

巴氏芽孢杆菌固化污染土的培养优化与矿化机制

陈永贵¹, 江昭明¹, 付俊^{1,2}, 周罕², 文子豪¹

(1. 同济大学土木工程学院, 上海 200092; 2. 中国有色金属工业昆明勘察设计研究院有限公司, 昆明 650051)

摘要: 微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)作为生态友好、可持续的污染土固化技术,关键在于能高效产脲酶的微生物。通过菌液配制以及微生物优化培养试验,研究了振荡转速、温度、培养基pH值等培养条件对巴氏芽孢杆菌生长及脲酶活性的影响规律,并结合傅里叶变换红外光谱、X射线光电子能谱、X射线衍射和扫描电镜等方法分析了生物矿化沉淀的生成机制。结果表明,210 r·min⁻¹下振荡转速培养基溶氧量高,细菌浓度及脲酶活性也较高;初始接种量为0.5%时培养基营养物质得到充分利用,细菌增殖速度快;30℃为细菌最佳生长环境温度;细菌耐受pH值范围为5~10,偏酸性环境能延缓脲酶活性达到峰值的时间,偏碱性环境更有利于激发脲酶活性;尿素质量浓度为5~25 g·L⁻¹时细菌生长速率较快,脲酶活性高。MICP过程在细菌的胞外聚合物上进行,生成的碳酸钙主要由菱形方解石和少量球形球霏石组成。

关键词: 微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP);污染土固化;巴氏芽孢杆菌;尿素;矿化机制

中图分类号: TU528.01

文献标志码: A

Optimization of *Sporosarcina pasteurii* Culture and Mineralization for Soil Solidification

CHEN Yonggui¹, JIANG Zhaoming¹, FU Jun^{1,2}, ZHOU Han², WEN Zihao¹

(1. College of Civil Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Kunming Prospecting Design Institute of China Nonferrous Metals Industry Co., Ltd., Kunming 650051, China)

Abstract: The microbial-induced calcite precipitation (MICP) method represents an ecologically friendly and sustainable microbial treatment and remediation technology designed for soil solidification and contamination, and the efficacy of the method depends on the microorganism adept at urease production. A comprehensive investigation was conducted to study the impacts of factors such as oscillating speed, temperature,

medium pH on the growth and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*. The underlying mechanisms of biomineralization precipitation were revealed by synergistically utilizing techniques such as Fourier transformation infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction, and scanning electron microscopy. The findings unequivocally demonstrate that an oscillating speed of 210 r·min⁻¹ coincides with heightened levels of dissolved oxygen within the medium, thereby fostering elevated bacterial concentrations and augmented urease activity. The judicious utilization of an initial inoculum quantity amounting to 0.5% of the medium constituents engenders maximal nutrient consumption and precipitates rapid bacterial proliferation. A temperature of 30℃ is established as the ideal for fostering bacterial growth, striking a balance between avoiding dormancy due to lower temperatures and evading protein denaturation and inactivation attributed to excessive heat. The bacterial consortia exhibit a notable resilience across a pH spectrum spanning 5 to 10, with acidic conditions eliciting a prolonged interval for urease activity to attain its zenith. Despite this delay, the pinnacle of urease activity remains relatively unaltered, whereas an alkaline milieu is conducive to accentuating urease activity. Urea, as a pivotal determinant, exerts a direct influence on the adenosine triphosphate (ATP) synthesis, which is crucial for bacterial energy metabolism, and thus profoundly affecting both bacterial proliferation and urease activity. Notably, a urea concentration ranging from 5 to 25 g·L⁻¹ fosters expedited bacterial growth rates coupled with heightened urease activity. The MICP process was carried out on extracellular polymers of bacteria, and the generated calcium carbonate was mainly composed of rhombic calcite and a small amount of spherical vaterite.

Keywords: microbial-induced calcite precipitation (MICP); contaminated soils solidification; *Sporosarcina*

收稿日期: 2023-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(42125701);云南省万人计划产业技术领军人才科技项目(云发改人事[2019]274号);中铝国际重点科研项目(CJ2021JS-06)

第一作者: 陈永贵,教授,博士生导师,工学博士,主要研究方向为环境工程地质和非饱和土力学。

E-mail: cyg@tongji.edu.cn



论文
拓展
介绍

pasteurii; urea; mineralization mechanism

微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)是一种生态友好、可持续的微生物固化与修复污染土技术^[1]。MICP技术不仅能有效固化土体,减少表面扬尘^[2],还对土体中铜、铅、镉、铬、砷等金属污染物具有良好的去除效果^[3]。近年来,在我国金属矿产资源开发过程中,废石尾渣、选矿废水、废气浮尘中的重金属元素成为主要污染源,引起矿区及周边农田土壤生态环境持续性破坏^[4]。为此,开展基于MICP技术的重金属污染土固化研究具有重要的理论意义与工程价值。

在MICP污染土固化过程中,需要将矿化所需的菌液和胶结液(一般为尿素和钙盐的混合溶液)注入土体内部。菌液为矿化反应提供脲酶,并为CaCO₃晶体的形成提供成核位点。因此,细菌产生脲酶的能力以及碳酸钙的生成速率直接影响污染土的固化和修复效果。不少学者选用高脲酶活性的巴氏芽孢杆菌进行科学研究和工程应用,Whiffin^[5]首先使用巴氏芽孢杆菌进行砂土固化;Turner等^[6]利用巴氏芽孢杆菌修复混凝土裂缝,使其渗透系数降低了一个数量级;Li等^[7]利用巴氏芽孢杆菌主导的MICP反应去除溶液中的Cu²⁺、Pb²⁺和Cd²⁺重金属离子;Zeng等^[8]则将巴氏芽孢杆菌用于重金属污泥处理,可交换态Cd减少了48.54%,而残留态Cd增加了81.77%,巴氏芽孢杆菌相对丰度达53.18%。以上研究说明巴氏芽孢杆菌在提升土体力学性能、控制土体渗透性、减轻溶液和土体重金属污染方面均有良好表现。

