

## **Warstwa ochronna ze strącanego biologicznie mikro-kalcytu na powierzchni tworzyw cementowych**

### **Protective effect of microbial calcite precipitation on the surface of cementitious materials**

#### **1. Wprowadzenie**

Kamienne i betonowe materiały budowlane ulegają procesom korozji pod działaniem czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych. W związku ze składem i teksturą węglanów (wapienie, marmury, dolomity) są szczególnie podatne na wietrzenie. Wzrost zanieczyszczenia atmosferycznego powietrza przyspieszył proces niszczenia kamieni węglanowych w ostatnim dziesięcioleciu.

Postępujące zniszczenie budowlanego i rzeźbiarskiego dziedzictwa światowego jest bardzo złożonym problemem i zaangażowano znaczne środki w celu znalezienia korzystnego rozwiązania. Zaproponowano różne zabiegi konserwatorskie w celu zabezpieczenia i wzmocnienia konstrukcji kamiennych przed ich rozpadem i ubytkiem warstw powierzchniowych, prowadzących do nieodwracalnych uszkodzeń. Zabezpieczenie polega na obróbce powierzchniowej konstrukcji kamiennych w celu ich zabezpieczenia przed wnikiem do ich wnętrza wody lub innych roztworów korozyjnych. Wzmocnienie obejmuje impregnację kruchych i zniszczonych porowatych elementów kamiennych za pomocą wiążących i twardniejących materiałów. Stosowano obróbkę tak przy użyciu organicznych jak i nieorganicznych tworzyw, między innymi żywic akrylowych i epoksydowych oraz roztworów  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Inną metodą jest wywołanie powstania patyny złożonej ze szczawianu wapnia na uszkodzonym elemencie kamiennym. Patyny powierzchniowe mogą powstawać w sposób naturalny z biegiem czasu w wyniku działania kwasu szczawowego na kalcyt. Jednak żadna z dotychczasowych, dostępnych metod nie okazała się zadowalająca. Dostępne na rynku środki organiczne powodują pozostanie nie łączących się z podłożem, często szkodliwych, warstewek powierzchniowych. Ponadto ich twardnienie może przebiegać wolno, przez długi okres i mogą przy zastosowaniu uwalniać szkodliwe rozpuszczalniki. Produkty nowoczesne, mogące być częściowo lub całkowicie pozbawione tych niedogodności są obecnie przedmiotem badań (1-4). Z drugiej strony nieorganiczne środki konsolidujące mogą być korzystniejsze gdyż minerały zawarte w elementach kamiennych i te materiały wykazują pewne

#### **1. Introduction**

Construction materials, such as stone and concrete, are subjected to the weathering action of several physical, chemical and biological factors. Because of their composition and textural characteristics, carbonate stones (limestones, dolostones and marbles) are particularly susceptible to weathering. The increase of atmospheric pollution has accelerated deterioration of carbonate stones in recent decades.

The progressive deterioration of worldwide built and sculptural heritage is a very knotty problem and considerable resources have been employed in order to find reasonable solutions. Many conservation treatments have been suggested for the protection and consolidation of stone before extensive granular disintegration will cause loss of surface material and, in turn, irreversible damage. Protection refers to treatments that waterproof stone surfaces in order to avoid that water or other weathering agents enter the core of the stone. Consolidation implies the impregnation and thus the strengthening of a friable decayed porous stone with a cementing and/or hardening product. Both treatments were performed using organic and inorganic materials, such as acrylic or epoxy resins and  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solutions. Another method is the generation of a calcium oxalate patina on the damaged stone. Surface patinas can be naturally formed during time by oxidation of calcite with oxalic acid. However, none of the treatments available to date have proven to be satisfactory. Commercial organic treatments result in the formation of incompatible, often harmful, surface films. In addition, their hardening could take long times and they could release during application noxious solvents. Innovative products, able to partly or fully avoid the mentioned inconveniences, are currently under study (1-4). On the other hand, inorganic consolidation may be preferable since stone minerals and protective or consolidating materials share some physical-chemical affinity. However, both conservation treatments are subject to frequent controversy due to their no reversible action and their limited long-term performance.

Because of problems related to incompatibility with the stone, both water repellents and consolidants have often been reported to even

fizykochemiczne powinowactwo. Pomimo tego wszystkie te zabiegi konserwacyjne wywołują sprzeczne opinie ze względu na ich nieodwracalne działanie, a równocześnie ograniczone w czasie.

W związku z problemami niezgodności z elementami kamiennymi i te niezwilżalne przez wodę jak i wzmacniające często wywoływały przyspieszone zniszczenie tych elementów. Na przykład obróbkę wodą wapienną, a więc zawierającą roztwór  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , stosowano w celu wzmocnienia elementów z  $\text{CaCO}_3$ . Ta metoda prowadzi jednak często do powstawania powierzchniowej, mikronowej grubości, kruchej warstewki złożonej z submikronowych kryształków kalcytu o niedostatecznych właściwościach zabezpieczających i wzmacniających (5).

Ponadto jest oczywiste, że potrzeba zapobiegania wnikaniu wody do elementu kamiennego, duże znaczenie ma także zachowanie wymiany gazowej tego elementu z otoczeniem, to znaczy że obróbka powinna zachować możliwość „oddychania” powierzchni kamienia i wymiany pary. Podsumowując: całkowita wodoszczelność kamienia jest zbyt radykalna, to jednak obróbka zabezpieczająca powinna ograniczyć wnikanie wody z zewnątrz, pozostawiając wymianę gazową w obu kierunkach.

Zaproponowano wywołaną bakteryjnie mineralizację węglanową jako przyjazną dla środowiska metodę ochrony przed zniszczeniem ozdobnych elementów kamiennych. Metoda ta polega na powstawaniu wywołanego bakteryjnie osadu węglanowego na wapieniu i, w odróżnieniu od obróbki wodą wapienną, utworzona warstwa jest bardzo koherentna (6). Jakkolwiek uważa się, że mikroorganizmy oddziałują zwykle szkodliwie na spójność struktur kamiennych, zaczyna wzrastać przekonanie o możliwości ich stosowania do obróbki tego rodzaju elementów kamiennych posiadających historyczne i zabytkowe znaczenie. W szczególności zdolność różnych mikroorganizmów albo do tworzenia zabezpieczających warstw kalcytu, które wzmacniają powierzchnie mineralne, a usuwają skorupę siarczanową. Obecne badania wykazują, że biologiczna odnowa stanowi dodatkową technologię dla prac konserwacyjnych obejmujących regenerację powierzchni kamiennych budowli, stanowiących dziedzictwo kulturowe (7).

Obróbka powierzchniowa odgrywa także ważną rolę w ograniczeniu degradacji betonu. Wpływ środowiska przy równoczesnej pewnej przepuszczalności betonu stanowią ryzyko powstawania uszkodzeń i szybkości ich rozwoju. Wiele fizycznych i chemicznych mechanizmów niszczenia betonu łączy się z korozyjnymi substancjami zawartymi w roztworach wodnych. Ważnym czynnikiem chroniącym przed zniszczeniem jest więc ograniczenie wnikania cieczy do betonu. Tradycyjne stosowanie powłok ma szereg niedogodności, których można uniknąć stosując bardziej ekologiczne metody, które są obecnie dostępne. W tym zakresie wywołana bakteryjnie mineralizacja węglanowa jest nową, przyjazną dla środowiska technologią, która może być stosowana do zabezpieczania i naprawy zapraw i betonów (8).

accelerate stone decay. For instance, the limewater treatment based on  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solutions was used to consolidate carbonate stones. However, this technique often leads to the formation of a superficial, micrometer-thick, friable aggregate of submicron-size calcite crystals and has an insufficient protection and/or consolidation effect (5).

Moreover, it is clear that while it is necessary to prevent the intrusion of water into the stone, it is also important to maintain a gaseous exchange between the stone and its environment, i.e. the stone treatments should leave the stone surface free to “breathe” and allow the vapour transfer. To sum up, as complete stone waterproofing is too radical, protective treatments should limit water penetration from the exterior, while allowing gaseous transfer in both directions.

Bacterially induced carbonate mineralization has been proposed as an environmentally friendly method to protect decayed ornamental carbonate stone. The method relies on the bacterially induced formation of a compatible carbonate precipitate on limestone and, unlike the limewater treatment, the carbonate cement appears to be highly coherent (6).

Although microorganisms are commonly associated with detrimental effects to the integrity of stone structures, there is growing evidence that they can be used to treat this type of stone deterioration in objects of historical and cultural significance. In particular, the ability and potential of different microorganisms to either form sacrificial layers of calcite that consolidate mineral surfaces or remove sulphate crusts have been demonstrated. Current research suggests that bioremediation has the potential to offer an additional technology to conservators working on the restoration of stone surfaces in heritage buildings (7).

Surface treatments play an important role also in limiting the degradation of concrete. The service environment and the permeation properties of concrete determine the risk of damage and the speed at which it can develop. Many of the physical and chemical deterioration mechanisms of concrete are related to aggressive substances present in aqueous solution. An important means to protect concrete against damage resides, then, in the diminishing the uptake of water. Conventional coatings for concrete displays several disadvantages partially offset by more ecologically friendly methods that have been recently suggested. Within this framework, bacterial induced carbonate mineralization has been recently proposed as a novel and environmentally friendly strategy for the protection and remediation of mortar and concrete (8).

## 2. Bacteria

The bacteria are a large group of unicellular microorganisms. Typically a few micrometres in length, bacteria have a wide range of shapes, ranging from spheres to rods and spirals. Bacteria are ubiquitous in every habitat on Earth, growing in soil, acidic hot springs, water, and deep in the Earth's crust, as well as in organic matter and the live bodies of plants and animals. There are typically 40 million bacterial cells in a gram of soil and a million bacterial

## 2. Bakterie

Bakterie stanowią dużą grupę jednokomórkowych mikroorganizmów. Przeważnie mają długość kilku mikronów i bardzo różne kształty poczynając od kulek poprzez laseczki aż do spirali. Bakterie są wszędzie na ziemi, rozwijają się w glebie, w kwaśnych ciepłych źródłach, w wodzie i głęboko w skorupie ziemskiej, a także w materii organicznej i w żywych roślinach i zwierzętach. Jest typowo 40 milionów komórek bakterii w gramie gleby i milion w mililitrze świeżej wody; w sumie jest około  $5 \cdot 10^{30}$  bakterii na ziemi, stanowiąc główną część biomasy ziemskiej. Bakterie odgrywają podstawową rolę w cyklu pokarmowym, w zależności od rodzaju dotyczących go organizmów, biorąc udział w wiązaniu azotu atmosferycznego i w procesach gnilnych.

W przemyśle bakterie mają znaczenie w obróbce ścieków, w produkcji serów i jogurtu w wyniku fermentacji, a także w biotechnologii, w produkcji antybiotyków i innych chemikaliów.

Włosowata struktura komórkowa niektórych bakterii ułatwia ich przyczepność do powierzchni. Tlen może ale nie musi być niezbędny dla życia niektórych bakterii w zależności od rodzaju metabolizmu używanego do uzyskiwania energii z pożywienia (bakterie tlenowe lub beztlenowe). Niemal wszystkie próbki pochodzące z badania mikroskopem elektronowym wykazują, że osadom mineralnym towarzyszą komórki bakterii. Jest cały szereg cech, które powodują, że posiadające je bakterie są idealnymi hetero zarodkami dla minerałów. Komórki bakterii są bardzo małe, szczególnie w środowiskach ubogich w pokarm.

W związku z małymi rozmiarami, bakterie mają największy stosunek powierzchni do objętości ze wszystkich żywych organizmów co, razem z obecnością posiadających ładunku grup chemicznych na powierzchni ich komórek, powoduje ich zdolność do zarodnikowania mineralnego. Bakterie dzielą się na dwie grupy: gram-dodatnie i gram-ujemne. Ogólnie, ujemnie naładowane grupy przeważają nad naładowanymi dodatnio nadając powierzchni komórki ogólny ładunek anionowy.

W zależności od środowiska ujemnie naładowane jony (na przykład siarczany, fosforany, węglany, siarczki, krzemiany) określają różne fazy mineralne. Utwory mineralne związane z bakteriami nie są kontrolowane przez organizmy; jest to spowodowane właściwościami fizykochemicznymi powierzchni bakterii i chemicznymi warunkami środowiska (9).

Bakterie można hodować w laboratorium na sztucznych kulturach. Wybrane i bogate środowiska to ciecze i zielone substancje zaprojektowane w celu hodowli wybranych mikroorganizmów. W trakcie hodowli bakterii ważne znaczenie ma zapewnienie podobnego środowiska i warunków odżywiania jakie występują w naturalnym środowisku. Sztuczne hodowlane środowisko musi zapewnić wszystkie składniki odżywcze, które bakterie mają w naturalnych warunkach.

cells in a millilitre of fresh water; in all, there are approximately five nonillion ( $5 \cdot 10^{30}$ ) bacteria on Earth, forming much of the world's biomass. Bacteria are essential in recycling nutrients, with many steps in nutrient cycles depending on these organisms, such as the fixation of nitrogen from the atmosphere and putrefaction.

In industry, bacteria are important in sewage treatment, the production of cheese and yoghurt through fermentation, as well as in biotechnology, and the manufacture of antibiotics and other chemicals.

On the surface of some bacteria, short projections, called fimbriae, facilitate bacteria adherence to surfaces. Oxygen may or may not be a life requirement for a particular species of bacteria, depending on the type of metabolism used to extract energy from food (aerobic or anaerobic). Obligate aerobes must have oxygen in order to live.

In almost any environmental sample, examination of the cells by electron microscopy reveals mineral precipitates closely associated with bacterial cells. There are several characteristics which bacteria exhibit that make them ideal nucleating agents for mineral precipitation. Bacterial cells are very small, especially in low-nutrient environments.

Due to their small size, bacteria as a group have the highest surface area-to-volume ratio of any group of living organisms and this, together with the presence of charged chemical groups on their cell surface, is responsible for the mineral-nucleating ability of these cells. Eubacterial cell walls come in two main formats, Gram-positive or Gram-negative. In general, negatively charged groups dominate over positively charged ones, giving the cell surface an overall anionic charge.

Depending on microenvironmental geochemistry, negatively charged counter ions (e.g., sulfate, phosphate, carbonate, sulfide, or silicate ions) determine specific mineral phases. Mineral formation on the bacteria is generally not controlled by the organism; it happens because of the physicochemistry of the bacterial surface and the chemistry of the cell's environment. (9).

Bacteria have to be grown (cultured) in the laboratory on artificial culture media. Selective and enrichment media are liquid or gel substances designed for the growth of only select microorganisms. When culturing bacteria, it is very important to provide similar environmental and nutritional conditions that exist in its natural habitat. Hence, an artificial culture medium must provide all the nutritional components that a bacterium gets in its natural habitat.

