

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2023.016



开放科学(资源服务)标识码 OSID:



天然海水环境下离子浓度对 MICP 反应的影响

滕秀英¹, 王子玉^{2a,3}, 贾永刚⁴, 陈文婧^{2b}

(1. 中国海洋大学 三亚海洋研究院, 海南 三亚 572000; 2. 海南热带海洋学院 a. 海洋科学技术学院; b. 生态环境学院, 海南 三亚 572022; 3. 海南热带海洋学院 崖州湾创新研究院, 海南 三亚 572025; 4. 中国海洋大学 山东省海洋环境地质工程重点实验室, 山东 青岛 266100)

摘要: 微生物岩土技术通过生物矿化过程改善基础材料的力学性质, 使其更适用于建筑或解决多学科领域的环境问题。微生物矿化过程中产生的碳酸钙是改善基础材料力学性质的主要成分, 但其生成量及形态等受多种因素的影响。通过离子计、pH 计、SEM、EDS 和 XRD 等手段探究天然海水和去离子水环境在矿化过程中氯化钙和尿素浓度、比例及菌液和胶结液(氯化钙、尿素)体积比等因素对沉淀物质形貌及晶体组成的影响。结果表明: 钙离子和尿素浓度及比例低时, 碳酸钙的产率较高, 但当初始钙离子、尿素浓度超过 1.0 mol/L 时, 离子浓度增大对细菌产脲酶有抑制作用, 浓度越高对脲酶的抑制作用越明显, 沉淀物产率也随之减小, 海水环境总体沉淀量与沉淀效率均高于去离子水环境。菌胶结液体积比去离子水中为 1:4、海水中不高于 1:10 时, 碳酸钙生成量较高, 去离子水环境晶型以方解石为主, 海水环境晶型以球霏石为主且沉淀中含有镁盐。

关键词: 微生物诱导碳酸钙沉淀; 水环境; 离子浓度; 碳酸钙沉淀效率

中图分类号: TU411.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-6717(2024)05-0047-10

Effect of ion concentration on MICP reaction in natural seawater environment

TENG Xiuying¹, WANG Ziyu^{2a,3}, JIA Yonggang⁴, CHEN Wenjing^{2b}

(1. Sanya Academy of Oceanology, Ocean University of China, Sanya 572000, Hainan, P. R. China; 2a. College of Marine Science and Technology; 2b. College of Ecology and Environment, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, Hainan, P. R. China; 3. Yazhouwan Innovation Research Institute, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572025, Hainan, P. R. China; 4. Shandong Provincial Key Laboratory of Marine Environmental Geology and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, P. R. China)

Abstract: Microbial geotechnical technology improves the mechanical properties of basic materials through the

收稿日期: 2022-10-31

基金项目: 国家自然科学基金(42162024、41831280); 海南省自然科学基金高层次人才项目(421RC592)

作者简介: 滕秀英(1996-), 女, 主要从事微生物诱导碳酸钙沉淀加固砂土研究, E-mail: txyyaojiayou@163.com。

王子玉(通信作者), 女, 博士, E-mail: zywang@hntou.edu.cn。

贾永刚(通信作者), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: yonggang@ouc.edu.cn。

Received: 2022-10-31

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (Nos. 42162024, 41831280); Hainan Natural Science Foundation High-level Talents Project(No. 421RC592)

Author brief: TENG Xiuying(1996-), main research interest: technology of sand reinforcement by calcium carbonate precipitation induced by microorganisms, E-mail: txyyaojiayou@163.com.

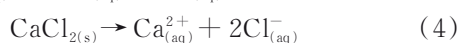
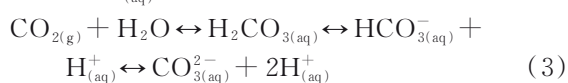
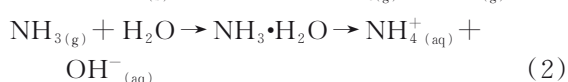
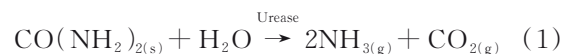
WANG Ziyu(corresponding author), PhD, E-mail: zywang@hntou.edu.cn.

JIA Yonggang(corresponding author), professor, doctoral supervisor, E-mail: yonggang@ouc.edu.cn.

process of biological mineralization, making it more suitable for building or solving environmental problems in multi-disciplinary fields. Calcium carbonate produced by microbial mineralization is the main component that improves the mechanical properties of basic materials, but the production efficiency and form are affected by many factors. By means of ion meter, pH meter, SEM, EDS and XRD, the influences of the concentration and proportion of calcium chloride and urea and the volume ratio of bacteria liquid and cementation liquid (calcium chloride, urea) on the morphology and crystal composition of precipitates in natural seawater and deionized water environment during the mineralization process were investigated. The results showed that: production of calcium carbonate is poorer when calcium ion concentration and the ratio of Ca^{2+} to urea are lower, however, the ion has an inhibitory effect on the production of urease by bacteria when the initial calcium ion and urea concentration exceeds 1.0 mol/L. The more obvious inhibition effect was observed at a higher ion concentration, and thus a lower precipitation product rate. The amount of precipitates and precipitation rate in the seawater environment were higher than those in the deionized water environment. When the volume ratio of bacterial to cementation solutions are 1:4 in deionized water and less than 1:10 in seawater, the amount of calcium carbonate is higher. The crystal type in deionized water is mainly calcite, while the crystal type in seawater is mainly of magnesium salt type.

