

## ВЫДЕЛЕНИЕ БИОКАЛЬЦИНИРУЮЩИХ УРЕОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЗАЛЕЧИВАНИИ БЕТОНА

Б.Т. Жанатаев<sup>1</sup>, З.Б. Тұнғышбаева<sup>1</sup>, М.Е. Дәулетқұл<sup>1</sup>,  
1 Казахский национальный педагогический университет имени Абая  
Алматы, Казахстан  
\*e-mail: bauka2923@gmail.com

### Аннотация

Микробно-индуцированное осаждение карбоната кальция (МИСР) широко используется в гражданском строительстве, а также в экологической и геотехнической областях. Уреолитическая активность является одним из наиболее перспективных бактериальных механизмов с точки зрения индукции образования карбоната кальция. В этом исследовании четыре бактериальных изолята с высокой способностью продуцировать уреазу были получены в результате двухэтапного скрининга с использованием высокобуферной среды мочевины. Самая высокая уреазная активность и образование карбоната кальция наблюдалась у *Sporosarcina pasteurii* 5.1 с  $4,40 \times 10^3$  ед./л уреазы и 24,15 мг/мл карбоната кальция, за ней следовал *Bacillus cereus* 4.3 с  $3,93 \times 10^3$  ед./л уреазы и 22,85 мг/мл карбоната кальция.

Микроструктуру осажденного кристаллического карбоната кальция наблюдали с помощью сканирующей электронной микроскопа SEM. Рентгеноструктурный анализ подтвердил, что основной полиморфной модификацией частиц карбоната кальция, полученных из обоих изолятов, является кальцит. Исследование заполнения трещин материала в образцах раствора показало, что по краям трещины и внутри через 10 суток образовались слои кальцита, которые постепенно заполнили трещины до верхней поверхности. Эти результаты показали, что эти два изолята обладают надежными характеристиками потенциальных бактерий, индуцирующих МИСР, для применения в гражданском строительстве и инженерии материалов.

**Ключевые слова:** уреолитические бактерии, кальцит, МИСР, уреазы

### 1. Введение

Микробно-индуцированное осаждение карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) (МИСР) представляет собой процесс биоминерализации, который естественным образом происходит в окружающей среде, при этом  $\text{CaCO}_3$  образуется в результате микробной метаболической активности. МИСР может осуществляться посредством различных механизмов микроорганизмов, таких как гидролиз мочевины, фотосинтез, восстановление сульфатов, восстановление нитратов или другие биохимические действия микроорганизмов, которые увеличивают состояние насыщения карбоната кальция [1, 2, 3, 4]. Биологический процесс имеет преимущества перед химическим методом с экономической и экологической точки зрения. Текущие тенденции в технологии МИСР сосредоточены на улучшении грунтов, герметизации трещин, самовосстанавливаемом бетоне и удалении тяжелых металлов из воды. Бактерии, используемые в этом процессе, чаще всего встречаются в суровых условиях; в основном из-за высокой щелочности, дефицита питательных веществ и высокой силы сдвига. Высокая жизнеспособность и ферментативная активность бактерий являются важными факторами успеха процесса МИСР [1, 5, 6, 7]. В некоторых применениях, таких как

самовосстанавливающийся бетон, когда бактерии включаются в бетон во время процесса смешивания и заливки, использование спор устойчивых к щелочам бактерий более выгодно, чем использование вегетативных клеток, поскольку они могут противостоять суровым условиям окружающей среды [ 8 , 9 ]. Уреолитические бактерии, продуцирующие уреазу, являются одними из наиболее широко изученных микроорганизмов, индуцирующих МІСР. Фермент уреазы гидролизует мочевины с образованием аммиака и угольной кислоты. Аммиак уравнивается в воде с образованием ионов аммония и гидроксида. Ионы гидроксида приводят к увеличению рН, что смещает равновесие угольной кислоты, что приводит к образованию карбоната. Между тем, анионные клеточные компоненты бактерий, такие как внеклеточные полимерные вещества и клеточные стенки, обеспечивают центры зародышеобразования, которые привлекают окружающие ионы металлов, такие как ион  $\text{Ca}^{2+}$ , для связывания с ионами карбоната и осаждения в виде  $\text{CaCO}_3$  [ 5 , 7 , 10 , 11 , 12 , 13 ]. Применение МІСР в реальных условиях может быть достигнуто посредством биостимуляции [ 14 , 15 ] и биоаугментации с использованием местных бактерий (штаммы, полученные из нативного происхождения) [ 16 , 17 , 18 ] или экзогенных бактерий (неместные бактериальные штаммы). [ 9 , 15 , 19 , 20 , 21 , 22 ]. Эффективность лечения МІСР на месте в основном зависит от бактериального метаболизма и взаимодействия уреолитических бактерий, аборигенных микроорганизмов и абиотических факторов окружающей среды. Следовательно, выбор подходящих штаммов, индуцирующих МІСР, является одним из ключевых процессов практической реализации метода МІСР. Большинство исследований МІСР на основе уреолитиков было сосредоточено на штаммах *Sporosarcina Pasteurii* из-за их высокой уреолитической способности [ 5 , 15 , 19 , 20 , 21 , 22 , 23 ]. Поэтому важно изолировать и исследовать другие потенциальные бактерии, продуцирующие уреазу, такие как *Bacillus* [ 2 , 4 , 23 ], *Lysinibacillus* [ 9 , 17 , 24 , 25 ], *Pararhodobacter* [ 16 ] и *Psychrobacillus* [ 18 ], чтобы обеспечить биоресурсы, которые могут использоваться в различных климатических условиях и средах.

В последнее время применение МІСР в гражданском строительстве широко изучается, в том числе в странах Азии [ 9 , 19 , 26 ]. Однако чистая культура уреолитических бактерий, первоначально выделенная в Жамбылской области, до сих пор не получена и не охарактеризована. Целью данного исследования было выделение и скрининг высокопроизводительных бактерий, продуцирующих уреазу, со способностью осажать большие количества  $\text{CaCO}_3$ . Полученные кристаллы  $\text{CaCO}_3$  охарактеризованы. Исследована эффективность заполнения трещин в образцах строительного раствора и испытания на хранение бактериальных эндоспор. Кроме того, был также оценен прогноз срока годности коммерческого производства бактерий, индуцирующих МІСР. Насколько нам известно, это первый отчет о хранении бактерий, индуцирующих МІСР, с использованием ускоренного тестирования при хранении.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Место отбора проб и сбор проб

Всего в сентябре 2023 г. было отобрано семь проб почвы. Образцы были собраны с участка Жамбылской области село Кокарык на скотном дворе. С каждого места отбора проб отбирали пробу почвы (около 500 г) с глубины 1–5 см и доставляли в лабораторию в ледяном ящике. Затем их хранили при температуре 4 °С до использования для выделения бактерий.