## 3. Microbial precipitation of calcium carbonate

Precipitation or consolidation of minerals is not an unusual process in nature. Mineral deposits are found in many different areas of the Earth ranging from the deep sea to the top of the mountains. Microorganisms contribute to the precipitation of a wide variety of authogenic minerals including oxides, phosphates, carbonates, sulphides, and silicates. The mechanisms of microbial mineral

### 3. Bakteryjne strącanie węglanu wapnia

Strącanie i zagęszczanie minerałów nie stanowi niezwykłego procesu w przyrodzie. Złoża mineralne występują w różnych obszarach na ziemi sięgając od głębokich mórz po szczyty górskie. Mikroorganizmy uczestniczą w strącaniu różnych autogenicznych minerałów obejmujących tlenki, fosforany, węglany, siarczki i krzemiany. Mechanizmy bakteryjnego strącania są różne lecz odpowiadają generalnie równowadze chemicznej, która określa zarodkowanie i wzrost kryształów.

Rola mikrobów w procesie strącania węglanów nie jest jasna. Badania kinetyczne wskazują, że strącanie  $\text{CaCO}_3$  jest funkcją stężenia komórek bakterii, siły jonowej i pH roztworu.

Boquet i in. sugerują, że prawie wszystkie rodzaje bakterii są zdolne do strącania  $\text{CaCO}_3$ . Knorre i Krumbein (12) stwierdzają, że bakteryjne strącanie węglanu zachodzi jako produkt uboczny powszechnych metabolicznych procesów bakteryjnych takich jak fotosynteza, hydroliza moczu i redukcja siarczanów. Te procesy metaboliczne zwiększają zasadowość środowiska i w związku z tym sprzyjają strącaniu  $\text{CaCO}_3$  (9).

Zarodkowanie jest najważniejszym etapem strącania fazy i może zachodzić w warunkach homogenicznych lub heterogenicznych. W tych pierwszych zarodki powstają w wyniku zderzeń jonów w roztworze. Zarodkowanie heterogeniczne polega na zarodkowaniu powstającej fazy na powierzchniach innych kryształów, których rolę spełniają komórki bakterii na powierzchniach minerałów. Po utworzeniu trwałych zarodków wzrost kryształów przebiega spontanicznie, przy założeniu, że roztwór pozostaje przesycony. Energia swobodna powstawania zarodków jest termodynamicznie związana z energią swobodną roztworu i międzyfazową energią swobodną powierzchni fazy stałej (13).

Warunkiem eutrofizacji<sup>1</sup> pierwszej powstającej fazy stałej na powierzchni bakterii, ulegającej koagulacji aż do utworzenia zwartej warstwy lub cząstek wydalanych z komórek. Wszystkie te cząstki gromadzą się w bio-mineralnych konglomeratach, które często odgrywają rolę struktur „przed-kryształicznych”. Te konglomeraty wzrastają i tworzą bio-mineralne narosty, które stopniowo tworzą bardziej kryształiczne struktury. W warunkach oligotropowych<sup>2</sup> pierwotne produkty stałe przechodzą szybko w struktury kryształiczne i znikają bez śladu (14).

Fazy węglanowe są strącane przez szereg zróżnicowanych grup mikroorganizmów. Obejmuje to różne beztlenowe bakterie i bakterie wytwarzające amoniak w wyniku degradacji bogatych w azot organicznych materiałów. W każdym przypadku metabolizm tych różnych mikroorganizmów uczestniczy bezpośrednio w powsta-

precipitation are diverse, but conform generally to chemical equilibrium constraints that regulate nucleation and crystal growth reactions (10).

The precise role of microbes in the carbonate precipitation process is still not clear. Kinetic studies indicated that  $\text{CaCO}_3$  precipitation is a function of the cell concentration ionic strength and pH of the medium.

Boquet et al. (11) suggested that almost all bacteria are capable of  $\text{CaCO}_3$  precipitation. Knorre and Krumbein (12) concluded that microbial carbonate precipitation (MCP) occurs as a by-product of common microbial metabolic processes, such as photosynthesis, urea hydrolysis, and sulfate reduction. These metabolic processes increase the alkalinity of the environment and thereby favour  $\text{CaCO}_3$  precipitation (9).

Nucleation is the most critical stage for mineral precipitation; it occurs either homogeneously or heterogeneously. In homogeneous reactions, mineral nuclei are formed by the random collision of ions in solution. Heterogeneous nucleation involves formation of crystal nuclei on the surfaces of foreign solids, such as microbial cells on mineral surfaces. Once a stable nucleus has formed, crystal growth can proceed spontaneously providing that the solution remains oversaturated. The free energy of crystal nucleation is thermodynamically controlled by the free energy of the solution and the interfacial free energy of the corresponding solid phase (13).

In eutrophic conditions<sup>1</sup>, the first solid products are patches that appear on the surface of the bacterial bodies and coalesce until forming a rigid coating and/or particles excreted from the cell. All these tiny particles assemble into biomineral aggregates which often display 'pre-crystalline' structures. These aggregates grow and form bio-crystalline build-ups which progressively display more crystalline structures with growth. In oligotrophic conditions<sup>2</sup>, the primary solid products are rapidly smoothed in the crystalline structure and leave no trace (14).

Carbonate phases are precipitated by several divergent groups of microorganisms. These include various anaerobic respiratory bacteria and bacteria that produce ammonia from the degradation of nitrogen-rich organic matter. In each case, the metabolic activities of these different microorganisms contribute directly to the development of highly oversaturated solutions from which carbonate phase deposition subsequently occurs (10).

The metabolic pathway used by the bacteria has an influence on the rate of carbonate production, and hence, on the rate of calcium carbonate precipitation. For biodeposition on limestone, the production of carbonates was often based upon the utilization of the

<sup>1</sup> Termin eutrophic odnosi się do środowiska cechującego się zgromadzeniem pokarmów, które pozwalają na wzrost licznych organizmów.

<sup>2</sup> Termin oligotrophic używany jest do określania środowisk ubogich w środki do podtrzymywania życia organizmów, które znajdują się w tych środowiskach

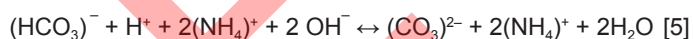
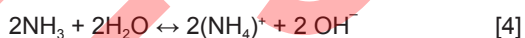
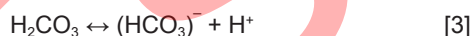
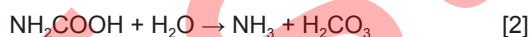
<sup>1</sup> The adjective *eutrophic* is used to refer to environments characterized by an abundant accumulation of nutrients that support a dense growth of organisms.

<sup>2</sup> The adjective *oligotrophic* is used to refer to environments that offer little to sustain life, organisms that survive in such environments.

waniu znacznie przesyconych roztworów, z których wydzielają się następnie osady węglanowe (10).

Metabolizm (przemiana materii), któremu ulegały bakterie nie miał wpływu na szybkość wytwarzania węglanów i w związku z tym na szybkość strącania węglanu wapnia. Bio-osadzanie na wapieniu wiązało się z często z wytwarzaniem węglanów przy wykorzystaniu dostępu do kwasów organicznych (15, 16) lub tlenowe odaminowanie<sup>3</sup> dostarczonych kwasów aminowych (5). Badania Dicka i in. (17) dotyczyły wytwarzania węglanów przy użyciu mocznika. Hydroliza mocznika jest prostym, pospolitym procesem bakteryjnym i może być łatwo wykorzystana w biotechnologii. W odróżnieniu od innych metod produkcją węglanów z zastosowaniem hydrolizy mocznika można łatwo sterować. Ponadto pozwala ona na uzyskanie dużej ilości węglanów w krótkim czasie.

Enzym mocznika (hydrolaza amidowa) jest spotykany w wielu różnych mikro-organizmach i można go łatwo uzyskać dodając niedrogi substrat, więc jest stosowany w wielu bio-technologiach. Enzym mocznika jest katalizatorem hydrolizy mocznika [CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] na amoniak i karbaminian (równanie [1]), który samoczynnie ulega hydrolizie z utworzeniem dodatkowej ilości amoniaku i kwasu węglowego (równanie [2]). Te produkty osiągają następnie w wodzie równowagę z utworzeniem jonów amonowych, wodorotlenkowych i wodorowęglanowych, co pokazano w równaniach [3] i [4]. Jony wodorotlenkowe powodują wzrost pH, co z kolei może przesunąć równowagę wodorowęglanu w środowisku bakterii z utworzeniem jonów węglanowych (równanie [5]), które w obecności jonów wapniowych powodują strącanie CaCO<sub>3</sub> (równanie [6]) (18).

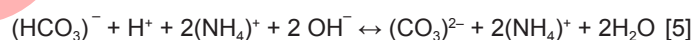
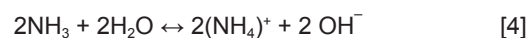
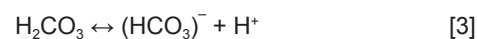
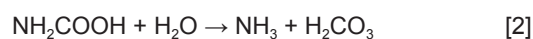


W związku z tym, że jony wapniowe są związane ze ścianami komórki, ponieważ mają one ładunek ujemny, może to spowodować utworzenie kryształów na ścianach komórki. Ponadto strącanie może także nastąpić w fazie ciekłej. Te procesy metaboliczne zwiększają zasadowość środowiska i sprzyjają strącaniu CaCO<sub>3</sub>. Ewentualnie, jest możliwe występowanie określonych cech pewnych bakterii, które przyczyniają się do strącania CaCO<sub>3</sub>. Na przykład ujemnie naładowane grupy funkcyjne na ścianach komórek bakteryjnych sprzyjają wiązaniu dwuwartościowych kationów (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), tworząc z mikroorganizmów idealne centra zarodnikujące (18).

<sup>3</sup> Odaminowanie jest procesem, w którym aminokwasy ulegają zniszczeniu w wyniku dostarczenia nadmiaru protein. Grupa aminowa zostaje usunięta z amino-kwasu i przekształcona w amoniak. Reszta kwasu aminowego składająca się głównie z węgla i wodoru zostaje zawrócona do obiegu lub utleniona, będąc źródłem energii.

supplied organic acids (15, 16) and/or oxidative deamination<sup>3</sup> of the supplied amino acids (5). Investigations by Dick et al. (17) were focused on the ureolytic carbonate production. The hydrolysis of urea presents a straightforward common microbial process and can be easily used for biotechnological applications. In contrast with other pathways, the production of carbonate by the hydrolysis of urea can be easily controlled. Moreover, it allows for the production of high concentrations of carbonate within a short amount of time.

The urease enzyme (urea amidohydrolase) is common in a wide variety of microorganisms, it can be readily induced by adding an inexpensive substrate and is involved in several biotechnological applications. The urease enzyme catalyzes the hydrolysis of urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) to ammonia and carbamate, equation [1], which spontaneously hydrolyzes to form an additional ammonia and carbonic acid, equation [2]. These products subsequently equilibrate in water to form bicarbonate and ammonium and hydroxide ions, equations [3] and [4]. The latter give rise to a pH increase, which in turn can shift the bicarbonate equilibrium in the bacterial environment, resulting in the formation of carbonate ions, equation [5], which in the presence of calcium ions precipitate as CaCO<sub>3</sub>, equation [6] (18):



Since calcium ions are bound to the cell wall, as a consequence of the negative charge of the latter, this can result in the formation of crystals on the bacterial cell. In addition, precipitation can also occur in the liquid phase. These metabolic processes increase the alkalinity of the environment and, thereby, favour CaCO<sub>3</sub> precipitation. Alternatively, it is possible that there are specific attributes of certain bacteria that promote and affect CaCO<sub>3</sub> precipitation. For instance, the negatively charged nature and specific functional groups of microbial cell walls favour the binding of divalent cations (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>), thereby making microorganisms ideal crystal nucleation sites (18).

Calcium carbonate precipitation is a rather straightforward chemical process governed mainly by four key factors: [1] the calcium concentration, [2] the concentration of dissolved carbon acid, [3] the pH and [4] the availability of nucleation sites. CaCO<sub>3</sub> precipitation requires sufficient calcium and carbonate ions so that the ion activity product exceeds the solubility constant (19).

The specific proteins present in biological extracellular polymeric substances as well as abiotic factors (salinity and composition of

<sup>3</sup> Deamination is the process by which amino acids are broken down when too much protein has been taken in. The amino group is removed from the amino acid and converted to ammonia. The rest of the amino acid is made up of mostly carbon and hydrogen, and is recycled or oxidized for energy.

Strącanie węglanu wapnia jest prostym procesem chemicznym, o którym decydują cztery czynniki: (1) stężenie wapnia, (2) stężenie rozpuszczonego kwasu węglowego, (3) pH i dostępne centra zarodnikujące. Strącanie  $\text{CaCO}_3$  takiej zawartości jonów wapnia i węglanowych, aby ich iloczyn aktywności przekraczał iloczyn rozpuszczalności (19).

Pewne proteiny obecne w biologicznych pozakomórkowych polimerach, jak również nieożywione czynniki (zasolenie i skład medium) powodują powstawanie różnych polimorficznych odmian  $\text{CaCO}_3$  (19).

Rodriguez-Navarro i in. (5) podają wpływ strącanych odmian polimorficznych (kalcyt, wteryt) na skuteczność obróbki obejmującej osadzanie biologiczne. Obecność krystalicznego trygonalnego kalcytu (uzyskanego w środowisku M3-P) dawało bardziej zagęszczony osad w porównaniu do iglastych kryształów wterytu (otrzymanych w środowisku M3). Autorzy przypisują te różnice w morfologii kryształów otrzymanych w tych dwóch mediach obecności fosforanów<sup>4</sup>.

Ponieważ mocznik jest stosunkowo niedrogi, łatwo dostępny i ulega degradacji do nieszkodliwych związków (dwutlenek węgla i amoniak), jest on doskonałym środkiem do manipulowania in situ w podpowierzchniowym środowisku biogeochemicznym. Ponadto stosowanie mocznika sprzyja szerszemu przestrzennemu rozmieszczeniu strąconego kalcytu w utworach podpowierzchniowych niż bezpośredni dodatek zasady, która w przeciwieństwie powoduje natychmiastowe strącanie tylko w otworach wiertniczych (10).

#### 4. Zastosowania mające na celu ochronę węglanowych elementów kamiennych

Miękkie wapienie wystawione na działania atmosferyczne szybko pokrywają się ochronną warstwą w wyniku rozpuszczania węglowodanów w wodzie w porach, odparowania roztworu i strącania kalcytu na odkrytej powierzchni. Ta warstwa „ochronna” wykazuje większą twardość i gęstość w porównaniu z niżej położonymi warstwami. Jednak w wyniku działania zanieczyszczeń atmosferycznych ulega powoli degradacji tracąc swoje ochronne właściwości. Odkrycie, że bakterie uczestniczą w tworzeniu wapienia prowadziło do wniosku o ich wykorzystaniu w strącaniu węglanów w celu zabezpieczenia i umocnienia ozdobnych elementów kamiennych.

