



Research Article

Received: August 23, 2025

Accepted: October 8, 2025

Published: November 19, 2025

ISSN 2304-6295

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects

Mazanko, Maria Sergeevna¹
 Prazdnova, Evgeniya Valeryevna¹
 Dyomin, Konstantin Alekseevich¹
 Nikora, Nadezhda Igorevna²
 Kosykh, Alexey Olegovich²
 Ryzhenkova, Darya Yurievna²
 Sytik, Valeria Sergeevna²
 Yelshaeva, Anastasia Mikhailovna²
 Vdovchenkov, Evgeny Viktorovich³
 Panchenko, Vadim Vladimirovich⁴
 Aliluyeva, Ekaterina Vladislavovna⁵
 Aramova, Olga Yurievna⁶
 Kornienko, Igor Valerievich⁷
 Shcheglova, Ekaterina Sergeevna⁸
 Bazhenov, Sergey Vladimirovich⁸
 Berezov, Rodion Vyacheslavovich⁸
 Manukhov, Ilya Vladimirovich⁸
 Rahmani, Hamid⁹
 Bahari, Abbas⁹
 Chistyakov, Vladimir Anatolievich¹
 Kirsanova, Tatiana Aleksandrovna¹⁰

¹ Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation; mmazanko@sfedu.ru (M.M.S.); prazdnova@sfedu.ru (P.E.V.); kdyomin@sfedu.ru (D.K.A.); vladimirchi@yandex.ru;

² Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation; nikorani@mail.ru (N.N.I.); akosyh@donstu.ru (K.A.O.); ryzhenkova.dar@ya.ru (R.D.Y.); anastasiya_el05@mail.ru (E.A.M.)

³ Institute of Oriental Studies of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; vdovchenkov@yandex.ru (V.E.V.)

⁴ The State Museum-Preserve «Tauric Chersonese», Sevastopol, Russian Federation; gemell@yandex.ru (P.V.V.)

⁵ University of Baghdad, Baghdad, Iraq; ezaikina@sfedu.ru (A.E.V.)

⁶ The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation; aramova@sfedu.ru (A.O.Y.)

⁷ North-Caucasus Federal University, Sevastopol, Russian Federation ikornienko@yandex.ru (K.I.V.)

⁸ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation scheglova.es@phystech.edu (S.E.S.); bazhenov1994@gmail.com (B.S.V.); rodion.berezov@phystech.edu (B.S.V.); manukhovi@mail.ru (M.I.V.)

⁹ University of Zanjan, Zanjan, Iran; hrahmani@znu.ac.ir (R.H.); bahari@znu.ac.ir (B.A.)

¹⁰ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russian Federation; 89094001052@mail.ru

Correspondence: * email 89094001052@mail.ru; contact phone [+79094001052](tel:+79094001052)

Keywords:

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Aliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



Ancient building mortars; Tauric Chersonesos; Bacteria; Urease; Self-healing of concrete; Calcium carbonate; Genomic analysis

Abstract:

Bioconcrete is a material that incorporates specific bacterial species along with several additional components beyond those found in conventional concrete. Due to microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP), it has the ability to prevent the propagation of microcracks and to seal them. The bacterial strains employed must remain viable under the harsh conditions of concrete formation, which include high pH, low moisture content, high density, and elevated temperature during curing. It has been hypothesized that bacteria capable of surviving for centuries within ancient construction materials may possess properties advantageous for bioconcrete applications. In this study, viable bacterial spores were isolated from fragments of ancient mortar collected from the ruins of the ancient city of Chersonesus Taurica. This site, a unique monument of Greek architecture that existed until the 15th century AD, is located in the area of modern Sevastopol (Russia). The isolated strains were evaluated for their ability to grow at pH 10, to produce urease, to precipitate calcium carbonate, and to withstand the concrete processing cycle. Genomic sequencing was performed for three selected promising alkalophilic strains. One of them was identified as a potential representative of a previously undescribed species, *Sutcliffeiella* sp., while the other two were identified as *Cytobacillus horneckiae* (all belonging to the family Bacillaceae). Genomic analysis revealed a set of genes associated with carbonate ion production and resistance to alkaline environments.

1 Introduction

Концепция самовосстанавливающегося биобетона основана на использовании микробно-индуцированного осаждения карбоната кальция (Microbial-Induced Calcite Precipitation или MICP), при котором специально отобранные микроорганизмы способствуют образованию кристаллов CaCO_3 , заполняющих трещины в бетонной матрице. Этот процесс имитирует естественные механизмы биоминерализации и может активироваться при появлении трещин без вмешательства человека [1]–[3].

Основные требования к бактериям для биобетона включают способность к образованию эндоспор для выживания в экстремальных условиях, устойчивость к высокому pH (12–13) бетонной среды, способность к осаждению карбоната кальция и сопротивляемость механическим напряжениям во время смешивания бетона. Большинство исследований сосредоточено на использовании бактерий рода *Bacillus* из-за их способности образовывать споры, сохраняющие устойчивость к неблагоприятным условиям на протяжении многих лет [4]–[6]. Применение уреолитических бактерий, таких как *Sporosarcina pasteurii* и различные виды *Bacillus*, показало высокую эффективность в заживлении трещин [7], [8]. Эти бактерии катализируют гидролиз мочевины с образованием аммиака и углекислого газа, что приводит к повышению pH и осаждению CaCO_3 в присутствии ионов кальция [9], [10]. На сегодняшний день накоплено немало данных, свидетельствующих о положительном влиянии бактерий на прочностные характеристики биобетона за счет MICP. Тем не менее, существуют и аргументы, опровергающие опосредованный живыми бактериями вклад MICP в прочность бетона [11], [12].

В первую очередь, эффективность конкретных вариантов технологий биобетона определяется выживаемостью бактерий в среде бетона. Высокая щелочность (pH \approx 13), повышение температуры во время гидратации цемента (до 70°C), механические напряжения при смешивании и ограничение размеров пор с течением времени создают экстремальные условия для микроорганизмов. Ivašková и соавторы анализировали жизнеспособность инкапсулированных в альгинат кальция бактерий *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus cohnii* и *Bacillus halodurans* после помещения в цементный раствор [13]. Было показано, что бактерии разных видов имеют разную выживаемость и теряют ее с разной скоростью, однако к исходу 2–3 недели, процент жизнеспособных спор практически перестает меняться и сохраняется в пределах 2 – 6% по крайней мере до конца 8 недели. Таким образом, выживать в среде бетона могут только крайне устойчивые алкалофильные бактерии.

