

APPLICATION OF BIOCEMENTATION IN THE CONTEXT OF SOLVING ENVIRONMENTAL ISSUES

V. Udymovych*National University of Food Technologies*

Key words:

Biocementation
Portlandcement
Microbiologically induced calcium precipitation
Urease-producing bacteria
Urease
Sporosarcina pasterii
Bacillus subtilis

Article history:

Received 03.08.2021
Received in revised form 17.08.2021
Accepted 25.08.2021

Corresponding author:

V. Udymovych

E-mail:

udymovych@ukr.net

ABSTRACT

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

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

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

This raises the question of creating inexpensive but efficient and durable building materials based on biotechnology. That is why microbial-induced calcium precipitation (MICP) by microorganisms is considered by many researchers as a promising way for soil strengthening and is called biocementation. MICP can also be used to create the surface protection of concrete structures and for their recovery. In biocementation, urease-producing bacteria (representatives of the genera *Sporosarcina*, *Yaniella* or *Bacillus*) are mainly used. The development and use of biocementation in the future may solve certain environmental problems associated with carbon emissions in the event of large production facilities.

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

DOI: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-8

ЗАСТОСУВАННЯ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ В КОНТЕКСТІ ВИРІШЕННЯ ЕКОЛОГІЧНИХ ПИТАНЬ

В. М. Удимович

Національний університет харчових технологій

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

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

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

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

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

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

Постановка проблеми. Належне обслуговування бетонних конструкцій має надзвичайно важливе значення для гарантування розрахованого терміну експлуатації (Czarnecki & Woysiechowski, 2013). Зважаючи на сучасні реалії, бетонні конструкції та покриття при взаємодії з навколишнім середовищем або при механічних пошкодженнях втрачають свою первинну міцність і структуру, що в майбутньому може призвести до катастрофічних наслідків. Європейський стандарт EN 1504 класифікує причини дефектів на дві основні групи: дефекти, спричинені пошкодженнями бетонного шару через вплив механічних, хімічних або фізичних факторів або корозію арматури, що викликана процесом взаємодії карбону та бетону. У зв'язку із цим протягом останніх років були розроблені різноманітні стандарти та рекомендації щодо проведення ремонтних робіт, наприклад, EN 1504, ACI 562-16 або ACI 546R-14.

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

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

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

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

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

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

Набуває популярності також підвищення міцності тріщин за допомогою розчину колоїдних наночастинок гідроксиду кальцію розміром від 50 до 300 нм (Van Hees et al., 2014, Rodriguez-Navarro et al., 2013). У цьому випадку реакція води та вуглекислого газу з гідроксидом кальцію призводить до кристалізації

карбонату кальцію з подальшим утворенням стабільного кальциту приблизно через 28 діб (Narwaria & Tiwari, 2016).

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

Суміші з модифікованими полімерами цементу (МПЦ) визначаються як гідралічний цемент, поєднаний під час змішування з органічними полімерами, які дисперговані або повторно дисперговані у воді, з агрегатами або без них. Злиття полімеру відбувається у вигляді гідрату цементу, в результаті чого утворюється спільна матриця гідратованого цементу і полімерної плівки. Завдяки цьому покращуються механічні показники, міцність зчеплення, міцність на розрив разом із зменшенням пружності (Parghi & Alam, 2016).

Геополімерні бетони (ГПБ) можна розглядати як відносно нові стійкі будівельні матеріали, що включають промислові відходи до їх складу (Huseien et al., 2017, Somma et al., 2011). Вони є безцементними альтернативними матеріалами, що виробляються у результаті хімічної взаємодії попелу, гранульованого доменного шлаку, суміші гідроксиду натрію (NaOH) та розчину силікату натрію (Na_2SiO_3) (Somma et al., 2011). ГПБ є доволі непоганою альтернативою для ремонту конструкцій на основі портландцементу за рахунок пружності, коефіцієнта Пуассона та міцності на розриві (Huseien et al., 2017, Pacheco-Torgal et al., 2012).

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

Просочення бетонної поверхні гідрофобними матеріалами (напр., силанами, силксанами), що здатні проникати крізь пори в бетоні, ефективне рішення для покращення характеристик бетону. Але ця умова може досягатися лише тоді, коли молекулярна будова речовини досягає достатньої глибини проникнення та взаємодії з конструкцією для досягнення гідрофобності обробленої поверхні (Pan et al., 2017).

Обробка поверхні для блокування пор збільшує твердість і непроникність поверхневого шару бетону при блокуванні капілярних пор (Jiang et al., 2015, Baltazar et al., 2014). Найпоширенішим герметиком для цього є силікат натрію (LaRosa Thompson et al., 1997). Pan та ін. (Pan et al., 2015) підтвердили ефективність як силікату натрію, так і фторосилікату для зменшення повітропроникності бетону, вимірювання глибини проникнення до 5 мм. Однак Ibrahim та ін. (Ibrahim et al., 1999) порівняли ефективність різних матеріалів для обробки по-

верхонь для підвищення стійкості бетону до сульфатного впливу, карбонізації та дифузії хлоридів і зробили висновки, що найгірший захист спостерігається після обробки силікатом натрію. У дослідженні (Dai et al., 2010) повідомлялося, що речовини на основі силікату натрію не перешкоджають потраплянню води до капілярних пор бетонних конструкцій.

