

原位激发产脲酶微生物固化尾矿砂

赖永明¹, 孔秋平²

(1. 龙岩学院资源工程学院, 福建 龙岩 364012; 2. 福建永强岩土股份有限公司, 福建 龙岩 364000)

摘 要: 尾矿砂力学性质差, 重金属含量高, 故其治理需要兼顾力学性能的提升和重金属的固定, 实际工程中还需考虑成本及适用性。设计并优化尾矿砂原位激发方案, 筛选富集本土微生物中的产脲酶菌固化尾矿砂, 通过一系列试验评价比较本土产脲酶菌和巴氏芽孢杆菌固化尾矿砂效果及经济环境效益。结果表明: 相同固化轮次下, 本土产脲酶菌具有更强的重金属固定能力和更好的固化深度和均匀性。本土产脲酶菌固化 15 轮与巴氏芽孢杆菌固化 10 轮的尾矿砂力学性能相当, 同时成本下降 2/3。原位激发诱导碳酸钙沉淀填充了砂颗粒间的孔隙, 并将可交换态的重金属转变为金属碳酸盐沉淀、金属-碳酸钙共沉淀或被铁、铝氧化物吸附, 在提升力学性能的同时实现了原位固定尾矿砂中重金属。原位激发产脲酶微生物固化尾矿砂改善了砂土肥力, 有利于矿山植被修复, 具有良好的工程适用性和经济环境效益。

关键词: 原位激发; 微生物诱导碳酸钙沉淀; 尾矿砂; 重金属固定

中图分类号: TD926.4 文献标志码: A 文章编号: 0454-5648(2025)05-1037-20

网络出版时间: 2025-01-09



矿业是人类社会继农业发展后产生的最重要的工业。随着社会发展, 矿产资源开发带来的环境问题受到了人们的重视。尾矿砂是矿石经选矿后的废弃物, 是一种比较特殊的土体。一方面, 选矿过程中矿石提取不完全, 伴生矿物未利用, 使得尾矿砂中含有较多的重金属元素。因此, 尾矿砂重金属污染程度相对于其他土体更加严重, 对环境的威胁也更大; 另一方面, 由于尾矿砂是矿石经历一系列破碎、磨矿、分选等措施得到的产物, 一般而言, 其颗粒粒径较小且均匀, 粘聚力和抗剪强度低, 较易液化, 力学性质较差。故对尾矿砂这种特殊土体的治理需要兼顾力学性能的提升和重金属的固定。

微生物诱导碳酸盐沉淀(MICP)技术是当前利用微生物改善土体性质和固定重金属的新技术^[1-2]。其基本原理是利用微生物新陈代谢过程中产生的脲酶将可溶性钙离子和土体中的游离态金属离子转化为碳酸盐沉淀, 在改善土体力学性质的同时固定重金属离子。在产脲酶菌中, 巴氏芽孢杆菌是迄今为止所知的利用尿素降解进行生物矿化的最高效的微

生物之一^[3]。基于巴氏芽孢杆菌的生物矿化对岩土材料的改良固化具有良好的效果。但该方法仍然存在一些不足, 如巴氏芽孢杆菌在高浓度重金属环境下, 活性降低^[4]; 前期反应生成的碳酸钙容易在土体表面堆积堵塞, 影响固化深度^[5]; 引入外来细菌, 有物种入侵风险^[6]等。且在实际工程中, 细菌培养和运输成本较高, 不适合大面积应用。原位激发砂土中的本土产脲酶微生物以诱导矿化, 不仅可以防止物种入侵, 且无需细菌培养和注浆程序, 有效降低成本的同时减轻堵塞。Gat 等^[7]通过选择活化和种群富集为土壤中固有的产脲酶微生物建立生长竞争优势而成为优势菌群。Gomez 等^[8]研究表明, 激发液的组成和对比对矿化效果有重要影响。Pakbaz 等^[9]发现, 使用糖蜜作为碳源可以有效激发本土细菌诱导矿化, 并提高土体的抗剪强度。Wang 等^[10]成功使用牛肉浸膏和蛋白胨作为碳源和氮源来刺激本土产脲酶细菌, 并发现添加少量铵根有利于提高脲酶活性, 从而获得更好的激发效果。可见不同砂土环境的原位激发方法各不相同, 而尾矿砂中重金属含

收稿日期: 2024-08-21。 修订日期: 2024-10-02。

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2023J01963); 龙岩市社会发展科技重点项目(2023LYF9001); 龙岩学院博士科研启动项目(LB2024007)。

第一作者: 赖永明(1988—), 女, 博士, 副教授。

通信作者: 孔秋平(1986—), 女, 硕士, 高级工程师。

Received date: 2024-08-21. Revised date: 2024-10-02.

First author: LAI Yongming (1988—), female, Ph.D., Associate Professor.

E-mail: lym@lyun.edu.cn

Correspondent author: KONG Qiuping (1986—), female, Master, Senior Engineer.

E-mail: 173476054@qq.com

量高, 微生物种类少, 激发难度大, 目前少有原位激发固化尾矿砂的研究, 仅有部分学者基于巴氏芽孢杆菌进行了相关矿化研究^[11–12]。但尾矿砂中的重金属不利于外源产脲酶菌的生长, 原位激发重金属耐受性高的本土产脲酶微生物更适用于尾矿库环境。如何开发出成本更低且更适于尾矿砂固化的最优原位激发方案是该技术应用于实际工程的关键。

在常用的优化设计方法中, Plackett-Burman(PB)设计是 1 种 2 水平的筛选试验, 主要针对因子数较多时, 从中筛选出少数重要变量的试验设计方法。通过比较各因子高低 2 水平下响应值的差异来确定各因子影响的显著性。通过该试验可用较少的试验次数筛选出对响应值影响较显著的因子。Central Composite Design(CCD)中心组合设计是采用多元二次回归方程来拟合因子与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优参数, 解决多变量问题的一种统计方法。

针对所述问题开展试验研究, 基于单因素试验和 PB-CCD 设计探究激发液组分选择及最佳浓度配比, 得到适用于尾矿砂的最优激发液配方, 筛选富集本土微生物中的产脲酶菌固化尾矿砂。通过一系列试验探究胶结液浓度和处理周期对固化效果的影响, 并与巴氏芽孢杆菌固化尾矿砂进行比较, 评价原位激发的固化效果及经济环境效益。通过分析原位激发前后尾矿砂中微生物群落变化, 结合扫描电子显微镜(SEM)的微观形貌分析及 X 射线衍射(XRD)物相鉴定, 揭示原位激发提升尾矿砂力学性能及固定重金属机制。