Keywords: microbial induced carbonate precipitation (MICP); water environment; ion concentration; precipitation efficiency of calcium carbonate

随着微生物学、地球化学及岩土工程等学科的交叉,微生物诱导碳酸钙沉淀(Microbial Induced Carbonate Precipitation, MICP)技术引起人们广泛关注,它在自然界中普遍存在且起到微生物诱导矿化作用^[1],该技术原理是产脲酶微生物催化环境中的尿素(Urea)水解产生 NH_3 和 CO_2 (式(1)), NH_3 溶于水生成 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 为弱电解质,在溶液中电离出 NH_4^+ 和 OH^- ,使溶液 pH 值升高(式(2)),同时促进式(3)中的反应朝 CO_3^{2-} 生成的方向进行,吸引环境中的 Ca^{2+} 在细菌表面与 CO_3^{2-} 生成碳酸钙结晶^[2-6](式(5)),细菌细胞为其提供成核位点^[7],随着反应的进行,细胞表面晶体数量增加,细胞被包裹,导致代谢所需的营养物质传输受阻,产脲酶能力逐渐减弱至细菌死亡,最终反应停止^[8],生成的碳酸钙结晶逐渐积累变大,在砂粒之间起连接作用,限制砂土移动从而提高土壤的强度和刚度等特性^[9]。Robert 等^[10]通过研究发现,与自发反应相比,脲酶使 Urea 的水解速度提高了 10^{14} 倍。



目前产脲酶微生物已被广泛用于诱导碳酸钙沉淀,从岩土工程角度来看, MICP 技术可以在不破坏原有土壤结构的情况下原位进行^[11],除土壤加固

外,原位碳酸钙沉淀还有许多其他应用,例如保护石灰岩纪念碑、堵塞采油储层岩石的孔隙、修复混凝土裂缝及减轻土壤的液化潜力^[12-14]等。碳酸钙通常以无定形、球霏石、文石和方解石等形式存在^[15]。影响碳酸钙沉淀的因素很多,包括细菌类型、细菌细胞浓度、pH 值、温度、Urea 和 Ca^{2+} 浓度等^[16-18],碳酸钙晶体形式影响沉积效果,探究不同条件对碳酸钙沉淀量及晶型形式的影响尤为重要。天然海水含盐量为 3.6%,属于高盐环境,该环境下由于渗透压和离子强度的影响,巴氏芽孢杆菌可能出现膜结构破坏甚至死亡的情况,董博文等^[19]对海水环境中微生物生长繁殖情况和脲酶活性进行研究,发现海水环境中培养的菌液在繁殖期间 OD_{600} 值低于去离子水环境中 OD_{600} 值,表明天然海水会抑制巴氏芽孢杆菌的生长,但稳定期细菌数量相差不大,即巴氏芽孢杆菌能够一定程度上克服盐度的影响并适应了海水环境。此外,有研究表明,较高的氯化钙 (CaCl_2) 和 Urea 浓度会抑制脲酶的活性,导致碳酸钙沉淀效率下降^[11,20];王子玉等^[21]研究了海水环境下微生物矿化反应速率与反应程度的影响,进一步揭示了水环境、脲酶、胶结液之间相对浓度的重要性。Mortensen 等^[22]使用地震剪切波速和电导率测量等技术,发现生物处理过程在众多土壤类型、氯化铵浓度和盐度范围内,从淡水到海水都同样有利于碳酸钙沉淀。

Urea 提供氮源, CaCl_2 提供钙源,由式(1)~式(5)可知,1 mol CaCl_2 与 1 mol Urea 完全反应生成 1 mol 碳酸钙,而 Okwadha 等^[23]研究表明,保持 Urea

浓度(333、666 mmol/L)不变,当 Ca^{2+} 浓度由25 mmol/L增加至250 mmol/L时,碳酸钙沉淀量可提高100%;但不同的是,Almajed等^[24]发现1 mol/L Urea、0.67 mol/L CaCl_2 和3 g/L脲酶处理溶液被确定为高沉淀质量和高沉淀效率的首选配方。因此, Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 的浓度和比例对碳酸钙沉淀的效率和质量有重要影响,科学合理的胶结液浓度及比例对MICP技术的有效应用至关重要。

目前大多数研究直接评估砂样的改善效果,较少评估灌浆溶液导致的沉淀特性,且相同条件下海水环境对其影响研究较少。鉴于此,笔者选用巴氏芽孢杆菌,考虑天然海水和去离子水环境下,离子浓度、胶结液与菌液体积比对MICP反应的影响规律,通过监测pH值、 Ca^{2+} 浓度变化规律,分析MICP反应速率与反应程度,通过扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)、能谱仪(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)和X射线衍射仪(X-Ray Diffractometer, XRD)观察生成沉淀物质的形貌及晶体组成,分析其矿物成分,了解各因素对生成碳酸钙形貌、沉淀效率及沉淀特征的影响。

1 材料与方法

1.1 天然海水

试验所用海水取自三亚大东海,pH值为8.25,含盐量为3.6%,离子成分如表1所示^[21]。

表1 海水中离子成分及浓度

mg/L			
Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+
426.53	1 219.86	11 078.58	140.16
Ba^{2+}	Cl^-	HCO_3^{2-}	SO_4^{2-}
0.12	18 690.10	169.01	2 769.10

1.2 细菌培养及监测

使用的细菌为巴氏芽孢杆菌(*Bacillus pasteurii*, 编号337 394, BeNa Culture Collection),

为中度嗜碱菌,具有非致病性的特点,是目前已知脲酶活性最高的细菌之一^[19],且存在于自然土壤中。试验中液体培养基配方为^[21]:5 g/L CaCl_2 、20 g/L Urea、15 g/L酪蛋白胨、5 g/L大豆蛋白,用NaOH将pH值调节至7.3,将制备好的溶液放置在高压锅内121 °C灭菌30 min,在无菌操作台上将培养皿中的菌群接种至高温灭菌冷却后的溶液中,之后放入摇床控制温度为25 °C,以220 r/min培养36 h后取出,即得试验所需菌液。

选用电导率法监测细菌活性,原理是在脲酶催化作用下不导电的Urea分子被水解转化成 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} ,使溶液的电导率增加,且电导率的变化速度与酶活性成正比^[25],依据Whiffin等^[26]的研究将3 mL的菌液与27 mL、1.11 mol/L的Urea溶液混合,在25 °C下用电导率仪测量5 min内相对电导率的变化值,然后考虑10倍稀释度,试验测得5 min内电导率变化值为1.38 mmol/(L·min)。使用紫外可见光光度计在600 nm波长下测量菌液的吸光度来量化细菌细胞浓度,测得 OD_{600} 为1.0。

