

生物刺激脲酶微生物诱导碳酸盐成矿的机理与应用

仵庆华¹ 王誉泽^{1,2*}

1 南方科技大学海洋科学与工程系 深圳 518055; 2 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州) 深圳 518055

1. 引言

微生物诱导碳酸盐沉淀(MICP)是指微生物通过其自身细胞或生化活性,影响周遭环境的酸碱度,从而使饱和溶液中形成碳酸钙。在MICP过程中,生物体可以分泌一种或多种代谢产物(CO_3^{2-}),这些阴离子与环境中的 Ca^{2+} 结合,形成碳酸盐沉淀^[1]。

目前,能形成MICP过程的机制有很多种,如尿素水解、硫酸盐还原、氨基酸氨化、反硝化、异化硫酸盐还原、光合作用、甲烷氧化和生物膜与胞外多糖。尿素水解沉淀碳酸盐是目前最广泛使用的方法。随着人类对于环境问题的重视,利用生物手段解决工程问题已成为现在的趋势,MICP作为一种长期修复技术,在花岗岩和混凝土等各种结构地层的裂缝胶结方面表现出很高的潜力。同时,MICP在防治砂土液化中,也是一种具有成本效益和绿色环保的替代方法,因为该过程相较于化学灌浆,灌注合成添加剂,对土体和环境的干扰小很多,同时生成的碳酸盐矿物在土颗粒间搭桥但并非完全填充孔隙,在提高土体强度的同时保持土体相对较高的渗透性,有效防治砂土液化。总而言之,MICP由于其成本效益高,过程可控性强,对环境影响小,以及可以对岩土体进行原位修复等特点,已成为岩土及相关工程中一种极具潜力的技术。

将MICP应用于土壤体改良中主要有两种手段:生物强化和生物刺激。生物强化是指外源细菌被人为添加到土壤土体中以促进碳酸钙沉淀。生物刺激则是指通过刺激本地细菌以获得碳酸钙沉淀,图1、2为生物刺激MICP原理图(以防治海岸带侵蚀为例)。Burbank等首次通过生物刺激手段,使得本地土体中的脲酶阳性细菌大量聚集,在二价钙离子存在的情况下水解尿素,从而导致方解石在土体孔隙内沉淀。后续科学家对两种方法进行了一系列共同实验。使用与培养注入沉积物种的*S. pasteurii*相同的培养手段对沉积物中的本地细菌进行刺激,而后对模型槽中的样品进行生物监测,剪切波速测量,静态贯入试验等试验,结果表明天然的解脲微生物被生物刺激后,在米尺度上显著改善松散砂,其结果与使用*S. pasteurii*生物增强方法取得的结果相媲美^[2]。

2. 微生物富集培养

微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)的第一步就是脲酶微生物的培养。生物刺激方法由于土体样品中微生物种类多样,无法针对性的使用某种特定培养基,因此培养基成分对于生物刺激的影响也是科学家们重点关注的一个问题,选用了酵母提取物(YE)、麦芽提取物(ME)和营养肉汤(NB)三种富集培养基,通过调整其中额外添加的尿素的含量,探究发现氮源含量较高的YE和NB培养基的效率优于ME,同时脲酶的解脲活性会随着尿素浓度的增加而增加,直至达到阈值尿素浓度。同时也需要根据某些采样点的特殊环境条件,添加一些相对应的培养基组分,例如从沿海或海水层区域取得的样品,培养时要适当添加人工海水成分以模拟还原现场环境。从特殊温度地区如亚北极寒冷地区、沙漠地区取样后的培养要注意温度对脲酶微生物的影响。

总结现有的文献,发现在富集培养基中添加适量原先土体环境中没有的铵根离子(2-10g/L)和尿素(120-333mM),对诱导土体中原生脲酶微生物具有良好的效果。因此添加适量的尿素在刺激液中是目前生物刺激方法的普遍做法。目前已发现的脲酶活性较高的环境脲酶微生物如表1所示,有多种脲酶细菌的解脲能力不亚于生物强化所常用的*S. pasteurii*。