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

Біомінералізація — процес осадження кристалів у клітинному або позаклітинному матриксі живого організму (Lowenstam & Weiner, 1989), який відбувається за рахунок переміщення та перетворення металів мікроорганізмами (Dhami et al., 2013; Dhami et al., 2016; Phillips et al., 2013; Zhu & Dittrich, 2016). Одним із найбільш досліджених і вивчених процесів біомінералізації є перетворення карбонату кальцію (CaCO_3) з подальшим утворенням кальциту (Fernandez et al., 2018, Banks et al., 2010; Ronholm et al., 2014; Rusznayk et al., 2012). Щороку з'являється інформація про проведення досліджень про вплив мікроорганізмів на осадження карбонату кальцію для геологічного та будівельного застосування (Dhami et al., 2013; Dhami et al., 2014).

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

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

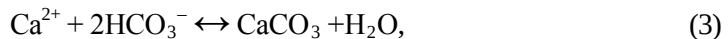
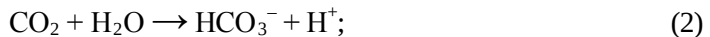
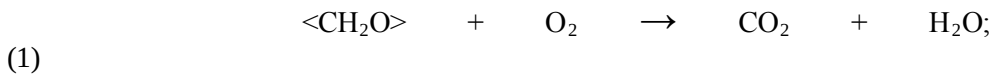
МІОК є успішним у разі досягнення та підтримання п'яти ключових факторів: (1) концентрації кальцію, (2) рівня розчиненого неорганічного вуглецю, (3) pH середовища, (4) активності уреаз (5) активності карбоангідрази (Hammes & Verstraete, 2002; Hammes et al., 2003; Achal et al., 2015; Ivanov & Stabnikov, 2019).

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

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

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

Хемотрофні осади CaCO_3 :



де $\text{<CH}_2\text{O>}$ — узагальнена формула вуглеводів.

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



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

На сьогодні найбільш вивченими мікроорганізмами для проведення мікробно індукованого осадження кальцію є уреазопродукуючі бактерії (Whiffin, 2004; Whiffin et al., 2007; Van Paassen, 2011; Stabnikov et al., 2013; Umar et al., 2016;

Mujah et al., 2017; Bibi et al., 2018). Hokkanen та Lynch (2003) у своїх дослідженнях відзначають, що передбачити розвиток бактерій, які пропонується використовувати для МІОК, не завжди можливо, тому необхідно аналізувати в кожному конкретному випадку модель їх застосування та можливі ризики.

Прогалини та обмеження при використанні МІОК. Багато дослідників з усього світу, таких як Al Qabany, DeJong, Valencia, Van Paassen, Whiffin та ін., виявили ряд недоліків та обмежень у технології МІОК для стабілізації ґрунту: як забезпечити наявність гомогенного шар покриття при обробці; яким чином створену технологію зробити безперебійною, системною та однорідною через застосування для різних оброблюваних площ і конструкцій; чи буде досягнуто умову рівномірного просочування та осадження кальцію? Саме ці питання на сьогодні створюють системні обмеження для подальшої економічної, а найголовніше, екологічної перспективи застосування МІОК у промислових масштабах.

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

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

Одним із способів отримання та накопичення уреазо-продукуючих бактерій є подача сечовини до ґрунтів (Stabnikov et al., 2013 b; Al-Thawadi, 2013). Потім відбувається відбір галофільних і лужнофільних уреазо-продукуючих бактерій або навіть автохтонних мікроорганізмів для відпрацювання біоцементатії за уреазної активності *in situ* (Hammes et al., 2003; Burbank et al., 2011, 2012). Відбір уреазо-продукуючих бактерій відбувається при використанні середовищ, що мають достатньо високу концентрацію солі та високі межі значення рН (Stabnikov et al., 2013 b). Ці умови допомагають отримувати та накопичувати культури з високим рівнем активності уреаз, навіть у неасептичних умовах (Cheng & Cord-Ruwisch, 2012).

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

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

Уреаза, що належить до групи гідролаз, — це металофермент, що містить нікель, який каталізує гідроліз сечовини в аміак і карбонат, ініціюючи реакційний ланцюг осадження карбонату кальцію (Castro et al., 2016). Li та ін. (2013) показали, що уреазопродукуючі бактерії можуть поглинати розчинні важкі метали в ґрунтах та ґрунтових водах і є активними під час МІОК. Автори, вивчаючи процес МІОК за допомогою гідролізу сечовини у *Sporosarcina pasteurii* та *Terrabacter*, дійшли висновку, що обидві бактерії успішно асимілюють Ni, Cu, Pb, Co, Zn та Cd з ґрунтів, осаджуючи їх карбонатами навіть за кислого значення рН, моделюючи ситуацію як при кислотних атмосферних опадах.

