

INCREASING THE ADSORPTION OF BACTERIAL CELLS TO THE SAND GRAINS FOR ENABLING THE INTENSIFICATION OF BIOCEMENTATION

V. Stabnikov

National University of Food Technologies

Key words: <i>Urease-producing bacteria</i> <i>Biocementation</i> <i>Adsorption of cells</i> <i>Metal cations</i>	ABSTRACT The biotechnology of biocement production for its use in construction industry and geotechnics is being developed as an alternative for conventional cement. The basis for biocementation is microbially induced calcium carbonate precipitation, which consists of two major steps: adsorption of cells of urease-producing bacteria on the surface of sand particles and enzymatic hydrolysis of urea in the presence of calcium ions that is accompanied by the formation of calcium carbonate crystals. The conducted research shows that the treatment of sand with calcium, aluminum or ferric cations increases the adsorption of bacterial cells to the sand particles from 29 to 37 % in comparison with non-treated sand and allows a 3-fold decrease in time needed for 100 % cells adsorption.
Article history: Received 05.11.2015 Received in revised form 20.11.2015 Accepted 16.12.2015	
Corresponding author: V. Stabnikov E-mail: npnft@ukr.net	

МЕТОД ПІДВИЩЕННЯ АДСОРБЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ДО ЗЕРЕН ПІСКУ З МЕТОЮ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ ПРОЦЕСУ БІОЦЕМЕНТАЦІЇ

В.П. Стабніков

Національний університет харчових технологій

Біотехнологія виробництва біоцементу для використання в будівництві та геотехніці розробляється як альтернатива традиційному цементу. Основою біоцементациї є мікробно-ініційоване осаження карбонату кальцію, яке складається з двох головних стадій: адсорбції клітин уреазо-продукуючих бактерій на частинках піску й ензиматичного гідролізу сечовини за наявності іонів кальцію, який супроводжується утворенням кристалів карбонату кальцію. В статті показано, що обробка піску катіонами кальцію, алюмінію або заліза підвищує адсорбцію бактеріальних клітин на зернах піску від 29 до 37 % порівняно з необробленим піском і дозволяє скоротити час, потрібний для досягнення 100 % адсорбції клітин, у три рази.

Ключові слова: *уреазо-продукуючі бактерії, біоцементация, адсорбція клітин, катіони металів.*

Постановка проблеми. В останні роки в лабораторіях таких країн, як Нідерланди, Австралія, Сполученні Штати Америки, Сінгапур і Китай ведуться досліди та польові тестування з метою отримання та використання нового біотехнологічного продукту — біоцементу. Одним із можливих напрямків застосування біоцементу є підвищення міцності ґрунту та зменшення його водопроникності. Змішування ґрунту з цементом і хімічними реагентами часто використовується у геотехнічній інженерії для закріплення ґрунтів [1]. Однак в'язкість цементного розчину занадто висока для того, щоб його можна було застосовувати для інжекції в пісковий ґрунт. У цьому випадку можна використовувати хімічні закріплювачі, але більшість цих закріплювачів мають високу вартість і токсичні для людини, тварин та рослин. Розчин біозакріплювача (біоцементу) має низьку в'язкість і тому може глибше проникати у ґрунт, ніж цемент та хімічні закріплювачі. Основою процесу біоцементатації є мікробно-ініційоване осадження карбонату кальцію, яке складається з двох головних стадій: адсорбції ферменту уреази або клітин уреазо-продукуючих бактерій (УПБ) на частинках піску та ензиматичного гідролізу сечовини за наявності іонів кальцію, який супроводжується утворенням кристалів карбонату кальцію [2].

Адсорбція бактеріальних клітин на зернах піску та рух бактеріальних клітин у його порах залежить від розміру, поверхневого заряду (дзета-потенціалу) та гідрофобності частинок піску й бактеріальних клітин, а також від концентрації протонів та інших іонів у середовищі [3, 4].

Метою дослідження є вивчення можливості контролю процесу адсорбції клітин уреазо-продукуючих бактерій на зернах піску за рахунок обробки їх катіонамірних металів.

Матеріали і методи. Галотолерантний та алкалофільний штам уреазо-продукуючих бактерій *Bacillus* sp. VS1 [5] вирощували в аеробних умовах до початку стаціонарної фази росту. Бактеріальну біомасу видаляли центрифугуванням, промивали від залишків культуральної рідини та ресуспендували у фізіологічному розчині 0,85 % NaCl. Суспензію відмитих бактеріальних клітин використовували в експериментах з прискорення адсорбції бактеріальних клітин до зерен піску.

У дослідженні застосовували сортований пісок ASTM (Американське товариство з випробування матеріалів) із зернами округлої форми, щільністю 2650 кг/м³ та вмістом кремнезему, SiO₂, ≥ 95 %. Три різні фракції піску були отримані просіюванням через сита: крупнозерниста фракція мала зерна розміром між 1,2 та 0,6 мм, середня фракція — між 0,6 та 0,2 мм, мілкозерниста фракція — нижче 0,2 мм.