2 试验方案

2.1 MICP水溶液试验

试验中发生的矿化反应及流程如图1所示。基于前人对胶结液浓度范围的研究,设置 CaCl_2 初始浓度为0.5、1.0、1.5 mol/L作为低、中、高浓度代表,选取 CaCl_2 与Urea浓度比为1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25和1:1.5,探究 CaCl_2 和Urea浓度及比例对反应的影响。将试剂溶于海水中,设置去离子水环境作为对照组,选取菌液与胶结液按照体积比1:4混合^[21],具体数据如表2所示,使用雷磁生产的离子计和pH计,监测试验过程中pH及 Ca^{2+} 浓度的数值变化,并称量沉淀物的质量,计算产率(实际生成量与理论生成量的比值)。

选取菌液与胶结液体积比为1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、0:1,具体数值见表2,监测混合液中pH值及 Ca^{2+} 浓度的数值变化;另制备相同混合溶液放置

表2 胶结液浓度、比例与菌液体积的关系

编号	水环境	$C_{\text{CaCl}_2}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$C_{\text{CaCl}_2}:C_{\text{Urea}}$	$V_{\text{菌}}:V_{\text{胶}}$
H01-H05	海水	0.5	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
H06-H10	海水	1.0	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
H11-H15	海水	1.5	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
D01-D05	去离子水	0.5	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
D06-D10	去离子水	1.0	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
D11-D15	去离子水	1.5	1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5	1:4
HV01-HV07	海水	1.0	1:1	0:1、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10
DV01-DV07	去离子水	1.0	1:1	0:1、1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10

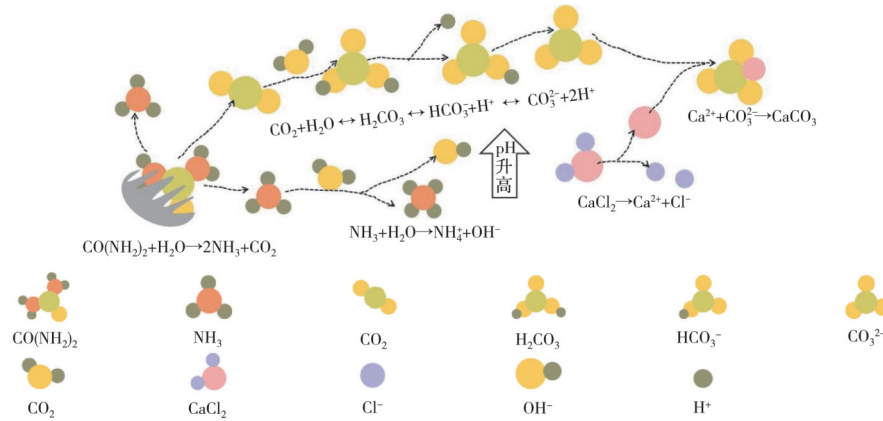


图 1 微生物矿化过程流程图

Fig. 1 Flowchart of microbial mineralization process

在摇床中震荡 48 h 后经滤纸过滤后收集沉淀物,将滤纸与锥形瓶一同放在烘箱中干燥至质量不再发生变化,称量沉淀物质量,计算产率。

2.2 SEM 和 XRD

使用型号为 JSM-7610F PLUS 的场发射扫描电子显微镜(SEM),观察前用喷金仪(离子溅射仪)在样品表面做喷金处理,目的是增强导电性。然后在 10 kV 加速电压下观察不同胶结液浓度及菌胶体积比等条件下沉淀物形状的差异,结合 EDS 对样品中的元素进行鉴定,将沉淀物用玛瑙研钵磨成粉末状制样后放入仪器中检测,经 XRD 测定样品物相组成,用 Jade 分析所得数据。

3 结果与分析

3.1 胶结液浓度及比例

3.1.1 pH 值变化

Mortensen 等^[22]发现,以巴氏杆菌为代表的细菌能够在去离子水及天然海水的条件下生长,因此该菌可以在各种水环境中诱导 MICP。

以 Ca^{2+} 初始浓度为 1.0 mol/L, $C_{\text{CaCl}_2} : C_{\text{Urea}}$ 分别为 1:0.5、1:0.75、1:1、1:1.25、1:1.5 为例,分析图 2 发现,在海水和去离子水环境中菌液和胶结液混合后 pH 变化规律相似:0.5 h 内升高,之后逐渐降低,最终至平稳状态。原因是环境中的 pH 值因 Urea 水解和碳酸钙的生成而改变,首先 Urea 水解提高了系统的 pH 值并产生 CO_3^{2-} ,随着碳酸钙的生成,溶液 pH 值降低至中性,但溶液最终 pH 值取决于反应速率和底物浓度^[17]。当 $C_{\text{CaCl}_2} \geq C_{\text{Urea}}$ 反应至平稳状态时,pH 值趋于弱酸性,原因是产物取决于 Urea 的量,随着反应的进行,溶液中生成氯化铵副产物,且 NH_4^+ 水解呈弱酸性;当 $C_{\text{CaCl}_2} < C_{\text{Urea}}$ 时,溶液中 pH 值趋于弱碱性,原因是产物取决于 Ca^{2+} 的量,溶液

中大部分 CO_3^{2-} 与 Ca^{2+} 结合形成碳酸钙结晶,留有较多的 OH^- 未参与反应,使得溶液呈碱性。但并不是 Urea 浓度与 CaCl_2 浓度差距越大溶液中的 pH 就越高,如去离子水环境 1:1、1:1.25、1:1.5 溶液中 pH 随 Urea 浓度增大而减小,这一结果可归因于蛋白质在含有高浓度 CaCl_2 或 Urea 的溶液中进行变性或沉淀(盐析),对细菌活性有抑制作用,使脲酶水解 Urea 能力减弱^[3, 19, 23],Urea 水解受到抑制;而海水环境 1:1、1:1.25、1:1.5 溶液中反应稳定时 pH 值逐渐增高,原因是虽然高浓度的 CaCl_2 和 Urea 对细菌活性有抑制作用,但海水一般呈碱性,pH 在 8.0~8.5 之间,试验所用海水 pH 值为 8.25,碱性环境对 CaCl_2 和 Urea 的反应起到促进作用,因此相同浓度及比例的胶结液在海水环境内 pH 值到达稳定的时间快于去离子水环境。

