

微生物非脲解作用诱导碳酸钙沉积研究

徐 晶, 姚 武

(同济大学 先进土木工程材料教育部重点实验室, 上海 201804)

摘要: 利用嗜碱型芽孢杆菌的非脲解矿化作用, 在含 2 种不同有机钙源的矿化培养基中实现了微生物诱导碳酸钙沉积。讨论了沉积过程中细菌生长特性及碳酸钙沉积动力学, 并综合运用 X 射线衍射仪、热分析仪和扫描电子显微镜对沉积产物进行了研究, 结果表明, 降低初始钙离子浓度有利于提高有机钙源的转化率, 而改变钙源种类对碳酸钙沉积动力学及碳酸钙晶型、形貌均有较大影响。在含乳酸钙和谷氨酸钙的矿化培养基中分别沉积得到了结晶不良的方解石和稳定性较差的球霏石, 且后者的沉积产率更高, 可达到近 100%。证实了嗜碱菌的非脲解诱导碳酸钙沉积途径具备应用于混凝土防护和修复的潜质。

关键词: 碳酸钙; 矿化沉积; 微生物; 非脲解

中图分类号: TU528.01

文献标志码: A

Non-ureolytic Microbiologically-induced Calcium Carbonate Precipitation

XU Jing, YAO Wu

(Key Laboratory of Advanced Civil Engineering Materials of the Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 201804, China)

Abstract: By using non-ureolytic bacteria of genus *Bacillus*, microbiologically-induced calcium carbonate precipitation was achieved in mineral medium containing two different kinds of organic calcium sources. The characteristics of bacterial growth and kinetics of calcium carbonate precipitation were discussed. Sediments were characterized by X-ray diffraction, thermal analysis and scanning electron microscopy. The results show that reducing the initial concentration of calcium ions is beneficial for improving the conversion ratio of organic calcium source, while altering the type of calcium source has a remarkable impact on both the kinetics of precipitation and the crystal form and morphology of calcium carbonate. Not well-crystallized calcite and unstable vaterite was formed from calcium lactate and calcium glutamate medium, respectively, and higher precipitation productivity was obtained in the latter case, which was nearly 100%. The potential application of

non-ureolytic bacterially-induced calcium carbonate precipitation in protection and remediation of concrete was validated.

Key words: calcium carbonate; mineral precipitation; microbe; non-ureolytic

大多数石质或混凝土类土木工程材料所存在的耐久性问题是物理、化学、生物等因素综合作用的结果, 其中很大程度上都是由于外界侵蚀性物质随着水并顺着材料表面孔隙及裂缝进入材料内部而造成材料由内至外的逐步劣化, 使得整体结构往往未达到预期寿命而破坏, 由此导致的后期修补、维护等问题亦日益突出^[1-2]。

由于劣化往往是从由表及里的渗透过程开始, 针对该问题最有效的一条途径就是采取表面防护。传统的表面处理主要包括各种有机或无机的表面防护剂^[3-5]。前者的粘结性、防水性、抗腐蚀性均较好, 但对环境会造成负面影响, 且与结构材料存在相容性问题; 后者优点是寿命长、抗老化性好、与结构材料相容性较好, 但其粘结性欠佳, 且由于可溶性盐的结晶膨胀反而加剧风化。近年来出现的生物表面修复技术引起了人们的关注, 自然界中的某些微生物通过在细胞内部或外部生成一些相对不溶的化合物, 能有选择性地堵塞或黏结具有渗透性的有孔介质, 其在石油、地质等工程已经有了相关的应用^[6-9]。相比之下, 微生物矿物沉积材料反应条件温和、负面效应弱且相容性好, 不会对结构及环境造成不可逆反应, 对生态平衡有积极作用^[10-11]。

当前国内外研究人员陆续开展了利用嗜碱菌的非脲解矿化作用进行混凝土的表面防护、裂缝修补以及古建筑文物的修复等研究^[12-18]。在富含 Ca^{2+} 的菌株培养液中, 该类菌能产生可将尿素分解为 CO_2 和