Анализ бактерий, выделяемых из бетонных конструкций, показал, что большинство из них относятся к филумам Actinobacteria, Proteobacteria и Firmicutes, с преобладанием родов

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



Arthrobacter, *Bacillus* и *Paenibacillus*. Интересно отметить, что спорообразующие Firmicutes (*Bacillus* и *Clostridium* spp.) составляют немалую долю в микробном сообществе бетона, что подтверждает их естественную адаптацию к среде бетона [14]. Такие исследования в основном проводятся на современных конструкциях, либо на изготовленных в лаборатории образцах [14–16]. Особый интерес представляют бактерии, выделенные из древних строительных материалов, т.к. некоторые древние сооружения обладают удивительными прочностными характеристиками, благодаря которым памятники архитектуры сохраняются многие сотни и даже тысячи лет. Вполне возможно, что определенную роль в сохранении прочности играют бактерии, вырабатывающие карбонат кальция. Исследования микробиома исторических памятников показали присутствие специализированных микробных сообществ, адаптированных к экстремальным условиям щелочной, соленой и олиготрофной среды [17–19]. Тем не менее, исследования микробиома древних строительных материалов все еще достаточно ограничены и сосредоточены в основном на деградирующей роли бактерий для памятников архитектуры [18], [20], [21].

Создание нано- и микроразмерных неорганических покрытий является одним из наиболее перспективных способов защиты объектов культурного наследия из известняка и мрамора. Лабораторное тестирование стимулирования биогенного минералообразования на поверхности образцов известняковой кладки из средневекового пещерного города на плато Эски-Кермен (Крым, Россия) показывают перспективность применения этих покрытий для консервации и реставрации известняковых кладок [22], [23].

Настоящее исследование было сосредоточено на выделении и характеристике жизнеспособных бактериальных спор из образцов древнего кладочного раствора из построек Херсонеса Таврического (Севастополь, Россия), уникального памятника греческой архитектуры, основанного в V веке до н.э. и просуществовавшего до XV века н.э. Было выдвинуто предположение, что длительная экспозиция древнего кладочного раствора в естественных условиях могла способствовать селекции бактерий с особыми свойствами адаптации к щелочной среде и способностью к биоминерализации.

Для оценки перспектив практического использования выделенных культур изучалась их способность расти при pH 10, продуцировать уреазу, образовывать кристаллы карбоната кальция и переживать условия процессинга современного бетонного раствора.

2 Materials and Methods

2.1 Sampling of ancient solution

Сбор образцов проводился на раскопках древних сооружений Херсонеса Таврического— эталонного памятника античного и средневекового времени, сохранившегося на территории современного Севастополя (Россия).

Фрагменты и куски раствора были взяты из материалов раскопок в слоях поздней античности и раннего средневековья Херсонеса. Образец №1 представлял собой кладочный раствор из древнего водохранилища. Комплекс городского водохранилища с прилегающими постройками является одним из самых значительных памятников архитектуры, открытых на территории Херсонеса. Центральным сооружением архитектурного ансамбля является прямоугольная цистерна, стены которой сложены на известковом растворе с добавлением песка и дробленой керамики (пуццолановой добавки из тесаных известняковых блоков). Исходя из анализа археологического материала, функционирование комплекса водохранилища относится к III - IX вв. н.э. [24]. Образец №3 представлял собой цемент с керамикой (IV-X век н.э.) из ванны для засолки рыбы (рыбозасолочной цистерны). Большинство цистерн вырублены в скале и построены бутовым или грубо отесанным камнем, стенки оштукатурены прочной цемянкой розового цвета [25]. Отбор образцов производился из облицовки стен цистерн 89 и 90, расположенных на северном берегу Херсонеса. Археологические образцы были взяты в соответствии со стандартной процедурой отбора. После сбора образцы были упакованы в стерильные контейнеры для предотвращения их загрязнения и разрушения, контейнеры были промаркированы уникальными идентификационными номерами и отправлены в лабораторию для дальнейшего изучения.

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



2.2 Isolation of viable ureolytic alkalophilic bacteria capable of precipitating CaCO_3 from ancient solution samples

В первую очередь проводилась тщательная стерилизация поверхности образцов раствора для исключения попадания посторонней микрофлоры. Каждый образец облучался ультрафиолетом (мощность лампы - 30 Вт) по 30 минут с каждой стороны, в общей сложности 3 часа. Затем образцы заворачивались в несколько слоёв стерильной фольги, дробились молотком и разворачивались в стерильном ламинарном боксе. В фольге находились агрегаты древних строительных материалов, крошка и пыль. Крупные фрагменты отбирались стерильным пинцетом, а пыль набиралась на стерильный шпатель. Порции массой 0.1 г равномерно распределялись по поверхности агаризованной среды на чашке Петри.

В качестве питательной среды для выделения бактерий использовалась универсальная питательная среда LB (Luria-Bertani) [26] с добавлением NaOH до pH 10. Чашки инкубировались при комнатной температуре, учет выросших колоний проводился через 18 часов, через сутки и через 3 и 5 суток.

Выросшие на чашках колонии жизнеспособных бактерий отбирались петлей и переносились на следующие среды: LB (pH 10), для выявления свойств алкалофильности; уреазный агар по Кристенсену для обнаружения активности уреазы, LB с внесением 10 г/л лактата кальция для определения способности осаждать кристаллы CaCO_3 . Результаты на уреазном агаре и LB pH10 снимались (учитывались?) через 18 часов, результаты на среде с лактатом кальция учитывались через 48 часов. На среде с pH10 регистрировался рост колоний бактерий, на уреазном агаре наблюдалось ярко-малиновое окрашивание вокруг колоний, свидетельствующее об уреазной активности. Колонии на среде с лактатом кальция микроскопировались с целью выявить кристаллы карбоната кальция. Штаммы, удовлетворяющие требованиям, переносились на твердую LB pH10, проверялись на чистоту методом ищущего штриха и далее помещались в коллекцию.

2.3 Assessment of the survival of bacterial strains in concrete processing conditions

На основе штаммов, выделенных из образцов древнего кладочного раствора, которые обладали наиболее перспективными свойствами (алкалофильность, уреазная активность, способность образовывать карбонат кальция из лактата кальция) и стабильно росли в лабораторных условиях, были изготовлены бактериальные препараты. Предварительное наращивание биомассы бактерий для препарата проводилось на чашках с твердой питательной средой LB (Luria-Bertani) при комнатной температуре в течение двух суток. Препараты готовились на основе твердофазного культивирования, в качестве субстрата использовались гидратированные соевые бобы [27]. Титр живых бактерий, подготовленных для внесения в бетон, составлял $\sim 6 \times 10^8$ КОЕ/г.

