, побудований з піску методом поверхневої біоцементатації, мав водопроникність 10^{-7} м/с і межу міцності під час стиснення 932 кПа за умови середнього вмісту осадженого кальцію 2,1 кг/м².

12. Використання мікробно-ініційованого осадження карбонату кальцію для біоагрегації пилових частинок на поверхні ґрунту за умови дози 16 г Са/м² знижує вітрове розсіювання піщаного пилу на 99,8%, а асоційованих з ним хімічних і бактеріологічних модельних забруднювачів, таких як фенантрен, нітрат свинцю та клітини бактерій *Bacillus megaterium* – на 92,7, 94,4 та 99,8%, відповідно. Під час моделювання водної ерозії ґрунту, навіть малі дози осадженого кальцію, 6,4 г/м² поверхні піску, знижували винос піску з водою на 73,2%, вивільнення фенантрени, нітрату свинцю та клітин *Bacillus megaterium* у довкілля на 61,3, 74,2 та 99,5% відповідно.

13. Біотехнологія біокапсуляції може бути використана для трансформування м'якої глини в твердий матеріал завдяки формуванню кальцитної оболонки агрегатів глини. Межа міцності на стиснення таких агрегатів розміром 5 мм, які містили 15% (мас/мас) осадженого кальцію, становила до 2175 кПа, що відповідає критеріям для геоматеріалів у будівництві.

14. Розроблено біотехнологію біоцементатійного покриття бетону та інших твердих матеріалів шаром карбонату кальцію для зменшення карбонатної корозії бетону та покращання колонізації епібіотою під час створення штучних рифів. Біоцементатійне покриття матеріалів може бути технологічним рішенням для створення штучних рифів і захисту прибережного довкілля.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографія:

1. Ivanov, V.; Stabnikov, V. *Construction Biotechnology: Biogeochemistry, Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes*. Springer, 2017.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні дані з біотехнологій виробництва та використання для захисту довкілля різних типів біоцементу для створення цієї наукової монографії.

Глави у книгах:

2. Ivanov, V.; Stabnikov, V.; Hung, Y.T. Screening and Selection of Microorganisms for the Environmental Biotechnology Process. In *Handbook of Environment and Waste Management. Air and Water Pollution Control*; Hung, Y.T., Wang, L.K., Shammass, N.K., Eds.; World Scientific Publishing Co., Inc., 2012; pp 1137–1149.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив літературні та власні експериментальні дані щодо вибору селективних умов для отримання накопичувальних культур мікроорганізмів для застосування у природоохоронних біотехнологіях.

3. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V. Basics of Construction Microbial Biotechnology. In *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*; Pacheco-Torgal, F., Labrincha, J.A., Diamanti, M.V., Yu C.P., Lee H.K., Eds.; Springer, 2015; pp 21–56.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні дані з біоцементу та біоцементациї під час написання глави в книзі.

4. Ivanov, V.; Stabnikov, V. Basic Concepts on Biopolymers and Biotechnological Admixtures for Eco-efficient Construction Materials. In *Biopolymers and Botech Admixtures for Ecoefficient Construction Materials*; Pacheco Torgal, F., Ivanov, V., Labrincha, J.A., Karak, N., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2016; pp 13–36.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні дані з випробувань біоцементів для закріплення ґрунтів під час створення глави книги.

5. Stabnikov, V.; Ivanov, V. Biotechnological Production of Biopolymers and Admixtures for Eco-efficient Construction Materials. In *Biopolymers and Botech Admixtures for Ecoefficient Construction Materials*; Pacheco Torgal, F., Ivanov, V., Labrincha, J.A., Karak, N., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2016; pp 37–56.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні дані з біотехнологій виробництва різних типів біоцементів для цієї глави.