NH_3 的脲酶, NH_3 使环境 pH 值升高, CO_2 则转化为稳定的 CO_3^{2-} 并与 Ca^{2+} 结合, 因而矿化诱导沉积出 CaCO_3 附着于混凝土表面或胶结混凝土裂缝^[19]. 但已有研究指出, 菌体脲解过程释放出大量的 NH_3 , 从而对环境和人体健康造成负面影响, 并且 NH_3 后期可能发生的酸化还可能会导致钢筋锈蚀^[20]. 鉴于此, 本文尝试通过嗜碱菌的非脲解矿化过程来实现诱导 CaCO_3 沉积, 为其进一步应用于混凝土防护和修复提供基础.

1 试验方案

1.1 菌株及纯化培养

采用某芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*) 的嗜碱型碳酸盐矿化菌. 液体纯化培养基选用牛肉蛋白胨培养基, 成分如下: NaHCO_3 0.42 g, Na_2CO_3 0.53 g, 蛋白胨 5 g, 牛肉膏 3 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 值 9.7. 培养基分装于三角瓶中, 在 121 °C 高压灭菌器中灭菌 20 min, 接种后于 37 °C, 120 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 水浴摇床培养, 并镜检计数观察菌液生长状况. 在细菌已处于稳定期时取出菌液, 在 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心机上离心 20 min, 经去离子水洗涤 3 次并收集菌株湿细胞, 最后在 4 °C 冰箱中保存待用.

1.2 微生物诱导 CaCO_3 沉积

诱导 CaCO_3 沉积采用含 2 种钙源的矿化培养基, 分别为乳酸钙 (Calcium lactate, L-Ca) 和谷氨酸钙 (Calcium glutamate, G-Ca). 矿化培养基基本成分为: NH_4Cl 0.2 g, KCl 0.2 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, KH_2PO_4 0.02 g, 酵母膏 1 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 值 10. 加入不同含量的 L-Ca 和 G-Ca, 使 Ca^{2+} 浓度分别达到 0.05, 0.10, 0.20 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 培养基各组分先单独分开灭菌再混合以避免产生沉淀, 随后进行分装, 每个 Ca^{2+} 浓度培养基均分别分装在 3 个 500 ml 的三角瓶内, 装量 100 ml. 接种菌株 (每毫升 1.0×10^7 个细胞) 后于 30 °C, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 水浴摇床培养 300 h. 在试验进行至 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 h 时将其终止并取样分析可溶性 Ca^{2+} 浓度及细菌计数. 可溶性 Ca^{2+} 浓度采用乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 滴定法确定, 细菌计数则采用稀释平板法.

1.3 沉积产物表征

沉积试验终止后, 收集瓶壁的沉积产物并用去离子水反复洗涤, 随后置于 105 °C 烘箱内烘干至恒重, 磨细后过 45 μm 筛. 用 Rigaku D/max 2550PC

型 X 射线衍射仪 (X-ray diffractometer, XRD) 测定粉体的物相组成, Cu $\text{K}\alpha$ 射线波长为 1.541 8 Å, 扫描 2θ 角范围为 20°~80°, 扫描速率 2° $\cdot \text{min}^{-1}$. 用 NETZSCH STA 449C 型综合热分析仪对样品进行热分析, 升温速率 10 °C $\cdot \text{min}^{-1}$, 由 30 °C 升至 900 °C, 得到热重 (thermogravimetric, TG) 和示差扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 曲线, 工作气氛为 N_2 . 用 Quanta 200 型场发射扫描电子显微镜 (field emission scanning electron microscope, FESEM) 观察沉积产物形貌, 并用其附带的能谱仪 (energy dispersive spectroscopy, EDS) 分析其元素组成.

