

УДК 579.66: 691.5

**Препарат на основе бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона**© 2020 С.В. КАЛЁНОВ<sup>1</sup>\*, Н.Б. ГРАДОВА<sup>1</sup>, С.П. СИВКОВ<sup>1</sup>, Е.В. АГАЛАКОВА<sup>1</sup>, А.А. БЕЛОВ<sup>1</sup>, Н.А. СУЯСОВ<sup>1</sup>, Н.С. ХОХЛАЧЕВ<sup>2</sup>, В.И. ПАНФИЛОВ<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва, 125047<sup>2</sup> ООО «Газпром ВНИИГАЗ», Московская обл., Ленинский район, с.п. Развилковское, пос. Развилка, 142717

\*e-mail: wsezart@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.02.2020 г.

После доработки 12.03.2020 г.

Принята к публикации 09.07.2020 г.

Разработка природоподобной и природосохраняющей технологии повышения прочности и сохранности строительных конструкций при сопутствующих антропогенных воздействиях и неблагоприятных условиях окружающей среды возможна на основе индуцированного микроорганизмами осаждения карбоната кальция. Способность уробактерий к осаждению карбоната кальция может быть использована для получения «самолечащегося» и укрепленного бетона, залечивания трещин и реставрации бетонных сооружений. Экологической нишей, перспективной для поиска таких микроорганизмов, устойчивых к повышенной щелочности, постоянному изменению условий окружения, стрессам, являются гиперсоленые среды. Проведенный скрининг микроорганизмов позволил выявить наиболее активные уробактерии, *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, из гиперсоленых озер. Введение этих микроорганизмов в состав цементной смеси существенно повышает прочность цементного камня, снижает пористость и капиллярное водопоглощение, что связано с происходящим биокальцинированием. Нами изучена микроструктура иммобилизованных в диатомите спор исследованных бактерий и показано, что для этой формы характерно длительное сохранение бактериальной активности. Выявлена высокая активность бактериальных препаратов при залечивании трещин в цементном камне.

**Ключевые слова:** биоминерализация, биоцементация, экстремальные галофилы, залечивание трещин, цементный камень, биобетон, гидролиз мочевины

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28

В природных условиях широко распространены биогеохимические процессы, такие как образование твердых пород из рыхлых осадков, укрепление почв, грунтов, песков в результате естественной биоцементации на основе жизнедеятельности микроорганизмов [1–3]. Биогеохимический подход дает возможность разработки технологии получения и использования биопрепаратов для воздействия на грунты с целью улучшения их функциональных свойств, закрепления песков, повышения прочности строительных материалов, таких как бетон, известняк, гипс, а также восстановления по-

врежденных конструкций [4–6]. Необходима разработка перспективной природоподобной технологии, основанной на использовании способности уробактерий к внеклеточному индуцированному осаждению кальция (МИСР) [7]. Эффективность этого процесса определяется пулом бактериальных ферментов и метаболитов, причем способность к биокальцинированию может различаться даже у микроорганизмов одного вида [8–10].

Недостаточная функциональная активность и устойчивость биокальцинирующих микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей

*Список сокращений:* LB – среда Лурья-Бертани; МИСР (microbial induced calcium carbonate precipitation) – индуцированное микроорганизмами осаждение карбоната кальция; КОЕ – колониеобразующая единица; ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия.

среды и антропогенным воздействиям, а также несовершенство форм биопрепаратов [7, 11, 12] – эти факторы ограничивают возможности их применения. В результате при проведении реставрационных работ приходится использовать экологически небезопасные технологии [12–14].

К настоящему времени проведен широкий скрининг уробактерий, способных к МІСР, из разных экосистем и обнаружено, что наиболее активные штаммы относятся к разным видам рода *Bacillus* [4, 7, 15].

Малоизученной экологической нишей для выделения бактерий, обладающих уреазной активностью и способностью к биоосаждению кальция, являются гипергалинные среды, из которых ранее выделяли бактерии рода *Bacillus*, не способные размножаться при повышенном содержании солей, что исследователи объясняли контаминацией, например, из привнесенного водными источниками и птицами материала, а также выживаемостью спор в условиях высокой солености [16–18]. Нами обнаружено (*неопубликованные данные*), что некоторые бактерии рода *Bacillus*, выделенные из гиперсоленых сред и не размножающиеся в монокультуре при высоких концентрациях NaCl (> 15%), при совместном культивировании в сообществе экстремальных галофилов – источников осмопротекторов [19] – активно растут при концентрации NaCl 25% и выше и являются автохтонной микрофлорой. В монокультуре бактерий рода *Bacillus*, выделенных из гипергалинных сред, оптимальные концентрации NaCl могут лежать как в широком диапазоне, так и быть ниже 0,9% (физиологический раствор), а для их культивирования подходят модификации среды Лурия-Бертани (LB) [20]. С одной стороны, отходы жизнедеятельности птиц в гиперсоленых озерах способствуют развитию уробактерий, с другой – устойчивость к высоким значениям pH, выживаемость в условиях осмотического шока, перепадов температуры способствуют отбору чрезвычайно устойчивых форм, перспективных для разработки биокальцинирующих препаратов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследования использовали:

- микроорганизмы из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева: *Bacillus subtilis* К, *Bacillus subtilis* М (медицинский штамм), *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*;

- штаммы микроорганизмов, выделенные методом накопительных культур на среде с мочевиной из эко- и техногенных систем, в которых возможно присутствие уробактерий:

- навоз крупного рогатого скота, навоз песцов

- (звероферма), птицы (птицеферма);

- закрепленные пески Астраханской области;

- разрушенные цементные блоки домов в Москве;

- экстремально галофильные экосистемы, характеризующиеся высокой концентрацией солей и высоким pH среды (озеро Эльтон, Россия; озеро Аликес, Греция; озеро Шотт-эль-Джерид, Тунис).

Идентификация культур, обладающих высокой биокальцинирующей активностью, проведена с использованием стандартного анализа последовательности генов 16S рРНК [21].

### Питательные среды и культивирование уробактерий

Бактерии культивировали на агаризованных питательных средах и глубинно в 250-мл колбах на орбитальном шейкере Unimax 2010 (Heidolph, Германия) при 180 об/мин и 50-мл заполнении, а также в ферментере с рабочим объемом 7 л («Фермус-3», Россия) для наработки биомассы при температурах 30–37 °С на питательных средах следующего состава, г/л:

**Среда LB:** глюкоза – 10, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 10, NaCl – 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2, KCl – 0,2, pH 7,0; водопроводная вода (использовалась для культивирования и хранения культур).

**Среда Кристенсена:** NaCl – 2–5, мочевины – 20, КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> – 1,2, глюкоза – 1, пептон – 2, pH 6,6–6,8; дистиллированная вода. Для получения индикаторной среды (оценка уреазной активности) добавляли водный раствор фенолового красного до конечной концентрации 0,012 г/л.

**Среда Дика:** пептон – 3, NaHCO<sub>3</sub> – 2,12, мочевины – 10, pH 7,5; дистиллированная вода [22].

**Среда Дика модифицированная:** пептон – 3, NaHCO<sub>3</sub> – 2,12, мочевины – 10, КН<sub>2</sub>Р<sub>4</sub> – 0,2 (1,2 – для культивирования в ферментере), глюкоза – 1 (7 – для культивирования в ферментере), pH 7,5; дистиллированная вода.

Компоненты среды стерилизовали при 121 °С в течение 25 мин. Несовместимые компоненты стерилизовали отдельно; растворы мочевины и фенолового красного стерилизовали фильтрацией.

Поверхностное культивирование уробактерий (для определения эффективности биоминерализации) проводили при температуре 30–37 °С на чашках Петри со средой Кристенсена с добавлением CaCl<sub>2</sub> в концентрации 7,5–20 г/л. Активность роста уробактерий определяли по оптической плотности суспензии на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 540 нм. Биомассу концентрировали на центрифуге Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Германия) при 7 500 об/мин в течение 15 мин при 15 °С.

### Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования микроструктуры образцов использовали сканирующий электронный микроскоп JSM-6510 LV (JEOL, Япония). Изображения участков образцов получали в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 15 кВ. Измерения были выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

### Приготовление образцов цементного камня

Материалом для формирования цементных образцов – балочек размером 1×1×3 см при водоцементном соотношении (В/Ц) 0,31 – служил портландцемент ЦЕМ I 42,5Н ГОСТ 31108–2003 производства «Подольскцемент» (Россия). Твердение образцов проходило в воздушно-влажных условиях (22±2 °С и 100% относительной влажности), испытания проводили на 7, 21 и 28 сутки. Испытание на прочность проводили на машине ELE Auto (ELE International, Великобритания) со скоростью нагружения 0,15 МПа/с. Открытую пористость цементного камня определяли гравиметрическим методом с использованием керосина в качестве насыщающей жидкости. Коэффициент капиллярного водопоглощения оценивали стандартным методом как тангенс угла наклона на линейном участке зависимости  $\Delta M = f(\tau) \cdot 1/2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Уреазная активность, ростовые характеристики и способность к биокальцинированию у бактерий, выделенных из различных источников