Приготовление бетонных кубиков проводилось путем смешивания 100 г цемента, 300 г песка, 150 мл воды и 0.2 г сухого бактериального препарата. Компоненты тщательно перемешивались, заливались в формы. Формы уплотнялись постукиванием и помещались на 30°C. После созревания бетонных кубиков в течение 28 дней, проводился высев жизнеспособных спор бактерий по методике, описанной в п. 2.2, на чашки с питательной средой LB с pH 10. В методику была внесена небольшая модификация, заключающаяся в том, что 1 грамм стерильно измельченного бетона помещался на чашки с питательной средой не напрямую (т.к. частицы бетона мешают корректному учету бактерий), а предварительно суспендировался в 2 мл физ. раствора. Затем суспензия высевалась на чашки с питательной средой LB pH 10. Учет выросших колоний проводился на 5 день после посева.

2.4 Genome-wide sequencing of isolated bacterial strains

Для секвенирования из чистых культур бактерий выделялась геномная ДНК с помощью метода [28]. Качество выделения ДНК оценивалось с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрация ДНК определялась спектрофотометрически на приборе NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Подготовка библиотек проводилась по стандартной методике для полногеномного секвенирования «Neb Next Ultra2» DNA Library Prep Kit for Illumina.



Секвенирование проводилось на Illumina MiSeq (длина прочтений - 250 п.о. с двух сторон фрагментов) с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Файлы FASTQ были получены с помощью ПО bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina).

2.5 Genomic data collection and analysis

Сборка геномов проводилась согласно следующему алгоритму: контроль качества прочтений с помощью FastQC v0.12.0 [29], тримминг адаптеров и низкокачественных оснований в Trimmomatic v0.39 [30], de novo сборка генома в SPAdes v4.1.0 [31] и таксономическая идентификация по базе GTDB [32] с использованием стандартного рабочего процесса GTDB-Tk v2.4.0 с референс-пакетом GTDB R226 [33]. Функциональная аннотация выполнялась с помощью DIAMOND v2.1.9 [34] в режиме protein–protein (blastp) против пользовательской базы белков, сформированной из базы данных AnnoTree [35], а также с помощью программ METABOLIC [36] и Prokka [37] с параметрами по умолчанию.

3 Results and discussion

3.1 Isolation and analysis of viable bacteria from samples of ancient masonry mortar

Был проведен сбор образцов кладочного раствора на раскопках древних сооружений Херсонеса Таврического, а затем был проведен анализ двух образцов. Жизнеспособные споры, заключенные в собранных образцах, активировались и высевались на питательные среды. Отбор колоний различных микроорганизмов для последующего анализа проводился, основываясь на морфологических отличиях. Обсемененность образца 1 (цементный раствор из древнего водохранилища) составила $1.6 \pm 0,3 \times 10^3$ КОЕ, обсемененность образца 3 (ванна для засолки рыбы) составила $5.4 \pm 0,4 \times 10^2$ КОЕ. Из образца 1 были выделены 16 штаммов бактерий (Dr1_1 – Dr1_16), из образца 3 были выделены 8 штаммов (Dr3_1 – Dr3_8). На рисунке 1 представлено фото чашки Петри с выросшими колониями.

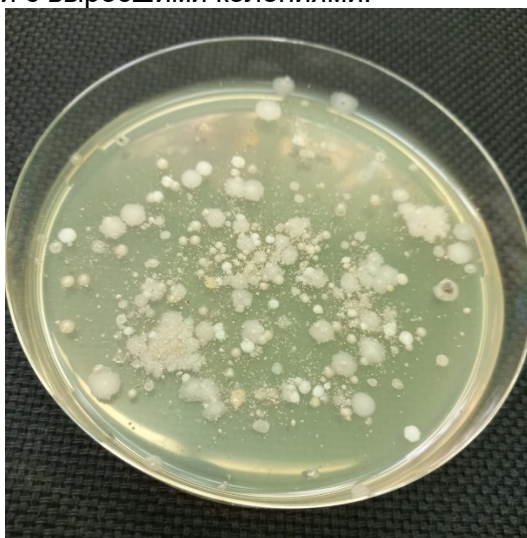


Fig. 1 – Growth of colonies of viable bacteria from the Dr1 sample. The image was made by the author of the article

Рис. 1 - Рост колоний жизнеспособных бактерий из образца Dr1. Изображение выполнено автором статьи

Все изолированные штаммы исследовались на алкалофильность, уреазную активность и способность образовывать карбонат кальция из лактата кальция. Интересно, что, хотя большинство выделенных штаммов не вырабатывали уреазу, некоторые штаммы, наоборот, обладали ярко выраженной уреазной активностью (рис. 2).

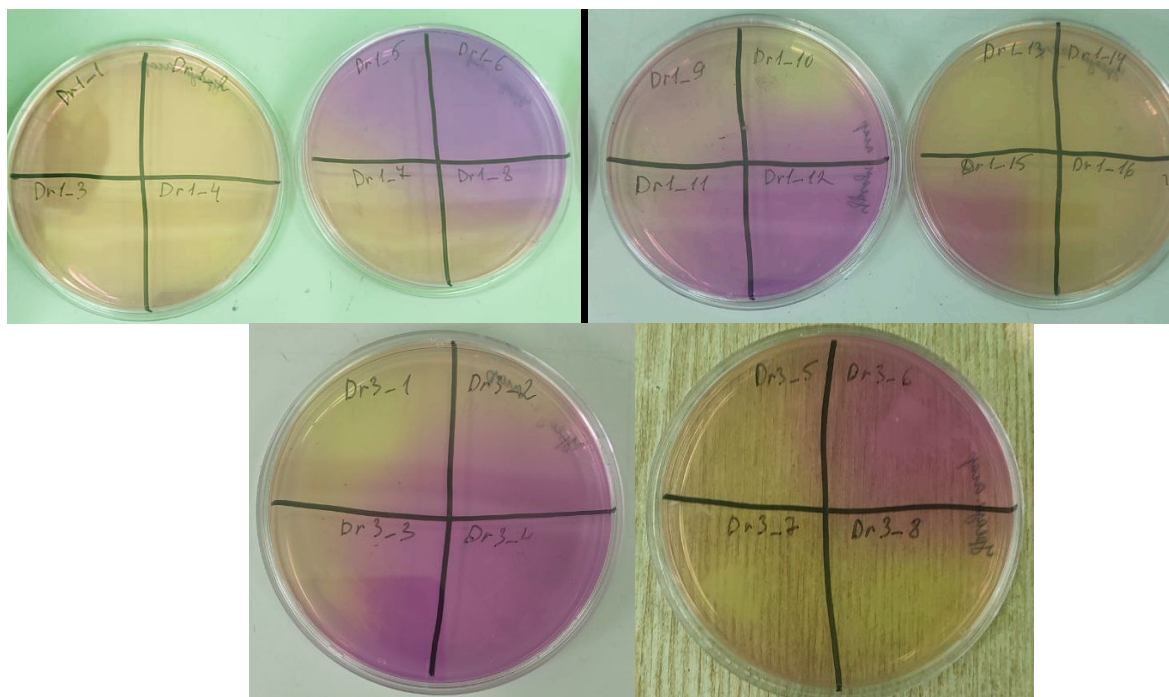


Fig. 2 – Urease activity of strains of viable bacteria isolated from samples of ancient building materials (strain number is indicated on the plate). The image was made by the author of the article
Рис. 2 - Уреазная активность штаммов жизнеспособных бактерий, выделенных из образцов древних строительных материалов (номер штамма указан на чашке). Изображение выполнено автором статьи

Можно предположить, что именно наличие высокой уреазной активности обеспечило сохранность археологических образцов за тысячелетний период. Свойства изолятов представлены в таблице 1.