### 2.2. Выделение и скрининг высокопродуктивных бактерий-продуцентов уреазы

Выделение уреолитических бактерий осуществляли с использованием планшетов для разбавления и методов прямых штрихов. Для посева с разбавлением один грамм образца почвы суспендировали и разбавляли до  $10^{-1}$ – $10^{-5}$  <sup>0,85</sup> % физиологическим раствором, затем 0,1 мл каждого разведения наносили в двух экземплярах на поверхность мочевинового агара Кристенсена (1 г/л пептона) · 5 г/л NaCl, 1,2 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,8 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 г/л глюкозы,

20 г/л мочевины, 0,012 г/л фенолового красного, 15 г/л агара, рН 6,8–7,0). Почвенную суспензию с разбавлением  $10^{-1}$  наносили штрихами непосредственно на три чашки агара Кристенсена с мочевиной. Планшеты инкубировали при комнатной температуре ( $28 \pm 2$  °С) в течение 24–48 часов. Отдельные колонии, имеющие яркий цвет фуксии вокруг колоний, который указывает на уреазную активность, отбирали и очищали на питательном агаре (3 г/л говяжьего экстракта, 5 г/л пептона, 15 г/л агара, рН 6,8–7,0). Скрининг высокопродуктивных бактерий-продуцентов уреазы проводили на мочевиновой среде с высокой буферной емкостью. Ночную культуру выбранных изолятов на питательном агаре суспендировали в 0,85% физиологическом растворе до мутности 4,0 по стандарту МакФарланда и использовали в качестве инокулята. Сто пятьдесят микролитров бактериальной суспензии добавляли к 5 мл мочевинового бульона Стюарта (0,1 г/л дрожжевого экстракта, 9,1 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,5 г/л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 г/л мочевины, 0,012 г/л фенолового красного, рН 6,8–7,0), инкубировали на вращающейся шейкере при 150 об/мин при комнатной температуре в течение 48 часов. В качестве отрицательного контроля использовали *Escherichia coli*. Изменение цвета фенолового красного наблюдалось через 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 и 48 часов.

### 2.3. Бактериальная идентификация

Ген 16S рРНК выбранных уреолитических бактерий амплифицировали из геномной ДНК с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F (5'-\_ТТААГАСТТ ГСТСТТАТГА АГТТАГСГГ-3') и 1492R (5' ТАСГГЯТАССТТГТТАСГАСТТ-3'). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием термоциклера Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США) при следующих условиях циклирования: 94 °С в течение 90 с, затем 25 циклов по 94 °С в течение 90 с, 30 с, 55 °С в течение 30 с и 72 °С в течение 1 мин, а затем последний этап удлинения при 72 °С в течение 5 мин. Нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями типовых штаммов в базе данных EzBioCloud [27] для таксономической идентификации. Филогенетическое дерево было построено на основе данных об эволюционном расстоянии с использованием метода Neighbor-Joining [28] на основе модели максимального составного правдоподобия [29] программного обеспечения MEGA11 [30]. Достоверность филогенетического дерева оценивалась на основе бутстреп-анализа (1000 повторов) [31]. Последовательности гена 16S рРНК изолятов 2.2, 3.7, 4.3 и 5.1 были представлены в базе данных GenBank под номером доступа LC741214.1 соответственно.

### 2.4. Определение бактериального роста и анализ уреазы

Посевные культуры выращивали на питательном агаре или триптическом соевом агаре (TSA; Himedia, Индия) в течение 16–18 ч. Для приготовления инокулята бактериальную культуру суспендировали в 0,85% физиологическом растворе до достижения мутности 0,5 стандарта МакФарланда (приблизительно  $\text{OD}_{600} = 0,1$ ). Рост бактерий исследовали в четырех средах, включая питательный бульон (NB), NB с добавлением 2% мочевины, триптический соевый бульон (TSB) и TSB с добавлением 2% мочевины. Общий объем 6,25 мл инокулята (5% об / об среды) переносили в колбы Эрленмейера емкостью 500 мл, содержащие 125 мл тестируемой среды. Культуры инкубировали на ротационном шейкере при 150 об/мин и 28°С в течение 48 часов. Культуральную жидкость собирали через 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 и 48 часов. Оптическую плотность клеток измеряли при 600 нм с помощью спектрофотометра (Shimadzu, Киото, Япония). Активность уреазы через 8, 12, 24 и 48 часов инкубации исследовали с использованием набора для анализа активности уреазы MAK120 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США).

## 2.5. Заполнение трещин материалом на образце строительного раствора

Исследование заполнения трещин материалом проводилось с использованием образцов раствора. Каждый образец раствора готовился в кубической форме размером  $2,5 \times 2,5 \times 2,5$  см<sup>3</sup> с вставленным пластиковым листом для создания имитации трещины (ширина 0,01–0,03 мм и глубина 0,5 мм). Под стереомикроскопом было подтверждено, что смоделированная трещина имеет соответствующий размер. Образцы раствора стерилизовали при 121,5 °С в течение 15 мин, сушили в сушильном шкафу при температуре 100 °С и хранили в отдельных стерилизованных коробках. Уреолитические бактерии, продуцирующие уреазу, *Sporosarcina pasteurii* 4.3, и уреолитические бактерии, не продуцирующие уреазу, *Bacillus cereus* 5.1, выращивали в TSB с 2% мочевины и инкубировали на роторном шейкере при 150 об/мин и комнатной температуре в течение 24 часов. Осадки клеток центрифугировали при 9000 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в свежем TSB с добавлением 2% мочевины. Плотность клеток доводили до достижения значения OD<sub>600</sub>, равного 0,5. Трещину заполняли 100 мкл клеточной суспензии и 8 мкл 5 М CaCl<sub>2</sub> (конечная концентрация 0,4 М CaCl<sub>2</sub>) каждые 12 ч в течение 30 дней, инкубируя при комнатной температуре. После процесса заполнения трещин материалом образцы строительного раствора сушили в печи с горячим воздухом при температуре 55 °С в течение 1 дня и напыляли золото. Кристаллизацию CaCO<sub>3</sub> наблюдали с помощью SEM, а минералогию определяли с помощью энергодисперсионного спектрометрического анализа.