目前对MICP污染土固化的试验研究虽然已经开展,但是大多针对不同试验条件下的固化效果,培

养条件对巴氏芽孢杆菌生长及脲酶活性影响的相关试验研究较少,且未能优选出各因素的合理取值,尤其是培养基中尿素的影响机制仍不明晰。孙潇昊等^[9]认为,尿素分解产生的OH⁻会导致细菌生长受限,脲酶活性增强,但更多学者认为偏碱性环境下细菌生长代谢更为旺盛^[3,10]。Sridhar等^[11]通过理论计算和试验结果相验证的方式指出,尿素能提供细胞生长所需的氮源,对于稳定细菌微环境pH值有重要作用。Pei等^[12]指出,细菌在缺乏尿素或铵根离子的条件下无法正常生长代谢。此外,尿素缺失还会影响CO₃²⁻的供应,进而限制MICP反应的进行。因此,有必要对包括尿素在内的巴氏芽孢杆菌生长和脲酶活性影响因素进行研究。

此外,实际工程中环境的多样性和复杂度较高,对巴氏芽孢杆菌的耐受性具有显著影响;另一方面,细菌诱导矿化过程伴随着一系列生化反应,对细菌本身的生存或生长也会产生不同程度的影响。因此,通过菌液配制以及微生物优化培养试验,揭示培养条件对巴氏芽孢杆菌生长及脲酶活性的影响规律;采用微观试验对生物矿化沉淀进行表征分析,阐明MICP反应机制,为MICP技术治理污染土提供依据。

1 试验材料与方法

1.1 细菌选用及菌液制备

常用矿化细菌的脲酶活性值见表1。对比可知,巴氏芽孢杆菌有着其他矿化细菌难以媲美的高脲酶活性。同时,脲酶活性越高,生成碳酸钙的速率越快,生成量越多,固化土壤和减轻污染的效果越好^[13]。因此,选用巴氏芽孢杆菌进行研究。

表1 几种矿化细菌脲酶活性对比

Tab.1 Comparison of urease activity of mineralized bacteria

细菌种类	脲酶活性/(mmol·(L·min) ⁻¹)	细菌种类	脲酶活性/(mmol·(L·min) ⁻¹)
巴氏芽孢杆菌	17.10~18.90 ^[14]	苏云金芽孢杆菌	5.58~6.39 ^[15]
巨大芽孢杆菌	4.59~5.31 ^[16]	球形芽孢杆菌	1.71~2.16 ^[17]
枯草芽孢杆菌	3.78~4.59 ^[18]	迟缓芽孢杆菌	0.81~1.80 ^[19]

研究所用巴氏芽孢杆菌(*Sporosarcina pasteurii*, ATCC 11859)来自上海微生物保藏中心。先在固体酪蛋白-大豆蛋白脲培养基(尿素20 g·L⁻¹,酪蛋白脲15 g·L⁻¹,大豆蛋白脲5 g·L⁻¹,氯化钠5 g·L⁻¹,琼脂20 g·L⁻¹)上培养细菌,再接种到液体酪蛋白-大豆蛋白脲培养基(尿素20 g·L⁻¹,酪蛋白脲15 g·L⁻¹,大豆蛋白脲5 g·L⁻¹,氯化钠5 g·L⁻¹)中

进一步活化,得到高活性的巴氏芽孢杆菌。培养基使用前需在121℃、0.15 MPa条件下灭菌20 min,尿素需溶解后过0.22 μm滤膜加入培养基中。将30℃条件下培养24 h的固体培养基中聚集菌落接种到灭菌后的液体培养基中,在恒温水浴振荡器中以30℃、180 r·min⁻¹的条件培养细菌30 h。细菌在4℃下保存。

1.2 微生物优化培养试验

以 OD_{600} (波长600 nm下样品的光密度)表征细菌浓度;将1 mL菌液与9 mL浓度为 $1.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尿素混合,测量5 min内混合液电导率的变化值,乘以稀释倍数(10)和11.11换算值以表征细菌脲酶活性^[5]。试验测得30 h时细菌 OD_{600} 为2.132,脲酶活

性为 $15.481 \text{ mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$ 。培养完成后的菌种于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。不同影响因素的工况设置见表2。接种细菌至灭菌后的CASO+尿素培养基中并振荡培养60 h,每隔12 h测定菌液的 OD_{600} 、脲酶活性,对照组为未接种巴氏芽孢杆菌的灭菌培养基。试验设计及接种如图1所示。

表2 微生物培养条件优化试验设计

Tab.2 Experimental design for optimization of microbial culture conditions

影响因素	变量范围	其他条件
振荡转速/($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	150、180、210	1.0%接种量、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=7$ 、尿素质量浓度 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
接种量/%	0.5、1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0	$180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=7$ 、尿素质量浓度 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
温度/ $^{\circ}\text{C}$	20、25、30、35、40	$180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、1.0%接种量、 $\text{pH}=7$ 、尿素质量浓度 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
培养基pH值	2、3、4、5、6、7、8、9、10	$180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、1.0%接种量、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、尿素质量浓度 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
尿素质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5、10、15、20、25、30	$180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、1.0%接种量、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}=7$