Table 1 – Properties of viable strains isolated from samples of ancient building materials
Таблица 1 - Свойства жизнеспособных штаммов, выделенных из образцов древних строительных материалов

Код штамма	Рост при pH10	Образование CaCO_3 из лактата кальция	Уреазная активность
Образец 1			
Dr1_1	+++	-	-
Dr1_2	+++	-	-
Dr1_3	+++	-	-
Dr1_4	++	-	-
Dr1_5	+++	-	+
Dr1_6	+++	-	+++
Dr1_7	+++	-	-
Dr1_8	+++	-	-
Dr1_9	+++	-	+
Dr1_10	+++	-	-

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;
 2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



Dr1_11	+++	-	-
Dr1_12	-	-	+++
Dr1_13	-	-	-
Dr1_14	++	-	-
Dr1_15	+++	-	++
Dr1_16	-	-	-
Образец 3			
Dr3_1	+	+	-
Dr3_2	+++	-	-
Dr3_3	+++	-	-
Dr3_4	+++	+++	+++
Dr3_5	++	-	-
Dr3_6	++	+	+
Dr3_7	+	-	-
Dr3_8	+++	-	-

Интенсивность роста на щелочной среде, образования кристаллов CaCO_3 , окрашивания уреазного агара оценивали визуально. «-» - отсутствие изучаемого признака. «+» - слабая интенсивность роста (образования кристаллов CaCO_3 , окрашивания уреазного агара); «++» - средняя интенсивность роста (образования кристаллов CaCO_3 , окрашивания уреазного агара); «+++» - высокая интенсивность роста (образования кристаллов CaCO_3 , окрашивания уреазного агара).

Среди выделенных штаммов было мало изолятов, обладающих способностью разлагать лактат кальция с образованием нерастворимой соли. Единственный штамм Dr3_4 образовывал крупные кристаллы (рис. 3), ещё 2 были способны образовать только мелкие разрозненные кристаллы, остальные не усваивали лактат из среды. Практически все бактерии были способны расти в алкалофильных условиях. К сожалению, рост большинства штаммов оказался нестабильным в лабораторных условиях.

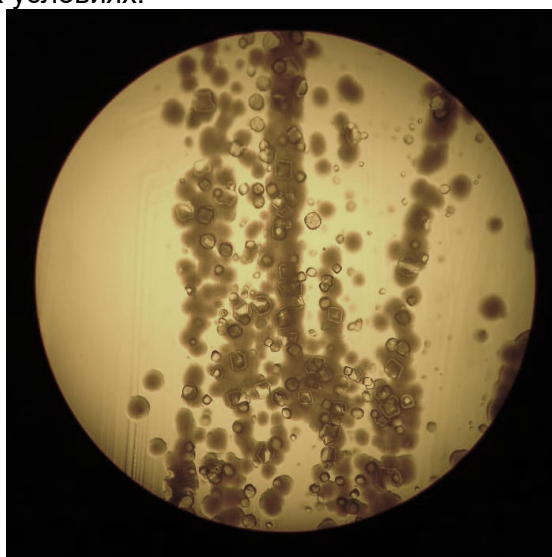




Fig. 3 – Calcium carbonate crystals formed in the biomass of the colony of strain Dr3_4. The image was made by the author of the article

Рис. 3 - Кристаллы карбоната кальция, образовавшиеся в биомассе колонии штамма Dr3_4. Изображение выполнено автором статьи

Для дальнейших исследований были отобраны штаммы, стабильно растущие в лабораторных условиях – Dr1_2, Dr1_6, и Dr3_4. Все они обладали способностью расти в щелочных условиях, штаммы Dr1_6 и Dr3_4 обладали высокой уреазной активностью, а Dr3_4, помимо этого, продемонстрировал также высокую выработку карбоната кальция из лактата кальция.

Уреолитические виды бактерий, устойчивые к щелочам, наиболее часто используются для самовосстанавливающихся цементных материалов [38], [39]. Благодаря уреазной активности, они могут разлагать мочевины ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) на аммиак (NH_3) /аммоний (NH_4^+) и карбонат-ионы (CO_3^{2-}). Осаждение карбоната кальция бактериями может быть обусловлено как действием клеточной стенки, так и механизмом карбоангидразы [6]. Отрицательно заряженная клеточная стенка может сорбировать положительно заряженные ионы кальция, которые затем соединяются с карбонат-ионом, образуя CaCO_3 . Механизм действия карбоангидразы при осаждении CaCO_3 включает катализ гидратации CO_2 , что приводит к образованию ионов бикарбоната, которые могут реагировать с ионами кальция с образованием твердого CaCO_3 . Интересно, что среди выделенных уреолитических штаммов (Dr1_6 и Dr3_4) только один обладал способностью формировать кристаллы карбоната кальция, что может быть обусловлено особенностями регуляции уреазы [10]. Hammes и соавторы [40] показали, что кальцификация в процессе уреолитического микробного осаждения карбоната была штаммоспецифичной, и эта специфичность была обусловлена главным образом различиями в экспрессии уреазы при разных концентрациях кальция.

Объекты окружающей среды, особенно с неблагоприятными условиями, могут быть хорошим источником перспективных штаммов бактерий для инженерного применения. Например, в прибрежной зоне штата Тамил Наду (Индия) из образцов песчаника и морских отложений были выделены штаммы, обладающие высокой уреазной и кальцификационной активностью, потенциально применимые для укрепления береговой линии за счет цементации пляжного песка [41], [42]. Gandhi и соавторы [43] использовали штаммы бактерий, выделенных со свалок, для создания биокирпичей с применением MICP. Так, с муниципального полигона твердых отходов Пирана (Индия) были изолированы восемь штаммов, два из которых (*Bacillus altitudinis* PN3 и *Bacillus thaonhiensis* PN7) продемонстрировали в 2–2.5 раза более высокую активность уреазы и карбоангидразы, лучшую адаптируемость к изменениям pH и температуры, а также улучшенные биоминерализующие свойства. Спорообразующие бациллы для самовосстановления бетона были выделены Otiniano и соавторами из почв известняковых шахт Симбал, Трухильо, Ла-Либертад, Перу [44]. Источником бактериального сообщества внутри бетона могут выступать его компоненты, такие как крупный гравий, песок и т.д. [14].