2 结果与讨论

2.1 微生物诱导 CaCO_3 沉积过程

细菌在 2 种钙源的矿化培养基中的生长曲线见图 1. 可以看出 Ca^{2+} 初始浓度对细菌的生长曲线特性影响不大. L-Ca 中细菌生长曲线的延迟期、对数生长期和稳定期分别为 0~50 h, 50~200 h 和 200 h 以上. G-Ca 中细菌生长的延迟期及对数生长期与在 L-Ca 中类似, 但 200 h 左右达到峰值后下降较快, 推测是营养物质在后期的大量消耗所致. 而相对长的延迟期说明细菌在矿化培养基中利用或转化有机质钙源的速率较小, 必须经过一段时间的驯化才能正常生长繁殖. 随着时间的延长, 细菌对矿化环境的适应性得到提高, 能够持续利用有机质钙源作为营养维持生长.

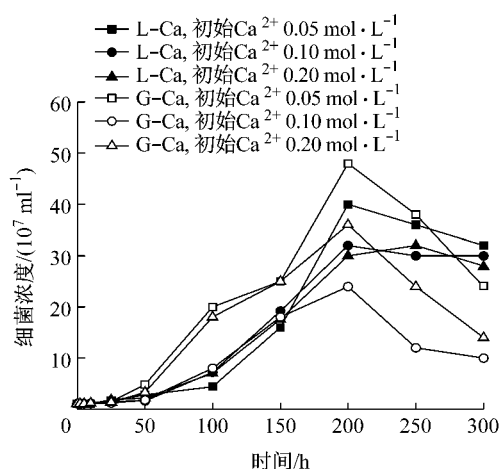


图 1 细菌生长曲线

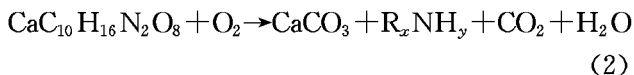
Fig.1 Profiles of cell growth

溶液中可溶性 Ca^{2+} 经细菌在耗氧的新陈代谢过程后转化为不溶性 Ca^{2+} , 即产生 CaCO_3 沉淀. 对

于 L-Ca, 该过程可表述为如下的反应方程式:



而对于 G-Ca, 其反应方程式如下:



其中, R_xNH_y 为胺类化合物。

经取样分析不同时间点的剩余可溶性 Ca^{2+} 浓度后, 就可推测出已被转化的 Ca^{2+} 浓度, 也即对应的 CaCO_3 沉积的量。图 2 为不溶性 Ca^{2+} 浓度随时间的变化曲线。可见在相同钙源的培养基中, 初始 Ca^{2+} 浓度对曲线的特性影响不大。L-Ca 中不溶性 Ca^{2+} 浓度在 100 h 后增加的速率缓慢, 而 G-Ca 中的不溶性 Ca^{2+} 浓度在 200 h 后仍持续增加, 且最终 G-Ca 中的 CaCO_3 沉积量亦显著高于 L-Ca, 这表明细菌对 G-Ca 的总体转化率高于 L-Ca。

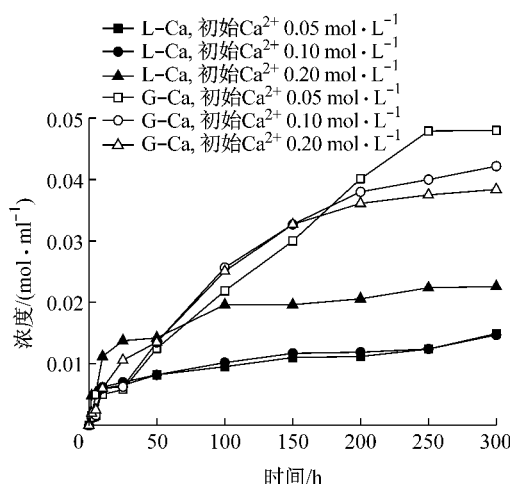


图 2 不溶性 Ca^{2+} 浓度变化曲线

Fig.2 Curves of insoluble calcium ions

鉴于 CaCO_3 沉积表现为初期快速增长、后期逐步减慢并稳定的特征, 可采用 Logistic 非线性回归对不同钙源培养基中 CaCO_3 沉积曲线进行拟合, 以分析其动力学过程。Logistic 模型可采用如下表达式^[21]:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-b)}} \quad (3)$$