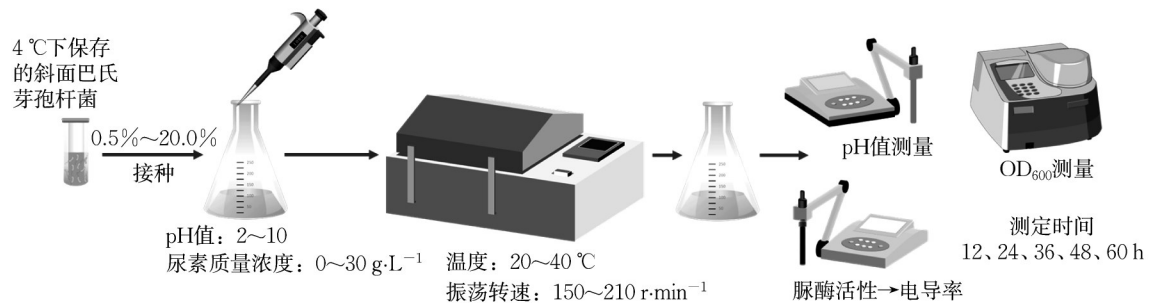


图1 试验设计及接种

Fig.1 Experimental design and bacterial inoculation

1.3 生物矿化沉淀的表征

将等量的10 mL处于生长对数期的菌液和 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的胶结液(尿素:CaCl₂浓度比=1:1)充分混合后静置10 min,经 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min后得到生物矿化沉淀。沉淀物经冷冻干燥处理并研磨成粉末,使用 0.075 mm 筛网筛分后上机测试。采用扫描电镜(Zeiss Sigma 300, SEM-EDS)对生物沉淀进行形貌拍摄和能谱点扫。使用X射线衍射仪(Bruker D2 PHASER, XRD)的铜靶对矿化沉淀进行物相分析,扫描范围为 $5^{\circ}\sim 80^{\circ}$,步长为 0.02° ,并使用MDI Jade 6.5软件对测试结果进行处理。使用傅里叶变换红外光谱仪(Thermo Scientific Nicolet iS20, FT-IR)对生物沉淀中主要功能基团进行分析,扫描波数范围为 $400\sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 。使用X射线光电子能谱仪(Thermo Scientific K-Alpha, XPS)对样品进行表面成分测试,利用结合能为 284.80 eV 的C1s峰进行校准。

2 试验结果

2.1 振荡转速的影响

$30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,振荡转速对巴氏芽孢杆菌生长曲

线和脲酶活性的影响如图2所示。巴氏芽孢杆菌属于严格好氧菌,缺少氧气会影响其正常代谢活动^[20-21]。振荡转速直接决定了培养基中的溶氧量,从而影响巴氏芽孢杆菌的生长曲线及脲酶活性。从图2可以看出, $210 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时 OD_{600} 峰值相较于 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时分别提高了35.16%和12.23%,随着振荡转速的降低脲酶活性受到抑制,表明缺氧条件下细菌代谢活动减缓,难以保持脲酶的高活性水平。

Martin等^[21]指出,无氧条件下检测到的脲酶活性是细菌在有氧条件下产生的,一旦巴氏芽孢杆菌处于无氧环境中,便不再合成脲酶。试验结果表明, $210 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡转速下,巴氏芽孢杆菌生长代谢情况良好。然而,实际工程中可能存在土壤透气性不足的问题,特别是距离灌浆点较远的地下深处含氧量较低,应及时补充高活性菌液或含氧培养基,以确保MICP对污染土的最佳固化效果。

2.2 接种量的影响

在0.5%~20.0%接种量范围内测得了巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的变化,结果如图3所示。可知,不同接种量下巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的变化趋势基本相同。20.0%接种量时培养

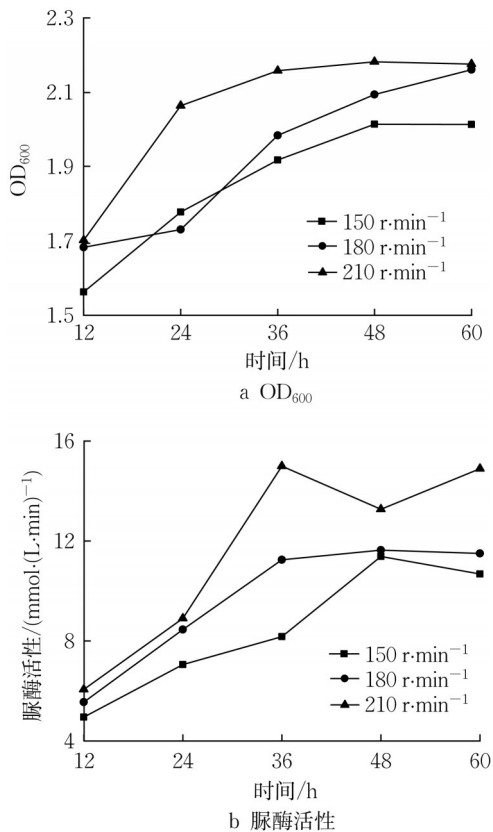


图2 振荡转速对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响
Fig.2 Effect of oscillating speed on the growth curve and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*

基初始阶段(12 h时)的脲酶活性相比于其他接种量更高,但脲酶活性峰值仅为 $15.13 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$, 相对于接种量为 0.5% 时菌液脲酶活性峰值 $17.92 \text{ mmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ 低了 15.57%。此外,较低接种量(0.5%、1.0%)试验组在 36~60 h 衰减阶段仍显示出比高接种量(10.0%、15.0%、20.0%)试验组更高的脲酶活性。这一现象表明,高接种量试验组的菌种数超过了培养基营养物质的承载力,细菌生长代谢活动受到抑制。因此,低接种量更有利于细菌的生长及脲酶活性激发。从经济性考虑,低接种量也能节约成本,推动 MICP 在工程中的应用。综合巴氏芽孢杆菌生长曲线及脲酶活性变化情况,推荐使用 0.5% 接种量。

2.3 温度的影响

温度对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响如图 4 所示。由图 4a 可知,20 °C 时 OD₆₀₀ 随培养时间延长而增大,60 h 时达到峰值 1.711,说明环境温度为 20 °C 时巴氏芽孢杆菌仍能正常存活;当环境温度为 20、25、30 °C 时,OD₆₀₀ 随温度升高而增大,最大峰值分别为 1.711、2.012、2.161;当环境温度为 35、40 °C