Ефективність адсорбції бактеріальних клітин оцінювали за зміною оптичної щільності рідини, яка виходила з піщаної колонки. Оптичну щільність розчинів вимірювали при довжині хвилі 600 нм на УФ спектрофотометрі. Уреазну активність визначали як кількість амонію, що утворилася в 1 М розчині сечовини за 5 хв.

У дослідженні використовували 50 мл колонки з полівінілхлориду (діаметр 2,8 см та довжина 12 см). Час, потрібний для повної адсорбції бактеріальних клітин, визначали на колонках, які були заповнені піском з частками розміром між 0,6 та 0,2 мм. Бактеріальну біомасу видаляли з культуральної рідини

центрифугуванням та ресуспендували у 10 % NaCl. 25 мл суспензії бактеріальних клітин з відомими оптичною щільністю й уреазною активністю, інjektували у зразки піску в напрямі від низу до верху для запобігання утворення каналів у піску та витримували 15, 30 та 60 хвилин. Ступінь адсорбції клітин на гранулах піску оцінювали за зміною оптичної щільності й уреазної активності у рідині, що виходила з колонок через 15, 30 та 60 хвилин.

Обробку зразків піску катіонами проводили в колонках водою (контроль), а в експериментах — 50 мМ розчинами кальцію або тривалентного заліза чи алюмінію. 25 мл свіжоприготованих розчинів хлоридів алюмінію, заліза та кальцію з рН 3,6, 1,8 та 5,8 відповідно вприскували у зразки піску в напрямі від низу до верху та витримували 1 год. Розчин самопливно видаляли і пісок тричі промивали інжекцією 25 мл деіонізованої води в напрямі зверху донизу. Значення рН води після третього промивання були 6,5, 6,9 та 7,2 для зразків піску, які були оброблені Al^{3+} , Fe^{3+} та замість Ca^{2+} катіонами, відповідно. Деіонізовану воду, 25 мл, використовували замість розчину солі в контролі. При вивченні адсорбції клітин 25 мл суспензії бактеріальних клітин з відомими оптичною щільністю й уреазною активністю інjektували у зразки піску в напрямі від низу до верху для запобігання утворення каналів у піску.

Результати і обговорення. Для визначення часу, який потрібен для повної адсорбції бактеріальних клітин на зернах піску, 25 мл суспензії клітин УПБ інjektували у напрямі від низу до верху в колонки, які були заповнені піском середньої фракції з розміром часток між 0,6 та 0,2 мм. Ефективність адсорбції бактеріальних клітин на частинках піску розміром між 0,2 та 0,6 мм визначали за зниженням вмісту бактеріальних клітин (вимірювання оптичної щільності при довжині хвилі 600 нм, $ОЩ_{600}$) та уреазної активності рідини, що виходила зверху колонки (рис.).

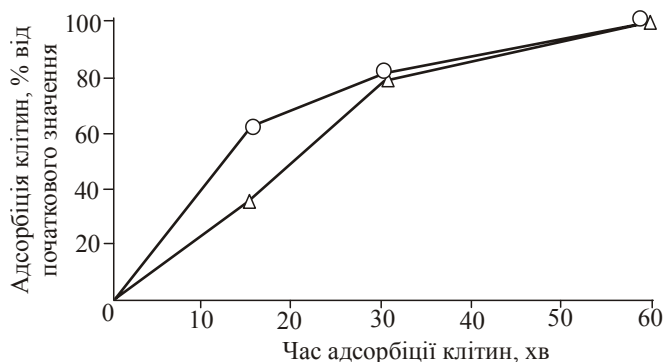


Рис. Адсорбція бактеріальних клітин на піску (адсорбція оцінювалась за оптичною щільністю $ОЩ_{600}$ (○) та уреазною активністю клітин (Δ))

Повну адсорбцію клітин спостерігали в колонках з подачею бактеріальної суспензії знизу до верху за 60 хвилин. Однак при практичному застосуванні біоцементатії для біозакріплення ґрунтів бактеріальна суспензія подається у напрямку зверху донизу. Вона проходить через шар піску і частина клітин вимивається із зони біоцементатії, а не адсорбується на зернах піску. Так, у

разі пропуску 25 мл бактеріальної суспензії зверху донизу через колонку з піском протягом 60 хв адсорбція клітин становила 44 % за оптичною щільністю та 39 % — за уреазною активністю.