式中: y 为待测指标, 即不溶性 Ca^{2+} 浓度; a 为最终沉积 Ca^{2+} 浓度, 其与初始 Ca^{2+} 浓度的比值即为有机钙源转化率 φ ; k 为反应速率常数; x 为时间; b 为沉积速率最大时对应的时间点。拟合结果如表 1 所示, 可看出 L-Ca 的 CaCO_3 沉积速率常数 k 值比 G-Ca 高, 而初始 Ca^{2+} 浓度对 k 值影响不明显。结合沉积曲线来看, 主要是由于 L-Ca 中早期的沉积速率大, 这从 b 值的计算结果中也得到了印证, 且在一定程度

上表明细菌在 L-Ca 中的早期活性高于 G-Ca, 而细菌对 G-Ca 的转化能力随时间延长逐渐超过了 L-Ca, 从表 1 可以看出, G-Ca 的 φ 值明显高于 L-Ca。另外, 随着初始 Ca^{2+} 浓度的降低, 2 种钙源中的转化率 φ 值均有不同程度的提高, 在 G-Ca 中甚至达到了 100%, 这说明采用较低的初始 Ca^{2+} 浓度有利于提高细菌对有机钙源的转化率。通过选择初始 Ca^{2+} 浓度合适的有机质钙源可望将其应用于实际混凝土结构的防护和修复当中。不过在实际工程中还需综合考虑混凝土及环境对微生物诱导沉积的影响, 如混凝土碱性对菌体的作用、混凝土各组分对 CaCO_3 晶体成核及生长的影响、环境温度和湿度的影响等。

表 1 CaCO_3 沉积的 Logistic 曲线拟合计算结果

Tabl.1 Calculation results of Logistic fitting for CaCO_3 precipitation

培养基钙源	初始 Ca^{2+} 浓度 / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	k	$a / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	b / h	$\varphi / \%$
L-Ca	0.05	0.051	0.012	29.07	24.0
	0.10	0.054	0.012	28.49	12.0
	0.20	0.057	0.021	21.37	10.5
G-Ca	0.05	0.020	0.050	120.71	100.0
	0.10	0.029	0.040	83.24	40.0
	0.20	0.030	0.037	73.88	18.5

2.2 CaCO_3 沉积的 X 射线衍射及热分析

图 3 为在不同钙源的培养基中得到 CaCO_3 沉积物的 XRD 谱, 可发现钙源种类对沉积的 CaCO_3 晶体类型有显著影响: 在 L-Ca 中得到的为方解石型 CaCO_3 , 而在 G-Ca 中主要得到球霏石型 CaCO_3 。同时也发现在 G-Ca 当中也存在少量的方解石, 这主要是由于球霏石的不稳定性造成的。已有文献指出, 在方解石、文石、球霏石这 3 种 CaCO_3 的主要晶型中, 以球霏石的溶解性最强, 密度最低, 仅在较低的温度下能稳定存在 (小于 3°C), 在一般的情况下将逐步