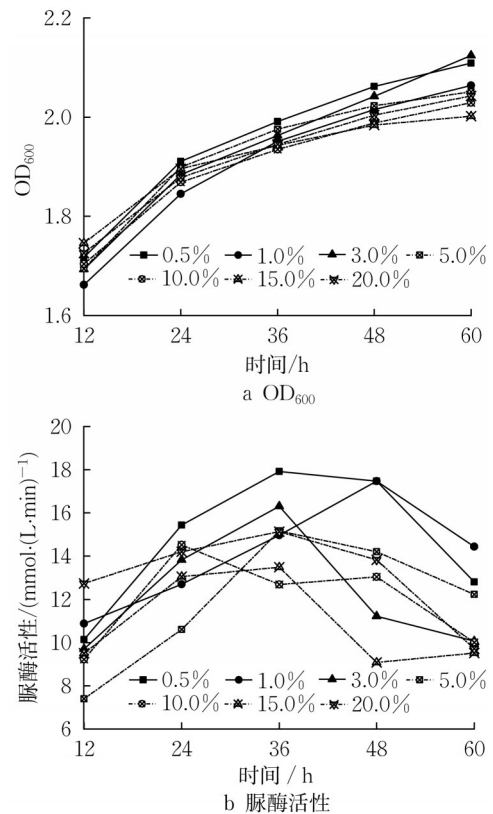


图3 接种量对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响
Fig.3 Effect of inoculation level on the growth curve and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*

时,OD₆₀₀ 随温度增加先升高后降低。由此可知,30 °C 为单因素条件试验下巴氏芽孢杆菌的最佳生长环境温度。温度会影响细菌细胞壁的稳定性和完整性,从而影响细菌活性。Kumari 等^[23]发现,10 °C 时细菌仍能有效抵御重金属 Cd 的毒性,童天志等^[24]通过试验证实了 15~30 °C 下产脲酶菌的 OD₆₀₀ 与温度呈正相关性,Whiffin^[5]、Ali 等^[25]、Zheng 等^[26]也获得了相同结论。

由图 4b 可知,巴氏芽孢杆菌在 20、25、30、35 °C 培养时,脲酶活性随培养时间延长而增大,最高峰值分别为 10.60、10.62、11.63、10.19 mmol·(L·min)⁻¹;40 °C 下培养时,脲酶活性随培养时间延长呈现先上升后下降的趋势,平均脲酶活性为 9.86 mmol·(L·min)⁻¹。与其他酶促反应一样,温度对于脲酶催化尿素水解的反应有着很大影响,多数脲酶的最佳反应温度为 20~37 °C^[25,27-28]。Mitchell 等^[28]发现,当温度从 15 °C 上升至 20 °C 时,脲酶活性可增加 5~10 倍;但是,Dhami 等^[29]的试验表明,脲酶活性在 35 °C 时达到峰值,55 °C 时脲酶活性下降了 47%;Zheng 等^[26]也发现,40 °C 时脲酶活性远低于 30 °C 水

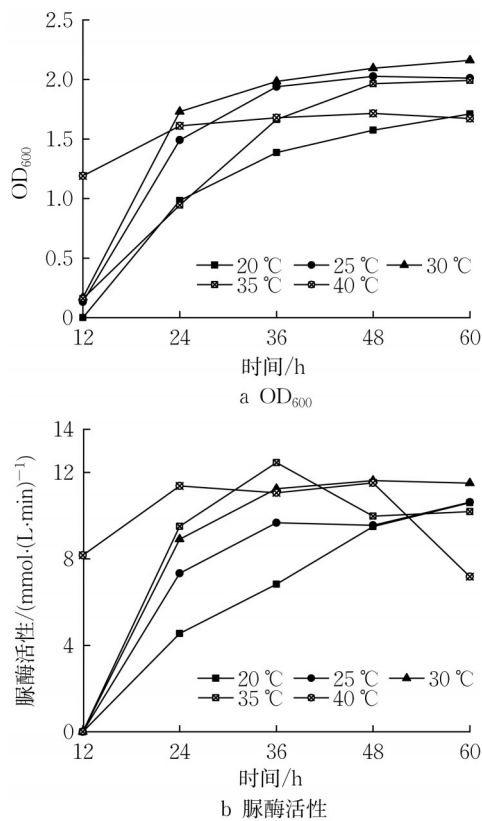


图4 温度对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响
Fig.4 Effect of temperature on the growth curve and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*

平。上述研究均表明,温度升高能有效提高脲酶活性,但温度超过一定范围后反而会抑制脲酶活性。温度不仅影响细菌生长、脲酶活性和碳酸钙溶度积,

还会影响最终碳酸钙的生成量甚至对污染土的固化效果^[30]。

2.4 培养基pH值的影响

培养基初始pH值对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响如图5所示。可知,pH值<5时细菌无法生长繁殖及合成脲酶;pH值为5和6时,0~12 h为细菌生长的迟滞期,12~36 h为对数生长期,36 h后进入稳定期;pH值为7~10时,培养12 h后菌液OD₆₀₀已超过1,说明迟滞期较短。其中,pH值为7的菌液在各时间节点OD₆₀₀均最高,说明环境pH值为5~10时巴氏芽孢杆菌均能正常生长繁殖,pH值为7时生长情况最佳,Ali等^[25]也发现中性条件下MICP矿化效率最高。然而,菌液pH值最终稳定在9左右,表明细菌更倾向于碱性环境下生长繁殖。Cuzman等^[10]所用巴氏芽孢杆菌最佳生长环境pH值为9.25,细菌体内正常pH值为8.4。不同研究中细菌对应的最佳生长环境有所差别,但本研究中pH值为6、7、8、9时的细菌生长曲线差别不大。推测差异产生的原因在于接种量、细菌自身繁殖能力、对碱性环境偏好程度的不同,细菌生长初期相同pH值的碱性环境对细菌生长起抑制作用,而繁殖到一定程度后处于生长对数期的细菌对碱性环境耐受能力更强,此时起到促进生长的作用,其中还涉及到细胞直接能源物质腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)合成机制。从细菌生长角度来看,pH值在6~9范围内生长良好,最佳生长环境pH值为7,60 h时菌液pH值为9.02,对应脲酶活性峰值为11.41 mmol·(L·min)⁻¹。