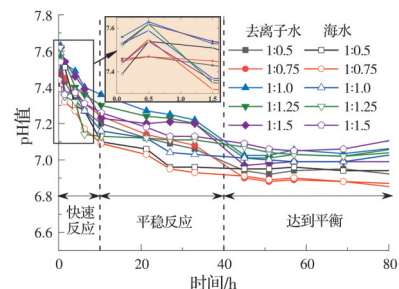


图 2 不同水环境中水溶液试验 pH 值变化

Fig. 2 pH changes of aqueous solutions tested in different water environments

3.1.2 Ca^{2+} 浓度变化

图 3 为 Ca^{2+} 浓度为 0.5、1.0、1.5 mol/L 时不同胶结液比例反应过程中 Ca^{2+} 浓度变化情况。可以看出 Ca^{2+} 浓度均随着时间的增加而降低。去离子水环境中初始 Ca^{2+} 浓度为 0.5 mol/L 时(图 3(a)),随 Urea 比例增加胶结液中 Ca^{2+} 浓度降低,最后至稳定状态;当初始 Ca^{2+} 浓度为 1.0 mol/L(图 3(b)),胶

结液比例低于 1:1 时,溶液中 Ca^{2+} 的浓度随反应的进行而降低,但比例超过 1:1 时溶液中 Ca^{2+} 的浓度随 Urea 浓度的增加而增加,原因是胶结液浓度过高,对细菌产脲酶有抑制作用,且浓度越高对脲酶的抑制作用越强,进而影响催化效果,即更多的 Ca^{2+} 未参与反应;当 Ca^{2+} 浓度为 1.5 mol/L 时(图 3(c)), Ca^{2+} 浓度变化与 1.0 mol/L 时相似。

与去离子水环境相比,海水呈碱性,试验使用

海水 pH 值为 8.25,由图像可知在初始钙离子浓度为 0.5、1.0、1.5 mol/L 时,随着反应时间的增加,环境中 Ca^{2+} 浓度变化情况与去离子水环境相似,但不同的是反应到达基本平衡的时间(反应速率)及溶液中剩余 Ca^{2+} 的浓度。图 3(d)为反应 80 h 达到平衡时溶液中剩余 Ca^{2+} 浓度,柱状图为残余 Ca^{2+} 浓度,折线图为 Ca^{2+} 残余量。从图中可以看出,海水环境比去离子水环境中 Ca^{2+} 浓度变化程度大,且最终溶液中剩余的 Ca^{2+} 浓度更低,其主要原因是虽然随着胶结液浓度的增加,脲酶催化速率会降低,但海水环境为碱性,会促进反应的进行。且试验过程中溶液外观颜色变化明显:菌液和胶结液混合时,海水环境中溶液颜色由透明色变成乳白色(生成碳酸钙)的时间较去离子水环境时间更短。此外发现,去离子水和海水环境胶结液浓度比相同时,胶结液浓度越高 Ca^{2+} 达到稳定的时间越长,即胶结液浓度对反应时间也有影响。

这些结果似乎表明,当溶液中 Urea 和 CaCl_2 的浓度高于最佳浓度时,脲酶催化作用受到限制,降低了其生物催化 Urea 水解的能力,此外 Nemat 等^[27-28]、Qabany 等^[29]通过实验也观察到试剂(Urea- CaCl_2)浓度增加超过一定限度并不会导致土壤的更高改良水平。

3.1.3 沉淀物产量

锥形瓶在 25°C、220 r/min 的摇床中震荡 48 h,将反应液经滤纸过滤,并用去离子水浸泡锥形瓶,每隔 12 h 换一次水,冲洗液也经滤纸过滤,清洗 3 次后在烘箱 60°C 下干燥至锥形瓶和滤纸的质量不再发生变化,之后测量滤纸和锥形瓶的质量,计算出沉淀物的质量。

从图 4(a)可以看出,胶结液比例一定时,随 CaCl_2 浓度(0.5、1.0、1.5 mol/L)增加,沉淀物质量逐渐增大,但海水环境中沉淀物质量要大于去离子水环境,原因是海水 pH 值较高,可以促进溶液中反应(式(3))正向进行,产生更多的 CO_3^{2-} ,与 Ca^{2+} 结合使沉淀增加;此外,海水中可能还存在 Ba^{2+} 和 Mg^{2+} ,会与碳酸根结合生成碳酸盐类结晶^[21]。当 $C_{\text{CaCl}_2}:C_{\text{Urea}}$ 为 1:0.5、1:0.75 时沉淀量较其他胶结液比例低,原因是此时 $C_{\text{CaCl}_2} > C_{\text{Urea}}$,沉淀量取决于 Urea 的量,即使反应完全,溶液中仍有剩余的 Ca^{2+} 未参与反应。 $C_{\text{CaCl}_2}:C_{\text{Urea}}$ 为 1:0.5、1:0.75、1:1 时沉淀物的产率随着初始溶液中 Ca^{2+} 的增加呈先增加后减小的趋势, $C_{\text{CaCl}_2}:C_{\text{Urea}}$ 为 1:1.25、1:1.5 时沉淀物产率随溶液浓度增加而逐渐减小(图 4(b)),且海水