Boquet i in. (11) byli jedni z pierwszych, którzy wykazali zdolność bakterii zawartych w glebie do strącania węglanu wapnia w warunkach laboratoryjnych. O ile poprzednie badania dotyczyły tylko bakterii z wody morskiej w środowisku ciekłym, to ci autorzy badali powstawanie kryształów spowodowane bakteriami glebowymi na stałych podłożach. Z pośród badanych organizmów, szereg bakterii laseczkowych (na przykład *Bacillus cereus* i *Pseudomonas*

the medium) cause the formation of different  $\text{CaCO}_3$  polymorphs (19).

Rodriguez-Navarro et al. (5) reported the importance of the precipitated polymorphs (calcite or vaterite) on the efficiency of the biodeposition treatment. The presence of well-developed rhombohedral calcite crystals (obtained in M3-P medium) resulted in a more pronounced consolidating effect compared to the presence of tiny acicular vaterite crystals (obtained in M3 medium). The authors attributed the differences in crystal morphologies obtained in the two media to the presence of phosphate<sup>4</sup>.

Because urea is relatively inexpensive, widely available and degrades to innocuous compounds (carbon dioxide and ammonia) it is an ideal agent for in situ manipulation of subsurface biogeochemical environments. Furthermore, the use of urea to cause an increase in pH is preferable to the direct addition of a base because the gradual hydrolysis of urea is likely to promote a wider spatial distribution of calcite precipitation in the subsurface formations than the direct addition of a base, which would in contrast causes immediate precipitation only in the borehole (10).

#### 4. Applications for the conservation of calcareous stone

Soft limestone, when exposed to atmospheric conditions, quickly acquires a protective skin through dissolution of carbonates within the pore water, evaporation and precipitation of calcite at or near the exposed surface. This “protective” layer demonstrates a higher hardness and density compared to the underlying layers. As a result of atmospheric pollutants, however, it slowly degrades, losing its protective role. The discovery that bacteria contribute to the formation of limestone led to the suggestion to use bacteria carbonate precipitation for the protection and consolidation of ornamental stone.

Boquet et al. (11) were among the first to demonstrate the ability of soil bacteria to precipitate calcium carbonate under laboratory conditions. While previous research only concerned marine bacteria in liquid media, the latter authors investigated the crystal formation by soil bacteria on solid media. Among the organisms tested, several *Bacillus* strains (for instance *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*) were observed to form crystals. The authors concluded that crystal formation is a function of the medium, and that under suitable conditions most bacteria can form crystals.

Adolphe and Billy (20) succeeded in the formation of calcite in the laboratory by bacteria isolated from tuff and travertine. Between 1983 and 1987, Castanier et al. (14) investigated the different mechanisms responsible for the microbial formation of calcium

<sup>4</sup> Medium ciekłe: M-3 [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ , wodzie destylowanej, pH 8] and M-3P [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  w 10 mM buforze fosforowym, pH 8]. Bacto Casitone – przetworzona kazeina, a ta ostatnia jest białkiem występującym w mleku, stanowi źródło azotu z aminokwasów.

<sup>4</sup> Liquid media M-3 [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ , in distilled water, pH 8] and M-3P [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  in a 10 mM phosphate buffer, pH 8].

aeruginosa) powoduje powstanie kryształów. Autorzy stwierdzają, że na powstawanie kryształów ma wpływ środowisko i w odpowiednich warunkach większość bakterii może wywoływać tworzenie kryształów.

Adolphe i Billy (20) uzyskali kalcyt w laboratorium wykorzystując bakterie wyizolowane z tufu i trawertynu. Pomiędzy 1983 i 1987 Castanier i in. (14) badali różne mechanizmy odpowiedzialne za bakteryjne powstawanie węglanu wapnia wykazując bakteryjne pochodzenie wapienia. Adolphe i in. (21) wykazali dalej bakteryjne pochodzenie narostów kalcytowych i dużą odporność tych warstw na korozję. Najlepsze wyniki uzyskano stosując bakterie *Bacillus cereus*. Wyniki tych badań Adolphe i in. (22) wykorzystali uzyskując patent na otrzymywanie powłok z użyciem mikroorganizmów. Proces ten został udoskonalony i wykorzystany przemysłowo przez firmę CALCITE S.A.

Obiecujące wyniki techniki CALCITE zachęciły różne grupy badawcze do oceny innych metod pozwalających na bio-strącanie węglanu na wapieniu. Te serie badawcze cechowały się stosowaniem różnych mikroorganizmów i mechanizmów metabolicznych w celu obejścia ograniczeń patentowych CALCITE. Można w nich wyróżnić badania, w których makrocząsteczki dostarczane są do elementu kamiennego razem z przesyconym roztworem węglanu wapnia, w celu strącania węglanu z wykorzystaniem bakterii zawartych w tym kamieniu. W tych ostatnich dodawany jest tylko pokarm do kamienia (23).

Tiano i in. (15) omówili stosowanie żywych komórek w celu powstawania nowych faz wewnątrz kamienia. Objęli badaniami szczepy *Micrococcus* spp. i *Bacillus subtilis*, a podłożem był bio-blastyczny wapień z Pietra di Lecce. W ich doświadczeniach prowadzonych w niesterylnych warunkach zastosowano bakterie uzyskane przez szczotkowanie próbek nasyconych destylowaną wodą. Następnie bakterie karmiono nawilżając codziennie małą ilością środka B4<sup>5</sup>.

Rodriguez-Navarro i in. (5) zwrócili uwagę, na dwa ważne ograniczenia metody CALCITE: nieskuteczność wglębnego wzmocnienia (tylko kilka mikronów) i powstawanie powierzchniowej warstewki złożonej z mieszaniny pozostałości biologicznych. Te ostatnie zatykają pory w kamieniu, co powoduje brak wzmocnienia. Jak już wspomniano, wiadomo że zatykanie przyspiesza zniszczenie. To uniemożliwia stosowanie mineralnego uszczelniania pochodzenia bakteryjnego (stosowanie *Bacillus pasteurii*), co zaproponowali Ferris i Stehmeier (24) w celu konserwacji ozdobnych kamieni. Inna potencjalna niedogodność stosowania bakterii *Bacillus* do konserwacji wynika z faktu, że te bakterie mogą tworzyć zarodniki, które w dogodnych warunkach (temperatura, wilgotność, dostępność pokarmu) mogą prowadzić do kiełkowania i niekontrolowanego wzrostu bakterii i powstawania bio-warstewki. Niezbędne więc jest opracowanie metod, które pomogą w uzyskaniu spójnego cementu węglanowego w układzie porów kamienia w obróbce, równocześnie blokującego lub uszczelniającego pory. Metoda ta

<sup>5</sup> Skład B4: szczawian wapnia 0,25% mas., ekstrakt z drożdży 0,4% mas., glukoza 1% mas., pH8.

carbonate, evidencing the microbial origin of limestone. Adolphe et al. (21) further demonstrated the bacterial origin of the calcite crusts and the great resistance of these layers towards erosion. The highest performance was obtained with *B. cereus*. From the above findings, Adolphe et al. (22) applied for a patent to produce a coating by microorganisms. This process has been improved and, then, used industrially by the CALCITE S.A. Bioconcept Company.

The promising results of the CALCITE technique encouraged different research groups to evaluate alternative approaches for the carbonate bio-precipitation on limestone. These series of approaches were characterized by the use of different microorganisms, metabolic pathways or delivery systems to overcome some of the potential limitations of the CALCITE patent. They can be divided into studies in which the inducing macromolecules are supplied to the stone together with a supersaturated solution of calcium carbonate and studies which obtain carbonate precipitation by the microbiota inhabiting the stone. In the latter, only nutrients are added to the stone (23).

Tiano et al. (15) commented on the use of viable cells for the formation of new minerals inside the stone. They experimented *Micrococcus* spp. and *Bacillus subtilis* strains on Pietra di Lecce bioclastic limestone. In their experiments, performed under non-sterile conditions, bacteria were applied by brushing sterilized specimens that were soaked with distilled water. Subsequently, the bacteria were fed daily by wetting with a small amount of B4 medium<sup>5</sup>.

Rodriguez-Navarro et al. (5) addressed two important limitations of the CALCITE method: its ineffectiveness for in-depth consolidation (apparently only a few microns) and the formation of a superficial film consisting of a mixture of biological remains. The latter plugged stone pores and provided no consolidation. As already pointed out, it is known that plugging accelerates decay. This prevented the use of the bacteriogenic mineral plugging (using *Bacillus pasteurii*) technique proposed by Ferris and Stehmeier (24) for ornamental stone conservation. Another potential drawback of the use of *Bacillus* in stone conservation is that these bacteria may form endospores which, under appropriate conditions (i.e., temperature, humidity, and nutrient availability), may eventually lead to germination and uncontrolled bacteria growth and biofilm formation. It is, therefore, necessary to develop methods that will help to create coherent carbonate cement in the porous system of the treated stone without, at the same time, blocking or plugging the pores. The method should also allow the biomineralization process to be stopped in order to avoid undesired side effects. This will lead to appropriate, controlled and long-lasting protection and consolidation of decayed porous carbonate stones.

Another treatment, proposed by Rodriguez-Navarro et al. (5), suggested a new treatment based on the use of *Myxococcus xanthus*. Depending on the chemistry of the culture media, *M. xanthus* is

<sup>5</sup> B4 composition: Calcium acetate 0.25 wt%; Yeas extract 0.4 wt%; Glucose 1 wt%. pH 8.

powinna także umożliwić zatrzymanie procesu bio-mineralizacji w celu uniknięcia pożądaných efektów ubocznych. Powinno to prowadzić do odpowiedniego, kontrolowanego i długo trwającego zabezpieczenia i wzmocnienia uszkodzonego porowatego węglanowego elementu kamiennego.

Inna metoda zaproponowana przez Rodriguez-Navarro i in. (5) sugeruje nową obróbkę z zastosowaniem *Myxococcus xanthus*. W zależności od składu chemicznego pożywki *M. xanthus* może wywołać powstawanie fosforanów (struwit, schertelit, newberyte), węglanów (kalcyt, magnezyt, wteryt) i siarczanów (baryt, taylorit). Ta zdolność do bio-mineralizacji ma szczególne znaczenie, bowiem może powodować powstawanie nowego cementu, zgodnego z substratem. *M. xanthus* może więc być stosowany do wzmocnienia różnych materiałów.

Ponadto *M. xanthus* ma zdolność do ześlizgiwania się na powierzchniach międzyfazowych co powoduje, że może tworzyć kolonie nie tylko na powierzchniach kamiennych, lecz także głębiej w porach. To będzie umożliwiać powstałemu węglanowi wędrówkę w układzie porowatym, wzmacniając go tym samym. Rodriguez-Navarro i in. (5) badali zdolność *M. xanthus* do strącania węglanu wapnia. Doświadczalną bio-mineralizację prowadzono w roztworze przy stałym wstrząsaniu lub w warunkach stacjonarnych, na sterylnym, porowatym wapieniu. Ich doświadczenia można następująco podsumować: (1) jednorodna warstwa węglanu o grubości 10-50  $\mu\text{m}$  pokryła obrabiany kamień; (2) nowy węglan tworzył jednolitą warstwę z substratem, (3) osad kryształów węglanu przylegał mocno do powierzchni porów i z tego powodu był wytrzymałszy na naprężenia mechaniczne w formie uderzeń dźwiękowych, niż kryształy kalcytu we wzmocnianym wapieniu. To tworzywo sięgało do głębokości 500  $\mu\text{m}$ , przy równoczesnym zachowaniu porowatości wapienia. Utworzony bakteryjnie węglan był bardziej odporny na naprężenia mechaniczne, a więc bardziej zwarty niż substrat. Płyta poddana tej obróbce wykazała większą odporność mechaniczną niż przed obróbką, gdyż płyty obrabiane, narażone na uderzenia dźwiękowe wykazały maksymalny ubytek masy wynoszący 0,27% po obróbce M-3 i 0,43% po M-3P, podczas gdy bez obróbki od 0,63% do 0,93%<sup>6</sup>. Pośród płyt po obróbce, sterylizowane wykazywały mniejszą odporność na uderzenia dźwiękowe<sup>7</sup> niż nie sterylizowane.

Ponadto w przypadku stosowania w próbkach kamiennych nie obserwowano wzrostu bakterii w czasie suszenia. W związku ze „śmiercią” komórek nie występował niekontrolowany wzrost bakterii. Bufor fosforanowy miał duży wpływ na wzrost komórek

<sup>6</sup> Ośrodki ciekłe M-3 i M-3P o składach jak w przypisie<sup>4</sup>

<sup>7</sup> Za pomocą uderzeń dźwiękowych można oznaczyć siły adhezji i wzmocnienie w wyniku utworzenia węglanów (5). Uderzenia dźwiękowe usuwają luźne ziarna węglanów w celu pomiaru rzeczywistego wzmocnienia osiągniętego w wyniku obróbki. W odróżnieniu od innych metod, na przykład opór stawiany wierceniu, uderzenia dźwiękowe w wodzie badają także rozpuszczalność kamienia, co ma duże znaczenie, gdyż chemiczne wietrzenie ma duży wpływ na zniszczenie węglanowych elementów kamiennych.

able to induce the formation of phosphates (struvite, schertelite, newberyite), carbonates (calcite, magnesite, vaterite) and sulfates (barite, taylorite). This capacity for biomineralization is of particular importance because, by creating new cement compatible with the substrate, *M. xanthus* may, thus, be used to consolidate a wide spectrum of materials. Furthermore, *M. xanthus* displays gliding motility and, being such a motility linked to interfaces, it could be then able to colonize, not only the surface of the stone, but also more deeply into the stone pores. This will enable the newly formed carbonate to root in the porous system, thus increasing its consolidation efficiency. Rodriguez-Navarro et al. (5) tested the ability of *M. xanthus* to induce calcium carbonate precipitation. Biomineralization tests were conducted in liquid media under constant shaking and stationary conditions, on sterilized porous limestone. They found that: [1] a coherent carbonate of 10–50  $\mu\text{m}$  in thickness coated the treated stones; [2] the new layer carbonate was compatible with the substrate; and [3] the deposited carbonate crystals resulted to be strongly adhered to the surface of the pores, since the newly formed carbonates were more resistant to mechanical stress, in the form of sonication, than the calcite crystals in the stone. This material was rooted down to a depth larger than 500  $\mu\text{m}$ , at the same time maintaining the porosity of the stone. The newly formed bacterial carbonate was more resistant to mechanical stress, i.e., more consolidated, than the substrate. Treated slabs showed a higher mechanical resistance than non-treated ones, since the former showed a maximum mass loss after sonication of 0.27% for M-3 runs and 0.43% for M-3P runs, while non-treated stone showed mass losses ranging from 0.63% to 0.93%<sup>6</sup>. Within treated stone slabs, those sterilized showed less resistance to sonication<sup>7</sup> than those non-sterilized.