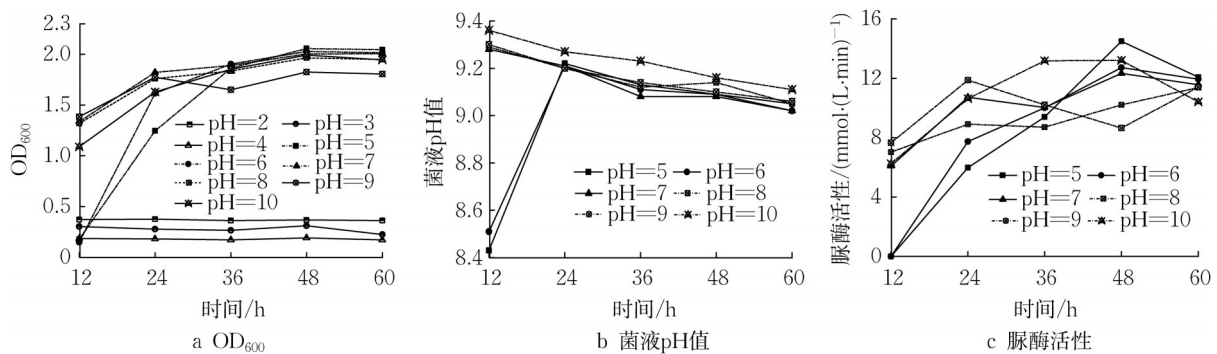


图5 培养基pH值对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响
Fig.5 Effect of medium pH value on the growth curve and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*

此外,从细菌生长及脲酶活性变化角度验证了Cheng等^[31]和Lai等^[32]提出的单相低pH灌浆法的可行性,即在偏酸性(pH为5~7)条件下,细菌在接种后24 h前生长速率下降,但24 h后细菌OD₆₀₀和脲酶活性与碱性环境下培养的细菌差别不大。降低培养基pH值能有效减少灌浆过程中土层表面形成的碳

酸钙致密层厚度,有利于菌液持续均匀地充填到土体孔隙中,增强土体整体固化效果。

2.5 尿素质量浓度的影响

尿素质量浓度对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响如图6所示。由图6a可知,尿素质量浓度为5、10、15、20、25、30 g·L⁻¹时,细菌OD₆₀₀随尿素质量浓

度增加先升高后降低,尿素质量浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细菌生长情况良好。Hu等^[17]也发现未添加尿素时细菌 OD_{600} 最高。由此可知,尿素对细菌生长具有抑制作用,但在微量尿素($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下细菌生长速率更快。

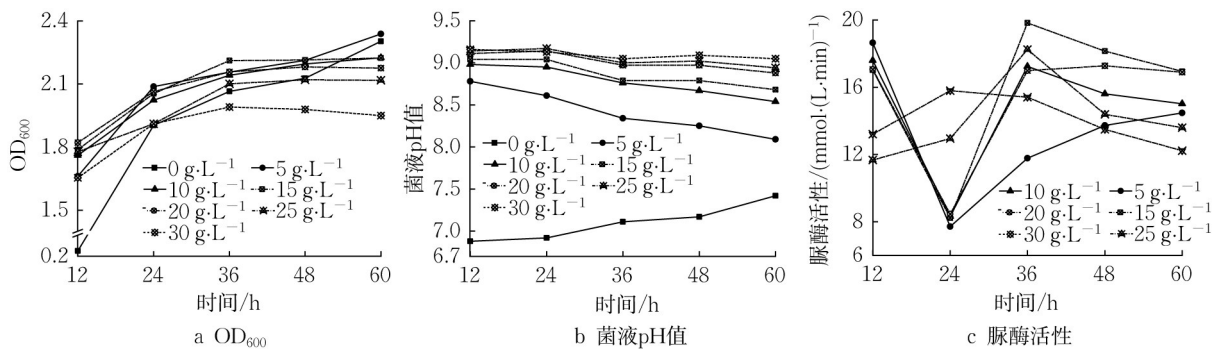


图6 尿素质量浓度对巴氏芽孢杆菌生长曲线和脲酶活性的影响

Fig.6 Effect of urea mass concentration on the growth curve and urease activity of *Sporosarcina pasteurii*

由图6c可知,尿素质量浓度对脲酶活性有着较大影响,未添加尿素的试验组脲酶活性为零(未在图中进行展示)。根据脲酶活性变化趋势可分为尿素质量浓度 $5\sim<25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $25\sim30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2种情况进行分析。当尿素质量浓度为 $5\sim<25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脲酶活性变化情况基本相同,其中尿素质量浓度 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 试验组表现最好,脲酶活性峰值高达 $19.82\text{ mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$;当尿素质量浓度为 $25\sim30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脲酶活性先增大后减小,60h时脲酶活性低于 $5\sim<25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 试验组的脲酶活性。脲酶活性在12~36h时变化幅度较大,结合细菌生长曲线进行推测,原因是快速增殖的细菌根据环境变化适时调整脲酶活性。由此可见,脲酶水解尿素过程还与细菌生长代谢活动密不可分。综合考虑尿素对巴氏芽孢杆菌生长及脲酶活性影响,初始尿素质量浓度 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。

3 分析与讨论

3.1 尿素影响机制

尿素对细菌生命活动的影响机制主要与直接能源物质ATP合成有关。Whiffin^[5]最早发现巴氏芽孢杆菌在缺少尿素的条件下无法正常产脲酶;Casey等^[33]进一步发现,巴氏芽孢杆菌通过改变脲酶和碳酸酐酶活性调控微环境中pH值、氨分子和铵根离子的比例,为ATP的合成提供动力。Cuzman等^[10]的研究显示,环境pH值为9.25的情况下细菌体内pH值为8.4,此时细胞膜外质子浓度高于胞内,在没有其他因素干扰的情况下,质子会从胞内扩散至胞外,不符合ATP合成的条件。