В результате проведенного нами широкого скрининга разных экологических ниш и техногенных систем были выделены уробактерии, что подтверждает литературные данные об их широком распространении. Большинство бактериальных культур, обладающих уреазной активностью, относилось к роду *Bacillus*. У выделенных бактерий выявлены большие различия в функциональных характеристиках, которые оценивали по уреазной активности на индикаторной среде Кристенсена, активности роста и способности к биокальцинированию на среде Кристенсена с добавлением  $\text{CaCl}_2$ . Следует отметить, что высокая скорость роста и уреазная активность не всегда сопутствовали хорошей биокальцинирующей способности. Наиболее высокие показатели скорости роста, уреазной активности и способности к осаждению  $\text{CaCO}_3$  выявлены для культур *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, выделенных из экстремально галофильных экосистем – озер Эльтон и Аликек.

### Изменение характеристик цементного камня при введении уробактерий

Внесение бактерий с разной функциональной активностью в цементную смесь на основе среды Дика с глюкозой проводили на стадии спорообразования. У сформированных в виде балочек образцов в течение 28 сут производили замер параметров.

Установлено, что прочность при изгибе цементных образцов, затворенных водой, мало меняется в течении 28 сут. Прочность образцов, затворенных средой Дика, несколько ниже прочности контрольных балочек, что объясняется влиянием органических компонентов среды. Существенная разница в характеристиках наблюдалась у цементного камня с бактериальными культурами. Так, при использовании микроорганизмов *Bacillus subtilis* К к 28 суткам происходит повышение прочности при изгибе на 9,8% относительно контрольных образцов и на 13,1% относительно образцов, затворенных средой Дика. При использовании культуры бактерий *Lysinibacillus macroides* в составе биоцемента повышение прочности к 28 суткам составило 38,2% и 42% относительно контрольных образцов и образцов на основе среды Дика соответственно (рис. 1).

Прочность при сжатии цементных образцов, затворенных водой, на 7 сутки составила 63,0 МПа, а к 28 суткам – 70,1 МПа (рис. 2). Прочность образцов, затворенных средой Дика, практически не отличается от прочности контрольных балочек. У образцов цементного камня с *Bacillus subtilis* К наблюдали повышение прочности относительно образцов балочек цементного камня, затворенных средой Дика, на 26,5% к 28 суткам. При использовании бактерий *Lysinibacillus macroides* повышение прочности на 28 сутки составило 67,8%

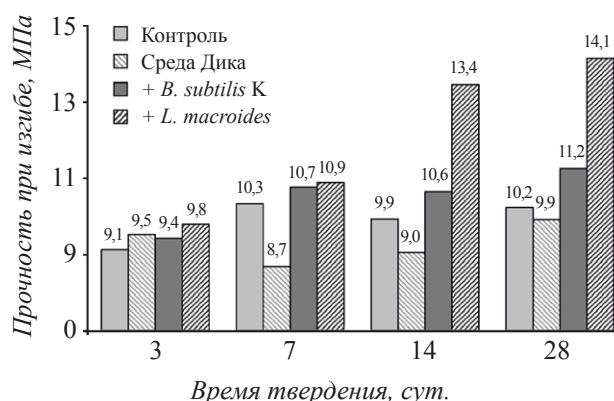
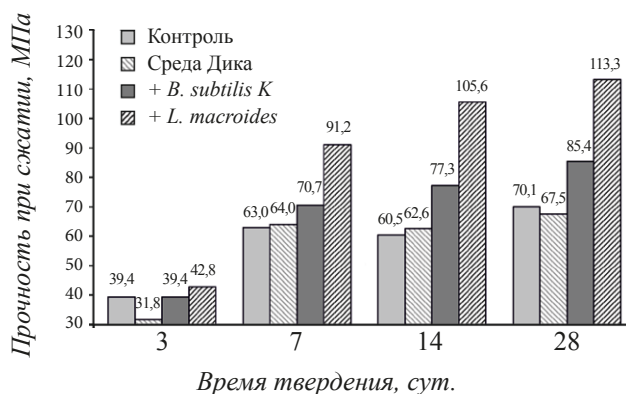


Рис. 1. Влияние уробактерий *Bacillus subtilis* К и *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при изгибе.

Fig. 1. The effect of the urobacteria, *Bacillus subtilis* K and *Lysinibacillus macroides*, on the flexural strength of a cement mortar.



**Рис. 2.** Влияние уробактерий *Bacillus subtilis* K и *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при сжатии.