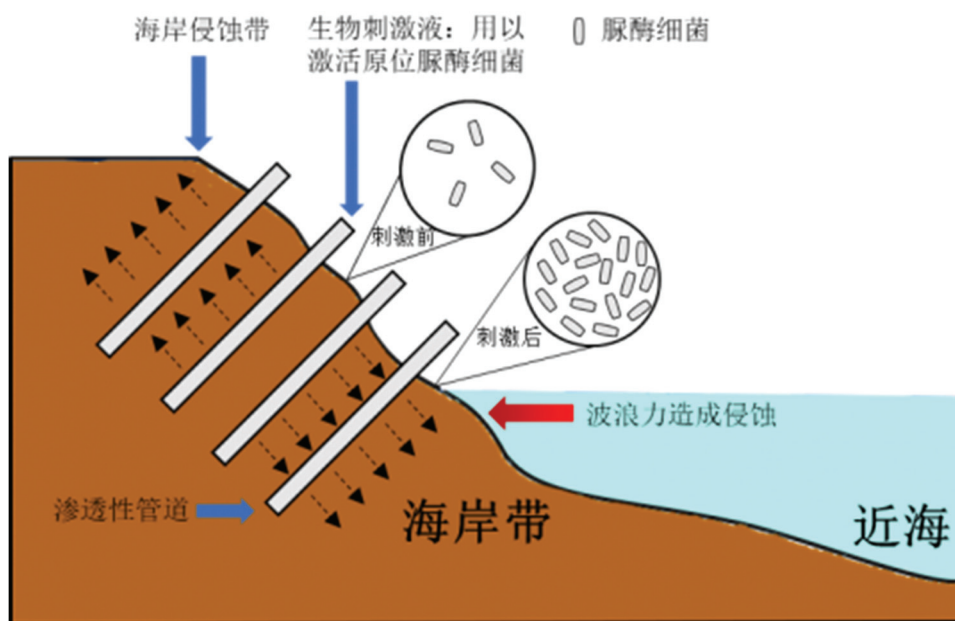


图 1 生物刺激 MICP 原理图 (以防治海岸带侵蚀为例)

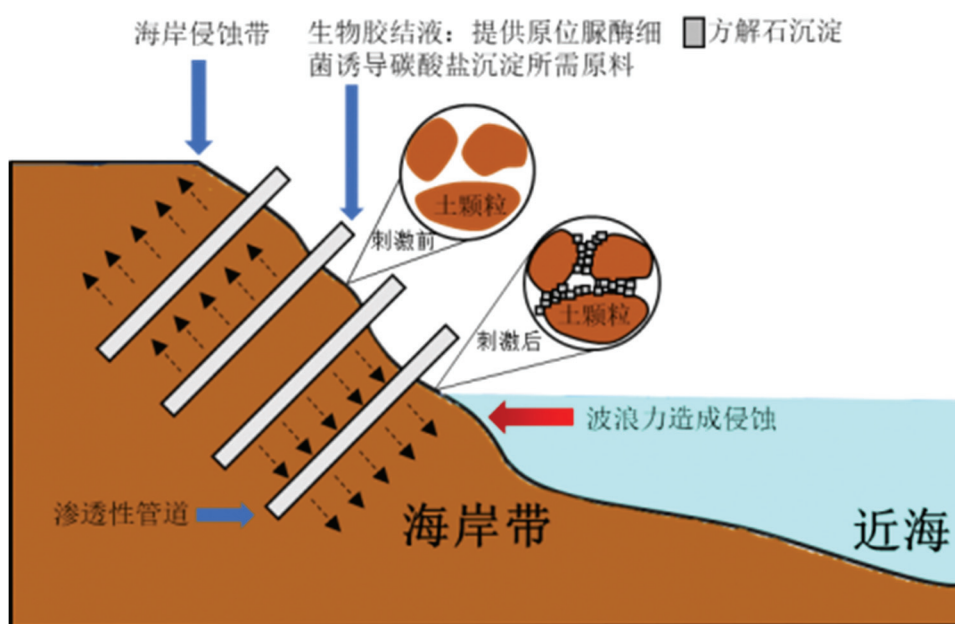


图 2 生物刺激 MICP 胶结阶段原理图 (以防治海岸带侵蚀为例)