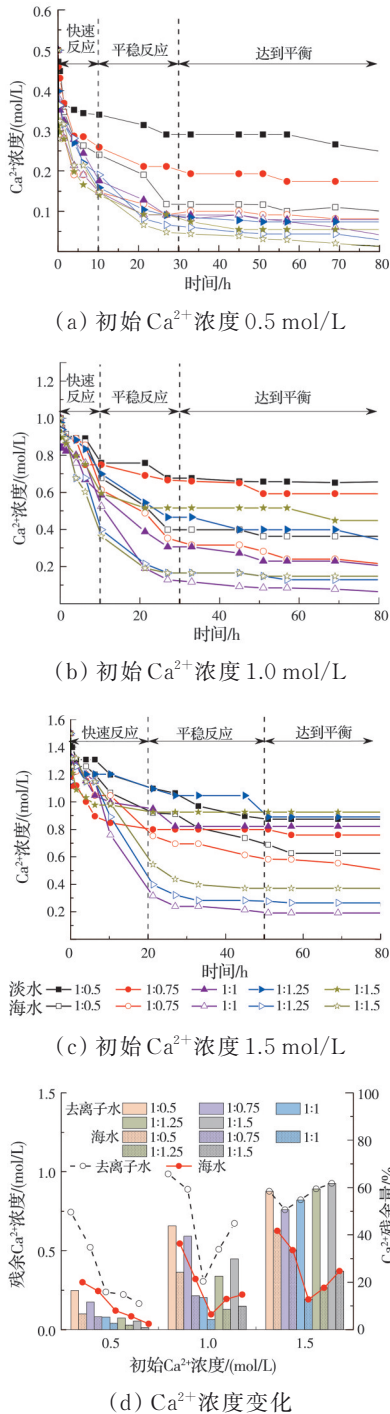
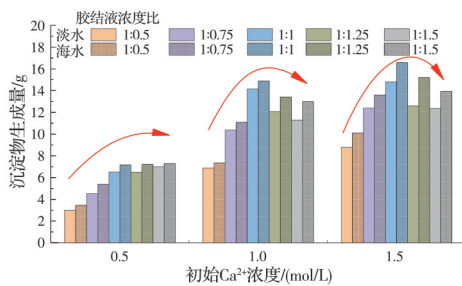
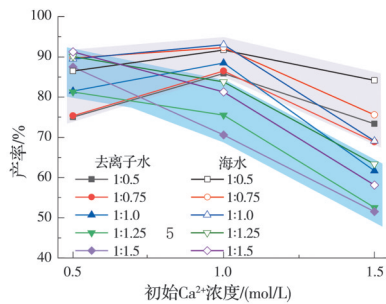


图 3 去离子水和海水环境中 Ca^{2+} 浓度变化
 Fig. 3 Changes of Ca^{2+} concentration in deionized water and seawater environments

环境中产率变化程度低于去离子水环境,原因与 Ca^{2+} 浓度变化密切相关。从表3可知,无论海水还是去离子水环境,当胶结液浓度比例大于1且比例相同时,随着 Ca^{2+} 浓度的增加,沉淀物增长率逐渐减小, CaCl_2 浓度从1.0 mol/L到1.5 mol/L时,沉淀物的增长率远小于0.5 mol/L到1.0 mol/L的变化情况,说明高浓度胶结液对反应起到抑制作用。对沉淀模式和晶体尺寸的这些差异进行更详细的讨论,以及这些差异的量化,可能是未来研究的主题。



(a) 不同环境中碳酸钙生成量的变化



(b) 不同环境中碳酸钙产率的变化

图4 不同环境中碳酸钙生成量及产率的变化

Fig. 4 Variation of calcium carbonate production and yield in different environments

经分析可以发现:去离子水和海水环境中pH值先上升后下降至平衡; Ca^{2+} 浓度一直呈降低趋势最终至平稳;随 Ca^{2+} 及Urea浓度的增加,沉淀量逐

渐增加,海水环境中沉淀物质量大于去离子水环境。当 Ca^{2+} 浓度为0.5 mol/L时,Urea浓度越大,沉淀物生成量越多,产率越高。当 Ca^{2+} 浓度为1.0 mol/L时, $C_{\text{CaCl}_2} \geq C_{\text{Urea}}$ 时随Urea浓度增加,溶液中 Ca^{2+} 浓度越低,沉淀物生成量增加,产率也呈增长趋势; $C_{\text{CaCl}_2} < C_{\text{Urea}}$ 时随Urea浓度增加,平衡时溶液中 Ca^{2+} 浓度越高,沉淀物生成量虽然在增加,但产率一直呈减小的趋势。当 Ca^{2+} 浓度为1.5 mol/L时,随Urea浓度增加,碳酸钙生成量增加,但产率降低,且小于初始 Ca^{2+} 浓度为0.5、1.0 mol/L时的产率。去离子水和海水环境中 $C_{\text{CaCl}_2} = 1$ mol/L、 $C_{\text{CaCl}_2} : C_{\text{Urea}} = 1:1$ 时沉淀物质量及产率最大,效果最好。

3.2 胶结液与菌液的体积比

图5(a)、(b)是以初始 Ca^{2+} 浓度为0.5 mol/L, CaCl_2 和Urea浓度比为1:1,菌液和胶结液体积比为1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10、0:1的溶液,可以看出,在最初0.5 h内混合液中pH值迅速上升,表明Urea水解使溶液呈碱性,之后反应生成碳酸钙过程pH值下降到平稳状态,但可以发现试验达到pH值及 Ca^{2+} 浓度平衡值时所需的时间随菌液占比增加而减少,结合沉淀物生成量图5(c)看出,当菌胶体积比小于1:6时,海水环境中沉淀物产率高于去离子水环境,而且到达稳定的时间短。去离子水环境中菌液和胶结液体积比小于1:4,海水环境中小于1:10时,测得溶液中 Ca^{2+} 浓度趋于零,催化效果好,但菌液和胶结液体积比小于1:4时经济效益不高,去离子水可选用1:4附近的比值,海水环境中可选用稍高点的比值,但低于1:10时较为理想。

当去离子水和海水环境中菌液和胶结液体积比为0:1时(图5(b))可看出,海水中 Ca^{2+} 浓度变化幅度比去离子水环境大,证明海水环境对Urea水解起到促进作用。

表3 Ca^{2+} 浓度与胶结液浓度比对沉淀物增长率的影响

Table 3 Effect of Ca^{2+} concentration on the ratio of cementing fluid concentration on sediment growth rate

胶结液浓度比	沉淀物增长率/%			
	淡水 CaCl_2 浓度 0.5~1.0 mol/L	淡水 CaCl_2 浓度 1.0~1.5 mol/L	海水 CaCl_2 浓度 0.5~1.0 mol/L	海水 CaCl_2 浓度 1.0~1.5 mol/L
1:1	117.2	4.5	4.3	4.5
1:1.25	85.8	107.8	85.9	78.1
1:1.5	61.3	11.5	10.7	7.3