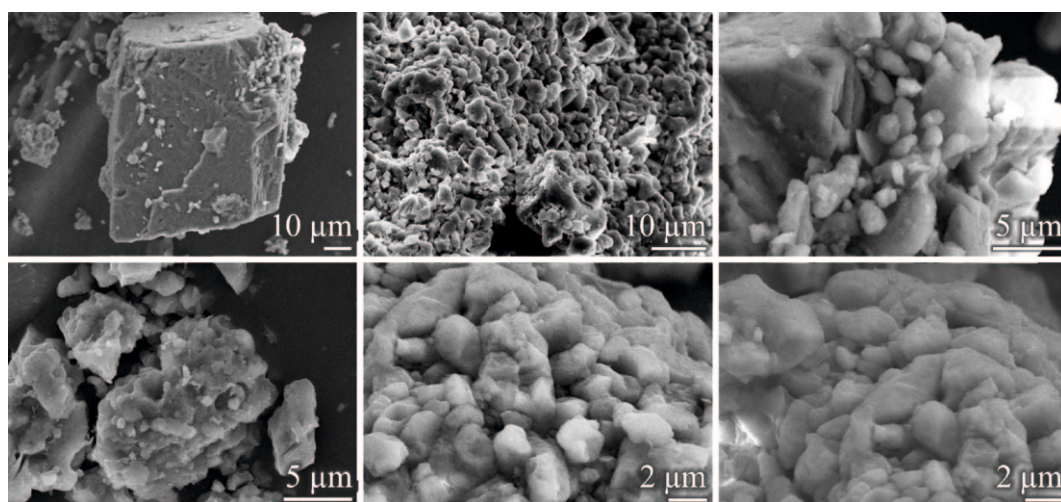
**Fig. 2.** The effect of the urobacteria, *Bacillus subtilis* K and *Lysinibacillus macroides*, on the compressive strength of a cement mortar.

относительно образцов, затворенных средой Дика. На основании этих результатов можно утверждать, что образовавшиеся в результате жизнедеятельности уробактерий кристаллы  $\text{CaCO}_3$  уплотняют структуру и значительно повышают прочность цемента. Возможно также образование кристаллов гидрокарбоалюминатов кальция при взаимодействии гидроалюминатов кальция с  $\text{CaCO}_3$ . Наибольшее повышение прочности происходит при использовании культур бактерий *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis* (функциональная активность аналогична), выделенных из гиперсоленых сред и обладающих повышенной устойчивостью к высоким значениям pH. Как отмечено в литературе, присутствие питательных веществ в цементных образцах обеспечивает защиту и повышенную жизнеспособность клеток и спор, подвергнутых воздействию характерных для цемента высоких значений pH.

### Исследование функциональной активности иммобилизованных клеток уробактерий и микроструктуры иммобилизованной формы на основе диатомита

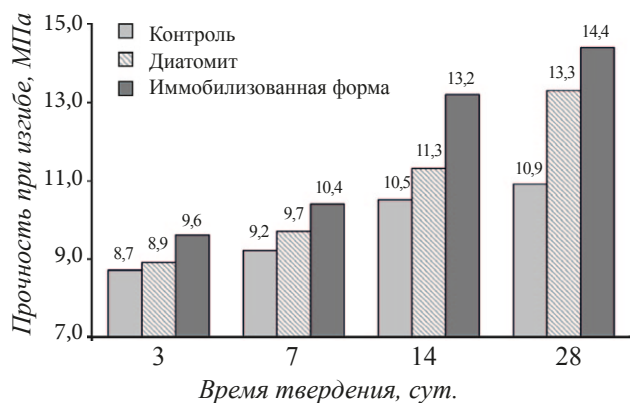
Одним из преимуществ иммобилизации является повышение устойчивости клеток и спор к действию неблагоприятных внешних факторов, таких как неоптимальная температура, pH, ингибирование продуктами метаболизма. Для препарата иммобилизованных клеток, вносимых в цементную смесь, важно, чтобы бактерии или споры оставались длительное время жизнеспособными и развивали с течением времени максимальную физиологическую активность. Для иммобилизации клеток исследуемых микроорганизмов использовали мелкодисперсную форму силикагеля, перлита, вермикулита, диатомита, трепела, целлюлозы, активированных углей. Максимальную степень сорбции клеток наблюдали для диатомита, трепела и активированных углей –  $(4-6) \cdot 10^7$  клеток/г. Иммобилизованные на сорбентах и высушенные при  $35-40^\circ\text{C}$  *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus licheniformis* после двух месяцев хранения при  $25-30^\circ\text{C}$  лучше других исследованных культур сохраняли функциональную активность. При исследовании жизнеспособных форм этих бактерий в адсорбентах при высевах на питательную среду выявлено нарастание колониеобразующих единиц (КОЕ) с  $(4-6) \cdot 10^7$  клеток/г после высушивания до  $(2-3) \cdot 10^9$  клеток/г через 2 месяца хранения. Это может быть связано как с остаточной влажностью высушенных образцов, так и с адсорбцией компонентов питательной среды на адсорбентах.