## 2.6. Ускоренное тестирование хранения лиофилизированных бактериальных эндоспор

*Bacillus cereus* 5.1 и *L. Sporosarcina pasteurii* 4.3 выращивали в колбах 500 мл, содержащих 125 мл модифицированной споруляционной среды [33]: 1 г/л говяжьего экстракта, 5 г/л пептона, 2 г/л дрожжевого экстракта, 0,25 г./л MgSO<sub>4</sub>, 1 г/л, 0,15 мг/л FeSO<sub>4</sub>, 0,16 г/л Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 1,26 мг/л MnCl<sub>2</sub>. Культуру инкубировали на ротационной шейкере при 150 об/мин при комнатной температуре. до тех пор, пока бактериальные споры не присутствовали и не покрывали 90% полей микроскопа под световым микроскопом. Результаты споруляции проверяли по методу Шеффера-Фултона каждые 0, 3, 5, 7 и 15 дней. Для уничтожения вегетативных клеток культуральный бульон подвергали тепловому шоку при 80°C в течение 10 минут и сразу же охлаждали на ледяной бане в течение 5 минут. Осадки собирали центрифугированием при 9000 об/мин в течение 10 мин и смешивали с 10% обезжиренным молоком в равных количествах. Образцы были разделены на 500 мкл в пробирки эппендорфа и заморожены при -20 °С. Процесс сублимационной сушки осуществляли с использованием сублимационной сушилки. Лиофилизированные образцы хранили при температуре 8, 15, 37 и 55 °С. Наклон логарифмической зависимости жизнеспособности от времени использовался для получения удельной скорости разложения в день ( $k$ ) при каждой температуре в соответствии с уравнением (1) [34].

$$\text{Log } N = \log N_0 - kt$$

(1)

$N_0$  — исходное количество жизнеспособных клеток,  $N$  — количество жизнеспособных клеток в любой момент времени (оба представлены как КОЕ/мл), а  $t$  — время хранения в днях.

$$k \text{ знак равно } k_0 e^{(-E_a/RT)}$$

(2)

Уравнение Аррениуса, как показано в уравнении (2), можно использовать для оценки корреляции между температурой (Кельвин) и значениями  $k$ . Где  $k_0$  — предэкспоненциальная константа,  $E_a$  — энергия активации реакции в килоджоулях на моль,  $R$  — универсальная газовая постоянная (8,32 Дж/моль·К), а  $T$  — абсолютная температура в Кельвинах. Уравнение (2) использовалось для получения прогнозируемого срока годности путем расчета

прогнозируемых значений удельной выживаемости ( $k$  в день) при различных температурах хранения.

### 3. Результаты

#### 3.1. Бактериальная изоляция и идентификация

При первичном скрининге из семи проб почвы на мочевином агаре Кристенсена было получено десять изолятов уреолитических бактерий. Однако только четыре изолята, изолят 2.2, 3.7, 4.3 и 5.1, смогли изменить pH мочевиного бульона стюарта от исходного pH 7,0 до pH 9,82–10 в течение 72 часов и проявили высокоэффективную уреолитическую способность. Четыре изолята были грамположительными, имели форму длинных палочек, набухшие, образующие эндоспоры, были положительными по каталазе и оксидазе. Анализ гена 16S рРНК по сравнению с опубликованными последовательностями, доступными в базе данных EzTaxon, показал, что четыре изолята принадлежали к роду *S. pasteurii*. Порог сходства последовательностей 16S рРНК для порогового значения на уровне вида составил 98,7% [ 35 ].

#### 3.2. Осаждение и характеристика $\text{CaCO}_3$

В этом исследовании уреолитические бактерии выращивали с добавлением 2% мочевины в течение 48 часов, а затем осаждали  $\text{CaCl}_2$ , чтобы избежать ингибирования роста бактерий из-за чрезмерного количества ионов кальция [ 36 ]. Осадитель  $\text{CaCO}_3$  наблюдался сразу после добавления раствора  $\text{CaCl}_2$  в результате химической реакции. При добавлении 0,1 М  $\text{CaCl}_2$  осадитель  $\text{CaCO}_3$  в культурах с бактериальными клетками и без них имел массу 8,20–8,79 и 7,66–8,66 мг/мл соответственно. При этом в присутствии 0,4 М  $\text{CaCl}_2$  осадитель  $\text{CaCO}_3$  культур с бактериальными клетками и без них весил 19,34–24,15 и 18,52–22,85 мг/мл соответственно. После осаждения  $\text{CaCO}_3$  щелочное значение pH культурального бульона сразу снижалось с 9,25–9,33 до 8,13–8,31, т. е. близко к нейтральному. Результаты показали, что концентрация ионов кальция в окружающей среде сильно влияет на эффективность осаждения  $\text{CaCO}_3$  (рисунок 1). Без вмешательства ионов кальция в рост и метаболизм бактерий уреазы уреолитических бактерий представляла собой продуцируемую деградированную мочевину, и это создавало избыточное количество карбоната в культуральном бульоне.

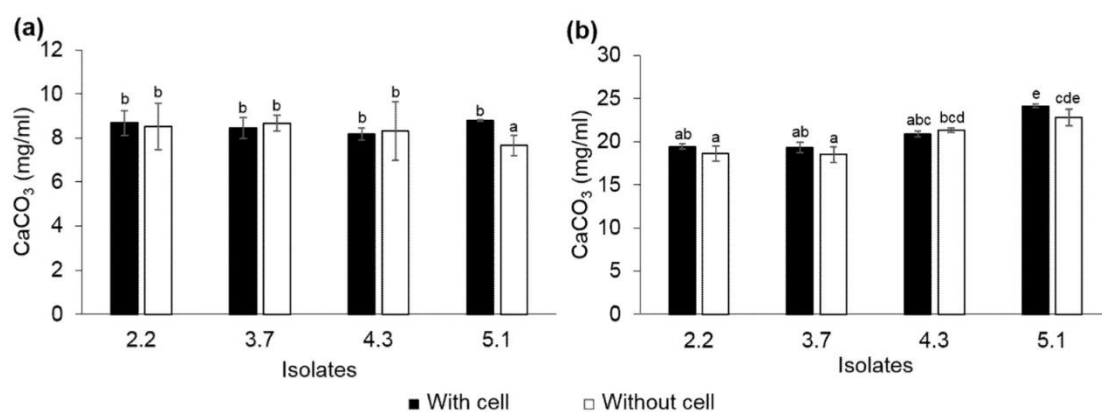


Рисунок 1 - Осаждение  $\text{CaCO}_3$  уреолитическими бактериями, выращенными в TSB с 2% мочевиной, инкубированными в течение 48 ч с добавлением 0,1 М ( а ) и 0,4 М ( б )  $\text{CaCl}_2$ .