3.3 碳酸钙形态

碳酸钙有多种晶型且形状各异,研究人员通过SEM对MICP处理过的土壤中碳酸钙晶体的形状、

大小、数量和分布等粒度特性进行了广泛研究,发现碳酸钙晶体的形状为球形或棱柱形,分别代表球霏石或方解石,在不同化学浓度处理的样品中,碳

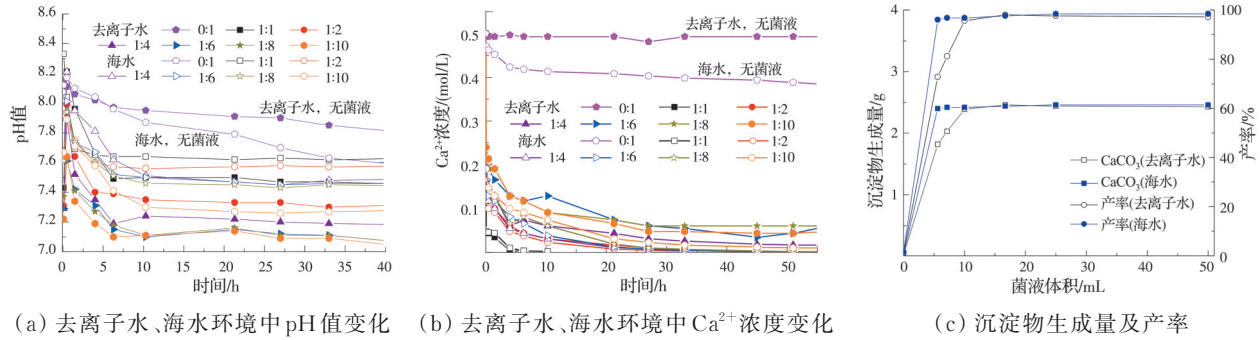


图 5 pH 值、Ca²⁺ 浓度及沉淀物生成量的变化

Fig. 5 Changes of pH, Ca²⁺ concentration and precipitation yield

酸钙晶体的大小和数量不同^[16-17],方解石热力学稳定性是岩土工程应用中最理想的多晶型^[24]。对生成的沉淀物进行SEM成像处理,以可视化沉淀物的形态,结合EDS分析确定每个样品中沉淀的元素组成,此外进行XRD分析以确定样品中的矿物晶相。

从图6观察到,去离子水环境中当Ca²⁺初始浓度相同时(D06、D08、D10),D06、D08条件下碳酸钙晶型为不规则的菱形方解石,随着CaCl₂和Urea浓度增加,在D10条件下出现极少量球霏石;当CaCl₂和Urea浓度比相同时(D03、D08、D13),D03样品中球霏石居多,D08、D13中为方解石,但形状不同;海

水环境下碳酸钙晶型以球霏石居多,Ca²⁺初始浓度相同时(H06、H08、H10),均出现方解石和球霏石,但仍以球霏石为主;当CaCl₂和Urea浓度比相同时(H03、H08、H13),均为方解石和球霏石的混合形式,因此,海水环境中球霏石占主导。去离子水和海水环境中对比不同菌胶体积比发现DV01、DV04中皆为方解石沉淀;HV01、HV04中都为方解石和球霏石的混合形式。此外,HV01中观察到许多与巴氏芽孢杆菌尺寸、形状相似的孔洞,表明巴氏芽孢杆菌在碳酸钙生成过程中充当晶核的作用,这与邵光辉等^[30]研究结果一致。

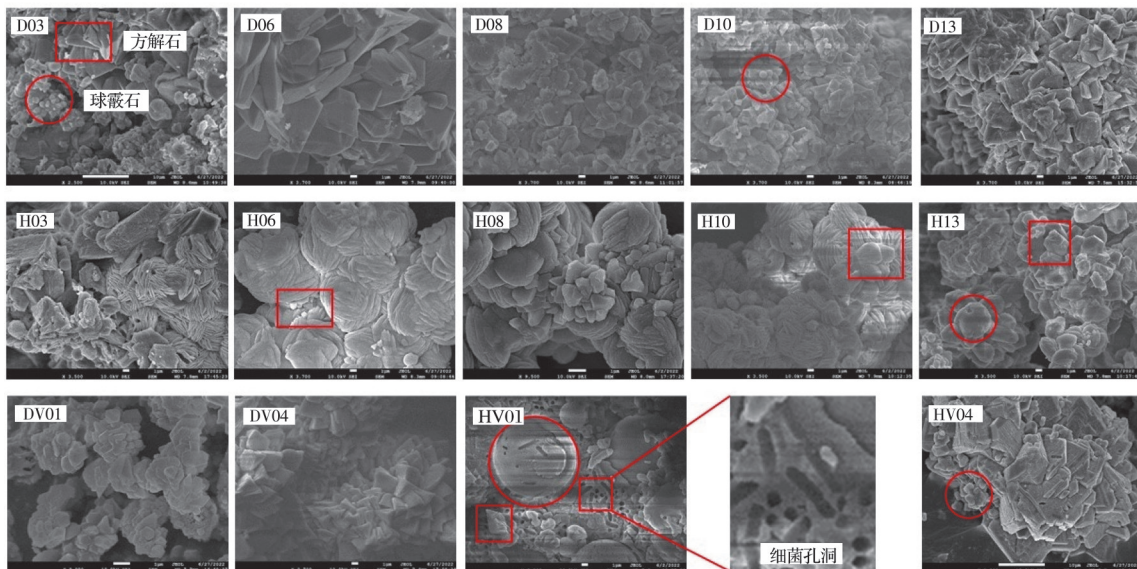


图 6 沉淀物 SEM 图像

Fig. 6 SEM images of sediments

图7为沉淀物EDS图,从图7可以发现,去离子水和海水检测样品中均有C、O、Ca等碳酸钙所需化学元素,结合XRD分析(图8)发现,去离子水沉淀中的物质主要是方解石,Urea浓度低于Ca²⁺浓度、胶结液整体浓度过高时易出现球霏石晶型,与SEM不同的是在XRD分析中D10未见球霏石,而D13中出现球霏石,推测原因是SEM、EDS、XRD等都是