Микроструктура иммобилизованной формы бактерий *Lysinibacillus macroides* на диатомите исследована сканирующей электронной микроскопией



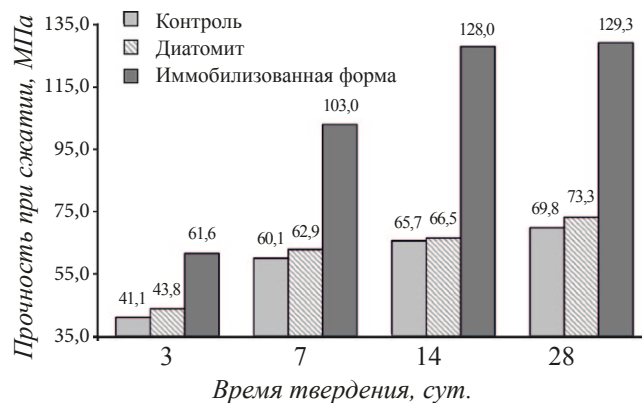
**Рис. 3.** Споры бактерий на поверхности частиц диатомита.

**Fig. 3.** Bacterial spores on the surface of diatomite particles.



**Рис. 4.** Влияние иммобилизованной формы *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при изгибе.

**Fig. 4.** The effect of the immobilized form of *Lysinibacillus macroides* on the flexural strength of a cement mortar.



**Рис. 5.** Влияние иммобилизованной формы *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при сжатии.

**Fig. 5.** The effect of the immobilized form of *Lysinibacillus macroides* on the compressive strength of a cement mortar.

после двух месяцев хранения. Эта иммобилизованная форма проявляла максимальную функциональную активность в предварительных экспериментах по биокальцинированию на колбах, что согласуется и с литературными данными [23]. На микрофотографиях иммобилизованной формы видны частицы диатомита с плотным слоем покрытых оболочкой спор бактерий размером 1–3 мкм (рис. 3).

При исследовании частиц диатомита с микробиологической добавкой методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) зарегистрирован ряд интенсивных пиков, соответствующих элементам Ca, O, K, Al, Si, Mg и C, что может указывать на наличие органических объектов, вероятно покрытых слоем карбоната кальция.

Таким образом, адсорбция бактерий *Lysinibacillus macroides* на минеральном носителе, диатомите, с последующей сушкой при умеренных температурах позволяет получить иммобилизованную, содержащую споры форму. Частичное покрытие спор оболочкой дополнительно предохраняет их от воздействия окружающей среды, что важно для сохранности препарата.

В последующих экспериментах использованы иммобилизованные на диатомите высушенные бактериальные образцы, добавленные непосредственно в цементную смесь на основе среды Дика

с глюкозой. Иммобилизованную форму вводили в состав цемента в виде сухого порошка в количестве 3% (по массе). В качестве затворителя при приготовлении цементного раствора использовалась среда Дика с глюкозой при значении В/Ц 0,3. Для сравнения формовали образцы цемента с добавлением исходного адсорбента, диатомита, в том же количестве. Результаты определения прочностных характеристик цемента представлены на рис. 4 и 5.

При исследовании прочности на изгиб (рис. 4) наблюдали незначительное повышение прочности цемента с иммобилизованными в диатомите бактериями *Lysinibacillus macroides*, что связано, вероятно, с заполнением части пор цементного камня образующимся в результате биоминерализации карбонатом кальция.