1 实验

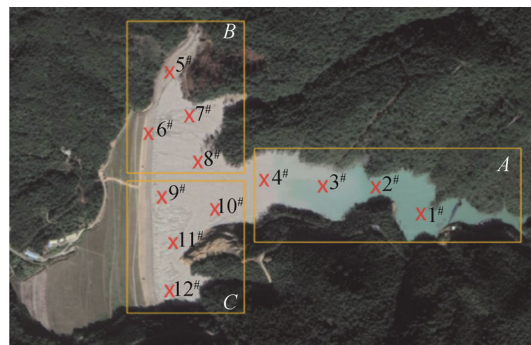
1.1 尾矿砂

所用的尾矿砂取自位于福建省龙岩市曹溪街道崎瀨村陈坑沟谷的福建马坑矿业股份有限公司尾矿库(见图 1a)。将尾矿库划分为 A、B、C 3 块区域, 每块区域各设置 4 个采样点, 共取 3 组 12 份样本(见图 1b)。为与尾矿库周边环境土壤进行对比, 同时对尾矿库周边 5 块农田进行采样。每个采样点取 3 个平行样以减少误差。采用靛酚蓝比色法测定各样本脲酶活性如图 2 所示, 可知尾矿砂中存在可分解尿素的微生物, 但活性很低。采用原子吸收光谱法测定各样本重金属含量, 参考 GB 15618—2018《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准》(试行)^[13], 以农用地土壤污染风险筛选值作为标

准值, 根据 HJ/T 166—2004《土壤环境监测技术规范》^[14], 采用 Nemerow 污染指数评价法计算各样本重金属污染等级。可知尾矿砂中镉、锌均超标, 其中镉中度污染(Nemerow 指数 2.59), 锌轻度污染(Nemerow 指数 1.75)。受尾矿库影响, 周边农田土壤镉含量 Nemerow 指数为 2.04, 也属于中度污染, 锌含量 Nemerow 指数为 0.81, 属于尚清洁(警戒线), 说明尾矿砂重金属流失较为严重, 对周边环境的影响较大, 亟需治理。各样本镉、锌含量如图 3 所示。



(a) Tailings pond site



(b) Distribution map of sampling points

图 1 尾矿库现场及采样点分布图

Fig. 1 Tailings pond site and distribution map of sampling points

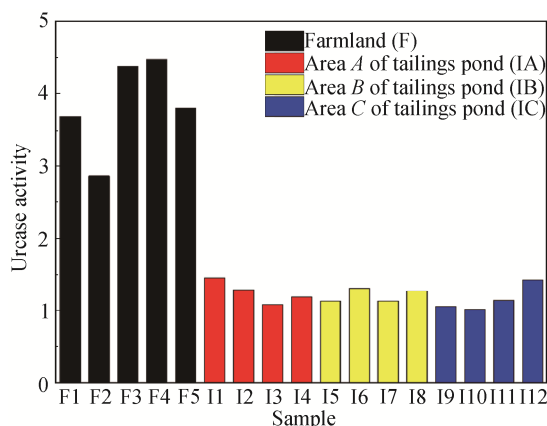


图 2 各样本脲酶活性

Fig. 2 Urease activity of samples

参照 GB/T 50123—2019《土工试验方法标准》^[15]测定尾矿砂的颗粒级配、密度、干密度、pH 值、比重、相对密度、最大干密度、最小干密度、天然孔隙率、最大孔隙率、最小孔隙率等理化特性。尾矿砂颗粒级配曲线及形貌如图 4 所

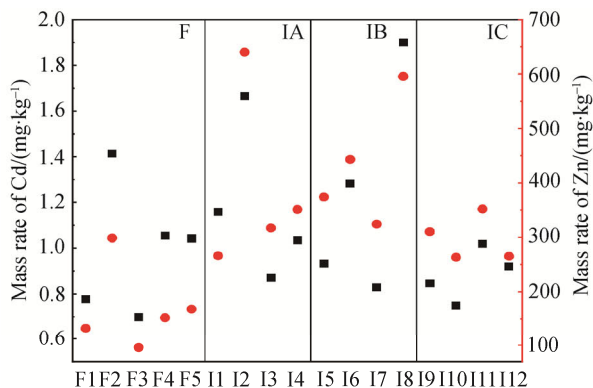


图 3 各样本镉、锌含量
Fig. 3 Cd and Zn content of samples

示, 其他理化特性见表 1。采用波长色散 X 射线荧光光谱仪(半定量方法)对尾矿砂的主要成分及含量进行分析, 结果如表 2 所示。由此可知, 尾矿砂为浅灰色细砂, 呈碱性, 成分中除了 SiO_2 外, 还含有较多的 CaO 和 Fe_2O_3 。

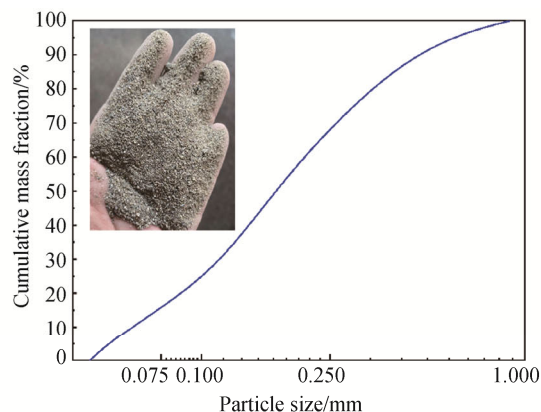


图 4 尾矿砂颗粒级配曲线
Fig. 4 Particle size distribution curve of tailings sand

表 1 尾矿砂基本理化特性

Table 1 Basic physical and chemical properties of tailings sand

Density	Dry density	pH value	Proportion	Relative density	Maximum dry density	Minimum dry density	Natural porosity	Maximum porosity	Minimum porosity
2 g/cm ³	1.959 g/cm ³	9.5	3.544	0.289 8	2.375 g/cm ³	1.828 g/cm ³	0.809 2	0.938 4	0.492 5

表 2 尾矿砂主要成分及含量

Table 2 Main components and content of tailings sand

SiO_2	CaO	Fe_2O_3	Mg	F	Al	Mn	Other
34.69	28.59	19.25	2.94	2.70	2.00	1.39	8.44

w is mass fraction.