Статті у наукових журналах:

6. Ivanov, V.; Shengli, K.; Stabnikov, V.; Guo, C.H. The Removal of Phosphorus from Reject Water of Municipal Wastewater Treatment Plant Using Iron Ore. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, 84 (1), pp 78–82. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження щодо мікробного відновлення заліза (III) в суспензії без перемішування часток оксиду заліза, аналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

7. Guo, C.H.; Stabnikov, V.; Kuang, S.; Ivanov, V. The Removal of Phosphate from Wastewater Using Anoxic Reduction of Iron Ore in the Rotating Reactor. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 46 (2), pp 223–226. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження щодо мікробного відновлення заліза (III) в суспензії з механічним перемішуванням часток оксиду заліза, аналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

8. Guo, C.H.; Stabnikov, V.; Ivanov, V. The Removal of Nitrogen and Phosphorus from Reject Water of Municipal Wastewater Treatment Plant Using Ferric and Nitrate Bioreductions. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101 (11), pp 3992–3999. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження щодо мікробного відновлення заліза (III) та вплив нітрату на цей процес, аналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

9. Stabnikov, V.; Chu, J.; Naeimi, M.; Ivanov, V. Formation of Water-Impermeable Crust on Sand Surface Using Biocement. *Cem. Concr. Res.* **2011**, 41 (11), pp 1143–1149. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав експериментальні дослідження щодо створення кірки біоцементу на поверхні, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

10. Chu, J.; Ivanov, V.; Stabnikov, V.; Naeimi M. Biocement: Green Building- and Energy-Saving Material. *Adv. Mater. Res.* **2012**, 347–353, pp 4051–4054. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав мікробіологічну та біотехнологічну частину дослідження щодо виробництва та використання біоцементу, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

11. Chu, J.; Stabnikov, V.; Ivanov, V. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation on Surface or in the Bulk of Soil. *Geomicrobiol. J.* **2012**, 29 (6), pp 544–549. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав експериментальні дослідження щодо різних типів біоцементзації - кірки біоцементу на поверхні чи біоцементзації в усьому об'ємі ґрунту, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

12. Стабніков, В.П. Біотехнологія Будівельних Процесів і Матеріалів. *Наукові Праці НУХТ* **2012**, 47, с 29–31.

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні дані щодо виробництва та випробувань біоцементів для гідроізоляції та закріплення ґрунтів та написав статтю.

13. Chu, J.; Ivanov, V.; Stabnikov, V.; Li, B. Microbial Method for Construction of Aquaculture Pond in Sand. *Géotechnique* **2013**, 63 (10), pp 871–875. (Наукометрична база Google Scholar)

Особистий внесок дисертанта: провів мікробіологічні та біотехнологічні дослідження використання біоцементу для гідроізоляції ставків та написав відповідну частину статті.

14. Стабніков В.П. Предобробка Клітин Уреаза-Продукуючих Бактерій Катіонами Кальцію для Інтенсифікації Біоцементаци Піску. *Наукові Праці НУХТ* **2013**, 48, с 92–95. (Наукометрична база Index Copernicus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав мікробіологічні дослідження щодо впливу іонів кальцію на адсорбцію клітин до часток піску, та їх подальшу біоцементацию, проаналізував отримані дані та написав статтю.

15. Stabnikov, V.; Chu, J.; Myo, A.N.; Ivanov, V. Immobilization of Sand Dust and Associated Pollutants Using Bioaggregation. *Water Air Soil Pollut.* **2013**, 224 (9), pp 1631–1700. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав хімічні та мікробіологічні дослідження щодо впливу біоцементу на розповсюдження частин піску та його хімічних і мікробіологічних забруднювачів, написав відповідну частину статті.

16. Stabnikov, V.; Chu, J.; Ivanov, V.; Li, Y. Halotolerant, Alkaliphilic Urease-Producing Bacteria from Different Climate Zones and their Application for Biocementation of Sand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 29 (8), pp 1453–1460. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав дослідження щодо виділення та ідентифікації штамів галотолерантних уреазних бактерій та їх тестування під час біоцементаци та написав відповідну частину статті.

17. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V. Iron- and Calcium-Based Biogrouts for Porous Soils. *Journal Proceedings of the ICE - Construction Materials* **2014**, 167 (1), pp 36–41. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: виконав дослідження щодо біоцементаци кальцій- чи залізовмісного біоцементу, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

18. Chu, J.; Ivanov, V.; Naeimi, M.; Stabnikov, V.; Liu, H.L. Optimization of Calcium-Based Bioclogging and Biocementation of Sand. *Acta Geotech.* **2014**, 9 (2), pp 277–285. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав біотехнологічні дослідження щодо оптимального часу біоцементаци та дози біоцементу для гідроізоляції піску, написав відповідну частину статті.

19. Стабніков В.П. Виділення та Характеристика Українського Штаму Уреаза-Продукуючих Бактерій для Біотехнологічного Виробництва Біозакріплювача Ґрунту. *Наукові праці НУХТ* **2014**, 20 (1), с 24–29. (Наукометрична база Index Copernicus).

Особистий внесок дисертанта: спланував та виконав дослідження щодо мікробіології уреаз-продукуючих бактерій та їх тестування під час біоцементаци та написав статтю.

20. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V. Strengthening of Soft Marine Clay Using Biocementation. *Mar. Georesour. Geotechnol.* **2015**, 33 (4), pp 325–329. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження щодо покриття частинок морської глини, зробив

мікроскопічний аналіз поверхонь різними методами, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

21. Stabnikov, V.; Ivanov, V.; Chu, J. Construction Biotechnology – a New Area of Biotechnological Research and Applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 31 (9) pp 1303–1314. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: узагальнив власні експериментальні та літературні дані щодо біоцементу та біоцементациї, написав відповідну частину статті.

22. Стабніков, В.П. Вирощування Водоростей для Отримання Біодизелю в Модельному Ставку, Сконструйованому Біотехнологічним Осадженням Карбонату Кальцію. *Наукові праці НУХТ* **2015**, 21 (5), с 22–26. (Наукометрична база Index Copernicus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження використання біоцементу для гідроізоляції ставків для вирощування водоростей для отримання біодизелю та написав статтю.

23. Стабніков, В.П. Метод Підвищення Адсорбції Бактеріальних Клітин до Зерен Піску з Метою Інтенсифікації Процесу Біоцементациї. *Наукові праці НУХТ* **2016**, 22 (1), с 14–18. (Наукометрична база Index Copernicus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав дослідження щодо покращання адсорбції бактеріальних клітин до зерен піску завдяки додавання іонів кальцію, алюмінію чи заліза, проаналізував отримані дані та написав статтю.

24. Stabnikov, V. New Role of Microbes in the Construction Industry. *Atlas of Science* [online] **2015**. <https://atlasofscience.org/new-role-of-microbes-in-the-construction-industry/> (accessed Nov 13, 2015).

Особистий внесок дисертанта: проаналізував та узагальнив власні дані щодо практичного використання біоцементациї та написав статтю.

25. Stabnikov, V. Production of Bioagent for Calcium-Based Biocement. *Int. J. Biotech. Well. Indus.* **2016**, 5 (2), pp 60–69. (Наукометрична база Google Scholar).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав дослідження щодо вирощування бактерій для біоцементациї, оптимального середовища та умов культивування, проаналізував отримані дані та написав статтю.

26. Stabnikov, V.; Ivanov, V.; Chu, J. Sealing of Sand Using Spraying and Percolating Biogrouts for the Construction of Model Aquaculture Pond in Arid Desert. *IAR.* **2016**, 8 (3), pp 207–216. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав мікробіологічні та біотехнологічні дослідження щодо нового способу біоцементациї - аеробного бактеріального окислення ацетату кальцію - для гідроізоляції ставків в піску, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

27. Stabnikov, V.; Ivanov, V. Biotechnological Production of Biogrout from Iron Ore and Cellulose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2017**, 92 (1), pp 180–187. (Наукометрична база Scopus).