3.2 Survival of bacteria from ancient structures in the conditions of concrete maturation

Из исследованных бактерий наилучшую выживаемость в условиях созревания бетона показали штаммы Dr1_6 и Dr3_4, немного хуже выживал штамм Dr1_2. Титр бактерий Dr1_6 составлял 4.2×10^3 на 1 грамм бетона, Dr3_4 - 1.1×10^3 на 1 грамм бетона, Dr1_2 - 2.1×10^2 на 1 грамм бетона. На рисунке 4 представлено фото чашки Петри с выросшими колониями микроорганизмов, пережившими процесс созревания бетона.



Fig. 4 – Bacteria of the Dr1_6 strain, re-seeded from a concrete sample. The image was made by the author of the article

Рис. 4 - Бактерии штамма Dr1_6, повторно высеянные из образца бетона. Изображение выполнено автором статьи

Выживание бактерий в бетоне является проблемой, несмотря на способность спор противостоять механическим и химическим воздействиям и длительный срок их жизни. Основными препятствиями к выживанию являются высокая щелочность бетона (pH может составлять около 13 после гидратации обычного портландцемента) и относительно небольшой размер пор из-за гидратации цемента [45]. Jonkers и соавт. показали, что диаметр пор в образцах цемента, выдержанных в течение 3 и 7 дней, составлял 0.1–1 мкм, а спустя 28 дней выдержки он был уже 0.01–0.1 мкм, что меньше среднего диаметра бактериальной споры [46]. Кроме того, споры должны выдерживать высокое напряжение сдвига во время смешивания, высокие температуры во время гидратации цемента и напряжение дегидратации после затвердевания. Можно предполагать, что количество сохраняющихся жизнеспособных спор бактерий будет достаточным для того, чтобы при растрескивании свежего биобетона споры были активированы попавшими (даже небольшими) количествами влаги и питательных веществ и запустили процесс самовосстановления бетона.

3.3 Identification and genomic characterization of bacterial strains isolated from ancient building materials

Геномы штаммов, обладающих наиболее перспективными свойствами (алкалофильность, уреазная активность, способность образовывать карбонат кальция из лактата кальция), а также показавших хорошую повторную выживаемость в бетоне, были секвенированы. Полногеномный анализ с помощью базы GTDB позволил идентифицировать эти штаммы как *Sutcliffeiella sp.* и *C. horneckiae* (Таблица 2).

Table 2 – Results of genomic identification of strains isolated from an ancient solution
Таблица 2 - Результаты геномной идентификации выделенных из древнего раствора штаммов

Номер	Род и вид	Ближайший геномный референс	Идентичность с ближайшим геномом	Относительная эволюционная дивергенция
Dr1_2	<i>Sutcliffeiella sp.</i>	N/A	N/A	0.96268
Dr1_6	<i>C. horneckiae</i>	GCF_002835735.1	99.3	-
Dr3_4	<i>C. horneckiae</i>	GCF_002835735.1	99.3	-

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



Анализ результатов таксономической классификации показал, что изолят Dr1_2 представляет собой новый, не описанный ранее вид в составе рода *Sutcliffiella*. Геном не имел достаточного сходства с существующими референсными геномами GTDB для присвоения видового статуса, что подтверждается отсутствием средней нуклеотидной идентичности (closest genome ANI) к ближайшему типовому штамму и невозможностью применения пороговых критериев видовой принадлежности. Филогенетическая классификация на основе размещения в дереве маркерных генов определила таксономическую принадлежность изолята только до родового уровня с высоким значением относительной эволюционной дивергенции (RED value = 0.96), что указывает на значительную генетическую обособленность от описанных представителей рода и подтверждает статус данного изолята как кандидата в новые виды, требующего дальнейшего исследования.

Аннотация геномов изученных штаммов выявила ряд генов, ассоциированных с продукцией карбонат ионов и устойчивостью к щелочным условиям (рис 5). Поиск генов уреазы в геномах данных бактерий показал, что два штамма, классифицированные как *C. horneckiae* (Dr1_6, Dr3_4), обладают как тремя субъединицами уреазы (*ureCAB*), так и вспомогательными уреазными белками (*ureDEFG*). Обнаружение генов *ureCAB* и *ureDEFG* согласуется с результатами фенотипического определения активности уреазы у этих двух штаммов, показавших хорошую уреазную активность (таблица 1). Кроме того, два из трёх штаммов кодируют карбоангидразу (Dr1_2, Dr1_6), фермент, катализирующий превращение двуокси углерода в карбонат. Интересно, что фенотипически именно эти два штамма никак не проявляли карбоангидразную активность и не были способны осажждать карбонат кальция. Напротив, штамм *C. horneckiae* Dr3_4, в геноме которого не обнаружилась карбоангидраза, проявлял хорошую способность к кальцификации. Противоречие между наличием генов карбоангидразы и фенотипическим проявлением свойств кальцификации может быть объяснено высказанным ранее предположением о штаммоспецифических особенностях регуляции экспрессии генов уреазы, а также свидетельствует о возможности существования механизма осаждения карбоната, не опосредованного карбоангидразой.

Также было обнаружено, что *Sutcliffiella* sp. имеет гены транспорта эктоина, обеспечивающего устойчивость к засолению и щелочным условиям.