1.2 原位激发尾矿砂方案设计优化

原位激发目的是在镉、锌超标的尾矿砂中筛选富集产脲酶微生物。除了微生物生长必须的碳源、氮源以外, 较高浓度的尿素是筛选产脲酶菌的重要成分。Wang 等^[10]证明, 铵根离子可提供较高的初始氨氮浓度, 有助于产脲酶菌形成相对于其他细菌的竞争优势。De Muynck 等^[16]发现产脲酶菌在含有酵母粉(YE)的培养基中生长更好。Gerlach 等^[17]证明, 镍元素可促进微生物体内脲酶的合成。Peng 等^[18]使用 *Rhodobacter sphaeroides*(球形红杆菌)对 Cd、Zn 污染土进行生物修复, 所用培养基的碳、氮源为乙酸钠和氯化铵。参考上述研究结果, 设计初始激发液组分为: 乙酸钠(碳源)42.5 mmol/L(3.5 g), 氯化铵(氮源)100 mmol/L(5.35 g), 尿素 333 mmol/L(20 g), 酵母粉(YE)0.2 g, 氯化镍 0.01 mmol/L, 将各组分溶于 1 L 去离子水, 溶液 pH 值为 7。

产脲酶微生物的脲酶活性是影响 MICP 固化效

果的最主要因素, 故以原位激发后尾矿砂悬浊液的脲酶活性作为评价指标和响应值。具体优化步骤如下:

1) 在初始激发液配方的基础上, 通过改变碳源或氮源进行单因素试验。选择等质量分数的单糖(葡萄糖和果糖)、二糖(麦芽糖)、多糖(淀粉)以及糖副产物(糖蜜)作为碳源, 选择等质量分数的 3 种有机氮源(蛋白胨、玉米浆、黄豆饼粉)和 3 种无机氮源(氯化铵、硫酸铵、硝酸钠)作为氮源。在装有 90 mL 激发液的锥形烧瓶中加入 10 g 风干尾矿砂, 放入 30 ℃、180 r/min 的摇床中培养。采用电导率法定时测定锥形瓶中悬浊液脲酶活性, 以脲酶活性作为评价指标, 筛选出最佳碳源和最佳氮源。

脲酶活性计算方法如下: 将 3 mL 待测液与 27 mL 1.5 mol/L 的尿素溶液混合摇匀, 置于 25 ℃ 的恒温水浴箱中, 分别测定混合溶液 1 min 和 9 min 后的电导率值, 根据以下公式计算锥形瓶中悬浊液的脲酶活性(UA):

$$UA = \frac{(\sigma_{EC,9\min} - \sigma_{EC,1\min})}{8} \times 10 \times 11.11 \quad (1)$$

其中: UA 为脲酶活性, mmol/L urea/min; $\sigma_{EC,9\min}$ 为混合溶液 9 min 后的电导率值, mS/s; $\sigma_{EC,1\min}$ 为混合溶液 1 min 后的电导率值, mS/s; 10 为待测液的稀释倍数, 11.11 为 25 °C 时电导率变化值与被分解尿素物质的量的换算系数。

2) 对步骤 1) 所得最佳碳源和最佳氮源、激发液中其他组分(尿素、酵母粉、氯化镍)和溶液 pH 值进行 PB 设计, 筛选出对脲酶活性影响最显著的成分作为关键因子, 通过改变各因子的浓度进行单因素试验, 确定各关键因子最佳浓度范围。

3) 以脲酶活性作为响应值, 使用 Minitab16 软件进行 CCD 响应面分析, 计算各关键因子最佳浓度, 得到尾矿砂最优激发液配方。

1.3 菌液及胶结液

对照组试验所用菌种为巴氏芽孢杆菌(编号 DSM33), 采用 ATCC 1376 NH₄-YE 培养液: 酵母粉 (YE) 20 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, Tris 缓冲剂 15.75 g/L。取培养 48 h 后进入稳定期的菌液开展试验, 测得此时菌液的吸光度(OD₆₀₀)值为 1.7~1.8。

胶结液为生物矿化过程提供钙源, 是等摩尔 CaCl₂ 和尿素的混合溶液。选用 0.5、1.0、1.5 mol/L 3 种浓度胶结液, 采用抽真空过滤法灭菌。

1.4 模具及方法

采用直径 10 cm×高 5 cm 的铝盒为模具。在铝盒底部打 5 个直径 3 mm 的孔用于排出废液, 在孔上铺一片直径 10 cm 的圆形滤布防止砂土颗粒流失。将风干后混合均匀的尾矿砂分 3 层填充至铝盒内, 每层振捣密实后方可进行下一层填充, 确保填充密度达到 85% 尾矿砂最大干密度(2.019 g/cm³), 即每个铝盒约填充 932 g 尾矿砂。此时孔隙率 e 为 0.69, 渗透系数 k 为 1.455×10^{-3} m/s。制样前铝盒和滤布均灭菌处理。

试验分为芽孢杆菌组和原位激发组。芽孢杆菌组所用尾矿砂事先置于 120 °C 的烘干箱中高温灭菌 12 h。每天先往砂样中加入 100 mL 巴氏芽孢杆菌菌液, 12 h 后加入 100 mL 胶结液, 此即为 1 轮固化。

原位激发组的尾矿砂无需灭菌, 每天先往砂样中加入 100 mL 激发液, 12 h 后再加入 100 mL 胶结液, 此即为 1 轮固化。

根据预试验结果, 芽孢杆菌组和原位激发组分别固化 10 轮、15 轮后, 由于尾矿砂表面钙化产物积聚, 矿化溶液很难再渗入, 故据此设置不同的固化轮次。每轮固化间隔 24 h。对照组砂样的激发液换成等体积的去离子水, 其余操作均同试验组。具体试验方案见表 3。每组砂样设置 3 个平行样。

多轮固化后的尾矿砂样在室温条件下静置 15 d, 以确保矿化反应完全。随后进行以下各项性能测试:

表 3 试验方案
Table 3 Experimental scheme

Sample No.	Cementation solution concentration/(mol·L ⁻¹)	Treatment rounds	<i>In situ</i> bio-stimulation	Bacillus pasteurianus
1#	0.5	10	Bio-stimulation solution + cementation Solution	Bacterial solution + cementation solution
2#	1.0	4		
3#	1.0	7		
4#	1.0	10		
5#	1.0	15	Bio-stimulation solution + cementation solution	
6#	1.5	10	Bio-stimulation solution + cementation solution	Bacterial solution + cementation solution
7#	1.0	10	Deionized water + cementation solution	