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

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

Карбоангідраза (КА), як і уреаз, відіграє важливу роль при проведенні МІОК, але на сьогодні ще не достатньо вивчено, як саме впливає на МІОК. КА також є металоферментом, але замість нікелю містить цинк, що вступає у ката-

літичну взаємодію з CO_2 та HCO_3 (бікарбонатом). При взаємодії з бікарбонатом вивільняються іони водню (H_2), які сприяють осадженню карбонату кальцію до кальциту з вивільненням води та вуглекислого газу (Castro et al., 2016). При осадженні карбонату кальцію за рахунок карбоангідрази форма осаду може бути ромбоєдром (менш жорстка структура) або ж багатокутною, а при наявності уреазі — еліпсоїдальною або ж багатокутною, що підтверджує взаємодоповнення елементів.

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

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

Уреазопродукуючі бактерії в цілому можна розподілити на дві основні групи (залежно від реакції на певну концентрацію амонію) (Gat et al., 2014): бактерії, в яких висока концентрація амонію пригнічує активність уреазі з подальшим низьким біоцементуючим ефектом (напр., *Bacillus megaterium*), та бактерії, де активність уреазі при високій концентрації не зменшується, а навпаки, призводить до інтенсивного біоцементуючого ефекту (напр., *Sporosarcina pasteurii*, що раніше мала назву *Bacillus pasteurii*). Саме представники другої групи є найбільш доцільними для біоцементації за достатньої наявності концентрації сечовини, зменшуючи потенційне потрапляння сечовини до ґрунту та ґрунтових вод. Однак цей процес має і негативну тенденцію, оскільки призводить до викидів амонію (NH_4^+) у навколишнє середовище, що може супроводжуватися легким відтінком амонію в місцях використання (Al Qabany et al., 2012).

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

RG1: мінімальний ризик захворювання людини;

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

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

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

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

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

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

Саме тому перед початком будь-яких досліджень і випробувань необхідно провести ретельний відбір, який передбачає (Іванов, 2015):

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

Зазвичай, у методах МІОК пропонується використовувати такі мікроорганізми, що відносяться до родів *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Spolooactobacillus*, *Clostridium* та *Desulfotomaculum*, а також *Serratia* — бактерії, які були ізольовані з бразильських ґрунтів (Enriquez, 2017). Enriquez виявив, що *Serratia ureilytica* sp має вищі показники осадження CaCO_3 (кальцит) порівняно з *Sporosarcina pasteurii* у піщаних ґрунтах за тих самих параметрів і умов (Whiffin, 2004). Morales та ін. (2015) досліджували біоцементатацію з низькою кількістю мікроорганізмів в розчині, що імітувало б природний рівень бактерій родини *Bacillaceae* у мулистоглинисто-піщаному ґрунті. Завдання дослідження — обмежити кількість утворюваного аміаку та його окислених форм, щоб мінімізувати потенційний вплив на навколишнє середовище та можливе розчинення осажденного карбонату кальцію внаслідок окислення аміаку. Результати дослідження показали низький рівень осад-

ження та меншу стійкість до стиснення порівняно з іншими дослідженнями щодо стабілізації ґрунтів. Автори дійшли висновку, що індукована біоцементация ґрунтів в такому разі не може забезпечити достатній рівень міцності.

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

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

У дослідженні (Ivanov & Stabnikov, 2019) відзначається, що лужнофільні уреазопродукуючі бактерії штамів VS8, VS1, VS21 та VS17 складають 55%, 30%, 10% та 5% загальної кількості колоній відповідно. Основним штамом була *Yaniella* sp. / *Enteractinococcus* sp. Штам VS8 з клітинами, схожими на мікрококи, був із сімейства *Micrococcaceae*. Це важливо для промислових процесів, оскільки *Yaniella* належать до першої групи ризику і в базі даних PubMed не було виявлено інформації про патогенність цього мікроорганізму.

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

У праці (Ivanov & Stabnikov, 2019) зазначається, що одним зі способів забезпечення біобезпеки при використанні уреазопродукуючих штамів є використа-

ння неочищеної бактеріальної уреазі при зменшенні активності бактеріальних клітин для утворення центрів кристалізації кальцію. Саме тому було проведено дослідження, у якому пропонується використовувати таку схему при біоцементуванні:

- провести обробку досліджуваного зразка розчином сечовини та кальцію карбонату;

- провести обробку поверхні культурою *Yaniella* sp. VS8;

- провести обробку 0,5% розчином додецилсульфатом натрію (для інактивації культури).

- при дотриманні такої послідовності дій було виявлено, що уреазна активність інактивованих бактерій не зменшувалась і залишалась на прийнятому рівні. Тому такий підхід до використання культур з інактивацією дає надію на вирішення питання біологічної безпеки при біоцементуванні.

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

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

Необхідні параметри контролю МІОК при біоцементзації. У більшості опублікованих статей йдеться саме про покращення міцності «ґрунтів». Однак результати відображають застосування біоцементзації лише до піску або піщаного ґрунту, без перспектив застосування у залізобетонних та/або бетонних конструкціях. Аналіз піску, піщаного ґрунту та гранулометричний стабілізований ґрунт продемонстрував, що очікуваний ефект МІОК був дуже різноманітний залежно від матриці, що використовується, (розподілу розміру частинок).