#### 3.4. Заполнение трещин материала и кристаллизация

Исследование заполнения трещин материала проводили на образцах строительного раствора с имитированными трещинами шириной 0,01–0,03 мм с использованием *Bacillus cereus* 5.1 и *Sporosarcina pasteurii* 4.3. Через 10 дней по краям трещины и внутри трещины

отчетливо наблюдались кристаллические слои от белого до желтого цвета, которые постепенно заполнялись до верхней поверхности трещины. Микроструктуру образцов строительного раствора исследовали с помощью SEM, как показано на Рисунке-1. Бактериальные клетки наблюдались на поверхности кристаллических слоев внутри трещины при увеличении 1500×. Кристаллическая морфология *Bacillus cereus* 5.1 представляла собой кристаллы неправильной и сферической формы. Однако кристаллический слой *Sporosarcina pasteurii* 4.3 имел гладкую поверхность.

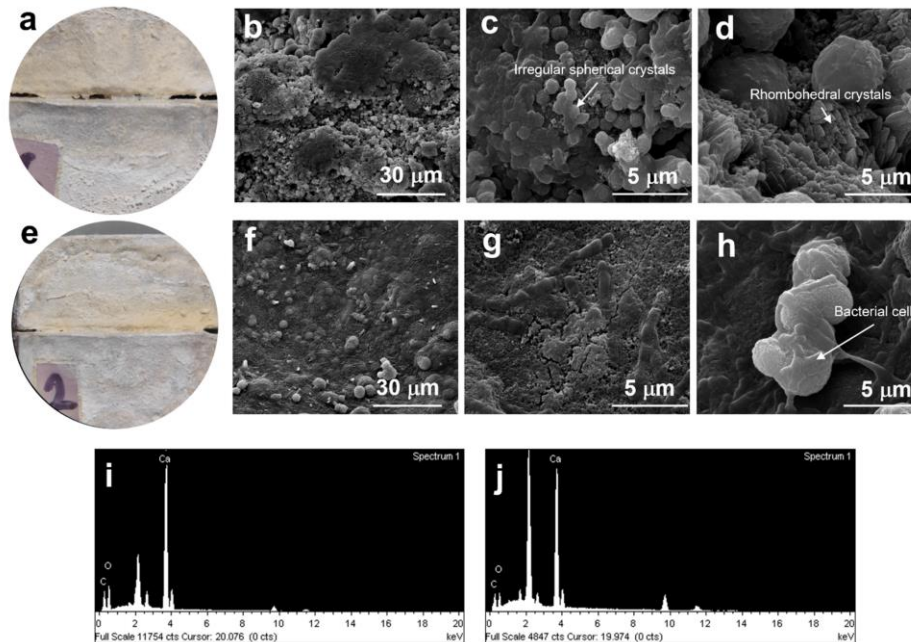


Рисунок 7. Микроскопические изображения заполненных трещин, SEM-изображения частиц  $\text{CaCO}_3$  в образцах раствора, индуцированных *Bacillus cereus* 5.1 (a – d, i) и *Sporosarcina pasteurii* 4.3 (e – h, j).

#### 4. Дискуссия

Целью данного исследования было выделение высокопродуктивных бактерий, продуцирующих уреазу, для применения МІСР. С помощью двухэтапного процесса скрининга с использованием мочевинового агара Кристенсена и мочевинового бульона Стюарта с высоким буфером из почвы мангровых лесов и супесей в Таиланде были получены четыре уреолитических изолята. Анализ 16S рРНК показал, что все изоляты принадлежали к роду *Sporosarcina pasteurii*, который входит в число хорошо известных бактерий, продуцирующих уреазу, и принадлежит к роду с высокой щелочностью. Его часто использовали в нескольких исследованиях активности уреолита МІСР [ 9 , 11 , 21 , 24 , 37 ]. Стоит отметить, что хотя *Sporosarcina pasteurii* 4.3 продемонстрировал большой потенциал с точки зрения возможностей МІСР в лабораторном эксперименте, его первоначальная среда обитания была связана с проблемой проседания грунта. Многие исследования показали, что многие бактерии, индуцирующие МІСР, естественным образом повсеместно распространены в почвах и способствуют осаждению  $\text{CaCO}_3$  посредством различных метаболических путей, таких как уреолитиз, аммонификация, денитрификация, окисление метана и восстановление сульфатов [ 11 , 25 , 26 , 38 , 39 ].

Однако в данном случае это могло произойти из-за того, что факторы окружающей среды на заводской площадке не подходили для процесса МІСР или из-за низкой популяции бактерий, индуцирующих МІСР, в среде обитания. Первое сообщение о МІСР-активности *Sporosarcina pasteurii* было опубликовано [ 17 ]. Штамм был локально выделен из

субарктического региона (Хоккайдо, Япония), его уреазы была сильно инактивирована при нагревании и не стабильна при 30 °С и выше. С другой стороны, *Sporosarcina pasteurii* 4.3, выделенный из субтропического региона, продемонстрировал высокую способность МІСР при температуре окружающей среды Казахстана.

В большинстве предыдущих исследований в лабораторных условиях наблюдалось осаждение  $\text{CaCO}_3$  при культивировании уреолитических бактерий на средах, содержащих 2% мочевины и ионов кальция [ 1 , 2 , 24 , 36 ]. Однако мы исследовали осаждение  $\text{CaCO}_3$  , разделив этот процесс на две стадии. Во-первых, уреолитические бактерии выращивали и производили уреазу в бульоне с мочевиной без ионов кальция, чтобы избежать неблагоприятного воздействия ионов кальция на рост бактерий и продукцию уреазы [ 36 ]. В ходе этого процесса ионы карбоната образовывались в результате гидролиза мочевины и накапливались в культуральной жидкости. Затем в культуральную среду наносили раствор  $\text{CaCl}_2$  для индуцирования осаждения  $\text{CaCO}_3$  . Сразу образовалось большое количество частиц  $\text{CaCO}_3$  , а щелочной рН (>9,0) культуральной жидкости снизился до прилб. 8.0. Рентгенограммы подтвердили, что полиморфная модификация  $\text{CaCO}_3$  представляет собой кальцит [ 38 ]. Следовательно, метод может быть пригоден для полевых применений, таких как биоцементация, которая требует образования больших количеств  $\text{CaCO}_3$  . Щелочной рН также мгновенно упал до нейтрального, что оказало меньшее влияние на окружающую среду с точки зрения рН. Тем не менее, оптимальные условия осаждения  $\text{CaCO}_3$  этих двух изолятов требуют дальнейшего изучения для улучшения процесса МІСР в полевых условиях.