1.5 表面强度及碳酸钙含量测试

采用常州赢安杨仪器有限公司生产的微型贯入仪(WXGR-4.0)测试固化后砂样的贯入阻力(见图 5b)。考虑到圆柱形测头较针式测头作用面积大, 能更好地反映砂样的整体力学性能, 故选择规格为 0.3 cm² 圆柱的 A 型号测头, 贯入深度 6 mm, 可用于快速估算固化砂土的无侧限抗压强度。将测头匀速地贯入砂样内至测头上刻线与砂样表面接触为止, 读取

此时峰值指针数字, 并计算贯入阻力。每个砂样表面均匀地取 5 处进行测试, 将其平均值作为该砂样的贯入阻力。

采用酸洗法测定碳酸钙含量。取 5 g 砂样置于 100 mL 的烧杯中, 倒入 20 mL 1 mol/L 的盐酸, 待反应完全后, 用滤纸过滤烧杯中的溶液及固体, 并用去离子水清洗 10 min 以去除砂样中所有可溶钙。随后将留在滤纸上的固体烘干称量质量, 酸洗前后

烘干砂样的质量差即为碳酸钙质量，碳酸钙含量 $\Omega(\%)$ 计算公式如下：

$$\Omega_0 = 100 - \frac{m_0}{5} \times 100 \quad (2)$$

$$\Omega = 100 - \frac{m}{5} \times 100 - \Omega_0 \quad (3)$$

其中： Ω_0 为未处理尾矿砂中碳酸钙质量分数，%； m_0 为未处理尾矿砂酸洗烘干后质量，g； m 为固化后砂样酸洗烘干后质量，g。

1.6 胶结厚度测定及渗透性测试

表面强度测试后，用游标卡尺测量砂样的胶结层厚度，如图 5f 所示。每个砂样选 5 处进行测量，取平均值作为该砂样的胶结厚度。

采用美国 METER 公司生产的 Mini Disk 小型盘式入渗仪测定砂样的渗透系数。如图 5c 所示，将盘式入渗仪注水后置于砂样表面正中央，定时记录管内液面高度变化，根据说明书计算各砂样渗透系数。

1.7 雨滴击溅测试

雨滴击溅装置(见图 5a)由降雨发生装置(见图 5d)和收集装置(见图 5e) 2 部分组成。降雨发生装置是一个上部开口的圆柱体(直径 10 cm×高 10 cm)，在圆柱体底部每隔 2 cm 等间距布设 21 个医用针头，

选用不同直径的医用针头以模拟小雨、中雨、大雨 3 种降雨强度。降雨参数如表 4 所示。收集装置为亚克力板制成的直径 110 cm 的击溅盘，以击溅盘中心为圆心，依次用橡胶圈围成半径分别为 5、15、25、35、45 cm 和 55 cm 的 6 个同心圆。其中，半径 5 cm 的圆用来放置直径 10 cm×高 5 cm 的铝盒尾矿砂样品。外围 5 个圆分别距铝盒尾矿砂样边缘 10、20、30、40 cm 和 50 cm，且橡胶圈与击溅盘黏结紧密不透水，每个同心圆之间对称设置两个排水孔，用于收集溅蚀尾矿砂粒。

试验采用去离子水，试验过程中始终保持降雨发生装置中水面高度为 2 cm，降雨发生装置距收集装置垂直高度为 2 m。全部针头匀速滴水时开始计时，降雨历时 15 min。按溅蚀环的 5 个距离(0~10、10~20、20~30、30~40 cm 和 40~50 cm)分别收集溅蚀出的尾矿砂，用去离子水分别洗到烧杯中并标记，于 105 ℃ 的烘干箱中烘干至恒定质量并记录数值。整个试验装置外围用塑料薄膜遮挡，以防止降雨过程中受到横向气流的扰动。每次试验结束后均将击溅盘清洗干净，准备下次试验。每组试验设置 3 个平行样。通过对比溅蚀质量及溅蚀距离分布，评价表 3 中不同方案固化尾矿砂样的抗雨蚀性。

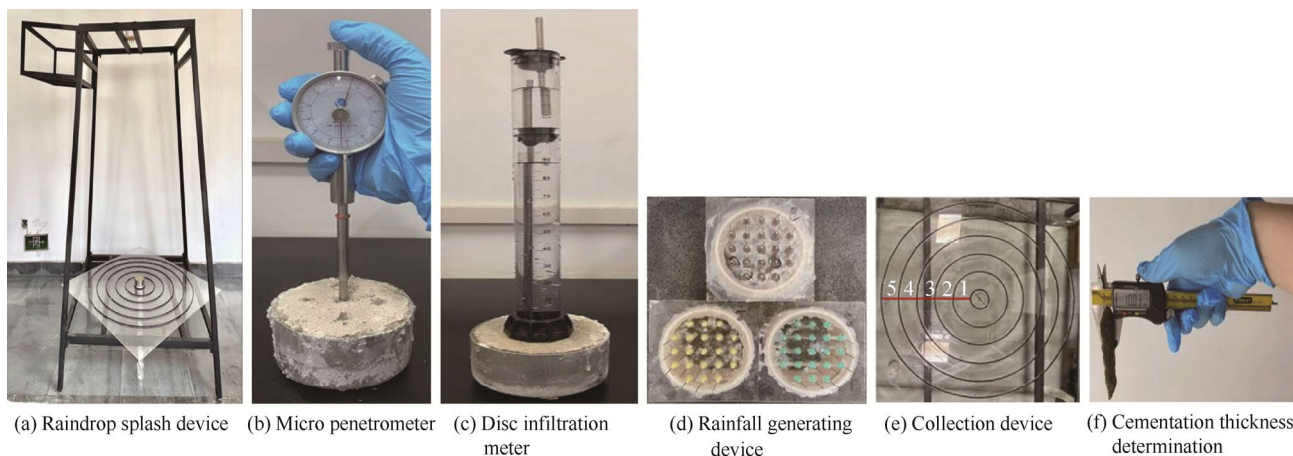


图 5 试验装置图

Fig. 5 Photos of test devices

表 4 模拟降雨参数

Table 4 Parameters of simulated rainfall

Needle diameter/mm	Raindrop diameter/mm	Height/m	Kinetic energy/(J·m ⁻² ·s ⁻¹)	Terminal velocity/(m·s ⁻¹)	Intensity/mm	Level
0.7	2.68	2	2.41×10 ⁻⁵	5.36	5.76	Light rain
0.8	2.97	2	3.35×10 ⁻⁵	5.42	17.48	Moderate rain
0.9	3.18	2	4.21×10 ⁻⁵	5.45	43.12	Heavy rain