Застосування методик повинно гарантувати надійні результати оцінки геотехнічних інженерних властивостей щодо оброблюваних поверхонь (проникність, пористість, жорсткість, міцність на зсув, без обмежень міцності при навантаженнях, параметри надійної процедури цементзації ґрунту та інших матеріалів) (Machado et al., 2009).

Необхідні параметри контролю: проникність води (гідравлічна провідність). У праці (Caputo, 1999) проникність ґрунту визначається як кількість води, яка проходить в порах між частинками з різною швидкістю за певний проміжок

часу. Оцінка швидкості проходження води є актуальною, оскільки вміст води в будь-якій ґрунтовій зоні пов'язаний зі взаємозв'язками між натягом ґрунту і тиском, що залежить від підвищеної кількості води, яка проникає (Franca et al, 2009; Rufino et al, 2011).

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

Висновки

На основі проведення аналізу літературних джерел можна відзначити, що мікробно індуковане осадження кальцію (МІОК) має значний потенціал з точки зору будівельної біотехнології, адже біоцемент має ряд переваг і вирішує цілу низку екологічних проблем. Для досягнення цієї мети пропонується використовувати уреазопродукуючі мікроорганізми, а також ацидогенні, галофільні, лужнофільні та денітрифікуючі мікроорганізми.

Література

- Achal, V., Kawasaki, S. (2016). Biogrout: A novel binding material for soil improvement & concrete repair. *Front. Microbiol.* 7:314. DOI.org/10.3389/fmicb.2016.00314.
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., Reddy, M. S. (2009). Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcina pasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(3), 433—438. DOI: 10.1007/s10295-008-0514-7.
- Achal, V., Mukherjee, A., Kumari, D., Zhang, Q. (2015). Biomineralization for sustainable construction — A review of processes & applications. *Earth-Science Reviews*, 148, 1—17. doi.org/10.1016/j.earscirev.2015.05.008.
- Achal, V., Pan, X. (2011). Characterization of urease & carbonic anhydrase producing bacteria & their role in calcite precipitation. *Current Microbiology*. 62(3), 894—902. DOI: 10.1007/s00284-010-9801-4.
- Al-Thawadi SM (2013). Consolidation of sand particles by aggregates of calcite nanoparticles synthesized by ureolytic bacteria under non-sterile conditions. *Journal of Chemical Science & Technology*, 2, 141—146.
- Al Qabany, A., Soga, K., Santamarina, C. (2012). Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation. *Journal of Geotechnical & Geoenvironmental Engineering*, 138(8), 992—1001.
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of Biotechnology*, 93, 171—181. DOI: 10.1016/s0168-1656(01)00393-5.
- Baltazar, L., Santana, J., Lopes, B., Rodrigues, M. P., Correia, J. R. (2014). Surface skin protection of concrete with silicate-based impregnations: influence of the substrate roughness & moisture. *Construction & Building Materials*, 70, 191—200.
- Bang, S. S., Galinat, J. K., Ramakrishnan, V. (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme & Microbial Technology*, 28, 404—409. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00348-3.

- Banks, E. D., Taylor, N. M., Gulley, J., Lubbers, B. R., Giarrizzo, J. G., Bullen, H. A., et al. (2010). Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, 27(5), 444—454. DOI.org/10.1080/01490450903485136.
- Bessler, K. E., Rodrigues, L. C. (2008). Os polimorfos de carbonato de calcio: uma síntese fácil de aragonita. *Química Nova*, 31(1), 178—180. DOI.org/10.1590/S0100-40422008000100032.
- Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq, M. Y., Suleiman, M. T., Zouari, N. (2018). Isolation, differentiation & biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil & their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *RSC Adv*, 8(11), DOI.org/10.1039/C7RA12758H.
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Williams, B. C., Crawford, R. L. (2012). Urease activity of ureolytic bacteria isolated from six soils in which calcite was precipitated by indigenous bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 29, 389—395.
- Burbank, M. B., Weaver, T. J., Green, T. L., Williams, B. C., Crawford, R. L. (2011). Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soil. *Geomicrobiology Journal*, 28, 301—312. DOI.org/10.1080/01490451.2010.499929.
- Cacchio, P., Ercole, C., Ca uccio, G., Lepidi, A. (2003). Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave & from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 85—98. DOI.org/10.1080/01490450303883.
- Caputo, M. (1999). Diffusion of fluids in porous media with memory. *Geothermics*, 28(1), 113—130.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J. P. (1999). Ca-carbonates precipitation & limestone genesis — the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126, 9—23. DOI.org/10.1016/S0037-0738(99)00028-7.
- Castro, M. J., Lopez, C. E., Narayanasamy, R., Marszalek, J. E., Luevanos Escareno, M. P., Fajardo, G. J., Balagurusamy, N. (2016) Potential of enzymes (urease & carbonic anhydrase). *Chimica Oggi — Chemistry Today*, 34(4).
- Chapelle, F. H. (2000). Ground-water microbiology & geochemistry. *John Wiley & Sons*, 468.
- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R. (2012). In situ soil cementation with ureolytic bacteria by surface percolation. *Ecological Engineering*, 42, 64—72. DOI.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.013.
- Coleman-Derr, D., Desgarennnes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016) Plant compartment & biogeography affect microbiome composition in cultivated & native Agave species. *New Phytologist*, 209(2), 798—811. DOI: 10.1111/nph.13697.
- Czarnecki, L., Woyciechowski, P. (2013). Prediction of the reinforced concrete structure durability under the risk of carbonation & chloride aggression. *The Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 61, 173—181.
- Dai, J., Akira, Y., Wittmann, F. H., Yokota, H., Zhang, P. (2010). Water repellent surface impregnation for extension of service life of reinforced concrete structures in marine environments: the role of crack. *Cement & Concrete Composites*, 32, 101—109.
- Daskalakis, M. I., Rigas, F., Bakolas, A., Magoulas, A., Kotoulas, G., Katsikis, I., et al. (2015). Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 73—84. DOI.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.005.
- Degens, B. P., Schi er, L. A., Sparling, G. P., Vojvodic-Vukovic, M. (2000). Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry*, 32(2), 189—196. DOI.org/10.1016/S0038-0717(99)00141-8.
- DeJong, J. T., Mortensen, B. M., Martinez, B. C., Nelson, D. C. (2010). Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*, 36(2), 197—210. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2008.12.029.
- DeJong, J. T., Soga, K., Banwart, S. A., Whalley, W. R., Ginn, T. R., Nelson, D. C., et al. (2011). Soil engineering *in vivo*: harnessing natural biogeochemical systems for sustainable, multi-functional engineering solutions. *Journal of The Royal Society Interface*, 8(54), 1—15. DOI:10.1098/rsif.2010.0270.