Бактериальные клетки служат центрами зародышеобразования внеклеточного осаждения  $\text{CaCO}_3$  , что согласуется с предыдущими исследованиями. Факторы окружающей среды, такие как аэрация, температура, рН и специфические белки, могут влиять на кристаллическую морфологию и образование различных полиморфов  $\text{CaCO}_3$  [ 2 , 21 , 23 , 39 ].

Поэтому для заполнения трещин материала был выбран *Sporosarcina pasteurii* 4.3, который обладал как высокой уреазной активностью, так и образованием EPS, наряду с *Bacillus cereus* 5.1, изолятом с самым высоким уровнем продукции уреазы. При SEM-визуализации в трещинах образцов раствора отчетливо наблюдался гладкий кристаллический слой *Sporosarcina pasteurii*, образующий гладкую поверхность слоя кальцита. Кристаллическая структура была едва видна, что могло быть связано с образованием *Sporosarcina pasteurii* 4.3. Однако у *L. Bacillus cereus* 5.1 были обнаружены кристаллы неправильной сферической и ромбоэдрической формы. Есть несколько сообщений о различных полиморфах  $\text{CaCO}_3$  , арагоните, кальците и ватерите, продуцируемых МІСР-индуцирующими бактериями [ 2 , 23 ].

Для успешной разработки коммерческого продукта необходимо прогнозирование срока годности бактерий, индуцирующих МІСР. В этом аспекте спорообразующие бактерии имеют больше преимуществ, поскольку споры бактерий выживают дольше, чем вегетативные клетки, в неблагоприятных условиях [ 7 , 9 ]. В этом исследовании ускоренное тестирование хранения использовалось для прогнозирования сроков хранения жизнеспособности спор уреолитических бактерий при различных температурах хранения. Лучшей температурой хранения *Bacillus cereus* 5.1 и *Sporosarcina pasteurii* 4.3 была низкая температура (8 °С). Прогнозируемая жизнеспособность спор *Bacillus cereus* 5.1 после хранения при 8 °С в течение 30 и 60 дней составила  $1,59 \times 10^6$  и  $1,10 \times 10^6$  КОЕ/мл соответственно (сохраняется 73,27% и 50,69%). В случае *Sporosarcina pasteurii* 4.3 жизнеспособность спор оценивалась в  $4,83 \times 10^6$  и  $2,39 \times 10^6$  КОЕ/мл (осталось 39,27% и 19,43%) после хранения при 8 °С в течение 30 и 60 дней соответственно. Удельная скорость разложения в день ( $k$ ) при экспериментальной температуре у *Bacillus cereus* 5.1 была меньше, чем у *Sporosarcina pasteurii* 4.3, о чем

свидетельствует тот факт, что *Bacillus cereus* 5.1 имел более высокую жизнеспособность спор, чем *Sporosarcina pasteurii* 4.3.

Следовательно, выживание и жизнеспособность МІСР-индуцирующих бактерий, которые являются основной стратегией образования  $\text{CaCO}_3$ , являются решающими факторами для технологии самовосстановления [ 1, 7, 9, 13, 36 ]. Многие исследователи сообщают, что некоторые защитные носители, такие как диатомит [ 40 ], полиуретан, силикагель [ 41 ], микрокапсулы на основе гидрогеля [ 42 ] и альгинатные микрокапсулы [ 9, 24 ], способны повысить выживаемость бактерий. и процесс МІСР.

## 5. Выводы

В этом исследовании сообщается об уреолитических бактериях *Sporosarcina pasteurii*, *Bacillus cereus*, недавно выделенных из почвы Жамбылской области село Кокарык. Наибольшая продукция уреазы и образование  $\text{CaCO}_3$  наблюдались у *Bacillus cereus* 5.1, за ней следовал *Sporosarcina pasteurii* 4.3. Основной полиморфной модификацией  $\text{CaCO}_3$  обоих изолятов был кальцит. Заполнение трещин в образцах строительного раствора показало, что *Sporosarcina pasteurii* 4.3, изолят, производящий уреазу, образовывал гладкий слой кальцита, тогда как *Bacillus cereus* 5.1, который не был способен производить уреазу, выделял кристаллы кальцита неправильной сферической и ромбоэдрической формы. Эти два изолята обладают надежными характеристиками потенциальных уреолитических бактерий, подходящих для применения МІСР.

**Вклад авторов:** Жанатаев Б.Т. – определение дизайна исследования, выполнение экспериментальной части исследования, написание текста; Тунғышбаева З.Б. – редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; Дәулетқұл М.Е. – выполнение экспериментальной части исследования, написание текста.

## Список литературы

1. Chuo, S.C.; Mohamed, S.F.; Mohd Setapar, S.H.; Ahmad, A.; Jawaid, M.; Wani, W.A.; Yaqoob, A.A.; Mohamad Ibrahim, M.N. Insights into the current trends in the utilization of bacteria for microbially induced calcium carbonate precipitation. *Materials* 2020, 13, 4993.
2. Dhami, N.K.; Reddy, M.S.; Mukherjee, A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23, 707–714.
3. Van Mullem, T.; Gruyaert, E.; Caspeele, R.; De Belie, N. First large scale application with self-healing concrete in Belgium: Analysis of the laboratory control tests. *Materials* 2020, 13, 997.
4. Zheng, T.; Su, Y.; Zhang, X.; Zhou, H.; Qian, C. Effect and mechanism of encapsulation-based spores on self-healing concrete at different curing ages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 52415–52432.
5. Gorospe, C.M. Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2013, 18, 903–908.
6. Vijay, K.; Murmu, M.; Deo, S.V. Bacteria based self-healing concrete—A review. *Constr. Build. Mater.* 2017, 152, 1008–1014.
7. Wang, J.; Ersan, Y.C.; Boon, N.; De Belie, N. Application of microorganisms in concrete: A promising sustainable strategy to improve concrete durability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2993–3007.
8. Jiang, L.; Jia, G.; Wang, Y.; Li, Z. Optimization of sporulation and germination conditions of functional bacteria for concrete crack-healing and evaluation of their repair capacity. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020, 12, 10938–10948.



