

УДК 640

ПОИСК НОВЫХ ПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ ОСАЖДАТЬ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ**Е.В. Журишкина, Д.А. Головкина, А.А. Кульминская**

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия

Курчатовский геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

Цементобетон – один из наиболее используемых материалов в строительстве. К сожалению, многие цементобетонные конструкции подвержены разрушительному влиянию климатических условий. В результате различных факторов окружающей среды происходит увеличение пористости материалов и образование трещин и, как следствие, старение бетонных конструкций [1, 2]. В современной строительной практике существует много способов для заполнения трещин, однако большинство традиционных систем основаны на использовании химических веществ. Они дороги и часто вредны для окружающей среды и здоровья людей [3, 4]. В течение последнего десятилетия в качестве альтернативной технологии разрабатываются микробиологические системы, способные осаждать карбонат кальция. Методы использования бактериальных систем более экологичны и обладают способностью к самопроизвольному запуску [5, 6].

Несмотря на достигнутые успехи в данной области, по-прежнему существуют некоторые ограничения, которые затрудняют продвижение данного метода в большое производство. Одними из таких трудностей являются дороговизна метода и малый объем заживления трещин. На данный момент с помощью бактерий можно восстановить лишь первичные микротрещины на поверхности цементобетонных конструкций. Поэтому задача поиска эффективного штамма для увеличения площади заживления остается актуальной.

Цель работы – поиск новых продуктивных штаммов, способных осажждать карбонат кальция и заполнять микротрещины в цемента-песчаных образцах.

В работе был исследован 71 бактериальный штамм домашней коллекции лаборатории энзимологии ПИЯФ. Отбор штаммов проводился по следующей схеме. На первом этапе были выявлены бактерии, устойчивые к щелочным значениям pH, так как цементные конструкции – это очень агрессивная среда, значения pH которой может достигать 12,5. Для этого исследуемые бактерии высевали на среду LB с pH 9–10, культивировали в термостате при 37°C. В результате было отобрано 28 штаммов. Следующим этапом отбирали грамположительные бактерии, как потенциально образующие споры, а значит способные выживать в неблагоприятных условиях. Было выявлено 9 грамположительных штаммов.

Следующим необходимым требованием к бактериям было наличие у них уреазной активности. Уреазную активность детектировали визуально при помощи агаризованной среды Кристенсена [7] при 37 °C в течение 24 часов. Положительный результат оценивали по появлению розового окрашивания среды. Качественный тест оказался положительным для всех штаммов. Количественно уреазную активность определяли по оценке электропроводности водной среды [8]. Для этого отобранные бактерии культивировали в жидкой среде В4-М в течение 14 дней при 37 °C при встряхивании (100 об/мин), ежедневно отбирая аликвоты для анализа pH и уреазной активности. Отобранный образец охлаждали до 25 °C и измеряли проводимость с использованием кондуктометра Gravity: Analog Electrical Conductivity Sensor/Meter (K = 10). Образование ионных частиц неионных субстратов приводила к увеличению общей проводимости раствора, а скорость, с которой проводимость увеличивалась, была пропорциональна концентрации активной уреазы, присутствующей в реакционной смеси. Проводимость среды со штаммом *E. coli* DH5α была взята в качестве отрицательного контроля. Было выявлено, что значение pH изменялось от 5 до 7 – 8,5 в течение первых двух дней для всех культур, затем оставалось постоянным до конца эксперимента. Большинство штаммов показали максимальную уреазную активность в первый день культивирования, активность штаммов *Bacillus subtilis* K51 и *B. cereus* 168 достигла максимума только на вторые сутки.

Для проверки способности микроорганизмов осажждать карбонат кальция, каждый из них выращивали в среде СС в течение суток при 37 °C. Затем осаждали бактерии центрифугированием. Осадок суспендировали и вносили в 100 мл жидкой среды В4-М [9], затем культивировали в течение 14 дней при 37 °C на шейкере. Полученные кристаллы карбоната кальция фильтровали путем осаждения и сушили в термостате при 37 °C (Рисунок 1).

По итогам оценки высушенных осадков, образованных бактериями, лучшими показали себя *B. licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* 4a, *B. cereus* 4b, *Micrococcus luteus* 6, у которых количество осадка составляло 201, 235, 218 и 208 мг, соответственно. Показатели остальных штаммов *B. subtilis* K51, *B. subtilis* 170, *B. cereus* 168, *M. luteus* BS52, *B. cereus* BSP были ниже.

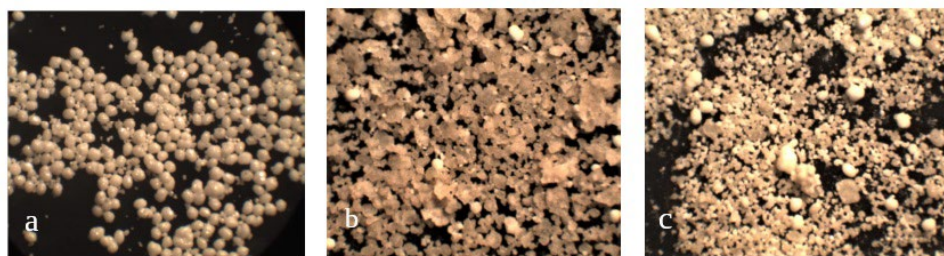


Рисунок 1 – Кристаллы, образованные бактериями в течении 14 дней культивирования (фото сделано на стереомикроскопе МИКРОМЕД МС-1 при 40х увеличении) : а – *B. licheniformis*; б – *B. cereus* 4b; в – *B. cereus* 168

Качественный анализ полученных осадков был осуществлен в лабораториях НИЦ «Курчатовский Институт» – ПИЯФ и ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Полученные образцы анализировали методом порошковой рентгеновской дифракции с использованием метода Ритвельда. Некоторые образцы были однофазными (*B. licheniformis*, *B. cereus* BSP, *B. subtilis* K51), но большинство представляли собой смесь кальцита и фатерита в различных сочетаниях.