DeJong, J. T., Soga, K., Kavazanjian, E., Burns, S., Van Paassen, L. A., Al Qabany, A., et al. (2013). Biogeochemical processes & geotechnical applications: progress, opportunities & challenges. *Geotechnique*, 63(4), 287—301.

De Muynck, W., Cox, K., Verstraete, W., De Belie, N. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction & Building Materials*, 22, 875—885. DOI:10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011.

De Muynck, W., Leuridan, S., Van Loo, D., Verbeken, K., Cnudde, V., De Belie, N., et al. (2011). Influence of pore structure on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation, *Applied & Environmental Microbiology Journal*, 77, 6808—6820.

De Muynck, W., Cox, K., De Belie, N., Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment, *Construction & Building Materials*, 22, 875—885.

De Muynck, W., Debrouwer, D., De Belie, N., Verstraete, W. (2008). Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement & Concrete Research*, 38, 1005—1014.

De Muynck, W., De Belie, N., Verstraete, W. (2010). Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological engineering*, 36, 118—136.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fernández, M. S., Montt, B., Ortiz, L., Neira-Carrillo, A., Arias, J. L. (2018). Effect of carbonic anhydrase immobilized on eggshell membranes on calcium carbonate crystallization *in vitro*. In Biomineralization pp. 31—37. Springer, Singapore.

Ferrara, L., Pattarini, A. (2016). Siloxanes in concrete: from manual application of water-proofing treatments to mix-design addition for concrete hydrophobicity. Proceedings CONSEC 2016, in: 8th International Conference on Concrete under Severe Conditions — Environment & loading, M. Colombo & M. di Prisco (Eds.) Lecco, Italy, 263—268.

Ferrara, L., Van Mullem, T., Alonso, M. C., Antonaci, P., Borg, R. P., Cuenca, E., Jefferson, A., Ng, P. L., Peled, A., Roig-Flores, M., Sanchez, M., Serna, P., Snoeck, D., Tulliani, J. M., De Belie N. (2018). Experimental characterization of the self-healing capacity of cement based materials & its effects on the material performance: a state of the art report by COST Action SARCOS WG2, *Construction & Building Materials*, 167, 115—142.