1.8 重金属浸出毒性及形态变化

由 1.1 可知，尾矿砂中镉中度污染，锌轻度污

染，导致周边农田土壤镉也中度污染，锌含量处于警戒线，对环境危害严重。又尾矿砂中铁含量较高，

故重点考虑 Fe、Zn、Cd 3 种重金属的浸出毒性。采用美国环境保护局(US EPA)危险废物浸出毒性方法(TCLP)测定固化前后砂样 Fe、Zn、Cd 的浸出浓度^[19]。重金属污染土的生物有效性、稳定性及毒性主要取决于重金属在土中的存在形态^[20]，根据 HJ/T 166—2004《土壤环境监测技术规范》^[14]测定固化前后砂样 Fe、Zn、Cd 重金属 5 形态(可交换态、碳酸盐结合态、铁锰氧化物结合态、有机结合态、残余态)的百分比变化，以进一步探究原位激发固定重金属机理。

2 结果与讨论

2.1 原位激发尾矿砂方案设计优化

2.1.1 单因素试验 不同碳源和氮源下锥形瓶中悬浊液的电导率及脲酶活性随时间的变化如图 6a 和图 6b 所示。可见脲酶活性与电导率变化规律基本一

致。淀粉和乙酸钠作为碳源时脲酶活性较高且 48 h 即可达到峰值。无机氮源和有机氮源中硫酸铵、氯化铵、蛋白胨、黄豆饼粉脲酶活性较高。故选取这 6 种脲酶活性较高且原位激发时间较短的碳氮源进行下一步 PB 设计。

2.1.2 PB 设计试验 将单因素试验选出的 6 种碳氮源和激发液中的其他 3 种成分(尿素、YE、氯化镍)和溶液 pH 值作为待筛选的 10 项因子，以原位激发 48 h 时激发液中的脲酶活性作为响应值，采用 Minitab16 软件进行试验次数 $N=12$ 的 PB 设计，分析结果如表 5 所示。其中 P 值是衡量因子不同水平下响应值差异大小的指标，乙酸钠、硫酸铵、尿素和 pH 值的 P 值均小于 0.05，表明上述成分是影响脲酶活性的显著因素，其中 pH 值的 P 值最小(0.012)，说明 pH 值是影响脲酶活性的最显著因子。选取这 4 项作为后续 CCD 中心组合设计的关键因子。

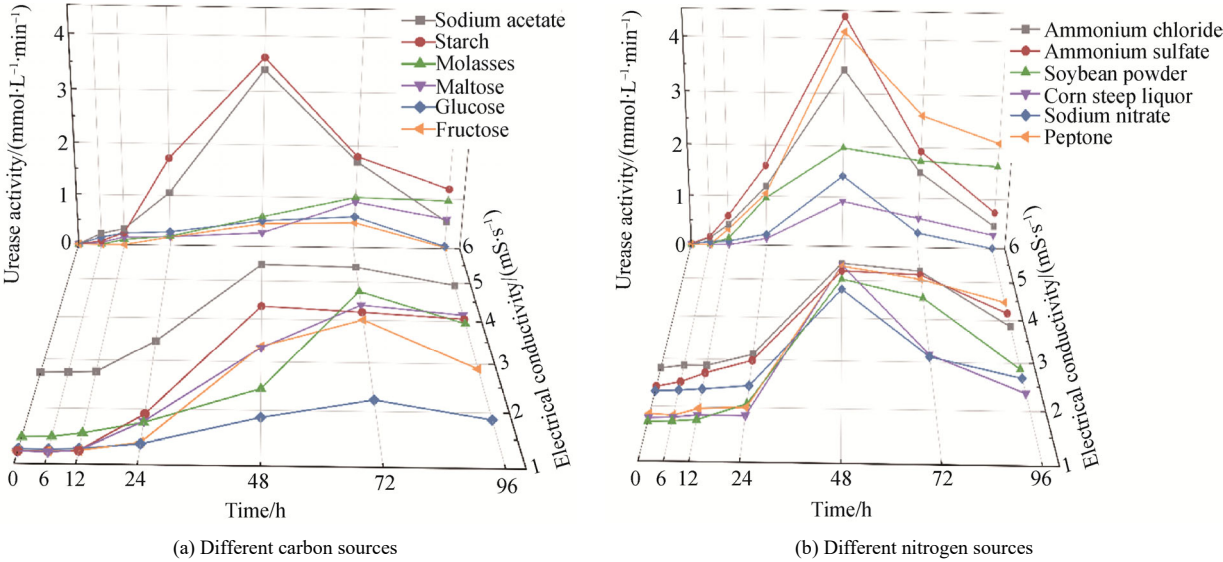


图 6 不同碳源、氮源下溶液电导率值及脲酶活性随时间变化
Fig. 6 Influence of carbon and nitrogen sources on electrical conductivity and urease activity

表 5 PB 设计分析结果
Table 5 Analysis results of PB design

Factor	Level		Effect	Coefficient	P
	-1	+1			
Starch/(g·L ⁻¹)	3.5	5.25	0.006 7	0.003 3	0.903
Sodium acetate/(mmol·L ⁻¹)	42.5	63.75	-0.740 0	-0.370 0	0.037
Peptone/(g·L ⁻¹)	5.35	8.00	0.04	0.02	0.525
Soybean powder/(g·L ⁻¹)	5.35	8.00	-0.373 3	-0.186 7	0.074
Ammonium chloride/(mmol·L ⁻¹)	100	150	0.1	0.05	0.260
Ammonium sulfate/(mmol·L ⁻¹)	40.50	60.75	1.143 3	0.571 7	0.024
Urea/(mmol·L ⁻¹)	333	500	0.706 7	0.353 3	0.039
YE/(g·L ⁻¹)	0.2	0.3	-0.48	-0.24	0.057
Nickel chloride/(mmol·L ⁻¹)	0.010	0.015	-0.226 7	-0.113 3	0.12
pH value	7	9	2.33	1.165	0.012

2.1.3 CCD 响应面分析 根据表 5 中各因子的正负效应调整初始激发液组分，负效应的因子取-1 水平，正效应的因子取+1 水平，即：乙酸钠 42.5 mmol/L，硫酸铵 60.75 mmol/L，尿素 500 mmol/L，YE 0.2 g/L，氯化镍 0.01mmol/L，pH=9。以此方案为基础，依次调节各关键因子浓度，保持其他组分不变，进行单因素试验，各关键因子设置不同浓度时 48 h 脲酶活