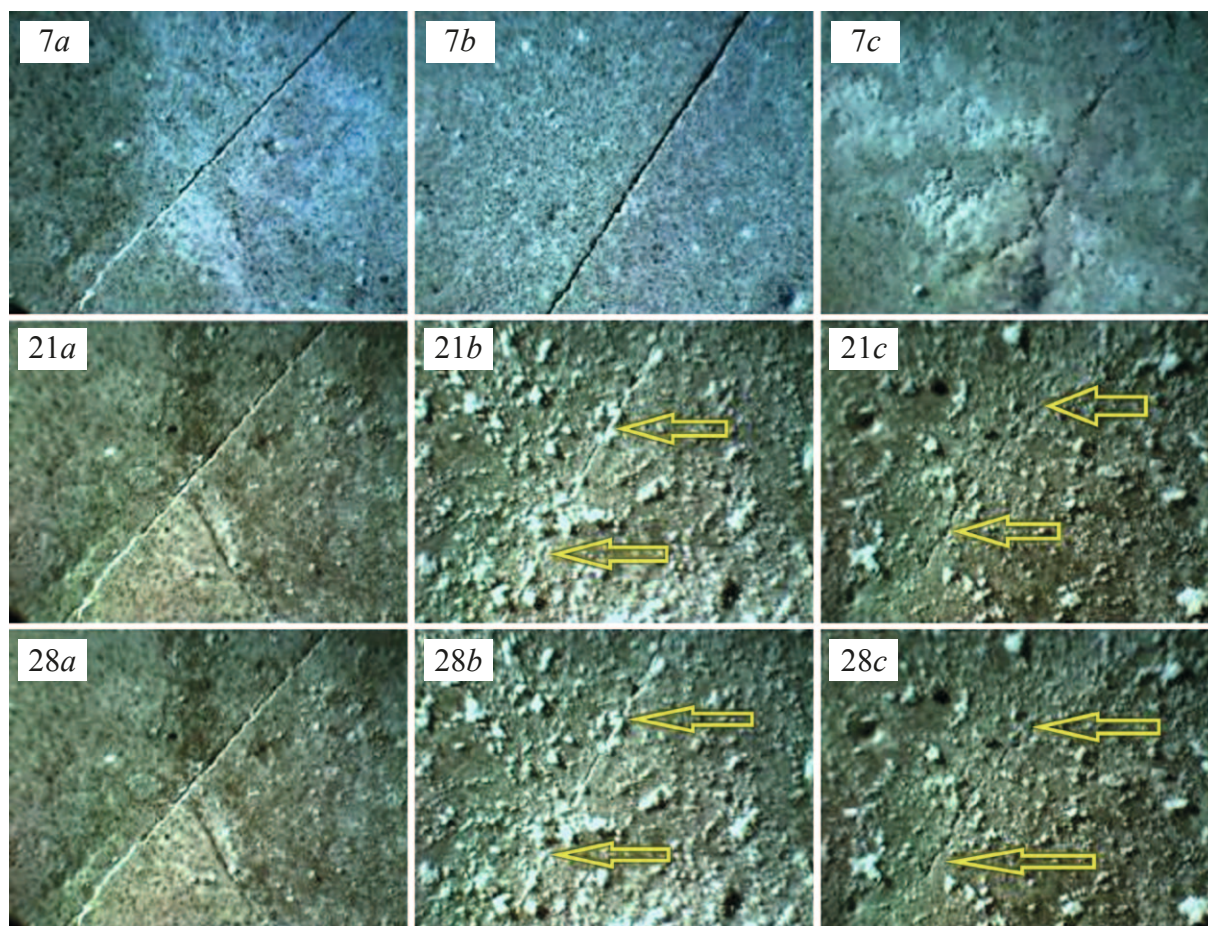
При исследовании прочности цементного камня на сжатие (рис. 5) к 28 суткам наблюдали повышение прочности образцов с иммобилизованной формой культуры *Lysinibacillus macroides* на 85,2% по сравнению с контрольными, в то же время применение диатомита на основе среды Дика без бактерий практически не оказывало влияния на процессы твердения.

При исследовании структурных характеристик цементного камня показано, что использование микробиологической добавки приводит

Таблица 1

**Характеристики образцов после твердения в течение 28 суток**  
**Characteristics of cement stone samples after hardening for 28 days**

Образец	Открытая пористость, см <sup>3</sup> /г	Коэффициент капиллярного водопоглощения, кг/м <sup>2</sup> · с <sup>0,5</sup>
Контроль (цемент + среда Дика)	0,158	0,0575
Цемент + среда Дика + диатомит	0,132	0,0473
Цемент + среда Дика + иммобилизованная форма	0,063	0,0355



**Рис. 6.** Заполнение трещин в цементном камне карбонатом кальция: *a* – контроль, *b* – вегетативные клетки, *c* – взвесь спор и остатки инактивированных клеток. Цифрами указано время процесса: 7, 21 и 28 сут.

**Fig. 6.** Filling cracks in the cement mortar with calcium carbonate: *a* – control, *b* – vegetative cells, *c* – spore suspension and inactivated cell residues. The numbers indicate the process time: 7, 21 and 28 days.

к осаждению  $\text{CaCO}_3$  в поровом пространстве образцов, уплотняя структуру и снижая пористость цемента, а также к 28 суткам уменьшает капиллярное водопоглощение цементного камня в 1,6 раза (табл. 1).

Таким образом, использование иммобилизованной культуры *Lysinibacillus macroides* в качестве добавки к цементу приводило к повышению его прочностных и улучшению структурных характеристик, как и при использовании культур живых бактерий. Применение иммобилизованной формы культуры позволит снизить скорость разрушения изделия в результате индуцированного бактериями «залечивания» микротрещин на начальном этапе возникновения, а также благодаря снижению числа открытых капиллярных пор повысить стойкость цементного камня к агрессивным средам.