为了解决无法合成ATP的问题,细菌驱动除 H^+ 以外的阳离子排出细胞膜外以增加膜电位,当膜电位足够大时可以驱使质子逆浓度梯度涌入细菌体内,为ATP的合成提供动力^[34]。在这个过程中尿素起到了重要作用,环境中尿素由于浓度差从胞外扩散至细菌体内,随后被脲酶水解成 NH_3 和 NH_4^+ ,一方面使得细胞质碱化,减小了细胞内外质子浓度差;另一方面,生成的 NH_4^+ 在细菌体内外存在浓度差, NH_4^+ 由细菌胞内扩散至胞外使得膜电位增大,增大后的膜电位驱动质子逆浓度梯度进入细菌体内,从而合成直接能源物质。缺乏尿素时,上述调控合成ATP过程可能无法实现。由图6b、c可知,未添加尿素时菌液pH值 <7.5 且不产生脲酶,细菌对环境适应性差,失去了矿化能力。Ma等^[35]对添加尿素前后巴氏芽孢杆菌进行转录组分析,添加尿素后调节镍活性中心和成熟脲酶的基因 $ureD$ 、 $ureE$ 、 $ureF$ 和 $ureG$ 以及用于脲酶结构组装的基因 $ureC$ 显著增加,未添加尿素的细菌增加了合成ATP酶的基因,进一步验证了上述尿素对于巴氏芽孢杆菌ATP合成的影响机制。

3.2 矿化机制分析

通过傅里叶变换红外光谱确定生物矿化沉淀中官能团,结果如图7a所示。位于 711 、 872 、 1800 、 2513 cm^{-1} 的吸收峰是由碳酸基团 $\nu(\text{CO}_3^{2-})$ 偏振形成的^[36-37],这是最稳定的菱形六面体-方解石的红外吸收特征^[38]。位于 711 cm^{-1} 的峰为 CO_3^{2-} 的C—O键合, 872 、 1083 cm^{-1} 的吸收峰为C—C键合^[39]。位于 $2800\sim3000\text{ cm}^{-1}$ 处的弱吸收峰是由多糖、氨基酸和烷基化合物中烷基 $\nu(\text{—CH})$ 的振动所引起的^[40],位于 $3000\sim3700\text{ cm}^{-1}$ 范围的宽频吸收峰是

由 $\nu(\text{-OH})$ 羟基和胺基 $\nu(\text{-NH})$ 的强烈拉伸振动形成的^[39],出现在 1404 cm^{-1} 处的尖锐吸收峰可以归类为羧酸盐中羧基 $\nu(\text{-COOH})$ 的对称偏振。Qian等^[37]研究发现,细菌表面的羧基存在于包括多糖、蛋白质和糖蛋白的生物大分子中,可作为矿化过程主要结合位点;Ma等^[35]研究发现,巴氏芽孢杆菌表面负电荷远多于非矿化菌,细菌生物膜上的磷酸基团、碳酸基团和硫酸盐基团可吸附游离的 Ca^{2+} 等金属阳离子。沉淀的表面成分分析(见图7b)也发现,沉淀中除了Ca、C、O元素外还存在N、Cl元素,说明细菌分泌的有机物参与了生物沉淀的组成。据此可知,MICP过程主要在细菌胞外聚合物(EPS)上进行。

图7d展示了细菌矿化沉淀的形貌特征。可以

看出,细菌诱导产生的碳酸钙主要有菱形和球形2种形状,结合EDS结果(见图7e)可知,沉淀为碳酸钙。对XPS全谱图中C1s基团的进一步分峰也得到了碳酸盐基团峰(见图7c)。SEM结果显示,细菌被“镶嵌”进碳酸钙中,进一步验证了FT-IR结果中碳酸钙成核点位在细菌膜上的猜想。根据XRD结果(见图7f),推断出菱形晶体为方解石,球形晶体为球霏石。根据奥斯特瓦尔德分步规则^[41],球霏石晶体是碳酸钙生成过程的中间产物,易于溶解并重结晶成更稳定的方解石晶体。方解石稳定性最好,对土颗粒的胶结最有利。因此,保证MICP有充足的反应时间是降低球霏石含量和增加最终方解石沉淀的有效方法。