性如图 7 所示。试验结果表明，乙酸钠、硫酸铵、尿素和 pH 值的最佳浓度范围分别为 21.25~63.75 mmol/L、40.5~72.9 mmol/L、333~666 mmol/L 和 7~9。

将乙酸钠、硫酸铵、尿素、pH 值这 4 项关键因子作为自变量，以 48 h 脲酶活性作为响应值，开展 4 因子 5 水平的 CCD 试验，各因子及水平见表 6。

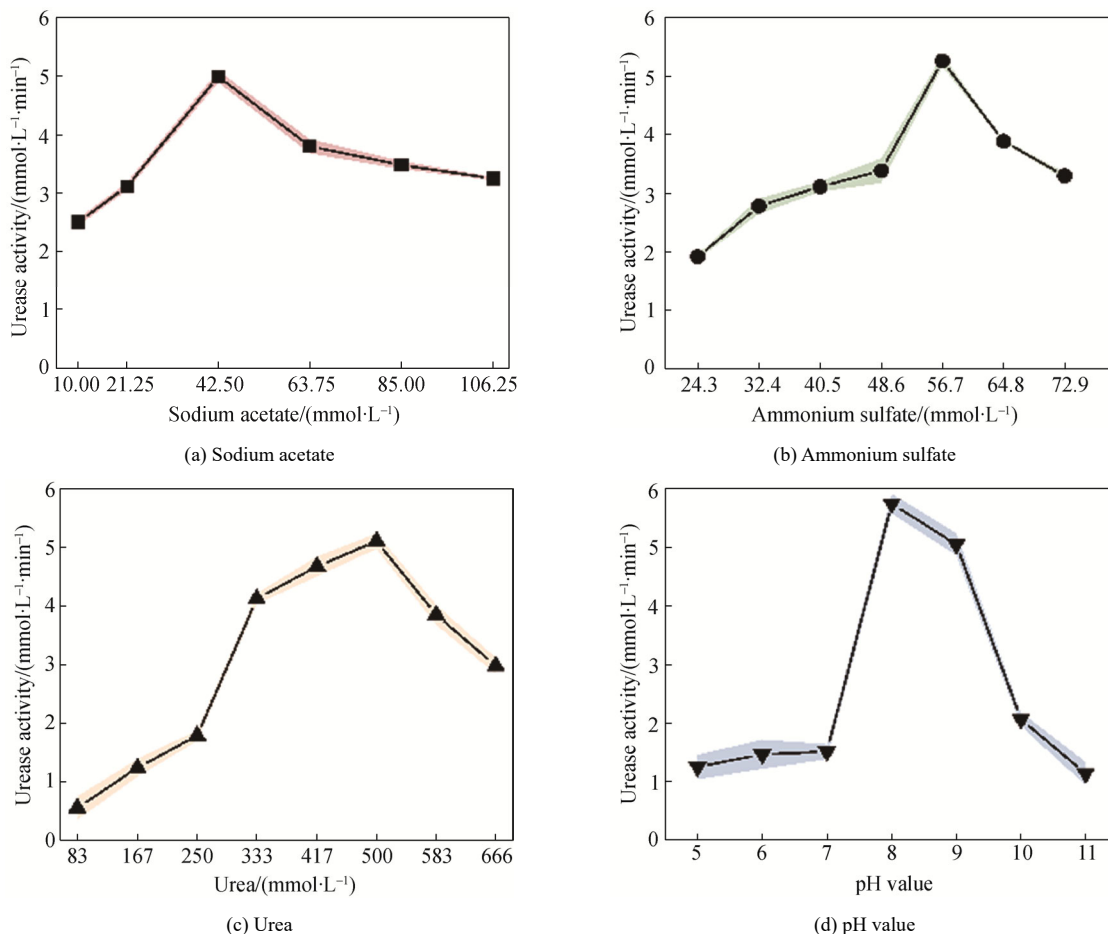


图 7 各关键因子浓度对脲酶活性影响

Fig. 7 Influence of key factor concentrations on urease activity

表 6 CCD 响应面分析关键因子及水平

Table 6 Key factors and levels of CCD response surface analysis

Key factor	Level				
	-2	-1	0	1	2
Sodium acetate/(mmol·L ⁻¹)	21.25	31.875	42.5	53.125	63.75
Ammonium sulfate/(mmol·L ⁻¹)	40.5	48.6	56.7	64.8	72.9
Urea/(mmol·L ⁻¹)	333	416	500	583	666
pH value	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0

使用 Minitab16 软件对试验结果进行分析，建立二次多项式回归模型，拟合所得方程为：

$$Y=6.178-0.12777A+0.1138B+0.02191C+0.48045D-0.65371A_2-0.69795B_2-0.45903C_2-0.31713D_2+0.3248AB$$

$$+0.05404AC-0.4123AD+0.10104BC-0.31254BD-0.11529CD \quad (4)$$

其中：Y 为脲酶活性；A 为乙酸钠；B 为硫酸铵；C 为尿素，D 为 pH 值。模型的 $R_{sq} = 96.04\%$ ，

$R_{Sq}(\text{调整}) = 92.58\%$ ，两者很接近且均 $>90\%$ ，说明模型拟合效果很好， $R_{Sq}(\text{预测}) = 80.27\%$ ，说明