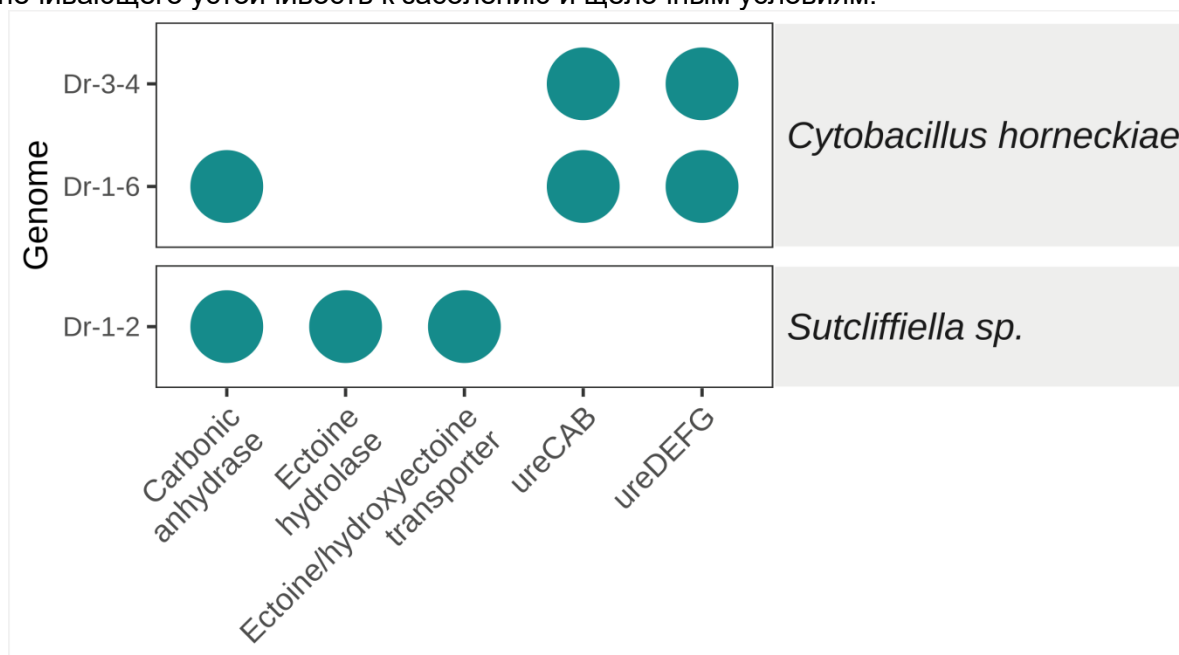


Fig. 5 – The results of the functional annotation of the studied bacterial strains

Рис. 5 - Результаты функциональной аннотации изученных штаммов бактерий

Cytobacillus является родом в семействе Bacillaceae, представители которого известны своей способностью выживать в экстремальных условиях и способствовать процессам осаждения карбоната кальция, опосредованных активностью уреазы или выработкой карбоангидразы. Хотя специальные исследования *Cytobacillus* в биобетоне отсутствуют, его

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



принадлежность к семейству Bacillaceae предполагает, что он может иметь сходные применения. Исследования подтверждают успешное применение различных видов *Bacillus* для улучшения прочностных характеристик бетона и заживления трещин в нем [47].

Несомненным преимуществом обнаруженных в данном исследовании штаммов *Cytobacillus* является их способность выживать в щелочной среде. Как древние строительные материалы в момент создания, так и бетон имеют высокий уровень pH, и *Cytobacillus*, вероятно, адаптирован к этим условиям, что делает его потенциальным кандидатом для применения в самовосстанавливающемся бетоне. Подобно видам *Bacillus*, *Cytobacillus* также может образовывать спящие споры, которые могут выживать в экстремальных условиях и активироваться при возникновении благоприятных условий (например, влажности), обеспечивая долгосрочную функциональность в биобетоне. Таким образом, хотя прямых доказательств нет, характеристики *Cytobacillus* предполагают, что он может играть роль в микробном самовосстановлении бетона, особенно из-за его вероятных возможностей биоминерализации и устойчивости к окружающей среде [48].

Род *Sutcliffiella* относится к грамположительным палочковидным бактериям семейства Bacillaceae. Он был описан только в 2020 г., и в него вошел ряд видов бактерий, ранее относившихся к роду *Bacillus* [49]. Представители этого рода были обнаружены в различных экстремальных местообитаниях. Так, Bai и соавторы [50] сообщили о выделении штамма *Sutcliffiella* DG-18T из образцов пустынной почвы, отобранных в пустыне Кубуци во Внутренней Монголии, Китай. Он был способен расти при температуре 4–40 °C и pH 8.0–10.0. Термофильный штамм *Sutcliffiella* sp. BAT, способный расти при температуре 28–46 °C, был выделен Муратовой и соавторами из резервуара для испарения воды на батарее отопления. В его геноме были обнаружены плазмиды с генетическими детерминантами, кодирующими ряд ферментов и метаболитов, которые могут способствовать адаптации к экстремальным условиям путем активации процессов спорообразования и формирования биопленок [49].

Таким образом, выделенные в ходе данной работы штаммы способны переносить неблагоприятные условия, характерные для бетона (высокий pH и температура, низкое содержание питательных веществ), и могут служить перспективными добавками, повышающими прочностные характеристики самовосстанавливающихся строительных материалов.

4 Conclusion

Было установлено наличие жизнеспособных спор бактерий во фрагментах древнего строительного раствора археологического памятника Херсонес Таврический. Выделенные штаммы бактерий были идентифицированы как *Sutcliffiella* sp. и *C. horneckiae*, они обладают алкалофильностью, два из них - высокой уреазной активностью и один - способностью к образованию кристаллов карбоната кальция. Выделенный изолят *Sutcliffiella* представляет собой новый, не описанный ранее вид в составе рода. Показана способность клеток обнаруженных штаммов выживать в достаточном количестве при повторном процессе созревания бетона. За счет чего можно предположить, что изолированные штаммы могут служить основой для разработки перспективных биодобавок для самовосстанавливающегося биобетона. Проверка этого предположения станет предметом дальнейших исследований.

5 Acknowledgements

Авторы работы выражают благодарность профессору Е.И. Ватину за помощь в организации исследований.

6 Fundings

This research was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 24-44-20012, <https://rscf.ru/en/project/24-44-20012/>.