Повышение прочности образцов цемента, сформированных в присутствии *Lysinibacillus macroides*, свидетельствует о сохранении жизнеспособности и функциональной активности бактерий. Наибольшая прочность на сжатие достиг-

нута для образцов с иммобилизованными в диатомите бактериальными клетками, причем сорбент здесь тоже играет важную роль – заполняя поры, дополнительно укрепляет цемент.

#### «Залечивание» трещин в бетоне

Эффективность использования уробактерий для залечивания трещин в бетоне анализировали путем погружения образцов цементного камня в питательную среду Дика с 7,5 г/л  $\text{CaCl}_2$  и суспензией вегетативных клеток и спор (с остатками инактивированных клеток) бактерий *Lysinibacillus macroides*. Состояние трещин контролировали через 7, 21 и 28 сут (рис. 6).

В среде с вегетативными клетками заметно заполнение трещин на 21 и 28 сутки образовавшимся карбонатом кальция, а также образование белого налета на поверхности образцов. Трещины в цементных образцах, погруженных в среду с суспензией спорулирующей культуры бактерий и спор, обладающих высокой проникающей способностью, визуально исчезли.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биотехнологический потенциал бактерий рода *Bacillus*, выделенных из гиперсоленых сред и обладающих способностью к биоосаждению кальция, может быть использован для получения биопрепаратов и применения в воспроизводимой природоподобной технологии индуцированного микроорганизмами осаждения кальция.

Введение выделенных бактерий в состав цементной смеси на основе питательной среды Дика приводит к существенному увеличению прочности цементного камня при изгибе и сжатии, особенно в поздние (14 и 28 сут) сроки твердения. Наибольшее повышение прочности наблюдали при использовании бактерий *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, которые проявляют высокую уреазную активность, устойчивы к щелочным средам и способны к биоосаждению кальция. Эти культуры могут быть использованы для эффективного залечивания трещин в поврежденных бетонных конструкциях.

Повышение прочности цементного камня под воздействием бактерий связано с уплотнением структуры цементного камня, уменьшением его капиллярной пористости вследствие образования дополнительных количеств карбоната кальция, образующегося в результате взаимодействия портландита,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , с продуктами жизнедеятельности бактерий.

Использование для приготовления цементной смеси на основе питательной среды Дика иммобилизованной формы спор бактерий в диатомите позволяет значительно повысить прочность цементного камня в процессе твердения. Иммобилизованная форма бактериального препарата высокотехнологична, удобна в использовании и обеспечивает его длительное хранение.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке РХТУ им. Д.И. Менделеева (проект № 033-2018).

## ЛИТЕРАТУРА

- Lowenstam H.A. Minerals formed by organisms. *Science*, 1981, 211(4487), 1126–1131. doi: 10.1126/science.7008198
- Hamilton W.A. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, 2003, 19(1), 65–76. doi: 10.1080/0892701021000041078
- Sharaky A.M., Mohamed N.S., Elmashad M.E., Shredah N.M. Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of sandy soil. *Constr. Build. Mater.*, 2018, 190, 861–869. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2018.09.159
- Wiktor V., Jonkers H.M. Bacteria-based concrete: from concept to market. *Smart. Mater. Struct.*, 2016, 25(8), 084006. doi: 10.1088/0964-1726/25/8/084006
- Zhao X., Wang M., Wang H., et al. Study on the remediation of Cd pollution by the biomineralization of urease-producing bacteria. *Int. J. Environ. Res.*, 2019, 16(2), 268. doi: 10.3390/ijerph16020268
- De Belie N., Wang J., Bundur Z.B., Paine K. Bacteria-based concrete. In: *Eco-efficient Repair and Rehabilitation of Concrete Infrastructures*. Eds Pacheco-Torgal F., Melchers R., de Belie N., Shi X., Van Tittelboom K., Saez Perez A. Woodhead Publishing, Duxford, UK, 2018, 531–567.
- Joshi S., Goyal S., Mukherjee A., Reddy M.S. Microbial healing of cracks in concrete: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 44(11), 1511–1525. doi: 10.1007/s10295-017-1978-0
- Castro M.J., Lopez C.E., Narayanasamy R., et al. Potential of enzymes (urease & carbonic anhydrase). *Chim. Oggi. Chem.*, 2016, 34(4), 56–59.
- Wang Z., Zhang N., Cai G., et al. Review of ground improvement using microbial induced carbonate precipitation (MICP). *Mar. Georesour. Geotechnol.*, 2017, 35(8), 1135–1146. doi: 10.1080/1064119X.2017.1297877
- Mazzei L., Cianci M., Benini S., et al. Kinetic and structural studies reveal a unique binding mode of sulfite to the nickel center in urease. *J. Inorg. Biochem.*, 2016, 154, 42–49. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.11.003
- Mondal S., Ghosh A.D. Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete. *Constr. Build. Mater.*, 2019, 225, 67–75. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2019.07.122
- De Muynck W., Cox K., De Belie N., Verstraete W. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Constr. Build. Mater.*, 2008, 22(5), 875–885. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2006.12.011
- Basheer P.A.M., Basheer L., Cleland D.J., Long A.E. Surface treatments for concrete: assessment methods and reported performance. *Constr. Build. Mater.*, 1997, 11(7–8), 413–429. doi: 10.1016/S0950-0618(97)00019-6
- Basheer L., Cleland D.J. Freeze–thaw resistance of concretes treated with pore liners. *Constr. Build. Mater.*, 2006, 20(10), 990–998. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2005.06.010
- Krishnapriya S., Babu D.V. Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. *Microbiol. Res.*, 2015, 174, 48–55. doi: 10.1016/j.micres.2015.03.009
- Garabito M.J., Márquez M.C., Ventosa A. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can. J. Microbiol.*, 1998, 44(2), 95–102. doi: 10.1139/w97-125
- Ventosa A., Márquez M.C., Garabito M.J., Arahal D.R. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles*, 1998, 2(3), 297–304. doi: 10.1007/s007920050072