模型预测可信度较高，该模型具有较好的统计学意义。

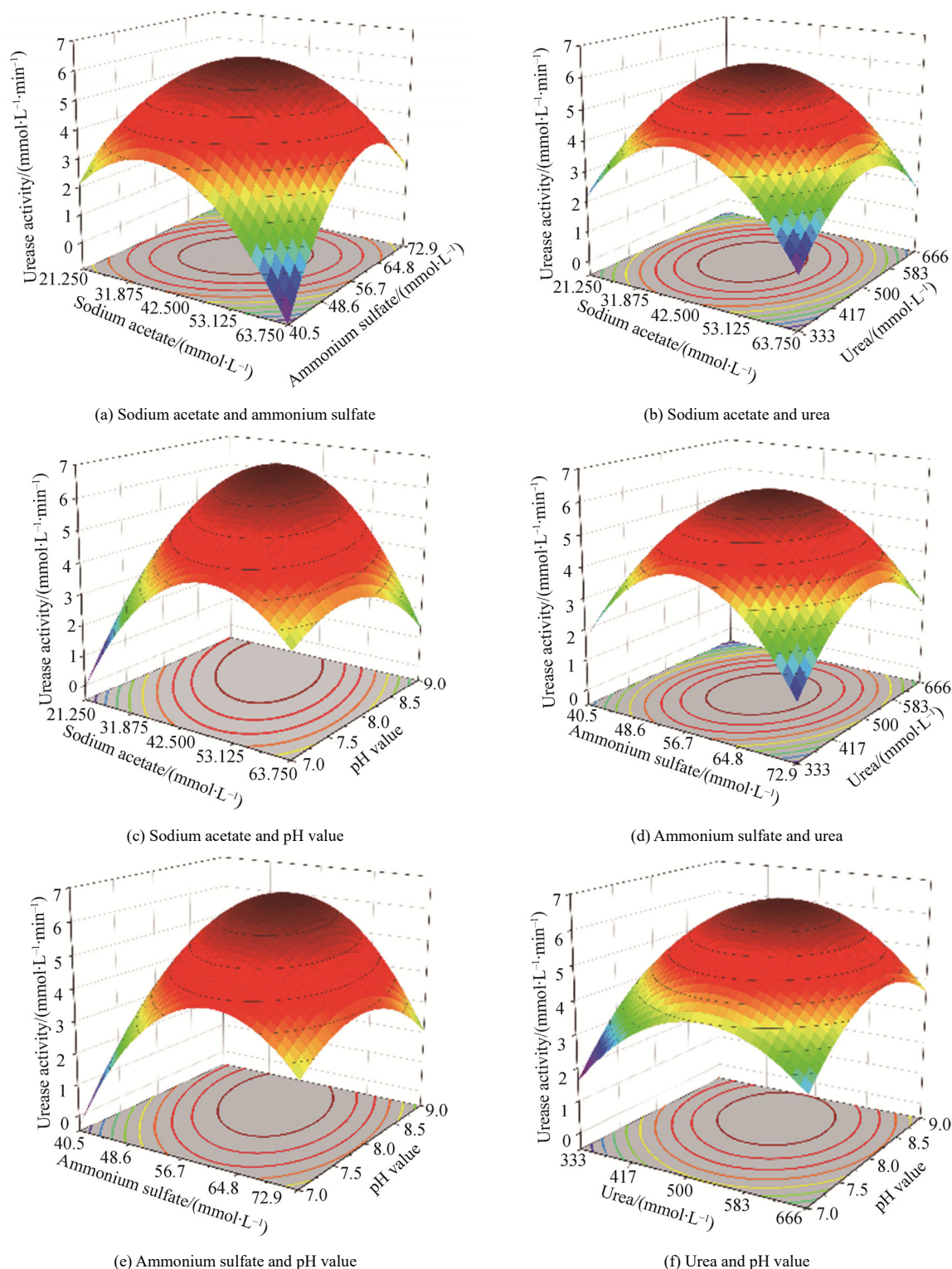


图 8 各因子交互作用下脲酶活性的三维响应面图

Fig. 8 Three-dimensional response surface plots of urease activity under interaction of factors

图 8 为两两因子交互作用对脲酶活性影响的三维响应面图。响应面的弯曲程度显示了因子对脲酶活性的影响程度，响应面越弯，因子对脲酶活性影

响越显著。相较而言，硫酸铵和 pH 值交互作用下响应面弯曲程度最高，对脲酶活性影响最显著，PB 设计中 pH 值和硫酸铵也是 P 值最小和效应绝对值

最大的两个因子, 2 种分析方法结果一致。采用不同颜色标注脲酶活性的高低, 蓝色越深代表脲酶活性越低, 红色越深代表脲酶活性越高, 注意到脲酶活性仅在各因子最优浓度范围内保持较高水平, 关键因子浓度过高或过低, 脲酶活性都迅速下降。各曲面的极值都在 $6 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 左右, 较优化前 $3.3958 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$ 有了很大提升。

模型拟合得到最高脲酶活性为 $6.5382 \text{ mmol}/\text{L urea}/\text{min}$, 对应的最优激发液组分为: 乙酸钠 $35.85 \text{ mmol}/\text{L}$, 硫酸铵 $53.59 \text{ mmol}/\text{L}$, 尿素 $481.0 \text{ mmol}/\text{L}$, YE $0.2 \text{ g}/\text{L}$, 氯化镍 $0.01 \text{ mmol}/\text{L}$, pH 值为 8.70。按照该方案配制激发液加入尾矿砂培养, 设置 3 个平行样, 测得 48 h 脲酶活性为 $6.6013 \text{ mmol}/\text{L urea}/\text{min}$, 与拟合值接近, 验证了模型的准确性。最优脲酶活性为初始原位激发方案($3.3958 \text{ mmol}/\text{L urea}/\text{min}$)的 1.944 倍。优化后的方案减少了碳源浓度, 碳氮比降低, 促进了微生物生长繁殖; 更换了氮源且增加了浓度, 促进蛋白质的合成和细胞生长; 提高了尿素浓度, 进一步筛选尾矿砂中产脲酶微生物; 同时提供了更适宜脲酶合成的 pH 值环境。

2.2 表面强度及碳酸钙含量测试

图 9 为不同胶结液浓度、不同固化轮次下 2 种方法处理后的砂样表面强度及碳酸钙含量。未处理砂样的表面强度为 0, 说明固化前尾矿砂颗粒松散, 没有强度。固化后, 所有砂样的表面强度均得到了不同程度的显著提升。相同胶结液浓度及固化轮次下, 原位激发处理后砂样表面强度明显低于芽孢杆菌, 这主要是由于巴氏芽孢杆菌的脲酶活性(约为 $30 \text{ mmol}/\text{L urea}/\text{min}$)高于原位激发后的本土产脲酶细菌。胶结液浓度相同时($1 \text{ mol}/\text{L}$), 表面强度随着固化轮次的增加而升高, 但芽孢杆菌处理 7 轮后的砂样表面强度的增幅迅速衰减, 芽孢杆菌处理 10 轮后的砂样表面强度较 7 轮的并无明显提升。而原位激发处理后砂样的表面强度随固化轮次呈线性增长, 这是因为芽孢杆菌是将外来细菌引入尾矿砂中, 生成的碳酸钙容易在砂样表面堆积造成堵塞, 后续菌液难以渗入砂样。而本土产脲酶细菌在尾矿砂中均匀分布, 且脲酶活性较低, 诱导生成的碳酸钙较少且随之分布较均匀, 不易造成堵塞。图 9 中原位激发 15 轮后砂样的表面强度与芽孢杆菌 10 轮后的相近, 说明原位激发可以通过增加固化轮次来提高固化强度。