细菌名称	脲酶活性	细菌浓度
<i>Pararhodobacter sp.</i>	0.8 mM urea/min	0.7-1.0 (OD ₆₀₀)
<i>Virgibacillus sp.</i>	0.9 mM urea/min	2.1 ± 0.2 (OD ₆₀₀)
<i>Micrococcus sp.</i>	1.1 mM urea/min	1.9 ± 0.1 (OD ₆₀₀)
<i>Bacillus sphaericus</i>	10 μM urea/min	2-2.5 (OD ₆₀₀)
<i>Brevundimonas sp.</i>	870 mg CaCO ₃ /L	300 cells/mL × 10 ⁶

表 1 代表性环境解脲细菌脲酶活性

3. 生物刺激 MICP 增强土体

表征解脲细菌加固土体能力指标除了解脲性能外, 促进结晶成核的能力也是很重要的, 因为松散的碳酸钙结晶颗粒只有成核后才能起到加固的作用。对于细菌表面成为有效的成核位点已有很多的研究, 以往文献指出细菌可以通过营造碱性环境和分泌细胞外聚合物 (EPS) 来促进沉淀的碳酸盐成核结

晶。同时细菌表明带有一些带负电荷的官能团（例如羧基，羟基等），带正电的钙离子等金属离子受到吸附作用，从而起到模板的作用^[3]。

考虑到 MICP 技术最终需要运用到现场工程中，因此在实验室实验中难以考虑到的问题也需要加以关注，例如深层土体中氧气含量问题。目前发现的大多数脲酶微生物均为好氧菌，这些微生物大多也作用于表层土体中，因为那里的氧气含量足够其表达活性。然而现场工程中需要加固的区域不仅限于表层，相反很多时候需要解脲细菌作用于深层土体。这就需要解脲细菌可以在缺氧条件下生存，繁殖并合成尿素酶。目前关于无氧条件下生物强化所用菌株的解脲效率存在争议，据报道 *B. megaterium* 和 *S. pasteurii* 在缺氧条件下仍有较高脲酶活性，但这归功于先前预培养时已经存在于细胞中的尿素酶。然而这些人为引入的解脲细菌无法在缺氧条件下持续生长，需要持续注菌。而本地解脲微生物广泛存在于缺氧的地下环境，因此在这种条件下，应对首先选择使用生物刺激方法。

判定某处现场是否可以运用生物刺激 MICP 方法，首先要进行实验室试验，判断此处是否含有原位脲酶细菌。利用 PDMS 微流控芯片进行模拟实验，可以满足在实验过程中随时观察细菌特点与胶结情况。作者将采集自南方科技大学校园内三处边坡土的样品在微流控芯片中进行生物刺激与胶结实验。结果表明有明显生成晶体沉淀，并与生物强化结果进行对比发现，沉淀晶体呈现堆叠状（图 3a）。之后通过扫描电子显微镜（SEM）与能量散射 X 射线谱（EDX）相结合使用，拍摄到非常清晰的微流控芯片通道内的结晶照片（图 3b），并通过分析其 EDX 数据图峰值确定该晶体组分为碳酸钙，为后续实验奠定基础。

除实验室尺度实验外，现场尺度实验也是生物刺激 MICP 的一种重要手段，最常用的是大型槽实验。相较于现场规模实验，大型槽实验的优势是实验条件较容易控制，成本更低，然而对实验结果的表征则不如实地规模实验更具有相关性。相比生物强化的实地规模实验，生物刺激就省去了注入菌液这一步，降低了生态风险和培养成本。需要注意的是注入胶结液的次数越多，堵塞的风险就越大，也会增加成本。