Additionally, when applied on stone specimens, no fruiting bodies were observed upon drying. As a result of this cell death, no uncontrolled bacterial growth was observed. The phosphate buffer had a profound effect on the bacterial cell yield and the carbonate productivity, as well as on the supersaturation preceding of the nucleation of carbonate crystals.

According to Jimenez-Lopez et al. (25), despite the success of the restoration methods, which involved the application of a bacterial inoculated culture medium, these procedures were technically

<sup>6</sup> Liquid media used for biomineralization: M-3 [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ , in distilled water, pH 8] and M-3P [1% Bacto Casitone, 1%  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  in a 10 mM phosphate buffer, pH 8]. Bacto Casitone is pancreatic digests of casein. Casein is the main milk protein and a rich source of amino acid nitrogen

<sup>7</sup> Sonication estimates both the adhesion force and the consolidation efficacy of the newly formed carbonates [5]. Sonication removes loose carbonate grains in order to measure the real consolidation achieved in the treatment compared to that of the non-treated stone. Unlike other physical-mechanical tests, such as drilling-resistance, sonication in water also tests the resistance toward dissolution of the treated stone, an important issue considering that chemical weathering strongly contributes to the decay of carbonate stones.



bakterii i wydajność powstawania węglanów, a także na przesyce-  
nie poprzedzające zarodkowanie kryształów węglanów.

Według Jimenez-Lopeza i in. (25) pomimo sukcesów w metodach  
restauracji, które wiązały się z wykorzystywaniem hodowli bakterii,  
te metody były problematyczne technicznie, ponieważ wymagały  
wyspecjalizowanego personelu i aparatury w celu uzyskiwania  
produktów i utrzymywania korzystnych warunków wzrostu bakterii.  
Ponieważ elementy kamienne, które miały być poddane obróbce  
nie są sterylne i mogą zawierać mikroorganizmy, które mogą po-  
wodować strącanie węglanu wapnia.

Z tego względu należałoby raczej zastosować korzystniejszą me-  
todę obejmującą sterylną hodowlę, która mogłaby aktywować w  
środowisku mikrobakteryjnym kamienia, tylko bakterie zdolne do  
spowodowania powstawania pozakomórkowego węglanu wapnia.  
Także badania podjęte zostały na zmienionym wapieniu, który  
był przez stulecia wystawiony na działanie zanieczyszczonego  
środowiska miejskiego (25). W szczególności próbki pochodziły  
ze zniszczonej, wapiennej sterczyny katedry Granada w Hiszpanii.  
W tych doświadczeniach zastosowano trzy kultury bakterii (M-3,  
M-3P i CC<sup>8</sup>), przy czym ze zniszczonego wapienia nie usunięto  
przed obróbką występujących w nim bakterii. Autorzy stwierdzili,  
że zastosowanie tych kultur bakteryjnych spowodowało aktyw-  
ację węglano-gennyh bakterii w środowisku mikro-biologicznym  
kamienia. W związku z tym, zostało wywołane strącanie węglanu  
wapnia.

Badania wytwarzania węglanu wapnia przez różne bakterie,  
uzyskane w różnych kulturach, którymi traktowano niesterylne  
elementy kamienne, wykazały, że **wszystkie wydzielone bakterie**  
były zdolne do wywoływania strącania węglanu wapnia w śro-  
dowiskach kultur M-3 i M-3P. Różniły się jedynie czasem, w którym  
wytwarzały CaCO<sub>3</sub>. Podane rodzaje kolonii występowały w obu  
kulturach. Różnice między nimi sprowadzały się do ilości powsta-  
łych kryształów, których ilość była większa w M-3 niż w M-3P.

We wszystkich przypadkach obrabiane płyty kamienne miały  
większą wytrzymałość mechaniczną (były lepiej wzmocnione) od  
nieobrabianych. Po uderzeniu dźwiękowym ubytek masy kamienia  
był mniejszy od 0,30% podczas gdy pierwotne kamienie miały  
ubytek sięgający 0,85%. Te wyniki pokazują, że samo działanie  
M. xanthus, mikrobiologicznych kolonii, a nawet samej kultury  
zwiększały mechaniczne właściwości kamienia. Natomiast kamień  
sterylizowany przed strącaniem węglanu miał mniejszą odporność  
na uderzenia dźwiękowe (ubytek masy od 0,21% do 0,30% w za-  
leżności od zastosowanej kultury bakteryjnej) niż te elementy,  
które nie były uprzednio sterylizowane (ubytek masy od 0,14% do  
0,20%). Obecność M. xanthus wydaje się ważna dla wzmocnie-  
nia kamienia w przypadku kultury M-3P gdyż najmniejszy ubytek  
masy wiązał się ze stosowaniem tej bakterii. Ponadto materiał  
był nie tylko osadzony na powierzchni lecz znajdował się głęboko

<sup>8</sup> CC: 0,3% Bacto Casitone, 0,4% Ca(CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0,1% CaCl<sub>2</sub>,  
0,3% NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% ekstraktu drożdży w wodzie destylowanej, pH 8.  
Stałe kultury M-3, M-3P i CC zostały przygotowane przez dodatek 1,8%  
agaru do kultury ciekłej.

problematic since they required specialized personnel/equipment  
to manipulate the product and to optimize the conditions for bacte-  
rial growth. Because the stones to be treated are not sterile and  
may contain microorganisms that can induce the precipitation  
of calcium carbonate, a simpler, more user-friendly restoration  
procedure would be to apply a sterile culture medium that could  
activate, from within the microbial community of the stone, only  
those bacteria able to induce the extracellular formation of calcium  
carbonate. Such a study was carried out on altered calcarenite ex-  
posed for centuries to environment and urban contamination (25).  
In particular, the samples were pieces of a deteriorated calcarenite  
pinnacle of the Granada Cathedral (Spain). In this study, three  
culture media (M-3, M-3P and CC<sup>8</sup>) were applied to the altered  
calcarenite in which the microbial community inhabiting the stone  
was not eliminated prior to the treatment. The authors found that  
the application of the culture media to the stone resulted in the  
activation of carbonatogenic bacteria among the microbial com-  
munity of the stone. As a consequence of the activation of those  
bacteria, a new calcium carbonate precipitation was induced.

The study of calcium carbonate production by the different bacteria  
isolated from the culture media in which the non-sterile stones  
were treated showed that all the isolated bacteria were able to  
induce the precipitation of calcium carbonate in M-3 and M-3P  
culture media. The only difference was in the time at which each  
isolated bacteria produced the carbonate. Similar colony types  
were observed in the two culture media. Differences between them  
were related to the different amount of crystals produced, which  
was higher in M-3 than in M-3P.

Treated stone slabs were in all cases more resistant to mechanical  
stress (i.e., more consolidated) than non-treated stone slabs. After  
sonication, the mass loss of treated stones was less than 0.30%,  
while untreated stones lost up to 0.85% of the initial mass (here  
referred to as the mass at the beginning of the sonication treatment).  
These results show that the sole action of M. xanthus, the microbial  
community, and even the culture media alone was able to increase  
the mechanical resistance of the stone. Of the treated stone slabs,  
those sterilized prior to the precipitation experiments showed less  
resistance to sonication (ranging the mass loss between 0.21% and  
0.30% of the initial mass, depending on the culture media) than those  
not previously sterilized (mass losses between 0.14 and 0.20% of  
the initial mass, depending on the culture media). The presence  
of M. xanthus seems to be important for the consolidation of the  
stone in M3-P culture medium, since minimum mass losses were  
observed in M. xanthus-inoculated runs. Moreover, the new mate-  
rial was not only deposited on top of the surface, but it was rooted  
both in the surface and deeply into the porous system of the stone.  
In summary, the proposed treatment effectively consolidates the  
original stone, increasing its resistance to mechanical stress and  
to erosion, making the treated stone more durable.

<sup>8</sup> CC [0.3 wt% Bacto Casitone, 0.4 wt% Ca(CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.1 wt% CaCl<sub>2</sub>,  
0.3% NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 wt% yeast extract in distilled water, pH 8]. Solid M-3,  
M-3P, and CC culture media were prepared by adding 1.8 wt% agar-agar  
to the liquid culture media.

w kamieniu, w układzie porów. Podsumowując, zastosowana obróbka wzmacniała pierwotny kamień, zwiększając wytrzymałość na naprężenia i odporność erozyjną, a więc zwiększając trwałość kamienia.

Ważnym aspektem zabezpieczenia kamiennych elementów ozdobnych jest aby nowy materiał zachował porowatość oryginalnego kamienia. Pod tym względem oraz zgodnie z pomiarami porowatości płyt (25) nie sterylizowane płyty po obróbce zachowują porowatość i rozkład wielkości porów oryginalnego wapienia, jednak wymiar dużych porów został nieco zmniejszony w przypadku kamieni zanurzonych w ośrodku utworzonym przez kulturę CC. W związku z tym, odpowiedni wybór kultury stanowiącej ośrodek jest ważny dla zapewnienia pierwotnej porowatości kamienia w wyniku obróbki zabezpieczającej ozdobne elementy kamienne in situ. Z drugiej strony, obrabiany sterylny kamień wykazał zmniejszenie wymiarów większych porów w stosunku do pierwotnego kamienia. Wyniki pokazują więc, że sterylizacja (przeptywająca para wodna) zmienia układ porów. Trzeba więc zwracać uwagę w procesach zabezpieczania i restauracji, które obejmują wstępne potraktowanie kamienia przed wzmacnianiem (czyszczenie parą) aby nie doprowadzić do zmian porowatości.

Wyniki badań Jimenez-Lopeza i in. (25) wykazały, że badane środowiska kultur były zdolne tylko do aktywacji bakterii wytwarzających węglan wapnia w mikrobiologicznej zbiorowości porowatych wapieni. Ta aktywacja była możliwa, pomimo że środowiska kultur nie zawierały węglowodanów jako źródła węgla. Jest to ważne ponieważ wykluczenie węglowodanów ze składu środowiska kulturowego może usunąć problemy związane z wytwarzaniem kwasu. Środowiska kulturowe wspomagają wzrost organo-chemo-organotroficznych bakterii, które są zdolne do wykorzystywania aminokwasów jako źródła węgla, azotu i energii, to znaczy do wytwarzania alkalicznych środowisk kulturowych przez tlenowe odaminowanie tych kwasów aminowych. Aktywowane bakterie z naturalnego zespołu mikrobiologicznego kamienia były zdolne do wywołania strącania  $\text{CaCO}_3$ , który był zgodny z substratem. Ten nowy  $\text{CaCO}_3$  wzmacniał porowaty wapień bez zatykania porów.

Powodzenie tej metody zostało wykazane tylko w przypadku wapienia z kamieniołomu Escúzar w południowej Hiszpanii. Może ona być jednak skuteczna w przypadku wapieni z innych lokalizacji, ponieważ bakterie wytwarzające węglan są pospolite a wapienie z różnych kamieniołomów mają podobne właściwości. Metoda ta może także być przydatna w przypadku wapieni z basenu morza śródziemnego, gdzie wapień jest jednym z najbardziej popularnych, stosowanych kamieni ozdobnych.

Jedną z zalet tej metody jest, że nie wprowadza ona żadnych nowych mikroorganizmów do obrabianego kamienia. Może to być związane z mniejszym ryzykiem stosowana obecnie do wzmacniania kamieni ozdobnych przez zastosowanie środowisk kulturowych zaszczipiających inne bakterie.

One important aspect in the protection of ornamental stone is that the new phase has to maintain the porosity of the original stone. In this regard and according to the measurements of slab porosity (25), treated non-sterilized slabs maintained the porosity and the pore size distribution of the original stone, although the size of the bigger pores was slightly reduced in those stones immersed in CC culture medium. Therefore, the proper choice of culture medium is also important to ensure that the porosity of the treated stone is not altered. The fact that the non-sterilized treated stones preserve the original stone porosity is critical to use the proposed treatment to protect ornamental stone in situ. On the other hand, treated sterile stone showed a decrease in the size of the bigger pores when compared with that of the original stone. Therefore, the results show that the stone sterilization process (steaming with flowing vapour) alters the stone porosity. Thus, special care must be taken in protection and/or restoration processes that include a pre-treatment of the stone to be consolidated (e.g., using standard vapour steam cleaning), to avoid excessive alteration of stone porosity.

The results of Jimenez-Lopez et al. (25) research showed that the culture media tested were able to activate only calcium carbonate producing-bacteria within the microbial community of the porous limestone tested. This activation was possible even though the culture media did not contain carbohydrates as a source of carbon. This is important, since such an exclusion of carbohydrates from the composition of the culture medium may avoid problems related to acid production. Culture media enhanced the growth of chemo-organotrophic bacteria that are able to use amino acids as a source of carbon, nitrogen, and energy and thus, induce the alkalisation of the culture media by oxidative deamination of such amino acids. The bacteria activated from the natural microbial community of the stone were able to induce the precipitation of a  $\text{CaCO}_3$  that was compatible with the substrate. This new  $\text{CaCO}_3$  consolidated the porous limestone without pore plugging.

Although the success of this method was only demonstrated on limestone from the Escúzar quarry, in southern Spain, the method may also be successfully employed in stone from a wider range of locations because carbonate producing-bacteria are commonly found and limestones from different quarries have similar characteristics. This method may be relevant to the Mediterranean Basin, where limestone is one of the most common and widely used ornamental stones.

One of the advantages of this method is that it does not introduce any new microorganism to stone that is been treated. This may be less risky than the method used at present to consolidate ornamental stone through the application of a bacteria-inoculated culture medium.

De Muynck et al. (23) utilized *Bacillus sphaericus*<sup>9</sup> for a limestone (Euville), frequently employed for building and sculpturing. A char-

<sup>9</sup> *B. sphaericus* is unlikely to cause human disease. No measurable health effects were seen in laboratory animals that were exposed to large concentrations of *B. sphaericus* by multiple routes of exposure. Cases involving human health effects following exposure to this organism are extremely rare. Mild eye and skin irritation may occur in humans following contact with *B. sphaericus*.