- Frankel, R. B., Bazylinski, D. A. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, 54(1), 95—114. DOI:10.2113/0540095.
- Fukue, M., Sato, Y., Yamashita, M., Yanai, M., & Fujimori, Y. (2003). Change in micro-structure of soils due to natural mineralization. *A lied Clay Science*, 23(1—4), pp. 169—177. DOI:10.1016/s0169-1317(03)00100-5.
- Gadd, G. M., Pan, X. (2016). Biomineralization, bioremediation & biorecovery of toxic metals & radionuclides. *Geomicrobiology Journal*, 33, 175—178.
- Gao, Y., Hang, L., He, J., Chu, J., 2019. Mechanical behavior of biocemented s&s at various treatment levels & relative densities. *Acta Geotechnica*, 14(3), 697—707.
- Gat, D., Tsesarsky, M., Shamir, D., Ronen, Z. (2014). Accelerated microbial-induced CaCO₃ precipitation in a defined coculture of ureolytic & non-ureolytic bacteria. *Biogeosciences*, 11(10). DOI:10.5194/BG-11-2561-2014.
- Gurbuz, A., Sari, Y. D., Yuksekdog, Z. N. (2015). Bacteria-induced cementation in s&y soils. *Geomicrobiology Journal*, 32, 853—859.
- Han, J., Lian, B., Ling, H. (2013). Induction of calcium carbonate by *Bacillus cereus*. *Geomicrobiology Journal* 30, 682—689. DOI:10.1080/01490451.2012.758194.
- Hammes, F., Verstraete, W. (2002). Key roles of pH & calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 1(1), 3—7. DOI:10.1023/A:1015135629155.
- Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S. D. (2003). Strain-Specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *A lied & Environmental Microbiology*, 69(8), 4901—4909. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003.
- He, J., Gao, Y., Gu, Z., Chu, J., Wang, L. (2020). Characterization of crude bacterial urease for CaCO₃ precipitation & cementation of silty s&. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 32(5). DOI:10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0003100.
- Hokkanen, H. M., Lynch, J. M. (2003). Biological control: benefits & risks, vol. 4. *Cambridge University Press*.
- Huseien, G. F., Mirza, J., Ismail, M., Ghoshal, S. K., Hussein, A. A. (2017). Geopolymer mortars as sustainable repair material: a comprehensive review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 80, 54—74.
- Ibrahim, M., Al-Gahtani, A. S., Maslehuddin, M., Dakhil, F. H. (1999). Use of surface treatment materials to improve concrete durability. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 11, 36—40.
- Ivanov, V. (2010). *Environmental Microbiology for Engineers*. CRC Press.
- Ivanov, V., Chu, J. (2008). A lications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging & biocementation of soil *in situ*. *Reviews in Environmental Science & Biotec-hnology*, 7(2), 139—153.
- Ivanov, V., Stabnikov, V. (2017). Springer Science+Business Media 2017; *Construction Bio-technology (Biogeochemistry, Microbiology & Biotechnology of Construction Materials & Pro-cesses)*.
- Ivanov, V., Chu, J., Stabnikov, V. (2014). Iron- & calcium-based biogrouts for porous soils. *Construction Materials*, 167, 36—41.
- Ivanov, V., Chu, J., Stabnikov, V., He, J., Naeimi, M. (2010). Iron-based bio-grout for soil improvement & l& reclamation. Second International Conference on Sustainable Construction Materials & Technologies, Ancona.
- Ivanov, V., Kuang, S., Stabnikov, V. (2009). The removal of phosphorus from reject water of municipal wastewater treatment plant using iron ore. *Journal of Chemical Technology & Bio-technology*, 84, 78—82.
- Jaji, A. Z., Zakaria, Z. A. B., Mahmud, R., Loqman, M. Y., Hezmee, M. N. M., Abba, Y., et al. (2017). Safety assessments of subcutaneous doses of aragonite calcium carbonate nano-crystals in rats. *Journal of Nanoparticle Research*, 19(5).

- Jiang, L., Xue, X., Zhang, W., Yang, J., Zhang, H., Li, Y., Zhang, R., Zhang, Z., Xu, L., Qu, J., Song, J., Qin, J. (2015). The investigation of factors affecting the water impermeability of inorganic sodium silicate-based concrete sealers. *Construction & Building Materials*, 93, 729—736.
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E. (2010). A lication of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological Engineering*, 36, 230—235.
- Keykha, H. A., Afshin, A., Bujang, B. K. H., Kawasaki, S. (2018). Microbial induced calcite precipitation by *Sporosarcina pasteurii* & *Sporosarcina aquimarina*. *Environmental Geotechnics*, DOI.org/10.1680/jenge.16.00009.
- Kim, H. J., Eom, H. J., Park, C., et al. (2016). Calcium carbonate precipitation by *Bacillus* & *Sporosarcina* strains isolated from concrete & analysis of the bacterial community of concrete. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26(3), 540—548. DOI.org/10.4014/jmb.1511.11008.
- Kubiak, K. J., Wilson, M. C. T., Mathia, T. G., Carval, P. (2011). Wettability versus roughness of engineering surfaces. *Wear*, 271, 523—528.
- LaRosa Thompson, J., Silsbee, M. R., Gill, M. R., Scheetz, B. E. (1997). Characterization of silicate sealers on concrete. *Cement & Concrete Composites*, 27, 1561—1567.
- Le Metayer-Levrel, G., Castanier, S., Orial, G., Loubiere, J. F., Perthuisot, J. P. (1999). A lications of bacterial carbonatogenesis to the protection & regeneration of limestones in buildings & historic patrimony. *Sedimentary Geology*, 126, 25—34.
- Li, M., Cheng, X., Guo, H. (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, 81—85.
- Lowenstam, H. A., Weiner, S. (1989). On Biomineralization. *Oxford University Press on Dem &.*
- Li, M., Fang, C., Kawasaki, S., Huang, M., Achal, V. (2018). Bioconsolidation of cracks in masonry cement mortars by *Acinetobacter* sp. SC4 isolated from a karst cave. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141, 94—100. DOI.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.008.
- Lukovic, M., Ye, G. (2015). Effect of moisture exchange on interface formation in the repair system studied by X-Ray Absorption, Materials (9), DOI.org/10.3390/ma9010002.
- Maheswaran, S., Dasuru, S. S., Murthy, A. R. C., Bhuvaneshwari, B., Kumar, V. R., Palani, G. S., et al. (2014) Strength improvement studies using new type wild strain *Bacillus cereus* on cement mortar. *Current Science*, 106, 50—57.
- McConnaughey, T. A., Whelan, J. F. (1997). Calcification generates protons for nutrient & bicarbonate uptake. *Earth-Science Reviews*, 42(1—2), 95—117.
- Medeiros, M. H. F., Helene, P. (2009). Surface treatment of reinforced concrete in marine environment: Influence of chloride diffusion coefficient & capillary water absorption. *Construction & Building Materials*, 23, 1476—1484.
- Millo, C., Dupraz, S., Ader, M., Guyot, F., Thaler, C., Foy, E., Menez, B. (2012). Carbon isotope fractionation during calcium carbonate precipitation induced by ureolytic bacteria. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 98, 107—124.
- Mitchell, J. K., Santamarina, J. C. (2005). Biological considerations in geotechnical engineering. *Journal of Geotechnical & Geoenvironmental Engineering*, 131(10), 1222—1233.
- Mortensen, B., DeJong, J. (2011). Strength & stiffness of MICP treated s& subjected to various stress paths. In: Han, J., Alzamora, D. A. (Eds.), ASCE Geo-Frontiers, 211. *Geotechnical Special Publication*, 4012—4020.
- Morales, L., Romero, E., Jommi, C., Garzon, E., Gimenez, A. (2015). Feasibility of a soft biological improvement of natural soils used in compacted linear earth construction. *Acta Geotech*, 10(1), 157—171.
- Mujah, D., Shahin, M. A., Cheng, L. (2017). State-of-the-art review of biocementation by microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. *Geomicrobiology Journal*, 34(6), 524—537.