9. Pungrasmi, W.; Intarasoontron, J.; Jongvivatsakul, P.; Likitlersuang, S. Evaluation of microencapsulation techniques for MICP bacterial spores applied in self-healing concrete. *Sci. Rep.* 2019, 9, 12484.
10. Connolly, J.; Kaufman, M.; Rothman, A.; Gupta, R.; Redden, G.; Schuster, M.; Colwell, F.; Gerlach, R. Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation. *J. Microbiol. Methods* 2013, 94, 290–299.
11. Dhami, N.K.; Reddy, M.S.; Mukherjee, A. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 314.
12. Seifan, M.; Samani, A.K.; Berenjian, A. Bioconcrete: Next generation of self-healing concrete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2591–2602.
13. Zhang, J.L.; Wang, C.G.; Wang, Q.L.; Feng, J.L.; Pan, W.; Zheng, X.C.; Liu, B.; Han, N.X.; Xing, F.; Deng, X. A binary concrete crack self-healing system containing oxygen-releasing tablet and bacteria and its Ca(2+)-precipitation performance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 10295–10306.
14. Chittoori, B.C.S.; Rahman, T.; Burbank, M. Microbial-facilitated calcium carbonate precipitation as a shallow stabilization alternative for expansive soil treatment. *Geotechnics* 2021, 1, 558–572.
15. Gomez, M.G.; Graddy, C.M.R.; DeJong, J.T.; Nelson, D.C. Biogeochemical changes during bio-cementation mediated by stimulated and augmented ureolytic microorganisms. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11517.
16. Danjo, T.; Kawasaki, S. Microbially induced sand cementation method using *Pararhodobacter* sp. strain SO1, inspired by beachrock formation mechanism. *Mater. Trans.* 2016, 57, 428–437.
17. Gowthaman, S.; Iki, T.; Nakashima, K.; Ebina, K.; Kawasaki, S. Feasibility study for slope soil stabilization by microbial induced carbonate precipitation (MICP) using indigenous bacteria isolated from cold subarctic region. *Appl. Sci.* 2019, 1, 1480.
18. Gowthaman, S.; Mitsuyama, S.; Nakashima, K.; Komatsu, M.; Kawasaki, S. Biogeotechnical approach for slope soil stabilization using locally isolated bacteria and inexpensive low-grade chemicals: A feasibility study on Hokkaido expressway soil, Japan. *Soils Found.* 2019, 59, 484–499.
19. Arpajirakul, S.; Pungrasmi, W.; Likitlersuang, S. Efficiency of microbially-induced calcite precipitation in natural clays for ground improvement. *Constr. Build. Mater.* 2021, 282, 122722.
20. Omoregie, A.I.; Palombo, E.A.; Ong, D.E.L.; Nissom, P.M. Biocementation of sand by *Sporosarcina pasteurii* strain and technicalgrade cementation reagents through surface percolation treatment method. *Constr. Build. Mater.* 2019, 228, 116828.
21. Vashisht, R.; Attri, S.; Sharma, D.; Shukla, A.; Goel, G. Monitoring biocalcification potential of *Lysinibacillus* sp. isolated from alluvial soils for improved compressive strength of concrete. *Microbiol. Res.* 2018, 207, 226–231.
22. Son, H.M.; Kim, H.Y.; Park, S.M.; Lee, H.K. Ureolytic/non-ureolytic bacteria co-cultured self-healing agent for cementitious materials crack repair materials. *Materials* 2018, 11, 782. [CrossRef]
23. Kim, H.J.; Eom, H.J.; Park, C.; Jung, J.; Shin, B.; Kim, W.; Chung, N.; Choi, I.G.; Park, W. Calcium carbonate precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* strains isolated from concrete and analysis of the bacterial community of concrete. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 26, 540–548.
24. Wang, J.; Mignon, A.; Snoeck, D.; Wiktor, V.; Van Vlietgerghe, S.; Boon, N.; De Belie, N. Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: A promising strategy for crack self-healing. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1088.
25. Lee, Y.S.; Kim, H.J.; Park, W. Non-ureolytic calcium carbonate precipitation by *Lysinibacillus* sp. YS11 isolated from the rhizosphere of *Miscanthus sacchariflorus*. *J. Microbiol.* 2017, 55, 440–447.

26. Iamchaturapatr, J.; Piriyaikul, K.; Ketklin, T.; Di Emidio, G.; Petcherdchoo, A. Sandy soil improvement using MICP-based urease enzymatic acceleration method monitored by real-time system. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2021, 2021, 6905802.
27. Yoon, S.H.; Ha, S.M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, 67, 1613–1617.
28. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406–425.
29. Tamura, K.; Nei, M.; Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 11030–11035. [CrossRef]
30. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021, 38, 3022–3027.
31. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39, 783–791.
32. Fukano, T.; Gomi, M.; Osaki, Y.; Morikawa, M. Isolation and characterization of an early colonizing *Rhizobium* sp. R8 from a household toilet bowl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015, 79, 1207–1215.
33. Ahmed, I.; Yokota, A.; Yamazoe, A.; Fujiwara, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, 57, 1117–1125.
34. Desmons, S.; Krhouz, H.; Evrard, P.; Thonart, P. Improvement of lactic cell production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 70, 513–526.
35. Stackebrandt, E.; Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 2006, 33, 152–155.
36. Zhang, J.L.; Wu, R.S.; Li, Y.M.; Zhong, J.Y.; Deng, X.; Liu, B.; Han, N.X.; Xing, F. Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 6661–6670.
37. Moravej, S.; Habibagahi, G.; Nikooee, E.; Niazi, A. Stabilization of dispersive soils by means of biological calcite precipitation. *Geoderma* 2018, 315, 130–137.
38. Ševčík, R.; Šásek, P.; Viani, A. Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO<sub>3</sub> polymorphs: Vaterite, aragonite and calcite. *J. Mater. Sci.* 2017, 53, 4022–4033.
39. Siddique, R.; Chahal, N.K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Constr. Build. Mater.* 2011, 25, 3791–3801.
40. Wang, J.Y.; Belie, N.; Verstraete, W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 39, 567–577.
41. Wang, J.Y.; van Tittelboom, K.; de Belie, N.; Verstraete, W. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Constr. Build. Mater.* 2012, 26, 532–540.
42. Wang, J.Y.; Snoeck, D.; van Vlierberghe, S.; Verstraete, W.; de Belie, N. Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Constr. Build. Mater.* 2014, 68, 110–119.