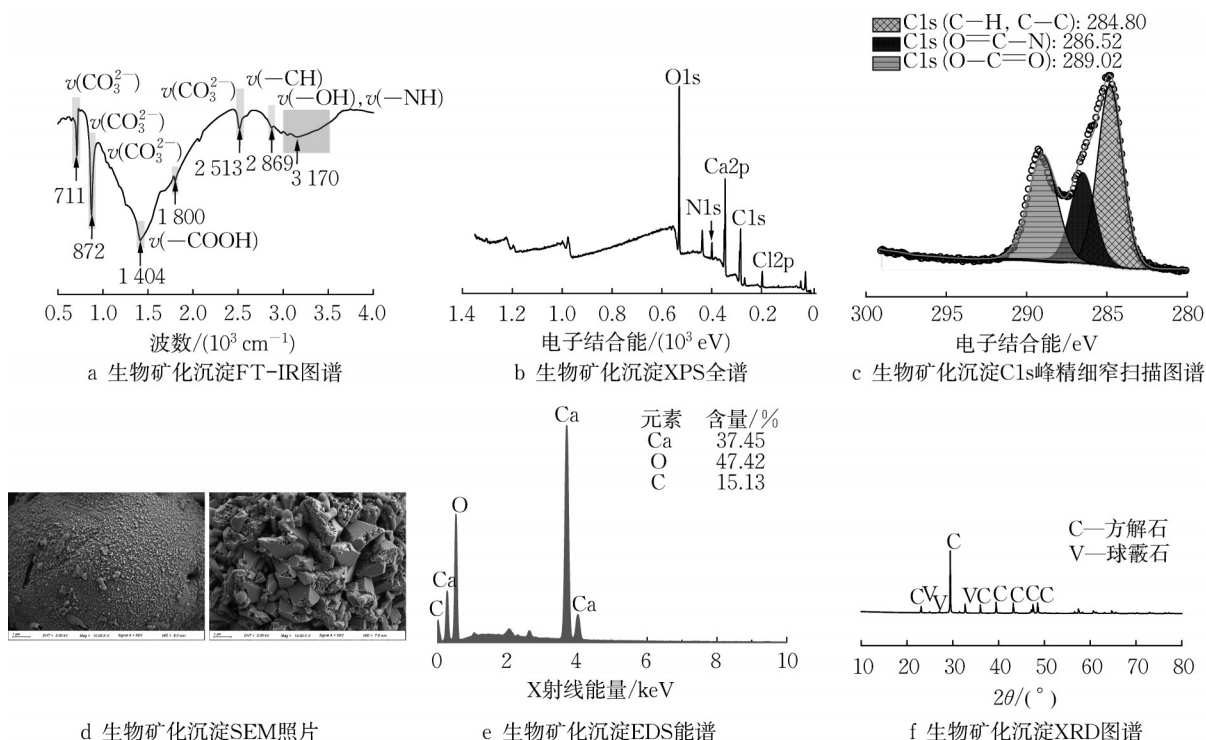


图7 生物矿化沉淀的表征

Fig.7 Characterization of biomineralized precipitation

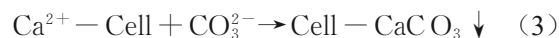
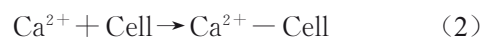
结合菌液 OD_{600} 、脲酶活性、pH值的变化以及对生物矿化沉淀的表征分析,巴氏芽孢杆菌利用脲酶水解尿素并诱导矿化产生 CaCO_3 的过程如下:

(1)微生物水解尿素。巴氏芽孢杆菌利用脲酶将尿素水解为氨和氨基甲酸,而氨基甲酸与水接触会迅速分解生成氨和碳酸,反应过程为



(2)细菌异质成核。细菌的胞外聚合物表面带有负电官能团,游离 Ca^{2+} 与这些负电官能团结合;当 Ca^{2+} 与 CO_3^{2-} 的离子积达到相应温度下的 CaCO_3 溶

度积常数时,在细菌表面生成 CaCO_3 ,反应过程为:



整个反应过程可表示为



4 结论

(1)210 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡转速下巴氏芽孢杆菌氧气

需求得到满足,细菌浓度及脲酶活性最高;较高的初始接种量可促使细菌快速增殖,但会超出培养基营养承载力,0.5%接种量较为合适。温度过低使得细菌休眠,过高则导致蛋白质变性失活,30℃为巴氏芽孢杆菌最佳生长环境温度。

(2)巴氏芽孢杆菌耐受pH值范围为5~10,最佳生长pH值为7。偏酸性环境能延缓脲酶活性达到峰值的时间,但不会大幅降低脲酶活性峰值,从细菌生长及脲酶活性角度验证了低pH值灌浆法的可靠性。尿素质量浓度在5~25 g·L⁻¹范围内细菌生长速率较快,脲酶活性高;高质量浓度尿素对细菌生长具有抑制作用,细菌生长最佳尿素质量浓度为15 g·L⁻¹。

(3)从ATP合成机理出发,提出了尿素对细菌生长及脲酶活性的影响机制,揭示了矿化反应对于细菌的生理意义。细菌调控脲酶活性以分解尿素产生NH₄⁺,由于浓度差NH₄⁺被动运输至细菌体外引起细胞膜电位增加,从而逆质子浓度梯度将H⁺由胞外运输至胞内,为ATP合成提供质子动力势。

(4)对生物矿化沉淀进行FT-IR、XPS、XRD和SEM-EDS表征分析后发现,MICP过程发生在细菌的胞外聚合物上,生成的碳酸钙主要由菱形方解石和少量球形球霏石组成。为了增大稳定矿物方解石的产量,可适当延长反应时间。

作者贡献声明:

陈永贵:设计试验,修改论文。
江昭明:开展试验,处理数据,撰写论文。
付俊:提供试验材料,修改论文初稿。
周罕:学术指导。
文子豪:协助试验。

参考文献:

- [1] TIWARI N, SATYAM N, SHARMA M. Micro-mechanical performance evaluation of expansive soil biotreated with indigenous bacteria using MICP method[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 1.
- [2] BANG S, MIN S H, BANG S S. Application of microbiologically induced soil stabilization technique for dust suppression [J]. International Journal of Geo-Engineering, 2011, 3(2): 27.
- [3] ANBU P, KANG C H, SHIN Y J, *et al.* Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications[J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 250.
- [4] ZHANG X, YANG H, CUI Z. Evaluation and analysis of soil migration and distribution characteristics of heavy metals in iron tailings[J]. Journal of Cleaner Production, 2018, 172: 475.
- [5] WHIFFIN V S. Microbial CaCO₃ precipitation for the production of biocement [D]. Perth: Murdoch University, 2004.
- [6] TURNER R, CASTRO G M, MINTO J, *et al.* Treatment of fractured concrete via microbially induced carbonate precipitation: from micro-scale characteristics to macro-scale behaviour [J]. Construction and Building Materials, 2023, 384: 131467.
- [7] LI X, WANG Y, TANG J, *et al.* Removal behavior of heavy metals from aqueous solutions via microbially induced carbonate precipitation driven by acclimatized *Sporosarcina pasteurii* [J]. Applied Sciences, 2022, 12(19): 9958.
- [8] ZENG Y, CHEN Z, LYU Q, *et al.* Microbiologically induced calcite precipitation for in situ stabilization of heavy metals contributes to land application of sewage sludge [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 441: 129866.
- [9] 孙潇昊, 缪林昌, 童天志, 等. 砂土微生物固化过程中尿素的影响研究[J]. 岩土工程学报, 2018, 40(5): 939.
SUN Xiaohao, MIAO Linchang, TONG Tianzhi, *et al.* Effect of methods of adding urea in culture media on sand solidification tests [J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2018, 40(5): 939.
- [10] CUZMAN O A, RICHTER K, WITTIG L, *et al.* Alternative nutrient sources for biotechnological use of *Sporosarcina pasteurii* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(6): 897.
- [11] SRIDHAR S, BHATT N, SURAIISKUMAR G K. Mechanistic insights into ureolysis mediated calcite precipitation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 176: 108214.
- [12] PEI D, LIU Z, WU W, *et al.* Transcriptome analyses reveal the utilization of nitrogen sources and related metabolic mechanisms of *Sporosarcina pasteurii* [J]. PLOS One, 2021, 16(2): e0246818.
- [13] 唐朝生, 泮晓华, 吕超, 等. 微生物地质工程技术及其应用 [J]. 高校地质学报, 2021, 27(6): 625.
TANG Chaosheng, PAN Xiaohua, LÜ Chao, *et al.* Biogeoenvironmental technology and the applications [J]. Geological Journal of China Universities, 2021, 27(6): 625.
- [14] SARDA D, CHOONIA H S, SARODE D D, *et al.* Biocalcification by *Bacillus pasteurii* urease: a novel application [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(8): 1111.
- [15] DHAMI N K, REDDY M S, MUKHERJEE A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 23(5): 707.
- [16] SUN X, MIAO L, WU L, *et al.* Improvement of biocementation at low temperature based on *Bacillus megaterium* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(17): 7191.
- [17] HU Y Y, LIU W T, WANG W J, *et al.* Biomineralization performance of *Bacillus sphaericus* under the action of *Bacillus mucilaginosus* [J]. Advances in Materials Science and Engineering, 2020, 2020: 6483803.
- [18] HSU C M, HUANG Y H, NIMJE V R, *et al.* Comparative