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



7 Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Wong, P.Y., Mal, J., Sandak, A., Luo, L., Jian, J. and Pradhan, N. (2024) Advances in Microbial Self-Healing Concrete: A Critical Review of Mechanisms, Developments, and Future Directions. *Science of The Total Environment*, **947**, 174553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174553>.
- 2 Elgendy, I.M., Elkaliny, N.E., Saleh, H.M., Darwish, G.O., Almostafa, M.M., Metwally, K., Yahya, G. and Mahmoud, Y.A.-G. (2024) Bacteria-Powered Self-Healing Concrete: Breakthroughs, Challenges, and Future Prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **52**, kuae051. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuae051>.
- 3 Beskopylny, A.N., Shcherban', E.M., Stel'makh, S.A., Shilov, A.A., Chernil'nik, A., El'shaeva, D. and Chistyakov, V.A. (2024) Analysis of the Current State of Research on Bio-Healing Concrete (Bioconcrete). *Materials*, **17**, 4508. <https://doi.org/10.3390/ma17184508>.
- 4 Tziviloglou, E., Wiktor, V., Jonkers, H.M. and Schlangen, E. (2016) Bacteria-Based Self-Healing Concrete to Increase Liquid Tightness of Cracks. *Construction and Building Materials*, **122**, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.06.080>.
- 5 Wang, J., Jonkers, H.M., Boon, N. and De Belie, N. (2017) *Bacillus Sphaericus* LMG 22257 Is Physiologically Suitable for Self-Healing Concrete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 5101–5114. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8260-2>.
- 6 Benjamin, B., Zachariah, S., Sudhakumar, J. and Suchithra, T.V. (2023) Bacterial Consortium Development and Optimization for Crack Controlling Cement Mortar. *Journal of Building Engineering*, **77**, 107501. <https://doi.org/10.1016/j.jobeb.2023.107501>.
- 7 Amer Algaifi, H., Abu Bakar, S., Rahman Mohd. Sam, A., Ismail, M., Razin Zainal Abidin, A., Shahir, S. and Ali Hamood Altowayti, W. (2020) Insight into the Role of Microbial Calcium Carbonate and the Factors Involved in Self-Healing Concrete. *Construction and Building Materials*, **254**, 119258. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119258>.
- 8 Hou, C., Wang, C., Zheng, L., Peng, J., Yuan, T., Huang, H. and Lu, X. (2024) Interfacial Crack Self-Healing by *Sporosarcina Pasteurii*: From Medium Optimization to Spore Encapsulation. *Biointerphases*, **19**, 061006. <https://doi.org/10.1116/6.0004099>.
- 9 Castro-Alonso, M.J., Montañez-Hernandez, L.E., Sanchez-Muñoz, M.A., Macias Franco, M.R., Narayanasamy, R. and Balagurusamy, N. (2019) Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. *Frontiers in Materials*, **6**, 126. <https://doi.org/10.3389/fmats.2019.00126>.
- 10 Aramova, O.Y., Kornienko, I.V., Chistyakov, V.A., Alliluyeva, E.V. and Kirsanova, T.A. (2024) Properties of the Urease Enzyme as a Component of Self-Healing Concrete. A Review. *Construction of Unique Buildings and Structures*; 113 Article No 11310. <https://doi.org/10.4123/CUBS.113.10>.
- 11 Pei, R., Liu, J., Wang, S. and Yang, M. (2013) Use of Bacterial Cell Walls to Improve the Mechanical Performance of Concrete. *Cement and Concrete Composites*, **39**, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2013.03.024>.
- 12 Skevi, L., Reeksting, B.J., Hoffmann, T.D., Gebhard, S. and Paine, K. (2021) Incorporation of Bacteria in Concrete: The Case against MICP as a Means for Strength Improvement. *Cement and Concrete Composites*, **120**, 104056. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2021.104056>.
- 13 Ivaškė, A., Gribniak, V., Jakubovskis, R. and Urbonavičius, J. (2023) Bacterial Viability in Self-Healing Concrete: A Case Study of Non-Ureolytic *Bacillus* Species. *Microorganisms*, **11**, 2402. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102402>.
- 14 Kiledal, E.A., Keffer, J.L. and Maresca, J.A. (2021) Bacterial Communities in Concrete Reflect Its Composite Nature and Change with Weathering. Lax, S., Ed., *mSystems*, **6**, e01153-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01153-20>.

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; *Construction of Unique Buildings and Structures*; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



- 15 Kiledal, E.A., Moxley, I., Shevchenko, O., Goff, J.L. and Maresca, J.A. (2024) Genome Sequence of *Methylobacterium Fujisawaense* Strain C14, Isolated from Concrete. Becket, E., Ed., *Microbiology Resource Announcements*, **13**, e00531-24. <https://doi.org/10.1128/mra.00531-24>.
- 16 Maresca, J.A., Moser, P. and Schumacher, T. (2017) Analysis of Bacterial Communities in and on Concrete. *Materials and Structures*, **50**, 25. <https://doi.org/10.1617/s11527-016-0929-y>.
- 17 Nigro, L., Mura, F., Toti, M.P., Cirigliano, A. and Rinaldi, T. (2022) Carbonatogenic Bacteria on the 'Motya Charioteer' Sculpture. *Journal of Cultural Heritage*, **57**, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2022.09.009>.
- 18 Adamiak, J., Otlewska, A., Tafer, H., Lopandic, K., Gutarowska, B., Sterflinger, K. and Piñar, G. (2018) First Evaluation of the Microbiome of Built Cultural Heritage by Using the Ion Torrent next Generation Sequencing Platform. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **131**, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.040>.
- 19 Dyda, M., Pyzik, A., Wilkojc, E., Kwiatkowska-Kopka, B. and Sklodowska, A. (2019) Bacterial and Fungal Diversity Inside the Medieval Building Constructed with Sandstone Plates and Lime Mortar as an Example of the Microbial Colonization of a Nutrient-Limited Extreme Environment (Wawel Royal Castle, Krakow, Poland). *Microorganisms*, **7**, 416. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100416>.
- 20 Negi, A. and Sarethy, I.P. (2019) Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microbial Ecology*, **78**, 1014–1029. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01366-y>.
- 21 Li, Q., Zhang, B., Wang, L. and Ge, Q. (2017) Distribution and Diversity of Bacteria and Fungi Colonizing Ancient Buddhist Statues Analyzed by High-Throughput Sequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **117**, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.018>.
- 22 Rudenko, A.P., Namsaraev, Z.B., Komova, A.V., Loboda, A.Yu., Mandrykina, A.V., Krashennnikov, S.V., Sharikov, R.V., Gurieva, P.V., Kovalenko, E.S., Khairedinova, E.A., Tereschenko, E.Yu., Aibabin, A.I. and Yatsishina, E.B. (2023) Application of Biogenic Mineral Formation for the Preservation of Limestone Masonry at the Eski-Kermen Archeological Site. *Nanobiotechnology Reports*, **18**, 141–151. <https://doi.org/10.1134/S2635167623010123>.
- 23 Руденко, А.П., Намсараев, З.Б., Комова, А.В., Лобода, А.Ю., Мандрыкина, А.В., Крашенинников, С.В., Шариков, Р.В., Гурьева, П.В., Коваленко, Е.С., Хайрединова, Э.А., Терещенко, Е.Ю., Айбабин, А.И. и Яцишина, Е.Б. (2024) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОГЕННОГО МИНЕРАЛООБРАЗОВАНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ИЗВЕСТНЯКОВЫХ КЛАДОВ СРЕДНЕВЕКОВОГО ГОРОДА НА ПЛАТО ЭСКИ-КЕРМЕН. *Российские нанотехнологии*, **19**, 133–144. <https://doi.org/10.56304/S1992722323010120>.
- 24 Ковалевская, Л.А. и Седикова, Л.В. (2005) К Вопросу о Водоснабжении Херсонеса в Позднеантичную Эпоху. *Материалы по археологии, истории и этнографии Таврики*, 71–93.
- 25 Романчук, А.И. (1973) Новые Материалы о Времени Строительства Рыбозасолочных Цистерн в Херсонесе. *Античная древность и средние века*, 45–53.
- 26 Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 14. print., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 27 Mazanko, M.S., Gorlov, I.F., Prazdnova, E.V., Makarenko, M.S., Usatov, A.V., Bren, A.B., Chistyakov, V.A., Tutelyan, A.V., Komarova, Z.B., Mosolova, N.I., Pilipenko, D.N., Krotova, O.E., Struk, A.N., Lin, A. and Chikindas, M.L. (2018) Bacillus Probiotic Supplementations Improve Laying Performance, Egg Quality, Hatching of Laying Hens, and Sperm Quality of Roosters. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **10**, 367–373. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9369-4>.
- 28 Sidoruk, K.V., Levitin, E.I., Sviridov, B.V., Piksasova, O.V. and Shustikova, T.E. (2021) A Method of DNA Extraction from a Wide Range of Objects via Treatment with Ammonium Salts. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **57**, 899–906. <https://doi.org/10.1134/S0003683821080056>.