De Muynck i in. (23) stosował *Bacillus sphaericus*<sup>9</sup> w przypadku wapienia (Euville) często używanego w budownictwie i w rzeźbiarstwie. Cecha charakterystyczną kamienia z Euville jest duża absorpcja wody. Próbkę zanurzano w ciekłych środowiskach hodowlanych zawierających ekstrakt drożdży, mocznik i chlorek wapnia. Wszystkie doświadczenia ze strącaniem biologicznym przeprowadzono w warunkach statycznych i niesterylnych (dostęp powietrza). Przeprowadzono także doświadczenia z dwoma ortokrzemianami etylowymi stosowanymi jako wzmacniacze. Wzmacniacz 1 składał się z samego ortokrzemianu etylu, natomiast wzmacniacz 2 zawierał 75% ortokrzemianu etylu i 25% ketono-etylu. Próbkę zanurzano w zawierającym je roztworze.

Próbki poddane były bio-osadzaniu wykazywały wzrost masy ze zwiększeniem stężenia mocznika i wapnia stosowanym w środowisku. Wzrost masy nie był jednak proporcjonalny do zwiększenia mocznika i dodatku wapnia.

Mikroanalizy rentgenowskie potwierdziły powstawanie kryształów złożonych z węglanu wapnia. Wielkość kryształów dochodziła do 50 µm. Ze wzrostem stężenia mocznika w środowisku biologicznym otrzymywano gładziej warstwy węglanów. Nie stwierdzono różnic w porowatości i w wymiarach porów poddanych i niepoddanych obróbce próbek.

Próbki, w których przeprowadzono bio-osadzanie wykazywały znacznie mniejszy ubytek masy po poddaniu uderzeniom dźwiękowym w stosunku do nieobrabanego wapienia i osiągnęły podobną odporność na uderzenia dźwiękowe do próbek poddanych działaniu ortokrzemianu etylu.

Obserwacje niewzmacnianych próbek poddanych uderzeniom dźwiękowym wykazały uszkodzenia kamienia w formie tworzenia rys w warstwach kryształów. Bardzo mało lub brak uszkodzeń dotyczyło próbek po bio-osadzaniu, a większość powierzchni pozostała całkowicie pokryta warstwą bio-osadzonych kryształów.

Obecność warstwy osadzonych kryształów ma także pewien wpływ na przepuszczalność wapienia. Jak już wspomniano, przepuszczalność pary wodnej jest ważnym czynnikiem, bowiem pozwala na transport pary wodnej z wnętrza budynku na zewnątrz do otoczenia i na suszenie powierzchni mokrych po deszczu.

Większe stężenia mocznika i chlorku wapnia lub ich kilkakrotne zastosowanie (2-3 razy) powodowało także znaczne zmniejszenie absorpcji wody, w porównaniu do próbek bez obróbki. Próbkę poddane działaniu ortokrzemianu etylu wykazały znacznie mniejszą szybkość absorpcji wody w porównaniu z pierwotnymi próbkami.

Bio-osadzanie spowodowało zmianę chromatyczną obserwowanej powierzchni wapienia. Jednak, ponieważ powierzchnia po obróbce

<sup>9</sup> *Bacillus sphaericus* nie wydaje się powodować chorób u ludzi. Nie stwierdzono wpływu na zdrowie zwierząt laboratoryjnych narażonych na działanie dużych stężeń *B. sphaericus* przez ich roznoszenie. Przypadki związane ze zdrowiem ludzi związane z ich narażeniem na działanie tych bakterii są szczególnie rzadkie. „Piasek” w oczach i podrażnienie skóry mogą występować u ludzi, którzy zetknęli się z tą bakterią.

acteristic feature of Euville stone is its high water absorption. The specimens were immersed in liquid culture media containing yeast extract, urea and calcium chloride. All biodeposition experiments were performed under static and non-sterile (exposed to the air) conditions. Experiments were also performed with two ethylsilicates-based consolidants. Consolidant 1 was composed of 100% ethylorthosilicates, while Consolidant 2 was composed of 75% ethylorthosilicates and 25% methyl ethylketon. These products were applied by immersion of the specimens in the respective solutions.

Biodeposition treated specimens showed increasing mass gain with increasing concentrations of urea and calcium in the biodeposition medium. The increase in mass gain was, however, not proportional to the increase in urea and calcium chloride.

EDX analyses confirmed that the deposited crystals consisted of calcium carbonate. Crystal sizes up to 50 µm or more could clearly be observed. With increasing concentrations of urea in the biodeposition medium, smoother layers of carbonates were obtained. No differences in porosity and pore size distribution could be observed between untreated and biodeposition treated specimens.

Biodeposition treated specimens showed a significantly smaller mass loss upon sonication compared to untreated limestone and showed a similar resistance towards sonication as specimens treated with ethylsilicates.

SEM observations of untreated samples subjected to sonication revealed damage of the stone as a result of fissuring of layers of carbonate crystals. Little or no damage could be observed in the biodeposition treated specimens, as the majority of the surface remained completely covered with a layer of biodeposited crystals.

The presence of a layer of deposited crystals had also a certain influence on the permeability of the limestone. As already mentioned, permeability towards water vapour is an important parameter, since allows water vapour transport from the interior of the building towards the outside environment and drying of wet surfaces after rain. Higher concentrations of urea and calcium chloride or repeated applications (2÷ 3 times) resulted also in a significant decreased of water absorption compared to the untreated specimens. Specimens treated with the ethylsilicate showed a significantly lower rate of water absorption compared to the untreated specimens.

The biodeposition treatment resulted in a change of the chromatic aspect of the limestone surface. However, since the treated surface appeared homogeneous with respect to colour, differences in visual appearance were considered acceptable.

In spite of higher amounts of calcium carbonate precipitated on the limestone specimens, in accordance with the findings of other authors (25), from sonication experiments no increased strengthening effect could be observed for biodeposition treatments with a higher dosage of calcium and urea.

The fact that biodeposition treated specimens showed similar water absorption and resistance towards sonication as limestone speci-

pozostała jednakowego koloru, różnice optyczne w wyglądzie uznano za akceptowalne.

Pomimo strącenia większej ilości węgla wapnia na próbkach wapieni inni autorzy (25) nie stwierdzili zwiększenia odporności tych próbek na uderzenia dźwiękowe po zastosowaniu w procesie bio-osadzania większego dodatku wapnia i mocznika.

Fakt, że objęte bio-osadzaniem próbki miały podobną absorpcję wody i odporność na uderzenia dźwiękowe jak próbki traktowane ortokrzemianami etylu otwiera nową perspektywę zastosowania tej metody w praktyce. Pomimo, że ortokrzemiany etylu są szeroko stosowane do wzmacniania materiałów węglanowych, mają one pewną wadę związaną z ich słabym wiązaniem chemicznym z kalcytem i tendencją do pęknięcia przy suszeniu. W przypadku kamienia węglanowego bio-osadzanie ma nad obróbką ortokrzemianem etylu przewagę związaną z chemiczną zgodnością nowej warstwy z matrycą kamienną. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że bio-osadzanie było stosowane przez 4 dni w optymalnych warunkach. Natomiast w roztworze ortokrzemianu etylu zanurzono próbki na 5 minut.

#### 4.1. Zaprawy biologiczne

Wiadomości i doświadczenie zdobyte przez obróbkę wapienia z zastosowaniem technologii CALCITE pozwoliło na rozwój zaprawy biologicznej dla naprawy małych ubytków na powierzchni wapienia. Celem stosowania zapraw biologicznych było ominięcie problemów związanych z chemiczną i fizyczną niezgodnością zwykle stosowanych zapraw z naprawianym materiałem, szczególnie w przypadku materiałów kruchych.

Biologiczna zaprawa składa się z mieszaniny bakterii, drobno zmielonego wapienia i ośrodka odżywczego, zawierającego sól wapnia. Podobnie do zaprawy wapiennej powstający węgiel wapnia cementuje kruszywa. Cementacja zachodzi jako wynik zarodnikowania i wzrostu kryształów węgla na powierzchni ziarn kruszywa, szczególnie w obszarach ich kontaktu.

Optymalizacja składu kruszywa obejmuje ilość i właściwości trzech głównych składników; to jest proszku wapiennego, odżywek i zaczynu bakteryjnego. Zaprawy oceniano na podstawie ich właściwości (kohezja i kolor), obecności mikropęknięć i wytrzymałości na rozciąganie. Biologiczne zaprawy wymagają stosowania dużej ilości bakterii i w związku z tym musi to wpłynąć na skład medium pokarmowego.

W oparciu o różne czynniki oceny, najlepsze wyniki osiągnięto z jedną częścią zaczynu bakteryjnego (zawierającego  $10^9$  komórek w 1 ml), jedną część pożywki i dwie części proszku wapiennego. Ta technika została z powodzeniem sprawdzona w małej skali na rzeźbach katedry w Amiens i na portalu zamku Argenton (Francja). Wzrokowe obserwacje w ciągu 2 lat po zastosowaniu tej techniki pokazały zadowalające zachowanie naprawionych obszarów (19).

mens treated with ethylsilicates opens perspectives for applications in practice. Although ethylsilicates are widely used as consolidants for carbonate materials, they present some drawbacks such as their poor chemical bonding to calcite and a tendency to crack upon drying. For carbonate-based stones, the biodeposition treatment presents over the ethylsilicates-based treatments the advantage of the chemical compatibility of the newly formed layer with the stone matrix. It should be noted, however, that the biodeposition treatment was applied for a period of 4 days under optimal conditions. The ethylsilicates, on the other hand, were applied using a 5-minute immersion treatment.

#### 4.1 Biological mortar

The knowledge and experiences obtained with the CALCITE Bio-concept treatment for limestone resulted in the development of a biological mortar for the remediation of small cavities on limestone surfaces. The aim of the biological mortar was to avoid some of the problems related to chemical and physical incompatibilities of commonly used repair mortars with the underlying material, especially in the case of brittle materials.

Abiological mortar refers to a mixture of bacteria, finely ground limestone and a nutritional medium containing a calcium salt. Similar to lime mortars, the produced calcium carbonate cements the aggregates together. Cementation occurs as a result of the nucleation and growth of carbonate crystals at the surface of the aggregates, especially at the contact areas between them.

The optimization of the mortar composition encompassed the dosage and characteristics of the three main components, i.e. limestone powder, nutrients and bacterial paste. The mortars were evaluated on the basis of their appearance (cohesion and colour), the presence of micro-cracks and the resistance towards fracturing. The biological mortars required the use of larger amounts of bacteria and, thus, the composition of the nutrient medium must be altered.

Based on the different evaluation parameters, best results were obtained with one part of bacterial paste (containing  $10^9$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ), one part of nutritional medium and two parts of limestone powder. The technique was already successfully tested on a small scale on sculptures of the Amiens Cathedral and on a portal of the Argenton-Château (France). Visual observations 2 years after the application of the treatment indicated a satisfactory appearance of the repaired zones (19).

#### 4.2 Bioremediation of black sulphate crusts

Atmospheric pollution and weathering, characteristic of urban areas, frequently result in disfigurement or damage of stone surfaces of historic buildings by salt crust formation (often gypsum). The latter can represent an opportunity to test bioremediation using microorganisms. Conventional techniques for the removal of these salt crusts from stone have several disadvantages: they can cause colour changes; adversely affect the movement of salts within the stone structure; or remove excessive amounts of the original surface.

## 4.2. Naprawa biologiczna czarnych narostów siarczanowych

Atmosferyczne zanieczyszczenia i wietrzenie typowe dla obszarów miejskich często powodują zniekształcenia i uszkodzenia powierzchni kamiennych budowli historycznych powodując powstawanie narostów solnych (często gipsowych). Te ostatnie mogą dawać sposobność do sprawdzenia napraw biologiczną metodą z użyciem mikroorganizmów. Techniki konwencjonalne stosowane do usuwania tych narostów z kamienia mają szereg wad: mogą spowodować zmianę kolorystyki; odwrotny efekt transportu soli w wewnętrznej strukturze kamienia, lub spowodować usunięcie nadmiernej części pierwotnej powierzchni.

Stosowanie bakterii, stosunkowo współczesna technika w tym obszarze, okazała się przydatna w usunięciu siarczanów z czarnych narostów gipsowych. Bakterie redukujące siarkę mogą spowodować dysocjację gipsu na jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{SO}_4^{2-}$ , a następnie redukcję tych ostatnich, natomiast jony  $\text{Ca}^{2+}$  reagują z dwutlenkiem węgla z utworzeniem węglanu [7]:



Dodatkowo, oprócz eliminacji czarnych narostów, mikrobiologiczne usunięcie siarczanów powoduje także zastąpienie gipsu kalcytem. W związku z tym metoda ta może być traktowana jako specjalny rodzaj techniki bio-osadzania. Heselmeyer i in. (26) osiągnął całkowite usunięcie narostów gipsowych na próbkach marmuru w warunkach laboratoryjnych, stosując *Desulfovibrio vulgaris*. Metoda została dalej udoskonalona przez Ranalli i in. (27), który stosował sepiolit jako nośnik dla *D. vulgaris* i *Desulfovibrio desulfuricans*. Stosowanie sepiolitu nie tylko zapewniło warunki rozkładu beztlenowego i wilgotność, lecz także pozwoliło autorom na skrócenie czasu zabiegu. Dalsze udoskonalenie zastosowania Cappitelli i in. (28), którzy opisali wyższość żelu organicznego (karbo-żel) jako układu dostarczającego bakterie. Zastosowanie karbo-żelu pozwoliło na dłuższą retencję żywych bakterii i znacznie zmniejszyło czas potrzebny na uwężnienie mikroorganizmów w porównaniu do sepiolitu. Ponadto zaproponowano metody zabezpieczające przed strąceniem czarnego siarczku żelaza. Udoskonalona metoda ma wyższość nad stosowaniem kwasu etylenodwuaminoceterooctoowego EDTA, więc nie powstał siarczan sodu (19, 29).

## 5. Zastosowanie przypadku zapraw, betonu i gipsu

Beton z cementu portlandzkiego stał się dzisiaj najczęściej stosowanym materiałem w konstrukcjach, ze względu na niski koszt oraz małe koszty napraw.

Zmniejszenie trwałości betonu jest spowodowane czynnikami zewnętrznymi – siarczany, kwasy, woda morską, a także chlorki i  $\text{CO}_2$ . Ponieważ te oddziaływania korozyjne następują w całej masie betonu, agresywne związki muszą migrować do wnętrza betonu. Przepuszczalność lub rysy są drogami transportu dla gazów i cieczy w betonie.