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав дослідження щодо бактеріального розчинення оксиду заліза завдяки ацидогенной ферментації

целюлози, використання розчинних солей заліза для гідроізоляції піску, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

28. Ivanov, V.; Stabnikov, V. Calcite/Aragonite-Biocoated Artificial Coral Reefs for Marine Parks. *AIMS Environ. Sci.* **2017**, 4 (4), pp 586– 595. (Наукометрична база Google Scholar)

Особистий внесок дисертанта: спланував і виконав дослідження щодо біопокриття різних матеріалів шаром карбонату кальцію, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

ПУБЛІКАЦІЇ У МАТЕРІАЛАХ НАУКОВИХ КОНФЕРЕНЦІЯХ

Повні тексти:

29. Ivanov, V.; Guo, C.H.; Kuang, S.L.; Stabnikov, V. Phosphorous Recovery and Nitrogen Removal from Wastewater using BioIronTech Process. In *International Conference on Nutrient Recovery from Water Streams*, Proceedings of International Conference, Vancouver, Canada, May 10-13, 2009; Ashley, K., Mavinic, G., Koch, F., Eds.; IWA Publishing, 2009; pp 597-606.

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічну частину дослідження, брав участь в аналізі отриманих даних та написанні статті.

30. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V.; He, J.; Naeimi, M. Iron-Based Bio-grout for Soil Improvement and Land Reclamation. In *Sustainable Construction Materials and Technologies*, Proceedings of 2nd International Conference, Ancona, Italy, June 28 – 30, 2010; Claisse, P., Ganjian, E., Canpolat, F., Naik T., Eds.; Special Technical Proceedings, [online] 2010; 6 p. http://www.academia.edu/1418183/Iron-Based_Bio-Grout_For_Soil_Improvement_and_Land_Reclamation

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічну та біотехнологічну частину дослідження, брав участь в аналізі отриманих даних та написав відповідну частину статті.

31. Chu, J.; Ivanov, V.; He, J.; Naeimi, M.; Li, B.; Stabnikov, V. Development of Microbial Geotechnology in Singapore. *Geo-Frontiers 2011: Advances in Geotechnical Engineering. American Society of Civil Engineering Proceedings of Conference Geo-Frontiers 2011*, Dallas, Texas, USA, March 13-16, 2011, pp 4070–4078.

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічне та біотехнологічне дослідження біоцементзації, проаналізував отримані дані та написав відповідну частину статті.

32. Chu, J.; Ivanov, V.; He, J.; Stabnikov, V. Use of Microbial Technology in Geotechnical Engineering. In *Geotechnique, Construction Materials and Environment*, Proceedings of the 2nd International Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, Nov 14-16, 2012; pp 1-4.

Особистий внесок дисертанта: вивчав мікробіологічне та біотехнологічне дослідження щодо гідроізоляції матеріалів за допомогою біоцементзації, брав участь в аналізі отриманих даних та написав відповідну частину статті.

33. Wu, S.; Wu, C.; Yang, Y.; Stabnikov, V., Chu, J. Biogrouting for Seepage Control in Underground Construction. In *Southeast Asian Conference and Exhibition*

in *Tunneling and Underground Space, 2017 (SEACETUS2017)*, Subang Jaya, Malaysia, April 18 – 19, 2017; pp 1-4.

Особистий внесок дисертанта: виконав мікробіологічне та біотехнологічне вивчення гідроізоляції підземних споруд і брав участь в аналізі отриманих даних.

Тези доповідей:

34. Ivanov, V.; Li, B.; Naeimi, M.; Stabnikov, V.; Chu J. Biocement – a New Sustainable and Energy Saving Material for Construction of Reservoirs, Ponds, and Immobilization of Sand. *Books of Abstracts*, International Conference Deserts, Drylands and Desertification Conference, November 8-11, 2010; Sde Boker, Israel.