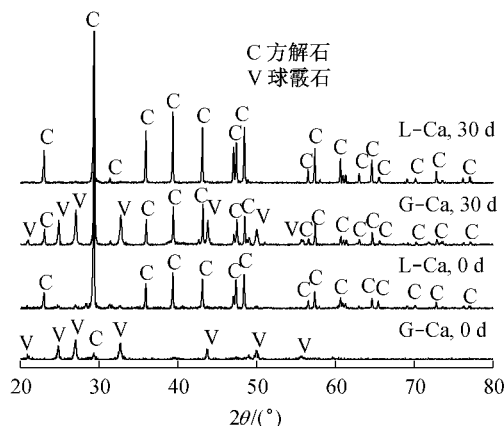


图 3 沉积矿物的 X 射线衍射图谱

Fig.3 XRD patterns of the precipitated minerals

转变成更稳定的方解石或文石^[22-23]。然而,某些有机质及微生物的存在能提高球霏石的稳定性,并促进其不断生成。Rodriguez 等^[24]发现一些包含氨基酸的有机物质大大提高了球霏石的沉积率及稳定性。本试验中所得到的稳定性较好的球霏石可以认为是采用了谷氨酸钙这种氨基酸类有机物质的缘故,但亦发现部分球霏石在一段时间后仍缓慢地转化为方解石,从图 3 可以看到 G-Ca 中的沉积物在放置 1 个月出现了大量的方解石晶型峰。

不同钙源培养基中得到的 CaCO_3 沉积物的综合热分析曲线如图 4 所示。G-Ca 的 TG 曲线表明在 200~500 °C 的温度范围内有 5.13% 的重量损失,然而 DSC 曲线上却未发现有对应的峰,可认为是包含在 CaCO_3 沉积物中的无定形有机物质发生分解所致,而这与 Rodriguez 等^[24]所报导的结果也相似。同时,该结果也进一步佐证了 XRD 的分析,即球霏石的稳定性来源于有机物质的存在。L-Ca 和 G-Ca 的 DSC 曲线分别在 693~803 °C 和 686~798 °C 温度范围内出现了强的吸热峰,相应的 TG 曲线上也出现了显著的重量损失,这主要是由于 CaCO_3 的分解造成。Tittelboom 等^[25]的结果表明,在 350~400 °C 之间球霏石快速转变为方解石,而结晶良好的方解石分解温度高达 780~990 °C。因此推测该处发生热分解的 CaCO_3 主要应为结晶不良的方解石。

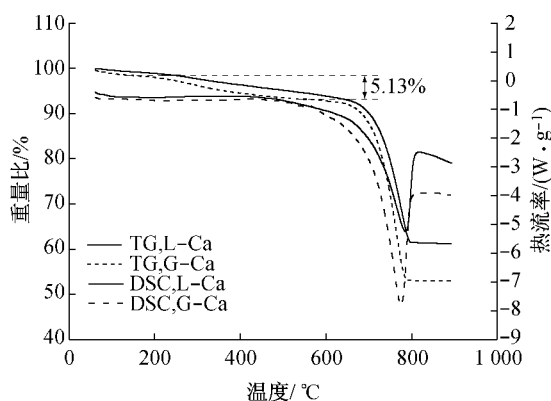


图 4 沉积矿物的热重与示差扫描量热曲线

Fig.4 TG/DSC results of precipitated minerals

2.3 CaCO_3 沉积的微观形貌

图 5a 和 5b 为微生物在 2 种钙源的矿化培养基中所得沉积产物的 FESEM 照片,可以看出连续的沉积物层紧密附着在沉积基片上,而 G-Ca 中得到的沉积物层比 L-Ca 更加厚且致密,这与前述的 G-Ca 总体转化率更高密切相关。EDS 的分析结果表明沉积产物主要元素为 Ca, C, O, 证实了该产物为 CaCO_3 。图 5c 和 5d 为更高放大倍数下的 FESEM 沉

积物形貌,可以清晰地看到 L-Ca 所得的 CaCO_3 晶体为不规则方形小颗粒,尺寸均在 5 μm 以下,结合 XRD 及热分析结果可知为结晶不良的方解石晶体。G-Ca 中则发现主要存在 2 种形貌的晶体颗粒:一种为近似球状的颗粒,尺寸小于 5 μm ;另一种为粗大的类枝状生长的晶体。结合前述 XRD 分析,认为前者为球霏石晶体,而后者是由不稳定球霏石逐步转变而得到的不规则方解石。FESEM 的结果表明钙源对 CaCO_3 沉积产物的形貌有很大的影响。