- Murugan, R., Loges, R., Taube, F., Sradnick, A., Joergensen, R. G. (2014). Changes in soil microbial biomass & residual indices as ecological indicators of land use change in temperate permanent grassland. *Microb. Ecol.*, 67(4), 907—918.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., L&i, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003). Microbial diversity & soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655—670.
- Narwaria, R. S., Tiwari, A. (2016). Development of cracks in concrete, preventive measures & treatment methods: a review. *Journal of Engineering & Technology*, 3, 671—677.
- Onofrei, M., Gary, M. N., Keil, L. D., Pusch, R. (1989). Studies of cement grouts & grouting techniques for sealing a nuclear fuel waste disposal vault. *Materials Research Society*, 137, 349—358.
- Ozen, I., Sims, S. (2015). Vital importance of moisture level in all stages of processing from calcium carbonate coating through polyethylene/calcium carbonate compounding to film generation. *Powder Technol.*, 270, 320—328.
- Pacheco-Torgal, F., Abdollahnejad, Z., Miraldo, S., Baklouti, S., Ding, Y. (2012). An overview on the potential of geopolymers for concrete infrastructure rehabilitation. *Construction & Building Materials*, 36, 1053—1058.
- Pan, X., Shi, C., Jia, L., Zhang, J., Wu, L. (2015). Effect of inorganic surface treatment on air permeability of cement-based materials. *Journal of Materials in Civil Engineering*.
- Pan, X., Shi, Z., Shi, C., Ling, T. C., Li, N. (2017). A review on surface treatment Part I: Types & mechanisms. *Construction & Building Materials*, 132, 578—590.
- Parghi, A., Alam, M. S. (2016). Effects of curing regimes on the mechanical properties & durability of polymer-modified mortars — an experimental investigation. *Journal of Cement-Based Materials*, 5, 324—347.
- Phillips, A. J., Gerlach, R., Lauchnor, E., Mitchell, A. C., Cunningham, A. B., Spangler, L. (2013). Engineered a lications of ureolytic biomineralization: a review. *Biofouling*, 29(6), 715—733.
- Piekarska, K., Piorkowska, E., Bojda, J. (2017). The influence of matrix crystallinity, filler grain size & modification on properties of PLA/calcium carbonate composites. *Polym. Test*, 62, 203—209.
- Reddy, S., Rao, M., Aparna, P., Sasikala, C. (2010). Performance of standard grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete. *Asian Journal of Civil Engineering (Building & Housing)*, 11, 43—55. DOI.org/10.1007/s40030-017-0227-x.
- Rodriguez-Navarro, C., Suzuki, A., Ruiz-Agudo, E. (2013). Alcohol dispersions of calcium hydroxide nanoparticles for stone conservation. *Langmuir*, 29, 11457—11470.
- Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Gallego, M., Ben, K., Gonzalez-Munoz, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *A lied & Environmental Microbiology Journal*, 69, 2182—2193.
- Ronholm, J., Schumann, D., Sapers, H. M., Izawa, M., A lin, D., Berg, B., et al. (2014). A mineralogical characterization of biogenic calcium carbonates precipitated by heterotrophic bacteria isolated from cryophilic polar regions. *Geobiology*, 12(6), 542—556.
- Rufino, R. D., Rodrigues, G. I. B., Campos-Takaki, G. M., Sarubbo, L. A., Ferreira, S. R. M. (2011). A lication of a yeast biosurfactant in the removal of heavy metals & hydrophobic contaminant in a soil used as slurry barrier. *A lied & Environmental Soil Science*.
- Rusznayk, A., Akob, D. M., Nietzsche, S., Eusterhues, K., Totsche, K. U., Neu, T. R., et al. (2012). Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg cave. *A lied & Environmental Microbiology Journal*, 78(4), 1157—1167.
- Sarda, D., Choonia, H. S., Sarode, D. D., Lele, S. S. (2009). Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel a lication. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 1111—1115.
- Sharma, A., Ramkrishnan, R. (2016). Study on effect of microbial induced calcite precipitates on strength of fine-grained soils. *Perspectives on Science*, 8, 198—202.
- Somma, K., Jaturapitakkul, C., Kajitvichyanukul, P., Chindaprasirt, P. (2011). NaOH-Activated ground fly ash geopolymer cured at ambient temperature.