Mazanko, M.; Prazdnova, E.; Dyomin, K.; Nikora, N.; Kosykh, A.; Ryzhenkova, D.; Sytik, V.; Yelshaeva, A.; Vdovchenkov, E.; Panchenko, V. Alliluyeva, E.; Aramova, O.; Kornienko, I.; Shcheglova, E.; Bazhenov, S.; Berezov, R.; Manukhov, I.; Rahmani, H.; Bahari, A.; Chistyakov, V.; Kirsanova, T.

Microorganisms from ancient unique structures: physiology, genetics, application prospects;

2025; Construction of Unique Buildings and Structures; 119 Article No 11904. doi: 10.4123/CUBS.119.4



- 29 Andrews, S. (2010) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.scienceopen.com/book?vid=45910064-0c10-468b-8ac3-025edade0c9d>.
- 30 Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- 31 Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. and Pevzner, P.A. (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, **19**, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- 32 Parks, D.H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A.J., Chaumeil, P.-A. and Hugenholtz, P. (2022) GTDB: An Ongoing Census of Bacterial and Archaeal Diversity through a Phylogenetically Consistent, Rank Normalized and Complete Genome-Based Taxonomy. *Nucleic Acids Research*, **50**, D785–D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>.
- 33 Chaumeil, P.-A., Mussig, A.J., Hugenholtz, P. and Parks, D.H. (2020) GTDB-Tk: A Toolkit to Classify Genomes with the Genome Taxonomy Database. Hancock, J., Ed., *Bioinformatics*, **36**, 1925–1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>.
- 34 Buchfink, B., Reuter, K. and Drost, H.-G. (2021) Sensitive Protein Alignments at Tree-of-Life Scale Using DIAMOND. *Nature Methods*, **18**, 366–368. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>.
- 35 Mandler, K., Chen, H., Parks, D.H., Lobb, B., Hug, L.A. and Doxey, A.C. (2019) AnnoTree: Visualization and Exploration of a Functionally Annotated Microbial Tree of Life. *Nucleic Acids Research*, **47**, 4442–4448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz246>.
- 36 Zhou, Z., Tran, P.Q., Breister, A.M., Liu, Y., Kieft, K., Cowley, E.S., Karaoz, U. and Anantharaman, K. (2022) METABOLIC: High-Throughput Profiling of Microbial Genomes for Functional Traits, Metabolism, Biogeochemistry, and Community-Scale Functional Networks. *Microbiome*, **10**, 33. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01213-8>.
- 37 Seemann, T. (2014) Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics*, **30**, 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- 38 Stepanov, N.A., Efremenko, E.N., Bruyako, M.G. and Grigoreva, A.I. (2017) CHANGES OF CONSTRUCTION MATERIAL PROPERTIES WITH ADDITION OF BACTERIAL CELL BIOMASS POSSESSING UREASE ACTIVITY INTO THE MATERIALS. *Vestnik MGSU*, 788–796. <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2017.7.788-796>.
- 39 Xu, J., Tang, Y., Wang, X., Wang, Z. and Yao, W. (2020) Application of Ureolysis-Based Microbial CaCO₃ Precipitation in Self-Healing of Concrete and Inhibition of Reinforcement Corrosion. *Construction and Building Materials*, **265**, 120364. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.120364>.
- 40 Hammes, F., Boon, N., De Villiers, J., Verstraete, W. and Siciliano, S.D. (2003) Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4901–4909. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4901-4909.2003>.
- 41 Prince Prakash Jeba Kumar, J., Rajan Babu, B., Nandhagopal, G., Ragumaran, S., Ramakritinan, C.M. and Ravichandran, V. (2019) In Vitro Synthesis of Bio-Brick Using Locally Isolated Marine Ureolytic Bacteria, a Comparison with Natural Calcareous Rock. *Ecological Engineering*, **138**, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2019.07.017>.
- 42 Sreekala, A.G.V., Saraswathy, S.M., Nathan, V.K. and Uppuluri, K.B. (2025) Genomic and Biochemical Investigations in the Biomineralizing Potential of an Isolated Marine Ureolytic Bacillus Sp. N₉. *Science of The Total Environment*, **964**, 178591. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178591>.
- 43 Gandhi, H., Beladiya, U., Poriya, M., Vaghela, J., Mevada, V., Patel, R. and Kothari, C. (2025) Carbon Capture and Sequestration through Landfill-Derived Bacillus Strains: Enhanced Microbially Induced Calcite Precipitation for Sustainable Bio-Brick Production. *Construction and Building Materials*, **491**, 142600. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2025.142600>.



- 44 Otiniano, N.M., Farfán-Córdova, M., Cabeza, J.G. and Cabanillas-Chirinos, L. (2024) Isolation and Selection of Spore-Forming Bacilli with Potential for Self-Healing of Concrete. *Scientific Reports*, **14**, 27223. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77241-9>.
- 45 Tang, Y. and Xu, J. (2021) Application of Microbial Precipitation in Self-Healing Concrete: A Review on the Protection Strategies for Bacteria. *Construction and Building Materials*, **306**, 124950. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.124950>.
- 46 Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O. and Schlangen, E. (2010) Application of Bacteria as Self-Healing Agent for the Development of Sustainable Concrete. *Ecological Engineering*, **36**, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.036>.
- 47 Yamasamit, N., Sangkeaw, P., Jitchaijaroen, W., Thongchom, C., Keawsawasvong, S. and Kamchoom, V. (2023) Effect of Bacillus Subtilis on Mechanical and Self-Healing Properties in Mortar with Different Crack Widths and Curing Conditions. *Scientific Reports*, **13**, 7844. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34837-x>.
- 48 Ahmed, S.O., Nasser, A.A., Abbas, R.N., Kamal, M.M., Zahran, M.A. and Sorour, N.M. (2021) Production of Bioconcrete with Improved Durability Properties Using Alkaliphilic Egyptian Bacteria. *3 Biotech*, **11**, 231. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02781-0>.
- 49 Муратова, А.А., Семенчукова, Е.А., Попова, И.В., Охремчук, А.Э. и Валентович, Л.Н. (2024) Выделение Термофильных Бактерий *Sutcliffeiella* Sp. Bat и Молекулярно-Генетический Анализ Их Генома. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*, **16**, 90–110.
- 50 Bai, P., Zhang, S., Chen, Y., Ping, W., Pang, H., Du, J., Li, Y. and Zhang, J. (2022) *Sutcliffeiella* Deserti Sp. Nov., Isolated from Desert Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **72**. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005259>.