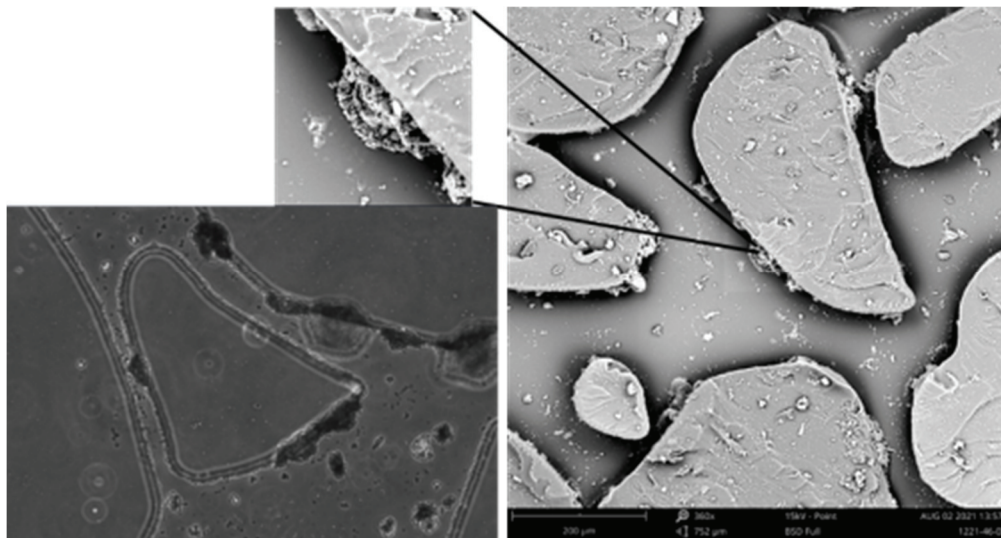


图 3 微流控芯片中原位脲酶细菌结晶状况 (a) 电镜照片 (b)

4. 展望

随着近年来人类对于环境保护的重视，利用生物手段取代原有的物理、化学手段处理工程问题也成为可持续且备受关注的办法。而通过刺激目标土体中原有的解脲细菌，使其诱导产生碳酸钙沉淀，加固土体强度或混凝土裂隙则是这些手段中的佼佼者。因其无需人为引入外源细菌，从而节省成本的同时避免了外来生物对当地环境产生不良影响。这一技术在未来的应用前景有：

(1) 原位刺激脲酶微生物防止土体液化。微生物活动导致碳酸钙沉淀, 剪切强度、限制压缩强度、刚度和液化阻力增加, 有可能成为稳定土体的传统方法(例如化学灌浆)的一种具有成本效益和绿色的替代方法。

(2) 加固海岸, 防治海岸带侵蚀。目前已有日本, 瑞士等海岸线较长国家的科学家在海岸侵蚀严重地区的样品中分离到解脲能力较强的脲酶细菌, 并通过土柱实验表明其有加固海岸的潜力。

(3) 重金属和放射性核素污染修复。MICP 是一种在控制各种污染物和重金属领域很有前途的技术。目前已有某些污水处理厂开始引入这一技术。而生物刺激则通过激活原位的细菌, 避免了人为引入的细菌可能对重金属离子或核素元素具有不良反应的问题。

参考文献

[1] Anbu, P., et al., Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. Springerplus, 2016. 5(1): p. 1-26.

[2] Burbank, M.B., et al., Precipitation of calcite by indigenous microorganisms to strengthen liquefiable soils. Geomicrobiology Journal, 2011. 28(4): p. 301-312.

[3] Jiang, N.-J., et al., Bio-mediated soil improvement: An introspection into processes, materials, characterization and applications. SOIL USE AND MANAGEMENT, 2021.