Sotoudehfar, A. R., Sadeghi, M. M., Mokhtari, E., Shafiei, F. (2016). Assessment of the parameters influencing microbial calcite precipitation in injection experiments using Taguchi methodology. *Geomicrobiology Journal*, 33, 163—72.

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

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

Stabnikov, V., Chu, J., Myo, A. N., Ivanov, V. (2013). Immobilization of s& dust & associated pollutants using bioaggregation. *Water Air Soil Pollut*, 224, 1631—1700. DOI.org/10.1007/s11270-013-1631-0.

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

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

Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology & Biochemistry*, 31(11), 1563—1571.

Umar, M., Kassim, K. A., Chiet, K. T. P. (2016). Biological process of soil improvement in civil engineering: a review. *Journal of Rock Mechanics & Geotechnical Engineering*, 8(5), 767—774.

Valencia, Y. (2009). Influencia da biomineralizacao nas propriedades físico-mecanicas de um perfil de solo tropical afetado por processos erosivos. Doctoral dissertation, PhD Thesis. Universidad de Brasilia, Brasilia, Brasil.

Valencia, Y., Camapum, J., Torres, F. A. (2014). Influence of biomineralization on the physico-mechanical profile of a tropical soil affected by erosive processes. *Soil Biology & Biochemistry*, 74, 98—99.

Van Hees, R. P. J., Lubelli, B., Niil& T., Bernardi, A. (2014). Compatibility & performance criteria for nano-lime consolidants, in: Proceeding of 9th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Ankara.

Van Paassen, L. A. (2009). Biogrout, Ground Improvement by Microbial Induced Carbonate Precipitation, Ph.D. thesis. Delft University of Technology, Delft, The Netherl&s.

Van Paassen, L. A., Daza, C. M., Staal, M., Sorokin, D. Y., van der Zon, W., van Loosdrecht, M. C. (2010). Potential soil reinforcement by biological denitrification. *Ecological engineering*, 36(2), 168—175.

Varalakshmi, A. D. (2014). Isolation & characterization of urease utilizing bacteria to produce biocement. *IOSR-JESTFT* 8, 52—57.

Wang, J., Cagatay, Y., Boon, N., De Belie, N. (2016). A lication of microorganisms in concrete: a promising sustainable strategy to improve concrete durability, *A lied Microbiology & Biotechnology*, 100, 2993—3007.

Wang, Y., Wang, H., Cheng, H., Chang, F., Wan, Y., She, X. (2020). Niche differentiation in the rhizosphere & endosphere fungal microbiome of wild Paris polyphylla Sm. *PeerJ*, 8.

Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N., Ferris, F. G. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation & for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 93—115.

Wei, S., Cui, H., Jiang, Z., Liu, H., He, H., Fang, N. (2015). Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Braz. J. Microbiol*, 46(2), 455—464.

Whiffin, V. S. (2004). Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement. Doctoral dissertation. Murdoch University.

Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A., Harkes, M. P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417—423.

Wojciechowski, L., Kubiak, K. J., Mathia, T. G. (2016). Roughness & wettability of surfaces in boundary lubricated scuffing wear. *Tribology International*, 93, 593—601.

Wright, D. T., Oren, A. (2005). Nonphotosynthetic bacteria & the formation of carbonates & evaporites through time. *Geomicrobiology Journal*, 22 (1—2), 27—53.

Wu, J. R., Han, S. F., Zhu, Y. Y., Lu, M., Wang, G. P., Guo, W. L. (2006). Study on taxonomy of endophytic fungi isolated from orchid mycorrhizae in Yunnan province. *J. Southw. For. Coll*, 26(3), 5—10.

Xue, X., Li, Y., Yang, Z., He, Z., Dai, J. G., Xu, L., Zhang, W. (2017). A systematic investigation of the waterproofing performance & chloride resistance of self-developed water-borne silane-based hydrophobic agent for mortar & concrete. *Construction & Building Materials*, 155, 939—946.

Yang, X., Xu, G., Chen, Y., Wang, F., Mao, H., Sui, W., et al. (2009). CaCO₃ crystallization control by poly (ethylene oxide) poly (propylene oxide) poly (ethylene oxide) triblock copolymer & O — (hydroxy isopropyl) chitosan. *J. Cryst. Growth*, 311(21), 4558—4569.

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

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