The use of bacteria, a relatively recent technique in this area, has been successful in removing sulphate from black gypsum crusts. Sulphur-reducing bacteria are able to dissociate gypsum into  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  ions, and the  $\text{SO}_4^{2-}$  ions are, then, reduced by the bacteria, whereas the  $\text{Ca}^{2+}$  ions react with carbon dioxide to form calcium carbonate [7]:



In addition to the elimination of black crusts, microbial removed sulphate results also in the replacement of gypsum by calcite. As such, this method could be considered as a special kind of biodeposition treatment. Heselmeyer et al. (26) obtained the complete removal of gypsum crusts from marble samples in laboratory conditions using a strain of *Desulfovibrio vulgaris*. The procedure was further optimized by Ranalli et al. (27), who used sepiolite as a carrier material for *D. vulgaris* and *Desulfovibrio desulfuricans*. The use of sepiolite not only provided anaerobic conditions and humidity, but also enabled the authors to shorten the treatment time. Additional improvements were made by Cappitelli et al. (28) who described the superiority of an organic gel (Carbogel) as a delivery system for the bacteria. The use of Carbogel allowed for a higher retention of viable bacteria and significantly decreased the time needed for entrapment of the microorganisms as compared to the use of sepiolite. In addition, methods were presented to avoid the precipitation of black iron sulfide. The optimized methodology appeared to be superior to chemical treatments involving the use of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), since no sodium sulphate was formed (19, 29).

## 5. Applications to mortar, concrete and gypsum

Portland cement concrete has clearly emerged as the material of choice for the construction in the world today, due to low cost of materials and construction for concrete structure as well as low cost of maintenance.

Lack of durability of concrete is caused by external agents - sulphates, acid, sea water and also by chlorides,  $\text{CO}_2$ . Since these attacks take place within the concrete mass, the attacking agent must be able to penetrate throughout the concrete. Permeability or cracks are, therefore, the means through which liquid or gases can travel through concrete.

Surface treatments are used in order to limit the infiltration of water and gases – and consequently to reduce the degradation of concrete. Nowadays a broad array of organic and inorganic products is available on the market for the protection of concrete surfaces, such as a variety of coatings, water repellents and pore blockers. These conventional means of protection show, however, beside their favourable influences also a number of disadvantageous aspects such as different thermal expansion coefficient of the treated layers and degradation over time.

In the latter case, although water transfer from outside toward the inside of the concrete treated by water repellent is totally stopped,

Stosuje się obróbkę powierzchniową w celu ograniczenia migracji wody i gazów, a w konsekwencji zmniejszenia stopnia zniszczenia betonu. Obecnie jest dostępnych na rynku szereg organicznych i nieorganicznych materiałów do zabezpieczenia powierzchni betonu, przez wykonywanie powłok środków niezwilżanych przez wodę, lub blokujących pory. Te konwencjonalne metody zabezpieczenia, obok korzystnego wpływu, wykazują jednak szereg niekorzystnych właściwości jak różny współczynnik rozszerzalności cieplnej utworzonych warstw i degradację w czasie.

W tym ostatnim przypadku, aczkolwiek migracja wody z zewnątrz do wnętrza betonu potraktowanego niezwilżalną substancją jest całkowicie zatrzymana, woda w formie gazowej w porach nie może opuszczać betonu i pozostaje obok spolimeryzowanej gumy. W końcu nasycona środkiem niezwilżalnym powierzchnia ulega odwarstwieniu (30, 31).

W związku z negatywnymi efektami ubocznymi niektórych technik tradycyjnych, zaproponowano wzbudzoną bakteriami mineralizację węglanową w celu ograniczenia wnikania wody i gazów do betonu.

Migracja związków chemicznych przez pęknięcia może zniszczyć matrycę cementową i przyspieszyć korozję zbrojenia. Następnie pęknięcia powstają wywołane następującymi czynnikami, na które narażony jest beton:

- zmiany objętości spowodowane skurczem, pęczaniem pod ciągłym obciążeniem, naprężeniami cieplnymi,
- naprężenia wywołane zjawiskami zmęczeniowymi lub różnymi przesunięciami układu konstrukcyjnego.

Pęknięcia konstrukcji betonowych mają tendencję do dalszej propagacji i zwykle wymagają kosztownych napraw. Jest duża liczba dostępnych na rynku materiałów do napraw rys w betonie: żywice, strukturalne żywice epoksydowe i inne mieszaniny syntetyczne. Te rodzaje żywic syntetycznych są stosowane coraz powszechniej do napraw rys w betonie, aczkolwiek mają one znaczne braki szczególnie w zakresie odporności na wietrzenie (32-36). Ponadto ponieważ pękanie konstrukcji betonowych przebiega przez dłuższy czas, szybki środek zaradczy powinien być stosowany powtarzalnie, w razie potrzeby.

Obiecujące wyniki innowacyjnych technik opartych na mikrobiologicznym strącaniu materiału doprowadziły do szeregu badań zastosowania bakterii w przypadku betonu. Stosowano także różne mikroorganizmy w celu zwiększenia wytrzymałości na ściskanie zapraw cementowych.

Odnosząc się do wpływu kwaśnych deszczów na trwałość napraw z bio-osadzaniem, według Morse'a (37); wywołane bakteriami kryształami kalcytu są mniej rozpuszczalne, przy czym zostało to wykazane doświadczalnie, że biologicznie utworzony kalcyt jest mniej rozpuszczalny niż uzyskany bez wpływu bakterii, w wyniku strącania chemicznego.

Hydrolizę mocznika wybrano jako bardzo przydatną metodę do wytwarzania jonów węglanowych, w związku z jego zdolnością do zwiększania zasadowości środowiska. Ponadto mocznik jest

water (in its gaseous form) inside the pores can no longer escape and remains near the polymerized resin. And finally, water repellent induced surface exfoliation (30, 31).

Due to the negative side-effects of some of the conventional techniques, bacterial induced carbonate mineralization has been proposed also to limit the infiltration of water and gases in concrete.

The ingress of chemicals through cracks is able to degrade the material matrix and to accelerate corrosion of the reinforcement. Cracks are a result of the following actions to which concrete can be subjected:

- volumetric change caused by shrinkage, creep under sustained load, thermal stresses;
- direct stresses due to fatigue load or differential movement in structural system.

Cracks in concrete structures tend to expand further and eventually require costly repair. There are a large number of products available commercially for repairing cracks in concrete: structural epoxy, resins, epoxy mortar, and other synthetic mixtures. These types of synthetic resins are extensively used in concrete crack repair, although they display severe deficiencies, especially in terms of scarce durability to weathering (32-36). Moreover, since cracking in concrete structures continues over a long period of time, a quick remedy should also be applied repeatedly as needed.

Promising results of innovative techniques based on microbial mineral precipitation have led to several investigations on the use of bacteria in concrete. Different microorganisms have been used, also, to increase the compressive strength of cement mortar.

Referring to the effect of acidic rain on the durability of the bio-deposition treatment, according to Morse (37) bacterially induced calcite crystals are more resistant to dissolution since it has been experimentally demonstrated that biologically deposited calcite is less soluble than inorganically precipitated calcite.

The hydrolysis of urea was selected as a very suitable pathway for the production of carbonate ions due to its ability to alkalize the environment. Furthermore, urea is an important organic nitrogen carrier in natural environments and is commonly used as an agricultural fertilizer.

Moreover, the ability to hydrolyze urea is widely distributed among indigenous bacteria in soils and groundwater systems. Urea-utilizing bacteria such as *Sporosarcina pasteurii* and *Sporosarcina ureae* are commonly isolated from soil, water, sewage and incrustations on urinals.

Zhong and Islam (38) used the consolidation of sand mixtures for the remediation of cracks in granite. Cracks in granite were packed with a mixture of bacteria, nutrients and a filler material. Among the different materials that were mixed with *Sporosarcina pasteurii*, the silica fume (10%) and sand (90%) mixture lead to the highest compressive strength and lowest permeability. As a further extension to this research, Ramachandran and co-workers (39) investigated the microbiological

ważnym organicznym nośnikiem azotu w naturalnym środowisku i jest stosowany powszechnie w rolnictwie jako nawóz.

Ponadto zdolność mocznika do hydrolizy jest rozpowszechniona wśród bakterii występujących w glebie i wodach gruntowych. Wykorzystujące mocznik bakterie na przykład *Sporosarcina pasteurii* i *Sporosarcina ureae* są powszechnie wyodrębniane w glebie, wodzie, ściekach i inkrustacjach w pisuarach.

Zhong i Islam (38) stosowali konsolidację mieszanin piaskowych do naprawy spękań w granicie. Spękania te wypełniano mieszaniną bakterii, pożywką i wypełniaczem. Pośród różnych materiałów, które były mieszane, kompozycja zawierająca *Sporosarcina pasteurii* z dodatkiem pyłu krzemionkowego (10%) i piasku (90%) miała największą wytrzymałość na ściskanie i najmniejszą przepuszczalność. Jako kontynuację tych doświadczeń Ramachandran i współpracownicy (39) badali mikrobiologiczną naprawę spękań w betonie. Badali strącanie kalcytu wywołane przez *Sporosarcina pasteurii* w dwóch rodzajach próbek zapraw cementu portlandzkiego: jeden sporządzony za zmieszania cementu i piasku z mikroorganizmami przy użyciu buforu fosforanowego i wody zarobowej oraz drugi z utworzonymi spękaniami wypełnionymi bakteriami *S. pasteurii* i pożywką. Doświadczenia wykazały, że nastąpił znaczny wzrost wytrzymałości na ściskanie kostek z zaprawy cementowej zawierającej małą ilość żywych komórek *S. pasteurii* w porównaniu do kostek bez dodatku bakterii. Podczas gdy wytrzymałość na ściskanie kontrolnych kostek po 28 dniach miała  $55 \pm 1$  MPa, próbki z dodatkiem komórek osiągnęły  $65 \pm 1$  MPa. Wytrzymałość na ściskanie uległa jednak zmniejszeniu ze wzrostem zawartości komórek i czasem dojrzewania. W próbkach o wymiarach 25,4 x 25,4 x 152 mm wykonano nacięcia symulujące spękania. Szerokość nacięcia utrzymano w zakresie 0,125 cala (3,175 mm). Spękania w kontrolnych próbkach wypełniono naturalnym piaskiem. Spękania w innych próbkach wypełniono piaskiem i bakteriami. Próbki zawierające bakterie w piasku wykazały znaczny wzrost wytrzymałości na ściskanie oraz sztywność<sup>10</sup>, w porównaniu z próbkami bez komórek. Mikrofotografie uzyskane za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego wykazały, że mikrobiologiczne strącanie kalcytu zachodziło głównie blisko powierzchni spękań gdzie następował wzrost gęsto ułożonych kryształów kalcytu, osadzonych w podłożu złożonym z komórek. Obecność kalcytu ograniczyła się jednak do powierzchni pęknięć. Autorzy przypisali to faktowi, że *S. pasteurii* wzrastają szybciej w obecności tlenu. Ponadto, bardzo zasadowe środowisko betonu (pH 12-13) było głównym czynnikiem hamującym wzrost *S. pasteurii*, których najkorzystniejsze warunki wzrostu występują przy pH 9.

Ramakrishnan i współpracownicy (39) badali wpływ tej techniki na trwałość betonu. Obecność bakterii zwiększała odporność betonu na siarczany, zamrażanie i rozmrażanie oraz skurcz suszenia; wpływ ten był silniejszy w przypadku wzrostu stężenia komórek

<sup>10</sup> Badano sztywność próbek bez i z bakteriami po 28 dniach stosując metodę obciążenia w trzech punktach. Zależność obciążenie – ugięcie naniesiono na wykres i od krzywej dopasowano prostą, której nachylenie przyjęto jako wskaźnik sztywności.

remediation of cracks in concrete. Calcite precipitation induced by *Sporosarcina pasteurii* was studied in two types of Portland cement mortar specimens: one prepared by mixing cement and sand with micro-organisms, using phosphate buffer for water mixing, and the other with simulated cracks filled with *S. pasteurii* bacteria and nutrients. The study showed that there was a significant increase in compressive strength values of the cement mortar cubes containing a low concentrations of living cells of *S. pasteurii* when compared with those without cells. While the 28-day compressive strength of the control cubes reached  $55 \pm 1$  MPa, specimens treated with more cells had a compressive strength of  $65 \pm 1$  MPa. Compressive strengths, however, decreased as cell concentrations and curing time increased. Specimens of dimensions 25.4 x 25.4 x 152 mm were provided with a cut to simulate a crack. The width of the cut was kept at an average of 0.125 in. (3.175 mm). The cracks in the control specimens were filled with natural sand. The cracks in the other specimens were filled with sand and bacteria. The specimens filled with bacteria and sand showed a significant increase in compressive strength and stiffness values<sup>10</sup> when compared with those without cells. Scanning electron micrographs identified that microbiological calcite precipitation occurred mainly close to the surface areas of the crack, where a dense growth of calcite crystals embedded with cells was observed. The presence of calcite was, however, limited to the surface areas of the crack. The authors attributed this to the fact that *S. pasteurii* grows more actively in the presence of oxygen. Still, the highly alkaline pH (12–13) of concrete was a major hindering factor to the growth of the moderate alkaliphile *S. pasteurii*, whose growth optimum is around a pH 9.

Ramakrishnan and co-workers (39) investigated the effect of this technique on the concrete durability. The presence of bacteria increased the resistance of concrete towards alkali, sulphate, freeze-thaw attack and drying shrinkage; the effect being more pronounced with increasing the concentration of bacterial cells. The authors attributed this result to the presence of a calcite layer on the surface, as confirmed by XRD analysis, able to lower the permeability of the specimens. The best results were obtained with the phosphate buffer.

Day et al. (40) investigated the effect of different filler materials on the crack remediation in concrete. Beams treated with bacteria and polyurethane showed a higher improvement in stiffness compared to filler materials such as lime, silica, fly ash and sand. According to the authors, the porous nature of the polyurethane minimizes transfer limitations to substrates and supports the growth of bacteria more efficiently than other filling materials, enabling an accumulation of calcite in deeper areas of the crack.

Ghosh and co-workers (41) studied the effect of addition of the anaerobic microorganisms on the compressive strength of cement–sand mortar and demonstrated the positive effect of the addition of *Shewanella* on the compressive strength of mortar spec-

<sup>10</sup> The specimens with and without bacteria were tested for their stiffness after 28 days using a three points loading method. A load-deflection relationship was plotted and a best-fit line was drawn, the slope of which was taken as the stiffness value.

bakteryjnych. Autorzy przypisują tę zależność obecności warstwy kalcytu na powierzchni; co potwierdzili rentgenograficznie, która zmniejszyła przepuszczalność próbek. Najlepsze wyniki uzyskano z buforem fosforanowym.

Day i in. (40) badali wpływ różnych wypełniaczy na naprawę spękań w betonie. Belecзки poddane działaniu bakterii i poliuretanu wykazały zwiększoną sztywność w porównaniu z wypełniaczami takimi jak wapno, krzemionka, popiół lotny i piasek. Według tych autorów porowata natura poliuretanu zmniejszyła ograniczenia wymiany z substratami i sprzyja wzrostowi bakterii w większym stopniu niż inne wypełniacze, co umożliwia gromadzenie się kalcytu w głębszych obszarach pęknięcia.