35. Стабніков, В.П. Сравнение Галотолерантных Алкалофильных Уреаза-Продуцирующих Бактерий для Закрепления Строительных Грунтов. *Тезисы докладов*, XIII Съезд Общества микробиологов Украины им. С.Н. Виноградского, Октябрь 1-6, 2013, Ялта, Крым, Украина.

36. Stabnikov, V. Production of Biocement from Food–Processing Wastes. *Books of Abstracts*, The Second North and East European Congress of Food NEEfood, 2013, May 26 – 29, 2013, Kyiv, Ukraine.

37. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V. Diversity of Microbial Ground Improvements. *Books of Abstract*, International Conference on Geotechnical Engineering and Geomechanics ICGEG 2014, Dec 15-16, 2014, Sydney, Australia. *Int. J. Geotech. Geol. Eng.* 2014, 1 (12), p 51.

38. Ivanov, V.; Stabnikov, V.; Zubair, A. Bioreduction and Biooxidation of Iron in Environmental Engineering. *Books of Abstract*, 2nd International Conference Environmental Science and Technology, May 14 - 17, 2014, Side, Turkey.

39. Stabnikov, V. Microbiology and Biotechnology of Construction Materials and Processes. *Тези Доповідей*, Мікробіологія та Імунологія - Перспективи Розвитку в XXI Столітті, Матеріали II Міжнародної Конференції, Квіт 14 – 15, 2016, Київ, Україна.

40. Stabnikov, V. Biotransformation of Food- Processing Wastes to Construction Materials. *Book of Abstracts*, 8th Central European Congress on Food. Food Science for Well-Being, May 23 – 26, 2016, Kyiv, Ukraine, p 228.

41. Ivanov, V.; Chu, J.; Stabnikov, V. Biotechnological Methods for the Grouting of the Tunneling Space. *Book of Abstracts*, 18th International Conference Concrete, Structural and Geotechnical Engineering, ICCSGE 2016, Aug 8-9, 2016, Venice, Italy.

42. Іванов, В.; Стабніков, В. Біоцементация Будівельних Матеріалів і Біозакріплення Грунтів. *Будівельний Конгрес України*, Київ, Україна, березень 1 – 3, 2017. Тези Доповідей.

АНОТАЦІЯ

Стабніков В.П. Наукові засади створення біотехнологій біоцементаци для використання в охороні довкілля і промисловості. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія». – Національний університет харчових технологій, Міністерство освіти і науки України, Київ, 2018.

Дисертацію присвячено розробці наукових засад біотехнології виробництва і використання біоцементу на основі уреаз-продукуючих бактерій, які утворюють кристали карбонату кальцію в розчині солі кальцію і сечовини. Обґрунтовано використання безпечних чистих культур уреаз-продукуючих, галотолерантних та алкалофільних штамів бактерій *Bacillus sp.* VS1 і *Yaniella sp.* VS8 як інокуляту під час виробництва бактеріальної біомаси для біоцементації. Розроблено наступні біотехнології мікробної біоцементації: 1) формування міцного біоцементованого шару з товщиною в кілька міліметрів; 2) формування біоцементованого шару товщиною декілька сантиметрів; 3) біоцементація всього об'єму пористого матеріалу методом перколяції чи інжекції; 4) біоцементація з заміною іонів кальцію на іони двовалентного заліза, які утворюються залізо-відновлювальними бактеріями з гематиту дешевої залізної руди; 5) послідовна денітрифікація і фіксація пухирців утвореного біогазу в порах піску шляхом карбонатної біоцементації. Показано в лабораторних та пілотних дослідженнях, що біоцементація може знайти застосування для герметизації ставків і водоізоляції звалищ твердих відходів у піщаному ґрунті, для боротьби з вітровою та водною ерозією ґрунтів, для іммобілізації хімічних та бактеріологічних забруднювачів ґрунту, для покриття твердих матеріалів шаром кальциту, для гідроізоляції тріщин у камені та попередження міграції забруднювачів від сховищ твердих відходів в ґрунтову та поверхневу воду. Проведені дослідження відкривають шляхи розвитку і практичного використання нової біотехнологічної дисципліни – біотехнології біоцементаційних матеріалів і процесів.