- study on the sand bioconsolidation through calcium carbonate precipitation by *Sporosarcina pasteurii* and *Bacillus subtilis*[J]. Crystals, 2018, 8(5): 189.
- [19] DICK J, DE WINDT W, DE GRAEF B, *et al.* Biodeposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus species*[J]. Biodegradation, 2006, 17(4): 357.
- [20] BENINI S, GONZÁLEZ A, RYPNIEWSKI W R, *et al.* Crystal structure of oxidized *Bacillus pasteurii* cytochrome *c553* at 0.97-Å resolution[J]. Biochemistry, 2000, 39(43): 13115.
- [21] MARTIN D, DODDS K, NGWENYA B T, *et al.* Inhibition of *Sporosarcina pasteurii* under anoxic conditions: implications for subsurface carbonate precipitation and remediation via ureolysis[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(15): 8351.
- [22] MANOHARII R, YOGALAKSHMI K N. *Brevundimonas diminuta* MYS6 associated *Helianthus annuus* L. for enhanced copper phytoremediation [J]. Chemosphere, 2021, 263: 128195.
- [23] KUMARI D, PAN X, LEE D J, *et al.* Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium undae* at low temperature [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 94: 98.
- [24] 童天志, 缪林昌, 孙潇昊, 等. 低温条件微生物沉积碳酸钙试验研究[J]. 硅酸盐通报, 2018, 37(5): 1509.
TONG Tianzhi, MIAO Linchang, SUN Xiaohao, *et al.* Microbially-induced carbonate precipitation in low temperature [J]. Bulletin of the Chinese Ceramic Society, 2018, 37(5): 1509.
- [25] ALI A, LI M, SU J, *et al.* *Brevundimonas diminuta* isolated from mines polluted soil immobilized cadmium (Cd^{2+}) and zinc (Zn^{2+}) through calcium carbonate precipitation: microscopic and spectroscopic investigations [J]. Science of the Total Environment, 2022, 813: 152668.
- [26] ZHENG T, QIAN C. Influencing factors and formation mechanism of CaCO_3 precipitation induced by microbial carbonic anhydrase[J]. Process Biochemistry, 2020, 91: 271.
- [27] TORRES-ARAVENA Á E, DUARTE-NASS C, AZÓCAR L, *et al.* Can microbially induced calcite precipitation (MICP) through a ureolytic pathway be successfully applied for removing heavy metals from wastewaters?[J]. Crystals, 2018, 8(11): 438.
- [28] MITCHELL A C, FERRIS F G. The coprecipitation of Sr into calcite precipitates induced by bacterial ureolysis in artificial groundwater: temperature and kinetic dependence [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69(17): 4199.
- [29] DHAMI N K, REDDY M S, MUKHERJEE A. Synergistic role of bacterial urease and carbonic anhydrase in carbonate mineralization [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(5): 2552.
- [30] LIANG C, SHAHIN M A, MUJAH D. Influence of key environmental conditions on microbially induced cementation for soil stabilization [J]. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 2017, 143(1): 04016083.
- [31] CHENG L, SHAHIN M A, CHU J. Soil bio-cementation using a new one-phase low-pH injection method [J]. *Acta Geotechnica*, 2019, 14(3): 615.
- [32] LAI H J, CUI M J, CHU J. Effect of pH on soil improvement using one-phase-low-pH MICP or EICP biocementation method [J]. *Acta Geotechnica*, 2023, 18(6): 3259.
- [33] CASEY J R, GRINSTEIN S, ORLOWSKI J. Sensors and regulators of intracellular pH [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, 11(1): 50.
- [34] JAHNS T. Ammonium/urea-dependent generation of a proton electrochemical potential and synthesis of ATP in *Bacillus pasteurii*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(2): 403.
- [35] MA L, PANG A P, LUO Y, *et al.* Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii* [J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 12.
- [36] ACHAL V, PAN X, FU Q, *et al.* Biomineralization based remediation of As (III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 201: 178.
- [37] QIAN X, FANG C, HUANG M, *et al.* Characterization of fungal-mediated carbonate precipitation in the biomineralization of chromate and lead from an aqueous solution and soil [J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 164: 198.
- [38] 曾勇, 陈泽智, 杜亚玲, 等. 产脲酶菌株 *Sporosarcina ureilytica* ML-2 诱导方解石沉淀矿化 Pb(II)、Cd(II)和 Cr(VI)研究[J]. 环境科学学报, 2022, 42(5): 148.
ZENG Yong, CHEN Zezhi, DU Yaling, *et al.* The mineralization study of Pb(II), Cd(II) and Cr(VI) by induced calcite precipitation by urease producing strain *Sporosarcina ureilytica* ML-2 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2022, 42(5): 148.
- [39] ZHU X, LI W, ZHAN L, *et al.* The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil[J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 149.
- [40] OLIVEIRA R C, HAMMER P, GUIBAL E, *et al.* Characterization of metal-biomass interactions in the lanthanum (III) biosorption on *Sargassum* sp using SEM/EDX, FTIR, and XPS: preliminary studies [J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 239: 381.
- [41] CÖLFEN H, ANTONIETTI M. Mesocrystals and nonclassical crystallization[M]. Chichester: Wiley, 2008.