Перевіряли можливість підвищити швидкість та ефективність адсорбції клітин бактерій на зернах піску шляхом їх попередньої обробки катіонами металів. При подачі бактеріальної суспензії у напрямі знизу доверху адсорбція клітин піском була завершена за 60 хв (рис.), тому тривалість усіх експериментів з вивчення впливу катіонів на адсорбцію клітин була 20 хвилин. Для цього часу адсорбція клітин по зміні оптичної щільності становила 69 % (рис.). Як зазначалося вище, пісок у колонках був оброблений різними катіонами, суспензію бактеріальних клітин інжектували у колонки з піском у напрямку знизу доверху. Ефективність адсорбції бактеріальних клітин на зернах піску після їх попередньої обробки різними катіонами оцінювалась за оптичною щільністю (результати наведені у табл.).

Таблиця. Ефективність адсорбції бактеріальних клітин на зернах піску після попередньої обробки катіонами різних металів

Розчин для обробки піску	Ефективність адсорбції клітин, % від початкової кількості, на зернах піску з розмірами, мм		
	0,2—0,6	0,6—1,2	> 1,2
Вода (контроль)	70	68	65
Розчин з Ca^{2+}	96	94	82
Розчин з Fe^{3+}	90	89	80
Розчин з Al^{3+}	92	90	84

Попередня обробка піску розчинами катіонів Ca^{2+} , Fe^{3+} , або Al^{3+} підвищувала абсорбцію бактеріальних клітин на 31 ± 6 % (середнє значення \pm середньоквадратичне відхилення для трьох повторностей) порівняно з контролем (пісок був оброблений водою).

Представлені дані показують, що ефективність адсорбції бактеріальних клітин не залежала від розміру зерен піску в діапазоні 0,2 — 2 мм. Це можна гіпотетично пояснити тим, що ефективність адсорбції бактеріальних клітин не залежить від питомої поверхні піску, але залежить від кількості позитивно заряджених місць, створених катіонами, що адсорбувалися на поверхні зерен піску.

Відомо, що покриття поверхні піску катіонами значно посилює адгезію клітин до зерен піску [4]. Це відбувається внаслідок збільшення позитивно заряджених місць на поверхні зерен піску, які притягують негативно заряджені місця на поверхні бактеріальних клітин. Як показали наші дослідження, попередня обробка піску тривалентними іонами Fe^{3+} та Al^{3+} або двовалентним катіоном Ca^{2+} підсилювала адсорбцію бактеріальних клітин майже до одного і того ж значення $31 \pm 6\%$, незважаючи на те, що містки між піском і бактеріальними клітинами, які були створені тривалентними катіонами, повинні бути в 1,5 раза міцнішими за соляні містки, що були створені двовалентними катіонами. Це означає, що адсорбція бактеріальних клітин, яка підсилена катіонами, відбувається завдяки числу позитивно заряджених місць, а не завдяки міцності зв'язків між катіонами та поверхнею.

Висновок

При проведенні біоцементації доцільно проводити попередню обробку піску катіонами металів. Обробка піску катіонами кальцію, алюмінію та заліза підвищувала адсорбцію бактеріальних клітин на зернах піску від 29 до 37 % порівняно з необробленим піском і дозволяла скоротити час, потрібний для досягнення 100 % адсорбції клітин у три рази.

Література

1. Karol R.H. Chemical Grouting and Soil Stabilization. — New York, 2003. — 558 p.
2. Stabnikov V., Ivanov V., Chu J. Construction Biotechnology: a new area of biotechnological research and applications // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2015. — V. 31, # 9. — P. 1303—1314.
3. Jacobs A., Lafolie F., Herry J.M., Debroux M. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. — 2007. — V. 59, # 1. — P. 35—45.
4. Tan Y., Bond W., Rovira A.D., Brisbane P.G., Griffin D.M. Movement through soil of a biological control agent, *Pseudomonas fluorescens* // Soil Biology and Biochemistry. — 1991. — V. 23, # 9. — P. 821—825.
5. Stabnikov V., Chu J., Ivanov V., Li Y. Halotolerant, alkaliphilic urease-producing bacteria from different climate zones and their application for biocementation of sand // World Journal of Microbiology and Biotechnology. — 2013. — V. 29, # 8. — P. 1453—1460.

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ АДСОРБЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ЗЕРНАХ ПЕСКА С ЦЕЛЬЮ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА БИОЦЕМЕНТАЦИИ

В.П. Стабников

Национальный университет пищевых технологий

Биотехнология производства биоцемента для его использования в строительстве и геотехнике разрабатывается как альтернатива традиционному цементу. Основой биоцементации является микробно-иницированное осаждение карбоната кальция, которое состоит из двух главных стадий: адсорбции клеток уреазы-продуцирующих бактерий на частицах песка и ферментативного гидролиза мочевины в присутствии ионов кальция, который сопровождается образованием кристаллов карбоната кальция. В статье показано, что обработка песка катионами кальция, алюминия или железа повышает адсорбцию бактериальных клеток на зернах песка от 29 до 37 % по сравнению с необработанным песком и позволяет сократить время, необходимое для получения 100 % адсорбции клеток, в три раза.

Ключевые слова: уреазы-продуцирующие бактерии, биоцементация, адсорбция клеток, катионы металлов.