Ключові слова: біоцемент, біоцементація, уреаз-продукуючі бактерії, залізо-відновлювальні бактерії, денітрифікуючі бактерії, біозакупорювання ґрунту, природоохоронні технології, боротьба з ерозією ґрунту

АННОТАЦИЯ

Стабников В.П. Научные основы создания биотехнологий биоцементации для использования в охране окружающей среды и промышленности. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени доктора технических наук по специальности 03.00.20 «Биотехнология». – Национальный университет пищевых технологий, Министерство образования и науки Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена разработке научных основ биотехнологии производства и использования биоцемента на основе уреаз-продуцирующих бактерий, которые образуют кристаллы карбоната кальция в растворе соли кальция и мочевины. Обосновано применение безопасных чистых культур уреаз-продуцирующих, галотолерантных и алкалофильных штаммов бактерий *Bacillus sp.* VS1 и *Yaniella sp.* VS8 как инокулята при производстве бактериальной биомассы для биоцементации. Разработаны следующие биотехнологии микробной биоцементации: 1) формирование крепкого

биоцементированного слоя с толщиной в несколько миллиметров; 2) формирование биоцементированного слоя толщиной в несколько сантиметров; 3) биоцементация всего объема пористого материала методом перколяции или инъекции; 4) биоцементация с заменой ионов кальция на ионы двухвалентного железа, которые образуются железо-восстанавливающими бактериями из гематита дешевой железной руды; 5) последовательная денитрификация и фиксация пузырьков образовавшегося биогаза в порах песка путем карбонатной биоцементации. Показано в лабораторных та пилотных исследованиях, что биоцементация может найти применение для герметизации прудов и водоизоляции хранилищ твердых отходов в песчаной почве, для борьбы с ветровой и водной эрозией почвы, для иммобилизации химических и бактериологических загрязнителей почвы, для покрытия твердых материалов слоем кальцита, для гидроизоляции трещин в каменных породах и предупреждения миграции загрязнителей от хранилищ твердых отходов в грунтовую и поверхностную воду. Проведенные исследования открывают пути развития и практического использования новой биотехнологической дисциплины – биотехнологии биоцементационных материалов и процессов.

Ключевые слова: биоцемент, биоцементация, уреаз-продуцирующие бактерии, железо-восстанавливающие бактерии, денитрифицирующие бактерии, биозакупоривание почвы, природоохранные технологии, борьба с эрозией почв.

SUMMARY

Stabnikov V.P. Scientific concepts for the development of biocementation biotechnology and its applications in environmental engineering.- Manuscript.

The thesis for academic degree of Doctor of Technical Sciences by specialty 03.00.20 «Biotechnology». – National University of Food Technologies, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

New area of biotechnology - construction biotechnology – is developing intensively for last decade. Construction biotechnology is using microorganisms for new materials such as biocement and new processes such as biocementation, that are useful for environmental engineering and industry. Biocement is considered as a replacement of cement for soil sealing and strengthening. Sizes of the biocement particles is significantly smaller that the cement sizes therefore biocement suspension is penetrating deeper than the cement suspension. Additionally, the viscosity of the biocement is 30 – 300 times lower than viscosity of the cement suspension.