Ghosh i współpracownicy (41) badali wpływ dodatku mikroorganizmów beztlenowców na wytrzymałość na ściskanie zapraw cementowych i wykazali korzystny efekt dodatku *Shewanella* na tę wytrzymałość. Mikroorganizmy, z różnymi stężeniami komórek dodawano do zaprawy razem z wodą zarobową. Próbki przechowywano w powietrzu, poza środowiskiem zawierającym pożywkę. Stosując stężenie  $10^5$  komórek w mb stwierdzono wzrost wytrzymałości na ściskanie o 17% i 25% odpowiednio po 7 i 28 dniach. W tych próbkach zauważono obecność włóknistego produktu wewnątrz porów. Jako wynik nastąpił spadek porowatości ze wzrostem trwałości betonu. Korzystny wpływ dodatku *Shewanella* wzrastał wraz z dłuższym czasem przechowywania. W celach porównawczych mikroorganizmy *E. coli* zastosowano także w zaprawach cementowych, jednak nie dały one poprawy wytrzymałości. To skłoniło autorów do wyrażenia opinii, że wybór mikroorganizmu odgrywa ważną rolę w poprawie wytrzymałości na ściskanie zaprawy.

Dwie różne publikacje Jonkera i współpracowników (42, 43) opisują zastosowanie bakterii jako „samoleczącego” dodatku do naprawy spękań w betonie. W przeciwieństwie do wcześniejszych badań taka metoda wymagała obecności wszystkich substratów, mikroorganizmów i pożywek w matrycy w celu minimalizacji substancji pobudzających dodawanych z zewnątrz. Z tego powodu autorzy badali zgodność różnych związków organicznych z matrycą cementową. Ponadto te przydatne bakterie powinny wykazywać zdolność przeżycia dłuższego czasu w betonie. Ponadto bakterie dodawano w formie zarodników<sup>11</sup>, ponieważ one są znane ze zdolności do przetrwania w granicznych obciążeniach mechanicznych i chemicznych. W tych przypadkach stosowano bakterie, które mają zarodniki odporne na zasadowe środowisko i należące do szczepu *Bacillus*: *Bacillus pseudofirmus* oraz *Bacillus cohnii*. W oparciu o te bakterie autorzy zastosowali różne reakcje poczynając od hydrolizy mocznika do uzyskiwania jonów węglanowych. W ten sposób można było uniknąć prawdopodobnego ujemnego wpływu tworzącego się amoniaku na korozję zbrojenia i zniszczenie matrycy cementowej

<sup>11</sup> Zarodnik jest „uśpioną” formą bakterii, w którą może ona sama się przemienić. Zarodniki są ważne, kiedy wypróbowuje się bakterie w środowisku szkodliwym dla przeciętnych warunków utrzymujących ich vitalność, szczególnie dotyczących ich wysuszenia. Zarodniki pozwalają na przeżycie przez bakterie okresów, w których narażone są na szkodliwe środowisko, nawet w ciągu milionów lat. Gdy środowisko staje się znów korzystne, zarodniki mogą same odżyć..

imens. Microorganisms of different cell concentrations were added to mortar mix with the mixing water. These specimens were cured in air and not in a medium containing nutrient. By using a concentration of  $10^5$  cells  $ml^{-1}$ , an increase of the compressive strength of 17% and 25% was observed after 7 and 28 days, respectively. In these samples, the presence of a fibrous material inside the pores was noticed. As a result, a reduction in porosity was observed, with a consequent increase in durability of concrete. The positive effect of the addition of *Shewanella* improved with increasing curing times. For comparison purposes, *E. coli* microorganisms were also used in the cement mortar but no improvement in strength was observed with them. This led the authors to suggest that the choice of the microorganism plays an important role in the improvement of the compressive strength of mortar.

In two different papers, Jonkers and co-workers (42, 43) investigated the use of bacteria as self-healing agents for the autonomous remediation of cracks in concrete. In contrast with the previous studies, such an approach necessitated the presence of all the reaction components, microorganisms and nutrients, in the matrix to ensure minimal externally needed triggers. Therefore, the authors investigated the compatibility of different organic compounds with the cement matrix. Moreover, suitable bacteria should be able to survive the concrete incorporation for prolonged periods of time. In addition, the bacteria were added as spores<sup>11</sup>, as these are known for their ability to endure extreme mechanical and chemical stress. For all those purposes, alkali-resistant spore forming bacteria related to the genus *Bacillus*, *Bacillus pseudofirmus* and *Bacillus cohnii*, were selected. On top of this, the authors chose a different pathway from the hydrolysis of urea for the production of carbonate ions. In this way, possible negative effects of the produced ammonia on the reinforcement, corrosion and degradation of the concrete matrix (when further oxidized by bacteria to yield nitric acid) could be avoided. Among the selected components, calcium lactate did not substantially affect the compressive strength values. Furthermore, the addition of a high number of spores resulted in a decrease of strength lower than 10% (19).

De Belie and De Muynck (44) further investigated the use of microbially induced carbonate precipitation for the repair of cracks in concrete. The use of pure bacteria cultures, as in a previously developed biodeposition procedure, did not result in sufficient calcium carbonate precipitation to completely bridge the cracks. Therefore, the bacteria *B. sphaericus* were protected from the alkaline pH conditions in a silica sol, resulting in the formation of a bioceramic material (sol-gel or biocer) which was able to bridge the cracks completely. However, when bacteria were protected in silica gel, cracks were filled completely.

<sup>10</sup> Spore is a kind of stripped-down, dormancy form that the bacterium can reduce itself to. The spore becomes important when the bacterium is experiencing an environment that is deleterious to the usual vegetative state of the bacterium, notably including when the bacterium is getting dried out (desiccated). Spores enable the survival of a bacterium through periods of environmental stress which may last millions of years. When the environment returns to favourable, the spore can reactivate itself to the vegetative state.



(związane z powstawaniem kwasu azotowego w wyniku dalszego utleniania bakterii). Pośród wybranych składników, mleczan wapnia nie miał zbyt dużego wpływu na wytrzymałość na ściskanie. Ponadto dodatek dużej ilości zarodników spowodował spadek wytrzymałości mniejszy od 10% (19).

De Belie i De Muynck (44) badali stosowanie mikrobiologicznie wywołanego strącania węglanu wapnia do usuwania rys w betonie. Stosowanie czystych kultur bakterii, analogicznych do uprzednio opracowanej metody biologicznego osadzania, nie doprowadziło do wystarczającego strącania węglanu wapnia, powodującego całkowite wypełnienie rys. W związku z tym, aby uchronić bakterie *B. sphaericus* przed środowiskiem zasadowym, wprowadzono zol krzemionkowy powodujący powstawanie materiału bioceramicznego (metoda zol-żel jako biocer) co doprowadziło do całkowitego wypełnienia rys.

Potencjał zupełnego „leczenia” rys oceniano mikroskopowo, za pomocą ultradźwięków oraz próby przepuszczalności wody pod ciśnieniem. Poddawanie rys działaniu bakterii przy stosowaniu metody zol-żel pozwoliło na znaczne zmniejszenie podciągania kapilarnego wody i przepuszczalności jonów. Zastosowanie bakterii spowodowało nieznaczny efekt zabarwienia powierzchni zaprawy i betonu. Otrzymane wyniki były porównywalne do otrzymywanych za pomocą tradycyjnych niezwilżanych wodą dodatków (silany i siloksany) (45).

De Muynck i in. (46) opisali wpływ osadzania biologicznego na trwałość próbek zaprawy o różnej porowatości. Trwałość oceniano w oparciu o badania przepuszczalności i wytrzymałości na degradacyjne procesy. W celu zbadania wpływu porowatości zaprawy na skuteczność tych biologicznych metod przygotowano kostki z zaprawy o różnym stosunku w/c (0,5; 0,6 i 0,7). Im większy był stosunek w/c, tym bardziej porowatą otrzymywano zewnętrzną warstwę zaprawy, wymagającą zabezpieczenia. Stosowano w tych badaniach *B. sphaericus*. Próbkę poddawano przyspieszonej karbonatyzacji, migracji chlorków i cykлом zamrażania oraz rozmrażania. W celu uzyskania wyraźniejszej oceny skuteczności metody bakteryjnej, wyniki porównano z danymi doświadczalnymi, uzyskanymi konwencjonalnymi metodami obróbki powierzchniowej. Strącanie na powierzchni węglanu wapnia zmniejszyło nasiąkliwość w stosunku do wody od 65% do 90%, w zależności od porowatości próbek. W związku z tym, szybkość karbonatyzacji i migracja chlorków zmniejszyła się odpowiednio o 25-30% i 10-40%. Zanotowano także zwiększoną odporność na zamrażanie. Wyniki otrzymane za pomocą biologicznego osadzania były podobne do konwencjonalnych metod naprawy.

W odróżnieniu od tradycyjnych metod zabezpieczania powierzchni powłokami, dających podobny współczynnik nasiąkliwości niezależnie od stosunku w/c, próbki o w/c wynoszącym 0,7 poddane obróbce z użyciem bakterii i wapnia dały gorsze wyniki niż w przypadku osadzania bakteryjnego na próbkach mających w/c 0,5 i 0,6. Zostało to prawdopodobnie spowodowane niepełnym pokryciem powierzchni, co potwierdziły obserwacje pod elektronowym mikroskopem skaningowym. W związku z większą porowatością i udziałem porów

The crack healing potential was illustrated by microscopic evaluation, ultrasound transmission measurements and low pressure water permeability tests. The treatment of cracks with the bacteria incorporated in the sol-gel resulted in a large reduction of capillary water uptake and permeability towards gas. This bacterial treatment resulted in a limited change of the chromatic aspect of mortar and concrete surfaces. The results obtained were comparable to those obtained with conventional water repellents (silanes, siloxanes) (45).

De Muynck et al. (46) reported the effects of biodeposition on the durability of mortar specimens with different porosity. Durability was assessed from the permeation properties and resistance towards degradation processes. In order to investigate the influence of the mortar porosity on the efficiency of the treatment, mortar cubes of various water-cement (w/c) ratios (0.5, 0.6 and 0.7) were prepared. The higher w/c ratios were chosen to simulate the more porous outer layers of mortar as a result of a low quality material needing protection. *B. sphaericus* was used in this study. The specimens were subjected to accelerated carbonation, chloride migration and freeze-thaw regime. To gain a better insight into the efficiency of the bacterial treatments, the results were compared with experimental data and published results of conventional surface treatments. The surface deposition of calcium carbonate crystals decreased the water absorption from 65 to 90% depending on the porosity of the specimens. As a consequence, the carbonation rate and chloride migration decreased of about 25–30% and 10–40%, respectively. An increased resistance towards freezing-thawing was also noticed. The results obtained with the biodeposition treatment were similar to those obtained with conventional surface treatments.

In contrast with conventional surface coatings, showing similar sorptivity coefficient regardless the water-cement ratio, specimens with a w/c equals to 0.7 treated with bacteria and a calcium source showed a higher sorptivity coefficient than the w/c 0.5 and 0.6 biodeposition-treated specimens. This could be due to an incomplete coating of the surface, as observed by SEM on thin section analysis. Due to the larger porosity and to the connectivity of the pores with increasing w/c, the absence of a coating will have a larger effect on the water absorption of specimens possessing a higher w/c than in the case of specimens with a lower w/c.

De Muynck et al. (19) investigated the effects of the type of bacterial culture and medium composition on the parameters affecting the durability of mortar and concrete. Standardized mortar prisms were prepared according to EN 196-1 and cylindrical specimens were drilled out of concrete slabs for gas permeability experiments. Pure bacteria (*B. sphaericus*) and urealytic mixed cultures (obtained through specific cultivation of active biomass) were compared for their effectiveness in relation to conventional surface treatments. For comparison purposes, a number of commercially available water repellents and coatings were chosen in order to compare the experimental results obtained in the study with those relative to conventional surface treatments. The type of bacterial culture and medium composition had a profound impact on CaCO<sub>3</sub> crystal morphology. The use of pure cultures resulted in a pronounced

ciągłych za wzrostem w/c brak powłoki będzie miał większy wpływ na nasiąkliwość próbek wodą w przypadku zwiększonego w/c.

De Muynck i in. (19) badali wpływ rodzaju bakterii i zastosowanego środowiska na czynniki decydujące o trwałości zaprawy i betonu. Przygotowano normowe kostki z zaprawy zgodnie z normą EN 196-1, odwiercono walce z betonowych płyt i przeprowadzono badania wytrzymałości. Czyste bakterie (*B. sphaericus*) i mieszane kultury zawierające mocznik (otrzymane przez specjalną hodowlę aktywnej bio-masy). Porównano zastosowanie tak uzyskanego środowiska biologicznego z tradycyjnymi metodami zabezpieczania powierzchni, przy wykorzystaniu szeregu dostępnych na rynku niezwiązanych wodą i stosowanych jako powłoki środków chemicznych. Zastosowanie czystych kultur biologicznych spowodowało zmniejszenie nasiąkliwości i stosunkowo małe zmiany zabarwienia, w stosunku do mieszanych kultur z mocznikiem używanych jako zaczyn. Wyniki obejmujące podciąganie kapilarne; przepuszczalność dla gazów - były porównywalne z otrzymanymi w przypadku stosowania dodatków niezwiązanych dla wody.

Według De Muynck i in. (19) stosowanie biologicznego osadzania na tworzywach cementowych trzeba rozpatrywać jako metodę nakładania powłok. Można to przypisać głównie powierzchniowemu strącaniu z powodu ograniczonego wnikania bakterii do porowatej matrycy. Grubość warstwy powierzchniowej wynosiła 10-40  $\mu\text{m}$ , a wielkość kryształów sięgała nawet 110  $\mu\text{m}$ . W związku z tym, że chlorki oddziałują szkodliwie na zbrojenia stosowano alternatywnie szczawian wapnia. Nie stwierdzono różnic w działaniu zabezpieczającym tworzywa cementowe w przypadku biologicznego osadzania przy użyciu różnych źródeł wapnia.

Annea i in. (47) przeprowadzili badania laboratoryjne na próbkach gipsu, zgodnie z patentem CALCITE, przy zastosowaniu *B. cereus*. Ta bakteria wywołuje powstawanie warstw na powierzchni gipsu złożonych z kalcytu, halitu i sylwinu. Stwierdzono, że nasiąkliwość maleje w próbkach po obróbce co świadczy o zmniejszeniu porowatości. Można więc stwierdzić, że metoda ta może być stosowana również do materiałów gipsowych. Ta metoda powoduje jednak strącanie soli chlorkowych w porowatym materiale. Autorzy wykazali jednak, że sole te można w znacznym stopniu usunąć przez przemycie próbek co odpowiada wpływowi deszczu w przypadku budynków. Równocześnie warstwa kalcytu nie została usunięta podczas tego przemycia.