18. Panosyan H., Hakobyan A., Birkeland N.K., Trchounian A. Bacilli community of saline-alkaline soils from the Ararat Plain (Armenia) assessed by molecular and culture-based methods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2018, 41(3), 232–240. doi: 10.1016/j.syapm.2017.12.002
19. Kushwaha B., Jadhav I., Verma H.N., et al. Betaine accumulation suppresses the de-novo synthesis of ectoine at a low osmotic concentration in *Halomonas* sp SBS 10, a bacterium with broad salinity tolerance. *Mol. Biol. Rep.*, 2019, 46(5), 4779–4786. doi: 10.1007/s11033-019-04924-2
20. Obeidat M. Isolation and characterization of extremely halotolerant *Bacillus* species from Dead Sea black mud and determination of their antimicrobial and hydrolytic activities. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 2017, 11(32), 1303–1314. doi: 10.5897/AJMR2017.8608
21. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 1991, 173(2), 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
22. Dick J., De Windt W., De Graef B., et al. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, 2006, 17(4) 357–367. doi: 10.1007/s10532-005-9006-x
23. Wang J.Y., De Belie N., Verstraete W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 39(4), 567–577. doi: 10.1007/s10295-011-1037-1

## A Preparation based on Bacteria Isolated from Hypersaline Environments to Improve the Functional and Protective Characteristics of Concrete

S.V. KALENOV<sup>1\*</sup>, N.B. GRADOVA<sup>1</sup>, S.P. SIVKOV<sup>1</sup>, E.V. AGALAKOVA<sup>1</sup>, A.A. BELOV<sup>1</sup>,  
N.A. SUYASOV<sup>1</sup>, N.S. KHOKHLACHEV<sup>2</sup>, and V.I. PANFILOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia

<sup>2</sup> Gazprom VNIIGAZ LLC, Moscow oblast, 142717 Russia

\*e-mail: wsezart@yandex.ru

Received February 28, 2020

Revised March 12, 2020

Accepted July 09, 2020

**Abstract**—Improving the strength and stability of cement-based structures in adverse environmental conditions with associated anthropogenic influences is possible through the development and implementation of nature-like and nature-friendly technologies. The ability of urobacteria to precipitate calcium carbonate can be useful in the manufacture of self-healing and reinforced concrete, in the crack healing and the restoration of concrete structures. Hypersaline environment is an ecological niche for search for microorganisms that are resistant to increased alkalinity, changing environmental conditions and stress. Screening of microorganisms allowed us to isolate the most active urobacteria, *Lysinibacillus macroides* and *Bacillus licheniformis*, from hypersaline lakes. The introduction of these microorganisms into the cement mixture significantly increased the strength of mortar specimens, reduced their porosity and capillary water absorption, which was associated with ongoing biocalcination. We studied the microstructure of spores of diatomite-immobilized bacteria and showed that this form provided long-term preservation of bacterial activity. A high activity of bacterial preparations in the healing of cement stone cracks was found.

**Key words:** biomineralization, biocementation, extreme halophiles, crack healing, cement mortar, microbial concrete, urea hydrolysis.

**Funding**—The work was supported by the D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (Project no. 033-2018).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-4-21-28