The thesis is devoted to the development of biocementation biotechnologies based on the activity of urease-producing bacteria and their applications in environmental engineering. Phylogenetic analysis by nucleotide sequences of 16S rRNA gene of strains from enrichment culture of urease-producing bacteria with stable urease activity has been done. Pure bacterial cultures should be used to avoid the presence of opportunistic pathogens. Urease-active halotolerant and alkaliphilic strains of *Bacillus sp.* VS1 and *Yaniella sp.* VS8 have been isolated, identified by 16S rRNA gene sequencing and studied as the bioagents for biocementation. Phylogenetic and physiological similarity of the strains *Bacillus sp.*, which were isolated for ureolytic precipitation of calcium carbonate from different climate world zones was

shown. To increase biosafety of biocementation, a method for production of inactivated but urease-active bacterial cells of urease-producing bacteria was developed and possibility of their application for biocementation was shown. It was shown that two types of urease-producing bacteria with constitutive urease (*Bacillus* sp. VS1) and inducible urease (*Yaniella* sp. VS8) can be cultivated for large scale biocementation using hydrolysate of activated sludge of municipal wastewater treatment plant. It is possible to increase greatly urease activity and biocementation rate by concentration of urease-producing bacterial biomass. It was shown that a mechanism of biocementation, which is based on microbiologically induced calcium carbonate precipitation, includes adsorption of bacterial cells onto the surface of sand grains, formation the crystals of calcite, aragonite, and vaterite, and binding with surface and between themselves. Adsorption efficiency of bacterial cells on the sand particles can be increased from 29 to 37% by pretreatment of sand with cations of calcium, aluminum and iron. To obtain material with needed properties, the following microbial biocementation technologies have been developed: 1) the formation of the strong biocemented layer with a thickness of a few mm by precipitation on the surface of material; 2) the formation of the layer with a thickness of a few cm by spraying biocement solution onto the surface, and 3) the formation of the biocemented volume of the porous material by percolation or injection of the biocement solution. To increase technological and economic efficiency of microbial biocementation two new methods have been proposed and studied. First method is the replacement of calcium ions with ions of ferrous, which were produced by iron-reducing bacteria from hematite of cheap iron ore. This method can decrease the hydraulic conductivity of sand to $1.4 \cdot 10^{-7}$ m/s. Second method includes bioimmobilization of the gas bubbles, which were produced in the sand pores. This method can decrease the hydraulic conductivity of sand to $2 \cdot 10^{-7}$ m/s. Biotechnology of the surface biocementation has been proposed. This process can be used for the sealing of the ponds or landfills in sandy soil. It was shown that biocementation can be used to control wind and water erosion of soil and release of associated with dust chemical and bacteriological model pollutants. An application of biocementation for the coating of the surfaces of concrete, stone, glass, plastic, and wood with the layer of calcite was studied. This biocoating can be used for the surface protection of coastal concrete structures, creation of artificial reefs, and can promote environmental sustainability in the coastal area. The pilot test of biotechnological biocementation for the sealing of the cracks in the rocks with inactivated but urease active cells *Yaniella* sp. VS8 showed the applicability of the method in environmental engineering for prevention of pollutants migration to groundwater and surface water from the landfills. The pilot biocementation of the mixture of sand and limestone in by the injection of urease-producing bacteria *Bacillus* sp. VS1 significantly decreased hydraulic conductivity. The pilot tests confirmed the effectiveness of biocementation to control the wind erosion of soil and showed the applicability of biocementation for the manufacturing of sand filters for microfiltration of water. Economical calculations showed the viability of biocementation application for environmental engineering. Selected microorganisms, discovered mechanisms of microbial biocementation, and the developed biotechnologies of the surface and bulk biocementation give the

opportunity for further scientific development and practical applications of new biotechnological discipline – biotechnology of biocement production and application.

Keywords: biocement, biocementation, urease-producing bacteria, iron-reducing bacteria, denitrifying bacteria, bioclogging of soil, bioaggregation of the soil particles, environmental technologies, protection soil from erosion.

Підп. до друку 19.04.2018. Наклад 100 пр. Зам. № 13-18

НУХТ. 01601 Київ-33, вул. Володимирська, 68
Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.