观测手段,并不能全方面地检测出所有物质,且存在一定的误差;海水环境中主要是球霏石和方解石的混合晶型。海水环境复杂,EDS海水环境图像中显示沉淀物中有Mg²⁺存在,XRD中存在含Ca、Mg重叠的峰,原因是海水中含有的少量Mg²⁺、Ba²⁺,在溶液中与碳酸根反应生成碳酸镁钙,且王子玉等^[21]通过水溶液试验发现,海水环境中生成了少量的球

形碱式碳酸镁 ($Mg_5(CO_3)_4(OH)_2 \cdot 4H_2O$) 和 γ 型碳酸钡;董博文等^[19]对海水环境中 MICP 处理后的钙质砂分析发现,除新生成的方解石,还出现了半水硫酸钙、碳酸镁等副产物。

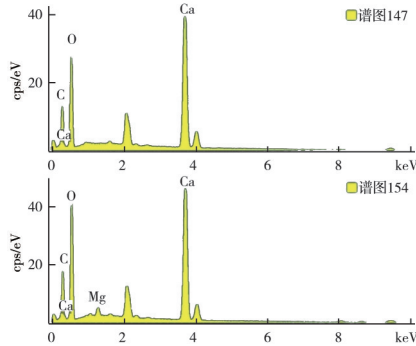
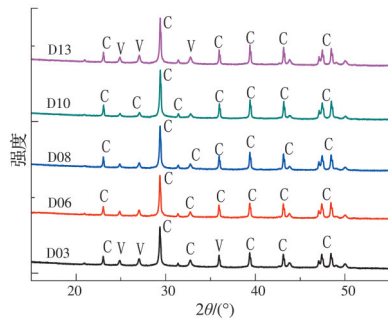
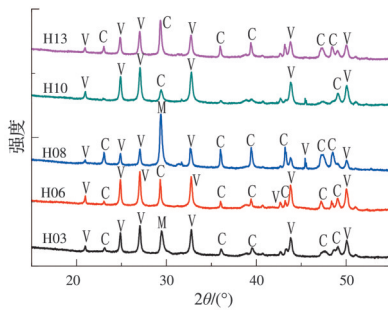


图 7 沉淀物 EDS 图像

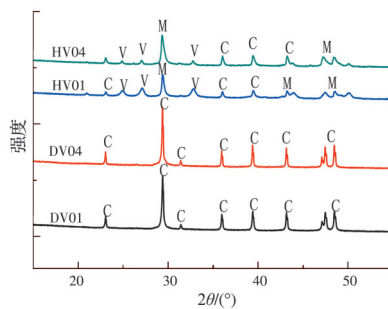
Fig. 7 EDS images of sediments



(a) 去离子水环境



(b) 海水环境



(c) 菌胶体积比不同

注:C-方解石;V-球霏石;M-CaMg (CO_3)₂

图 8 沉淀物 XRD 图像

Fig. 8 XRD images of precipitates

4 结论

1) 通过设置不同水环境、离子浓度及比例等因素,研究巴氏芽孢杆菌对诱导生成碳酸钙沉淀形貌、沉淀量及产率的影响,发现去离子水和海水环境中 pH 值先上升后下降至平衡; Ca^{2+} 浓度为 0.5 mol/L 时 Urea 浓度增加,沉淀物生成量越多,产率越高;当 Ca^{2+} 浓度为 1.0 mol/L, $C_{CaCl_2} \geq C_{Urea}$ 时 Urea 浓度增加,溶液中 Ca^{2+} 浓度越低,沉淀物生成量增加,产率也呈增长趋势, $C_{CaCl_2} < C_{Urea}$ 时 Urea 浓度增加,平衡时溶液中 Ca^{2+} 浓度越高,沉淀物生成量虽增加,但产率一直减小;当 Ca^{2+} 浓度为 1.5 mol/L 时 Urea 浓度增加,沉淀物生成量增加,但产率降低。此外,当胶结液浓度比例大于 1 且比例相同时,随 Ca^{2+} 浓度增加,沉淀物增长率逐渐减少, C_{CaCl_2} 从 1.0 mol/L 到 1.5 mol/L 时,沉淀物增长率远小于 0.5 mol/L 到 1.0 mol/L 的变化情况,说明高浓度胶结液对反应起到抑制作用。海水环境中沉淀物质量要大于去离子水环境,因此,去离子水环境中菌胶结液体积比为 1:4、海水中不高于 1:10, $C_{CaCl_2} = 1$ mol/L、 $C_{CaCl_2}:C_{Urea} = 1:1$ 时,沉淀物质量及产率最大,效果最好。

2) 淡水环境中当 $CaCl_2$ 浓度大于 Urea 浓度时多出现方解石和球霏石的混合晶型,其他浓度未见球霏石;海水环境各因素下多以球霏石和方解石混合晶型出现,但以球霏石晶型为主。在现场应用中使用和控制 MICP 工艺,要考虑胶结液浓度、细菌与胶结液体积比及溶液注入速率等因素;沉积在孔隙中的碳酸钙将样品颗粒连接起来,不同的晶体模式可能会影响样品的强度和刚度,因此,还要考虑现场水环境、沉淀物组成及结构。

3) 沉淀物的产率是根据理论碳酸钙的实际沉淀量与理论生成值定义的,但从 EDS 和 XRD 结果可知海水中还存在 Ba^{2+} 和 Mg^{2+} ,会与碳酸根结合生成碳酸盐类结晶,因此,可进一步探究对海水环境下碳酸钙与其他碳酸盐的识别及对产率的影响。

此外,试验所用海水未进行灭菌处理,海水原位菌群是否对试验结果产生影响有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘汉龙,肖鹏,肖杨,等.微生物岩土技术及其应用研究新进展[J].土木与环境工程学报(中英文),2019,41(1):1-14.
- LIU H L, XIAO P, XIAO Y, et al. State-of-the-art review of biogeotechnology and its engineering applications[J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2019, 41(1): 1-14. (in Chinese)