Bakterie są trudne do utrzymania na powierzchni zaprawy cementowej z łatwą utratą pożywki, w związku z czym trudno stosować hydrolizę enzymów w sposób ciągły. Duże znaczenie ma także uzyskanie warstwy zabezpieczającej na pionowych płaszczyznach budynków. Agar należy do doskonałych koagulantów, który jest często stosowany w stałym lub semi-stałym środowisku kulturowym, bowiem jego temperatura przechodzenia w fazę stałą jest znacznie niższa niż temperatura topnienia. Wang i in. (48) używali agar jako nośnik bakterii na powierzchni zaprawy, stosując jego topienie. Dawało to możliwość unieruchomienia bakterii i ich pożywki na powierzchni kostki zaprawy, zapewniając mikro-środowisko dla ich wzrostu i reprodukcji. Dzięki temu można było uzyskać warstwę

decrease in uptake of water and less pronounced change in the chromatic aspect, compared to the use of mixed urealytic cultures as a paste. The results obtained – concerning capillary water uptake, gas permeability, chromatic aspect – were comparable to those obtained with conventional water repellents.

According to De Muynck et al. (19), the biodeposition treatment on cementitious materials should be regarded as a coating system. This could be attributed to the fact that the carbonate precipitation was primarily a surface phenomenon due to the limited penetration of the bacteria in the porous matrix. From thin section analysis, the authors observed that the majority of the surface was covered with a layer of crystals with thicknesses within the range of 10–40  $\mu\text{m}$ , in which larger crystals (up to 110  $\mu\text{m}$ ) could be also found. As chloride ions are detrimental for the reinforcement in concrete structures, the use of calcium acetate as an alternative calcium source was investigated. However, no differences in the protective effect were observed between biodeposition treatments with a different calcium source.

Annea et al. (47) performed a bio-treatment in the laboratory on plaster samples following that under patent by the Calcite Bio-concept firm, involving *Bacillus cereus*. This bacterium produced calcite, halite (NaCl) and silvite (KCl) coatings on plaster surfaces. The measurements of water absorption indicated that the water penetration decreased in the treated samples, suggesting that the surface porosity was reduced. As a consequence, this conservation technique appears to be perfectly efficient also on plaster. The process caused also problems, i.e. salt deposit (NaCl and KCl coming from the feeding solution) on and within porous materials. The authors, however, showed that simply washing the sample (by rain, in the real case of buildings) sufficed to remove these salts to a large extent. Nevertheless, the calcite coating was still present and was not removed, and the surface porosity should be reduced due to the calcite deposit only.

Bacteria are difficult to be immobilized on the cement mortar surface and its necessary nutrition is easy to be lost, so the enzyme hydrolyzation is difficult to be performed continuously. But it is very important that in actual application the surface which needs film coating and protection is more on vertical plane. Agar is a kind of excellent coagulant which is often used in microorganism solid culture medium and semisolid culture medium, mainly because its solidification temperature is much lower than its melting temperature. Wang et al. (48) used agar as the carrier of bacteria, brushing it on the cube mortar surface after agar was heated and melted to liquid. Thus, the bacteria and its essential nutriment could be immobilized on cube surface tightly, providing a micro-environment for the growth and reproduction of the bacteria. By this way, a calcium carbonate layer was precipitated on cement mortar surface gradually, and it was possible to obtain a bio-film on its original location. However, compared with the film coating on top plane, the thickness of film was only about 40  $\mu\text{m}$ , lower than a half thickness of the former (horizontal plane): this result was primarily due to the loss of semi-solid cultures from the vertical plane under gravity action.

węglanu wapnia na powierzchni zaprawy cementowej. Jednak warstewka ta w odróżnieniu od poziomych płaszczyzn miała małą grubość wynoszącą tylko 40  $\mu\text{m}$ , a więc połowę w stosunku do poziomej płaszczyzny. Było to spowodowane utratą kultur, wywołaną grawitacją.

## 6. Podsumowanie

Bakterie odgrywają i będą w dalszym ciągu odgrywały ważną rolę w mineralogii gleb i osadów. W związku ze wzrostem rozmaitych badań geo-mikrobiologicznych co doprowadzi do pełniejszego wyjaśnienia złożonej geo-chemicznej roli bakterii.

W porównaniu z tradycyjnymi technikami opisane metody wyróżniają się ekologicznymi zaletami oraz tendencją do poprawy zabezpieczającego działania ze wzrostem czasu. Wszystkie opisane metody są porównywalne ze spotykanymi w przyrodzie procesami powstawania wapieni.

Równocześnie metody biologiczne są pożądane, bowiem strącanie węglanu wapnia wywołane aktywnością biologiczną są wolne od zanieczyszczeń i naturalne.

## 6. Conclusions

The previous discussion reveals that bacteria have played, and are continuing to play, a determinative role in the mineralogical characteristics of most soil and sediment environments. As the number and variety of geo-microbiological studies continue to grow, it is envisaged that the complex geochemical role of bacteria will become clearer.

Compared to the more traditional methods, the techniques described mainly differ in their natural and ecological character and in the fact that the protection acquired tends to increase with age. As a matter of fact, all of the applications reported tend to recreate a naturally-made material in a way that is similar to the limestone substrate. These applications, in fact, follow the same metabolic pathways that result in the formation of limestone in nature.

Moreover, the use of this biological technique is highly desirable even because the calcium carbonate precipitation as a result of microbial activities is pollution free and natural.

## Literatura / References

1. C. Esposito Corcione, A. Prevederio, M. Frigione, Kinetics characterization of a novel photopolymerizable siloxane-modified acrylic resin. *Thermochimica Acta*, **509**, 56–61 (2010).
2. C. Esposito Corcione, M. Frigione, Influence of stone particles on the rheological behavior of a novel photopolymerizable siloxane-modified acrylic resin. *Journal of Applied Polymer Science*, **122**, 942–947 (2011).
3. Esposito Corcione, C.; Frigione, M. UV-cured siloxane-modified acrylic coatings containing birifringent calcarenitic stone particles: photo-calorimetric analysis and surface properties. *Progress in Organic Coatings* 2011, **72**, 522–527.
4. C. Esposito Corcione, M. Frigione, Factors influencing photo-curing kinetics of novel UV cured siloxane-modified acrylic coatings: oxygen inhibition and composition. *Thermochimica Acta*, **534**, 21–27 (2012).
5. C. Rodriguez-Navarro, M. Rodriguez-Gallego, K. Ben Chekroun, M. T. Gonzalez-Muñoz, Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied Environmental Microbiology*, **69**, 2182–2193 (2003).
6. E. Vejmelková, P. Máca, M. Keppert, P. Rovnaníková, R. Cerný, Commercial renovation renders: Mechanical, Hygric, thermal and durability properties. *Cement Wapno Beton*, **78**, 5, 288–298 (2011).
7. A. Webster, E. May, Bioremediation of weathered-building stone surfaces. *Trends in Biotechnology*, **24**, 255–260 (2006).
8. W. De Muynck, K. Cox, N. De Belie, W. Verstraete, Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. *Construction and Building Materials*, **22**, 875–885 (2008).
9. S. Douglas, J. Beveridge, Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **26**, 79–88 (1998).
10. F. G. Ferris, Calcite Precipitation and Trace Metal Partitioning in Groundwater and the Vadose Zone. U.S. Department of Energy. Project Number: 70206, 1999.
11. E. Boquet, A. Boronat, A. Ramos-Cormenzana, Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, **246**, 527–529 (1973).
12. H. Knorre, W. Krumbein, Bacterial calcification. In: R. E. Riding, S. M. Awramik (eds.) *Microbial sediments*, pp. 25–31, Springer-Verlag: Berlin, Germany 2000.

13. W. Stumm, J. J. Morgan, *Aquatic Chemistry*, 3rd ed.; John Wiley: New York, USA 1996.
14. S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, J. P. Perthuisot, Ca-carbonates precipitation and limestone genesis. The microbiologist point of view. *Sedimentary Geology*, **126**, 9-23 (1999).
15. P. Tiano, L. Biagiotti, G. Mastromei, Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation, *Journal of Microbiology Methods*, **36**, 139-145 (1999).
16. E. May, *Biobrush research monograph: novel approaches to conserve our European heritage*. EVK4-CT-2001-00055, 2002-2005.
17. J. Dick, W. De Windt, B. De Graef, H. Saveyn, P. Van der Meeren, N. De Belie, W. Verstraete, Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*, **17**, 357-367 (2006).
18. F. Hammes, N. Boon, J. de Villiers, W. Verstraete, S. D. Siciliano, Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. *Applied Environmental Microbiology*, **69**, 4901-4909 (2003).
19. W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete, Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering*, **36**, 118-136 (2010).
20. J. P. Adolphe, C. Billy, *Biosynthèse de calcite par une association bactérienne aérobie*; CR Academic & Science: Paris, France, **278**, 2873-2875 (1974).
21. J. P. Adolphe, A. Hourimèche, J. F. Loubière, J. Paradas, F. Soleilhavoup, Les formations carbonatées d'origine bactérienne. Formations continentales d'Afrique du Nord. *Bulletin of the Geological Society of France*, **8**, 55-62 (1989).
22. J. P. Adolphe, J. F. Loubière, J. Paradas, F. Soleilhavoup, Procédé de traitement biologique d'une surface artificielle. *European patent 90400G97.0.*, 1990.
23. W. De Muynck, K. Verbeken, N. De Belie, W. Verstraete, Influence of urea and calcium dosage on the effectiveness of bacterially induced carbonate precipitation on limestone. *Ecological Engineering*, **36**, 99-111 (2010).
24. F. G. Ferris, L. G.; Stehmeier, *Bacteriogenic mineral plugging*. U.S. patent 5,143,155., 1992.
25. C. Jimenez-Lopez, F. Jroundi, C. Pascolini, C. Rodriguez-Navarro, G. Piñar-Larrubia, M. Rodriguez-Gallego, M. T. Gonzalez-Muñoz, Consolidation of quarry calcarenite by calcium carbonate precipitation induced by bacteria activated among the microbiota inhabiting the stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **62**, 352-363 (2008).
26. K. Heselmeier, U. Fisher, K. E. Krumbein, T. Warscheid, Application of *Desulfovibrio vulgaris* for the bioconversion of rock gypsum crusts into calcite, *Bioforum*, **89**, 1-2, (1991).
27. G. Ranalli, M. Chiavarini, V. Guidetti, F. Marsala, M. Matteini, E. Zanardini, C. Sorlini, The use of micro-organisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **40**, 255-261 (1997).
28. F. Cappitelli, E. Zanardini, G. Ranalli, E. Mello, D. Daffonchio, C. Sorlini, Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, **72**, 3733-3737 (2006).
29. F. Cappitelli, L. Toniolo, A. Sansonetti, D. Gulotta, G. Ranalli, E. Zanardini, C. Sorlini, Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. *Applied Environmental Microbiology*, **73**, 5671-5675 (2007).
30. G. G. Amoroso, V. Fassina, *Stone decay and conservation. Atmospheric Pollution, Cleaning, Protection*, p. 453, Elsevier: Amsterdam, Holland 1983.
31. M. Camaiti, G. Borselli, U. Matteoli, Prodotti consolidanti impiegati nelle operazioni di restauro. *L'Edilizia*, **10**, 125-134 (1988).
32. M. A. Aiello, M. Frigione, D. Acierno, Effects of Environmental Conditions on Performance of Polymeric Adhesives for Restoration of Concrete Structures. *Journal of Materials in Civil Engineering*, **14**, 185-189 (2002).
33. M. Frigione, M. A. Aiello, C. Naddeo, Water effects on the bond strength of concrete/concrete adhesive joints. *Construction and Building Materials*, **20**, 957-970 (2006).
34. M. Frigione, M. Lettieri, A. M. Mecchi, Environmental effects on epoxy adhesives employed for restoration of historical buildings. *Journal of Materials in Civil Engineering*, **18**, 715-722 (2006).
35. M. Lettieri, M. Frigione, Natural and Artificial Weathering Effects on Cold-Curing Epoxy Resins. *Journal of Applied Polymer Science*, **119**, 1635-1645 (2011).
36. M. Lettieri, M. Frigione, Effects of humid environment on thermal and mechanical properties of a cold-curing epoxy resin. *Construction and Building Materials*, **30**, 753-760 (2012).
37. I. Morse, *The Kinetics of Calcium Carbonate Dissolution and Precipitation*; Mineralogic Society of America, 1983.
38. L. Zhong, M. R. Islam, A new microbial plugging process and its impact on fracture remediation. *Proceedings of the 70th Annual Technical Conference and Exhibition of the Society of Petroleum Engineers*, SPE 30519, pp. 703-715 Dallas, Texas 1995.
39. K. Ramachandran, V. Ramakrishnan, S. Bang, Remediation of Concrete Using Micro Organisms. *ACI Materials Journal*, **98**, 3-9 (2001).
40. J. L. Day, V. Ramakrishnan, S. S. Bang, Microbiologically induced sealant for concrete crack remediation. *Proceedings of the 16th Engineering Mechanics Conference*, Seattle, Washington 2003.
41. P. Ghosh, S. Mandal, B. D. Chattopadhyay, S. Pal, Use of microorganism to improve the strength of cement mortar. *Cement and Concrete Research*, **35**, 1980-1983 (2005).
42. H. M. Jonkers, E. Schlangen, Crack repair by concrete-immobilized bacteria, p. 7, *Proceedings of First International Conference on Self Healing Materials*, Noordwijk; A. J. M. Schmets, S. Van der Zwaag, Eds., The Netherlands 2007.
43. H. M. Jonkers, A. Thijssen, O. Copuroglu, E. Schlangen, Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete, p. 25, *Proceedings of First International Conference on BioGeoCivil Engineering*, Delft, The Netherlands 2008.
44. N. De Belie, W. De Muynck, Crack repair in concrete using biodeposition. *Proceedings of ICCRR Cape Town*, South Africa 2008.
45. K. Tittelboom, N. De Belie, W. De Muynck, W. Verstraete, Use of bacteria to repair cracks in concrete. *Cement and Concrete Research*, **40**, 157-166 (2010).
46. W. De Muynck, D. Debrouwer, N. De Belie, W. Verstraete, Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. *Cement and Concrete Research*, **38**, 1005-1014 (2008).
47. S. Annea, O. Rozenbauma, P. Andreazza, J. L. Roueta, Evidence of a bacterial carbonate coating on plaster samples subjected to the Calcite Bioconcept biomineralization technique. *Construction and Building Materials*, **24**, 1036-1042 (2010).
48. R. Wang, C. Qian, J. Wang, Bio-deposition of a calcite layer on Cement-based Materials by brushing agar-immobilized bacteria. *Advances in Cement Research*, **23**, 185-192 (2011).