Самым важным моментом в оценке бактериальных штаммов была проверка их способности заполнять трещины. Для этого в лаборатории были изготовлены образцы из цемента марки М300. После затвердения на них были созданы микротрещины. Бактерии растили в среде СС в течении суток, затем вносили в модифицированную среду В4-М с добавлением 0,3 % ксантана для увеличения вязкости среды. Бактериальные суспензии наносили на поверхность образцов и помещали в термостат на 37 °С. Заживление поверхности образцов наблюдали в течение месяца, периодически добавляя питательную среду. Контрольным был образец без добавления бактерий. По окончании эксперимента образцы высушили и визуально проанализировали на стереомикроскопе МИКРОМЕД МС-1 (Рисунок 2). Бактериальные штаммы *B. licheniformis*, *B. cereus* 4b, *S. epidermidis* 4a, *M. luteus* BS52, *M. luteus* 6 показали хороший результат, произошло полное заполнение трещин, у штаммов *B. cereus* BSP и *B. cereus* 168 полного заполнения не наблюдалось.

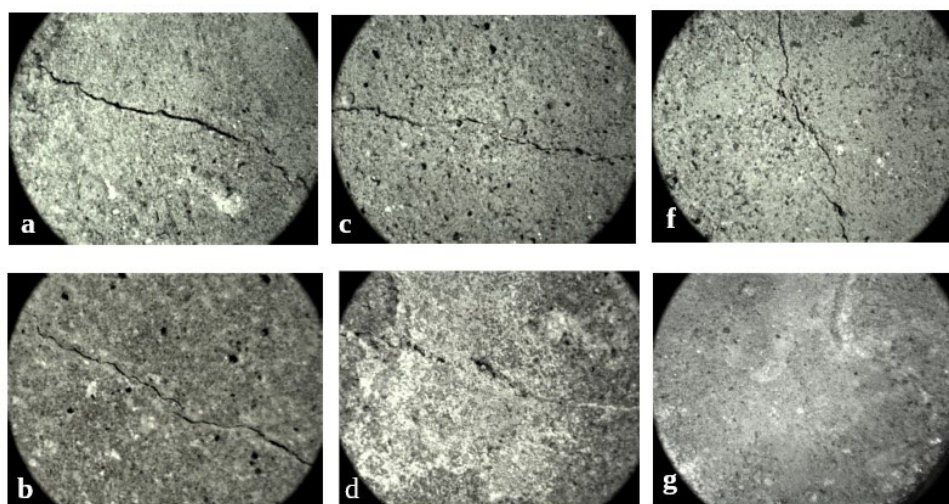


Рисунок 2 – Фотографии заполнения микротрещин на выборке цемент-песчаных образцов. Верхний ряд – исходные трещины, нижний – после месяца культивирования с бактериями: а-б – контроль без бактерий; в-д – *B. cereus* 168; ф-г – *B. licheniformis*.

Для дальнейшего изучения процесса кристаллообразования карбоната кальция был отобран штамм *B. licheniformis*, так как по нашим данным он оказался способным образовывать самый стабильный полиморф (кальцит) в достаточных количествах, а также эффективно заполнять микротрещины в цемент-песчаных образцах.

Следует отметить, что биогенные процессы кристаллообразования довольно сложны и протекают в зависимости от различных факторов, включая состав питательной среды, тип бактерий, процесс аэрации. По результатам нашего исследования видно, что у каждого из отобранных штаммов кристаллообразование идет разными способами и приводит к различному выходу осадков и их морфологии при разных условиях. Эти результаты могут привести к разработке методов, необходимых для эффективного управления технологией самовосстановления цементных конструкций.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Muynck, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review / W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete // *Ecol Eng.* – 2010 – № 36. – P. 118–36.
2. Dhami, N.K. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritage / N.K. Dhami, M.S. Reddy, A. Mukherjee // *Frontiers Microbiol.* – 2014 – № 5. – P. 304
3. Ivanov, V. Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. / V. Ivanov, V. Stabnikov, O. Stabnikova, S. Kawasaki // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 2019 – № 35(2). – P. 26
4. Okafor, N. Environmental microbiology of aquatic and waste systems / N. Okafor. – N. : Springer, 2011 – 307 p.
5. Hammes, F. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation / F. Hammes, W. Verstraete // *Rev Environ Sci Biotechnol.* – 2002 – № 1. – P. 3–7.
6. Stocks-Fischer, S. Microbiological precipitation of CaCO₃ / S. Stocks-Fischer, J.K. Galinat, S.S. Bang // *Soil Biol Biochem.* – 1999 – № 31. – P. 1563–1571
7. Курманбаев А.А. Выделение уреолитических бактерий, перспективных для микробиологического осаждения кальцита / А.А. Курманбаев, Г.Ж. Нагметова, Л.Ж. Бижанова, А.Я. Ягофарова, Б.М. Шурабаев // *актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук* – 2017 – № 4(1). – С. 53–57.
8. Whiffin, V.S. Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement : Dissertation / V.S. Whiffin; Murdoch University. – Australia, 2004 – 154 p.
9. Seifan, M. Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species / M. Seifan, A.K. Samani, A. Berenjian // *Appl Microbiol Biotechnol* – 2016 – № 100. – P. 9895–9906