- [2] YANG Y J, LI M D, TAO X Q, et al. The effect of nucleating agents on enzyme-induced carbonate precipitation and corresponding microscopic mechanisms [J]. *Materials*, 2022, 15(17): 5814.
- [3] 何稼, 楚剑, 刘汉龙, 等. 微生物岩土技术的研究进展 [J]. *岩土工程学报*, 2016, 38(4): 643-653.
HE J, CHU J, LIU H L, et al. Research advances in biogeotechnologies [J]. *Chinese Journal of Geotechnical Engineering*, 2016, 38(4): 643-653. (in Chinese)
- [4] CARMONA J P S F, VENDA OLIVEIRA P J, LEMOS L J L, et al. Improvement of a sandy soil by enzymatic calcium carbonate precipitation [J]. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Geotechnical Engineering*, 2018, 171(1): 3-15.
- [5] SEIFAN M, SAMANI A K, BERENJIAN A. Bioconcrete: Next generation of self-healing concrete [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(6): 2591-2602.
- [6] 杨钻. 高强微生物砂浆机理与工作性能研究[D]. 北京: 清华大学, 2013.
YANG Z. Research on mechanism and performance of high-strength microbial mortar [D]. Beijing: Tsinghua University, 2013. (in Chinese)
- [7] DEJONG J T, FRITZGES M B, NÜSSLEIN K. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear [J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2006, 132(11): 1381-1392.
- [8] 彭劼, 田艳梅, 杨建贵. 海水环境下MICP加固珊瑚砂试验[J]. *水利水电科技进展*, 2019, 39(1): 58-62.
PENG J, TIAN Y M, YANG J G. Experiments of coral sand reinforcement using MICP in seawater environment [J]. *Advances in Science and Technology of Water Resources*, 2019, 39(1): 58-62. (in Chinese)
- [9] HARKES M P, VAN PAASSEN L A, BOOSTER J L, et al. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement [J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(2): 112-117.
- [10] ROBERT L, BLAKELEY, BURT ZERNER. Jack bean urease: The first nickel enzyme [J]. *Journal of Molecular Catalysis*, 1984, 23(2): 263-292.
- [11] RAN D, KAWASAKI S. Effective use of plant-derived urease in the field of geoenvironmental/geotechnical engineering [J]. *Journal of Civil & Environmental Engineering*, 2016, 6(1): 1-13.
- [12] AL-THAWADI S. Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand [J]. *Journal of Advanced Science and Engineering Research*, 2011, 98-114.
- [13] 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): 1005-1014.
- [14] IVANOV V, CHU J. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ [J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2008, 7(2): 139-153.
- [15] KHODADADI TIRKOLAEI H, JAVADI N, KRISHNAN V, et al. Crude urease extract for biocementation[J]. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 2020, 32(12): 1-12.
- [16] NG W, LEE M, HII S. An overview of the factors affecting microbial-induced calcite precipitation and its potential application in soil improvement [J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2012, 6(2): 723-729.
- [17] QABANY AAL, SOGA K, SANTAMARINA C. Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation [J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2012, 138(8): 992-1001.
- [18] 尹黎阳, 唐朝生, 谢约翰, 等. 微生物矿化作用改善岩土材料性能的影响因素[J]. *岩土力学*, 2019, 40(7): 2525-2546.
YIN L Y, TANG C S, XIE Y H, et al. Factors affecting improvement in engineering properties of geomaterials by microbial-induced calcite precipitation [J]. *Rock and Soil Mechanics*, 2019, 40(7): 2525-2546. (in Chinese)
- [19] 董博文, 刘士雨, 俞缙, 等. 基于微生物诱导碳酸钙沉淀的天然海水加固钙质砂效果评价[J]. *岩土力学*, 2021, 42(4): 1104-1114.
DONG B W, LIU S Y, YU J, et al. Evaluation of the effect of natural seawater strengthening calcareous sand based on MICP [J]. *Rock and Soil Mechanics*, 2021, 42(4): 1104-1114. (in Chinese)
- [20] HE J, GAO Y F, GU Z X, et al. Characterization of crude bacterial urease for CaCO₃ precipitation and cementation of silty sand [J]. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 2020, 32(5): 1-9.
- [21] 王子玉, 喻文晔, 齐超楠, 等. 海水环境下MICP的反应机理与影响因素[J]. *土木与环境工程学报(中英文)*. 2022, 44(5): 128-135.
WANG Z Y, YU W Y, QI C N, et al. Reaction mechanism and influencing factors of MICP in seawater environment [J]. *Journal of Civil and Environmental Engineering*, 2022, 44(5): 128-135.
- [22] MORTENSEN B M, HABER M J, DEJONG J T, et al. Effects of environmental factors on microbial induced calcium carbonate precipitation [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(2): 338-349.

- [23] OKWADHA G D O, LI J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation [J]. *Chemosphere*, 2010, 81(9): 1143-1148.
- [24] ALMAJED A, KHODADADI TIRKOLAEI H, KAVAZANJIAN E Jr. Baseline investigation on enzyme-induced calcium carbonate precipitation [J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2018, 144(11): 98-114.
- [25] 刘津江, 王森, 樊敏, 等. 产脲酶微生物的筛选和应用研究进展[J]. *生物技术*, 2022, 32(1): 107-113, 119.
LIU J J, WANG M, FAN M, et al. Research advances in application and screening of urease-producing microorganisms [J]. *Biotechnology*, 2022, 32(1): 107-113, 119. (in Chinese)
- [26] WHIFFIN V S, VAN PAASSEN L A, HARKES M P. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2007, 24(5): 417-423.
- [27] NEMATI M, VOORDOUW G. Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(5): 635-642.
- [28] NEMATI M, GREENE E A, VOORDOUW G. Permeability profile modification using bacterially formed calcium carbonate: Comparison with enzymic option [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 925-933.
- [29] QABANY A A, SOGA K. Effect of chemical treatment used in MICP on engineering properties of cemented soils [J]. *Géotechnique*, 2013, 63(4): 331-339.
- [30] 邵光辉, 尤婷, 赵志峰, 等. 微生物注浆固化粉土的微观结构与作用机理[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2017, 41(2): 129-135.
SHAO G H, YOU T, ZHAO Z F, et al. Microstructure and mechanism of microbial cementation silt treated by bio-grouting[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 41(2): 129-135. (in Chinese)

(编辑 胡玲)