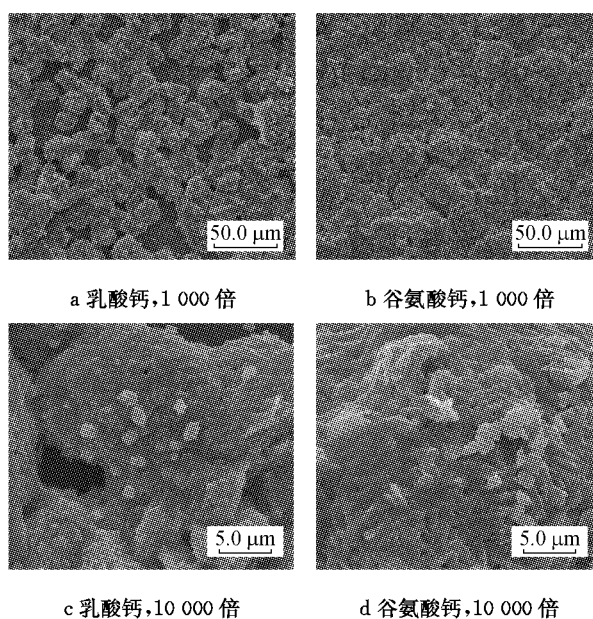


图 5 不同钙源中沉积矿物的扫描电子显微镜照片

Fig.5 SEM images of precipitated minerals from different calcium sources

3 结论

(1) 菌体在不同有机质钙源的矿化培养基中经过一段时间的驯化后提高了适应性,能够进行正常的生长繁殖并将有机钙源转化为有效 CaCO_3 沉积。降低初始 Ca^{2+} 浓度有利于提高对有机钙源的转化率。钙源的种类对 CaCO_3 沉积的动力学过程有显著影响,表现为 L-Ca 中的 CaCO_3 早期沉积速率更大,但细菌对 G-Ca 的最终总体转化率更高。该微生物诱导矿物沉积技术有望应用于混凝土结构的防护和修复中。

(2) 钙源种类对微生物矿化沉积的 CaCO_3 晶体类型及形貌均有显著影响:L-Ca 中主要得到结晶不良的方解石晶体,呈不规则颗粒状;G-Ca 中则生成大量类球状的球霏石晶体,而由于球霏石固有的不稳定性,部分将在一段时间后向更稳定的方解石转