## References

1. Chuo, S.C.; Mohamed, S.F.; Mohd Setapar, S.H.; Ahmad, A.; Jawaid, M.; Wani, W.A.; Yaqoob, A.A.; Mohamad Ibrahim, M.N. Insights into the current trends in the utilization of bacteria for microbially induced calcium carbonate precipitation. *Materials* 2020, 13, 4993.
2. Dhimi, N.K.; Reddy, M.S.; Mukherjee, A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23, 707–714.
3. Van Mullem, T.; Gruyaert, E.; Caspeele, R.; De Belie, N. First large scale application with self-healing concrete in Belgium: Analysis of the laboratory control tests. *Materials* 2020, 13, 997.
4. Zheng, T.; Su, Y.; Zhang, X.; Zhou, H.; Qian, C. Effect and mechanism of encapsulation-based spores on self-healing concrete at different curing ages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 52415–52432.
5. Gorospe, C.M. Effects of different calcium salts on calcium carbonate crystal formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2013, 18, 903–908.
6. Vijay, K.; Murmu, M.; Deo, S.V. Bacteria based self-healing concrete—A review. *Constr. Build. Mater.* 2017, 152, 1008–1014.
7. Wang, J.; Ersan, Y.C.; Boon, N.; De Belie, N. Application of microorganisms in concrete: A promising sustainable strategy to improve concrete durability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2993–3007.
8. Jiang, L.; Jia, G.; Wang, Y.; Li, Z. Optimization of sporulation and germination conditions of functional bacteria for concrete crack-healing and evaluation of their repair capacity. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020, 12, 10938–10948.
9. Pungrasmi, W.; Intarasoontron, J.; Jongvivatsakul, P.; Likitlersuang, S. Evaluation of microencapsulation techniques for MICP bacterial spores applied in self-healing concrete. *Sci. Rep.* 2019, 9, 12484.
10. Connolly, J.; Kaufman, M.; Rothman, A.; Gupta, R.; Redden, G.; Schuster, M.; Colwell, F.; Gerlach, R. Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation. *J. Microbiol. Methods* 2013, 94, 290–299.
11. Dhimi, N.K.; Reddy, M.S.; Mukherjee, A. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 314.
12. Seifan, M.; Samani, A.K.; Berenjian, A. Bioconcrete: Next generation of self-healing concrete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 2591–2602.
13. Zhang, J.L.; Wang, C.G.; Wang, Q.L.; Feng, J.L.; Pan, W.; Zheng, X.C.; Liu, B.; Han, N.X.; Xing, F.; Deng, X. A binary concrete crack self-healing system containing oxygen-releasing tablet and bacteria and its Ca(2+)-precipitation performance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 10295–10306.
14. Chittoori, B.C.S.; Rahman, T.; Burbank, M. Microbial-facilitated calcium carbonate precipitation as a shallow stabilization alternative for expansive soil treatment. *Geotechnics* 2021, 1, 558–572.
15. Gomez, M.G.; Graddy, C.M.R.; DeJong, J.T.; Nelson, D.C. Biogeochemical changes during bio-cementation mediated by stimulated and augmented ureolytic microorganisms. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11517.
16. Danjo, T.; Kawasaki, S. Microbially induced sand cementation method using *Pararhodobacter* sp. strain SO1, inspired by beachrock formation mechanism. *Mater. Trans.* 2016, 57, 428–437.
17. Gowthaman, S.; Iki, T.; Nakashima, K.; Ebina, K.; Kawasaki, S. Feasibility study for slope soil stabilization by microbial induced carbonate precipitation (MICP) using indigenous bacteria isolated from cold subarctic region. *Appl. Sci.* 2019, 1, 1480.
18. Gowthaman, S.; Mitsuyama, S.; Nakashima, K.; Komatsu, M.; Kawasaki, S. Biogeotechnical approach for slope soil stabilization using locally isolated bacteria and inexpensive low-grade chemicals: A feasibility study on Hokkaido expressway soil, Japan. *Soils Found.* 2019, 59, 484–499.

19. Arpajirakul, S.; Pungrasmi, W.; Likitlersuang, S. Efficiency of microbially-induced calcite precipitation in natural clays for ground improvement. *Constr. Build. Mater.* 2021, 282, 122722.
20. Omoregie, A.I.; Palombo, E.A.; Ong, D.E.L.; Nissom, P.M. Biocementation of sand by *Sporosarcina pasteurii* strain and technical grade cementation reagents through surface percolation treatment method. *Constr. Build. Mater.* 2019, 228, 116828.
21. Vashisht, R.; Attri, S.; Sharma, D.; Shukla, A.; Goel, G. Monitoring biocalcification potential of *Lysinibacillus* sp. isolated from alluvial soils for improved compressive strength of concrete. *Microbiol. Res.* 2018, 207, 226–231.
22. Son, H.M.; Kim, H.Y.; Park, S.M.; Lee, H.K. Ureolytic/non-ureolytic bacteria co-cultured self-healing agent for cementitious materials crack repair materials. *Materials* 2018, 11, 782. [CrossRef]
23. Kim, H.J.; Eom, H.J.; Park, C.; Jung, J.; Shin, B.; Kim, W.; Chung, N.; Choi, I.G.; Park, W. Calcium carbonate precipitation by *Bacillus* and *Sporosarcina* strains isolated from concrete and analysis of the bacterial community of concrete. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 26, 540–548.
24. Wang, J.; Mignon, A.; Snoeck, D.; Wiktor, V.; Van Vlierghe, S.; Boon, N.; De Belie, N. Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: A promising strategy for crack self-healing. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1088.
25. Lee, Y.S.; Kim, H.J.; Park, W. Non-ureolytic calcium carbonate precipitation by *Lysinibacillus* sp. YS11 isolated from the rhizosphere of *Miscanthus sacchariflorus*. *J. Microbiol.* 2017, 55, 440–447.
26. Iamchaturapatr, J.; Piriyaikul, K.; Ketklin, T.; Di Emidio, G.; Petcherdchoo, A. Sandy soil improvement using MICP-based urease enzymatic acceleration method monitored by real-time system. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2021, 2021, 6905802.
27. Yoon, S.H.; Ha, S.M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, 67, 1613–1617.
28. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406–425.
29. Tamura, K.; Nei, M.; Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 11030–11035. [CrossRef]
30. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021, 38, 3022–3027.
31. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39, 783–791.
32. Fukano, T.; Gomi, M.; Osaki, Y.; Morikawa, M. Isolation and characterization of an early colonizing *Rhizobium* sp. R8 from a household toilet bowl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015, 79, 1207–1215.
33. Ahmed, I.; Yokota, A.; Yamazoe, A.; Fujiwara, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007, 57, 1117–1125.
34. Desmons, S.; Krhouz, H.; Evrard, P.; Thonart, P. Improvement of lactic acid production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998, 70, 513–526.
35. Stackebrandt, E.; Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 2006, 33, 152–155.
36. Zhang, J.L.; Wu, R.S.; Li, Y.M.; Zhong, J.Y.; Deng, X.; Liu, B.; Han, N.X.; Xing, F. Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 6661–6670.