化,此晶型转变所带来的影响还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Mehta P K, Monteiro P J M. Concrete: structure, properties, and materials[M]. 2nd ed; Prentice Hall, 1993.
- [2] De Muynck W, De Belie N, Verstraete W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review [J]. Ecological Engineering, 2009, 36(2): 118.
- [3] Basheer PaM, Basheer L, Cleland D J, et al. Surface treatments for concrete: assessment methods and reported performance [J]. Construction and Building Materials, 1997, 11(7/8): 413.
- [4] Ibrahim M, Al-Gahtani A S, Maslehuddin M, et al. Effectiveness of concrete surface treatment materials in reducing chloride-induced reinforcement corrosion [J]. Construction and Building Materials, 1997, 11(7/8): 443.
- [5] Ibrahim M, Al-Gahtani A S, Maslehuddin M, et al. Use of Surface Treatment Materials to Improve Concrete Durability [J]. Journal of Materials in Civil Engineering, 1999, 11(1): 36.
- [6] Finnerty W R, Singer M E. Microbial enhancement of oil recovery [J]. Nature Biotechnol, 1983, 1: 47.
- [7] Macleod F A, Lappin-Scott H M, Costerton J W. Plugging of a model rock system by using starved bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(6): 1365.
- [8] Ruiz C, Monteoliva-Sanchez M, Huertas F, et al. Calcium carbonate precipitation by several species of *Myxococcus* [J]. Chemosphere, 1988, 17(4): 835.
- [9] Mitchell J K, Santamarina J C. Biological considerations in geotechnical engineering [J]. J Geotech Geoenviron Eng, 2005, 131(10): 1222-1233.
- [10] 李沛豪, 屈文俊. 生物修复加固材料在土木工程中的应用研究进展 [J]. 材料科学与工程学报, 2008, 26(5): 810.
LI Peihao, QU Wenjun. State of Arts in Application of Bioremedying and Bioreinforcing Materials in Civil Engineering [J]. Journal of Materials Science & Engineering, 2008, 26(5): 810.
- [11] 袁雄洲, 孙伟, 陈惠苏. 水泥基材料裂缝微生物修复技术的研究与进展 [J]. 硅酸盐学报, 2009, 37(1): 160.
YUAN Xiongzhou, SUN Wei, CHEN Huisu. Research and progress of microbiologically-enhanced crack remediation for cementitious materials [J]. Journal of the Chinese Ceramic Society, 2009, 37(1): 160.
- [12] Bang S S, Lippert J J, Yerra U, et al. Microbial calcite, a bio-based smart nanomaterial in concrete remediation [J]. International Journal of Smart and Nano Materials, 2010, 1(1): 28.
- [13] Ghosh P, Mandal S, Chattopadhyay B D, et al. Use of microorganism to improve the strength of cement mortar [J]. Cement and Concrete Research, 2005, 35: 1980.
- [14] De Muynck W, Cox K, De Belie N, et al. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete [J]. Construction and Building Materials, 2008, 22: 875.
- [15] De Muynck W, Debrouwer D, De Belie N, et al. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials [J]. Cement and Concrete Research, 2008, 38(7): 1005.
- [16] Ramachandran S K, Ramakrishnan V, Bang S S. Remediation of Concrete Using Micro-Organisms [J]. ACI Materials Journal, 2001, 98(1): 3.
- [17] 王瑞兴, 钱春香. 微生物沉积碳酸钙修复水泥基材料表面缺陷 [J]. 硅酸盐学报, 2008, 36(4): 457.
WANG Ruixing, QIAN Chunxiang. Restoration of defects on the surface of cement-based materials by microbiologically precipitated CaCO_3 [J]. Journal of the Chinese Ceramic Society, 2008, 36(4): 457.
- [18] 王瑞兴, 钱春香, 王剑云, 等. 水泥石表面微生物沉积碳酸钙覆膜的不同工艺 [J]. 硅酸盐学报, 2008, 36(10): 1378.
WANG Ruixing, QIAN Chunxiang, WANG Jianyun, et al. Different treated methods of microbiologically deposited CaCO_3 layer on hardened cement paste surface [J]. Journal of the Chinese Ceramic Society, 2008, 36(10): 1378.
- [19] Stocks-Fischer S, Galinat J K, Bang S S. Microbiological precipitation of CaCO_3 [J]. Soil Biology & Biochemistry, 1999, 31(11): 1563.
- [20] Jonkers H M, Thijssen A, Muyzer G, et al. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete [J]. Ecological Engineering, 2010, 36(2): 230.
- [21] Marquardt D W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters [J]. J Soc Ind Appl Math, 1963, 11(2): 431.
- [22] Plummer L N, Busenberg E. The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO_2 - H_2O solutions between 0 and 90 ° C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO_3 - CO_2 - H_2O [J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1982, 46(6): 1011.
- [23] Spanos N, Koutsoukos P G. The transformation of vaterite to calcite; effect of the conditions of the solutions in contact with the mineral phase [J]. Journal of Crystal Growth, 1998, 191(4): 783.
- [24] Rodriguez-Navarro C, Jimenez-Lopez C, Rodriguez-Navarro A, et al. Bacterially mediated mineralization of vaterite [J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2007, 71(5): 1197.
- [25] Van Tittelboom K, De Belie N, De Muynck W, et al. Use of bacteria to repair cracks in concrete [J]. Cement and Concrete Research, 2010, 40(1): 157.