37. Moravej, S.; Habibagahi, G.; Nikooee, E.; Niazi, A. Stabilization of dispersive soils by means of biological calcite precipitation. *Geoderma* 2018, 315, 130–137.
38. Ševčík, R.; Šašek, P.; Viani, A. Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO<sub>3</sub> polymorphs: Vaterite, aragonite and calcite. *J. Mater. Sci.* 2017, 53, 4022–4033.
39. Siddique, R.; Chahal, N.K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Constr. Build. Mater.* 2011, 25, 3791–3801.
40. Wang, J.Y.; Belie, N.; Verstraete, W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 39, 567–577.
41. Wang, J.Y.; van Tittelboom, K.; de Belie, N.; Verstraete, W. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Constr. Build. Mater.* 2012, 26, 532–540.
42. Wang, J.Y.; Snoeck, D.; van Vlierberghe, S.; Verstraete, W.; de Belie, N. Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. *Constr. Build. Mater.* 2014, 68, 110–119.

## ТҮЙІНДЕМЕ

### БИОКАЛЬЦИНАЦИЯЛАУШЫ УРЕАЗА БЕЛСЕНДІ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ АНЫҚТАУ, БЕТОНДАҒЫ ЖАРЫҚТАРДЫ ҚАЙТА ҚАЛПЫНА КЕЛТІРУГЕ ҚОЛДАНУ

Б.Т. Жанатаев<sup>1</sup>, З.Б. Тұнғышбаева<sup>1</sup>, М.Е. Дәулетқұл<sup>1</sup>  
1 Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті

Алматы, Қазақстан

\*e-mail: bauka2923@gmail.com

Цемент бұл құрылыс материалы ғана емес қоғамдағы мәдени мұраларды сақтауды қамтамасыз ететін материал. Жыл сайын әлемде цемент бетонын пайдалана мыңдаған құрылымдар салынады (мәдени мұралар, тарихи ескерткіштер), бірақ уақыт өте келе жарамсыз және де адам мен жануарлар үшін қауіпті болып келеді. Бұл зерттеуде мочевианың жоғары буферлі ортасын қолдана отырып, екі сатылы скрининг нәтижесінде уреаз түзуге қабілеті жоғары төрт бактериялық изолят алынды. Кальций карбонатының ең жоғары уреаз белсенділігі мен түзілуі *Sporosarcina pasteurii* 5.1-де  $4,40 \times 10^3$  уреаз 24,15 мг/мл кальций карбонатында байқалды, содан кейін *Bacillus cereus* 4.3  $3,93 \times 10^3$  уреаз 22,85. мг / мл кальций карбонаты байқалды.

Бұл мақалада биоцементациялау әдісі арқылы құмнан жасалынған құрылыс материалы зерттелді. Қатқан құмның беріктігін анықтау үшін жауын суының эрозиясы арқылы сынақ жүргізілді. Сондай-ақ нығайтылған құмды SEM-BSE микроскопы арқылы зерттеліп, құмдағы кальций карбонаттарының биоцементілігі айқын көрініс берді. Ерітінді үлгілеріндегі материалдың жарықтарын толтыруды зерттеу жарықшақтың шеттерінде және ішінде 10 күннен кейін кальцит қабаттары пайда болғанын көрсетті, олар жарықтарды жоғарғы бетке дейін біртіндеп толтырды. Бұл нәтижелер бұл екі изоляттың Құрылыс және материалдық инженерияда қолдану үшін МІСР индукциялайтын әлеуетті бактериялардың сенімді сипаттамаларына ие екенін көрсетті.

**Түйін сөздер:** уреолитикалық бактериялар, кальцит, МІСР, уреаз

## SUMMARY

# ISOLATION OF BIOCALCIFYING UREOLYTIC BACTERIA, FOR USE IN CONCRETE HEALING

B.T. Zhanataev<sup>1</sup>, Z.B. Tungyshbaeva<sup>1</sup>, M.E. Dauletkul<sup>1</sup>  
1 Kazakh National Pedagogical University named after Abai  
Almaty, Kazakhstan

Microbially induced calcium carbonate deposition (MICP) is widely used in civil engineering, as well as in environmental and geotechnical fields. Ureolytic activity is one of the most promising bacterial mechanisms in terms of induction of calcium carbonate formation. In this study, four bacterial isolates with a high ability to produce urease were obtained as a result of two-stage screening using a high-buffer urea medium. The highest urease activity and formation of calcium carbonate was observed in *Sporosarcina pasteurii* 5.1 with  $4.40 \times 10^3$  units/l of urease and 24.15 mg/ml of calcium carbonate, followed by *Bacillus cereus* 4.3 with  $3.93 \times 10^3$  units/l of urease and 22.85 mg/ml of calcium carbonate.

The microstructure of the precipitated crystalline calcium carbonate was observed using a scanning electron microscope SEM. X-ray diffraction analysis confirmed that the main polymorphic modification of calcium carbonate particles obtained from both isolates is calcite. A study of the filling of cracks in the material in the solution samples showed that calcite layers formed along the edges of the crack and inside after 10 days, which gradually filled the cracks to the upper surface. These results showed that these two isolates have reliable characteristics of potential MICP-inducing bacteria for applications in civil engineering and materials engineering.

**Keywords:** ureolytic bacteria, calcite, MICP, urease

Авторлар туралы мәлімет:

Жанатаев Б.Т. – докторант, Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Қазыбек би 30, Алматы, Қазақстан. [bauka2923@gmail.com](mailto:bauka2923@gmail.com) ORCID 0000-0003-3550-1430

Тұңғышбаева З.Б. –биология ғылымдарының докторы, профессор, Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Қазыбек би 30, Алматы, Қазақстан. [alua2002@yandex.ru](mailto:alua2002@yandex.ru) ORCID - [0000-0003-4432-0658](https://orcid.org/0000-0003-4432-0658)

Даулетқұл М.Е. – докторант, Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Қазыбек би 30, Алматы, Қазақстан. [dauletkul\\_meirzhan@mail.ru](mailto:dauletkul_meirzhan@mail.ru) ORCID 0009-0009-4192-7068

Zhanatayev B.T. – PhD student, Abai Kazakh Kazakh National Pedagogical University, 30 Kazybek Bi Street, Almaty, Kazakhstan. [bauka2923@gmail.com](mailto:bauka2923@gmail.com) ORCID 0000-0003-3550-1430

Tungyshbayeva Z.B. – Doctor of Biological Sciences, Professor, Abai Kazakh National Pedagogical University, 30 Kazybek Bi str., Almaty, Kazakhstan. [alua2002@yandex.ru](mailto:alua2002@yandex.ru) ORCID 0009-0009-4192-7068

Dauletkul M. E.-doctoral student, Kazakh National Pedagogical University named after Abai, Kazybek bi 30, Almaty, Kazakhstan. [dauletkul\\_meirzhan@mail.ru](mailto:dauletkul_meirzhan@mail.ru) ORCID 0009-0009-4192-7068