固化轮次相同时(10 轮), 表面强度随着胶结液浓度的增加, 呈现先上升后下降的趋势, 这与

Cheng 等的研究结论一致^[21]。胶结液浓度较低时($0.5 \text{ mol}/\text{L}$), Ca^{2+} 太少, 碳酸钙生成量较少, 砂样胶结效果差, 强度较低; 但胶结液浓度过高时($1.5 \text{ mol}/\text{L}$), 过多的 Ca^{2+} 会抑制巴氏芽孢杆菌的脲酶活性^[22], 生成碳酸钙反而减少, 胶结效果不如 $1 \text{ mol}/\text{L}$ 时。

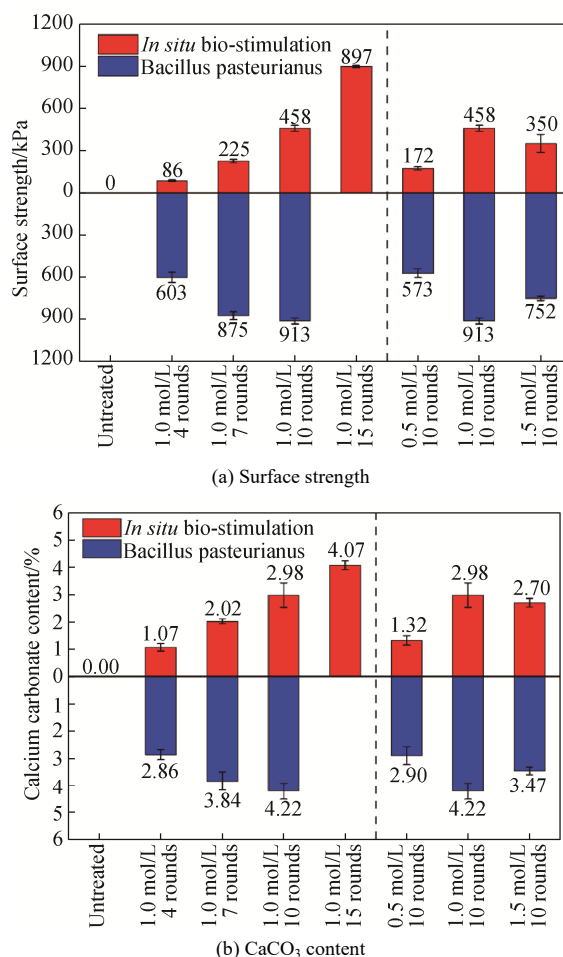


图 9 表面强度及碳酸钙含量
Fig. 9 Surface strength and CaCO_3 content

砂颗粒间碳酸钙的形成是 MICP 提升砂土力学性能的主要原因, 碳酸钙附着于砂颗粒表面或将相邻的砂颗粒连接在一起, 使固化后砂土获得一定强度。因此, 碳酸钙含量是评价 MICP 固化砂土效果的重要指标。相同胶结液浓度及固化轮次下, 原位激发处理的砂样碳酸钙含量低于巴氏芽孢杆菌; 相同加固方法下, 碳酸钙含量随着固化轮次的增加而增加, 随着胶结液浓度的升高先增加后减少, 与表面强度规律一致。图 10 为原位激发砂样表面强度与碳酸钙含量之间的关系, 可见表面强度与碳酸钙含量呈正相关。这与 Liu 等^[23]和 Dagliya 等^[24]的研究结果一致, 碳酸钙含量越多, 砂颗粒连接得越多、

越紧密，尾矿砂获得的强度越高。

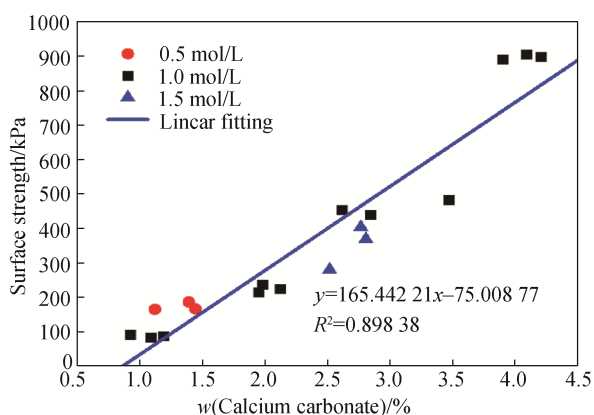


图 10 表面强度及碳酸钙含量之间的关系

Fig. 10 Relationship between surface strength and CaCO_3 content

2.3 胶结厚度测定及渗透性测试

图 11 为不同胶结液浓度、不同固化轮次下 2 种方法处理后的尾矿砂胶结厚度。未处理砂样的胶结厚度为 0，说明固化前尾矿砂呈相互独立的颗粒状。固化后，生成的碳酸钙填充了砂颗粒间的孔隙，将相邻的砂颗粒连接在一起，形成了具有一定厚度的胶结层。相同胶结液浓度及固化轮次下，原位激发处理后砂样胶结厚度大多高于芽孢杆菌，也是因为巴氏芽孢杆菌是引入的外来细菌，渗透深度有限，而本土产脲酶菌均匀分布于尾矿砂各处，加固深度大于芽孢杆菌。注意到 1 mol/L 胶结液原位激发处理 4 轮后的砂样胶结厚度小于芽孢杆菌，这是因为固化轮次较低时，砂样表面堵塞不严重，且此时固化深度较浅，芽孢杆菌生成的碳酸钙较多，故胶结厚度大于原位激发。胶结液浓度相同时(1 mol/L)，芽孢杆菌处理 10 轮后的胶结厚度与 7 轮接近，

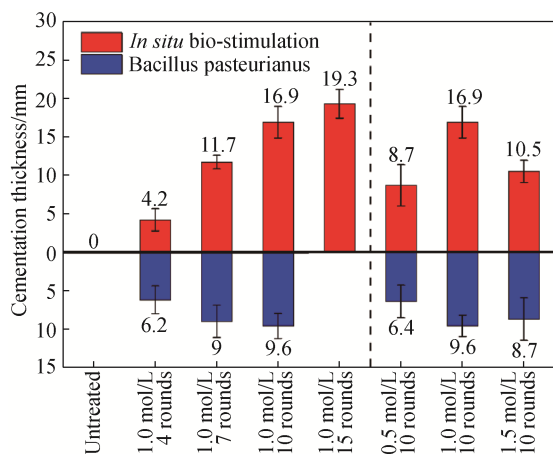


图 11 胶结厚度

Fig. 11 Cementation thickness

说明固化轮次越多，砂样表面堵塞越严重，菌液越难渗入。与表面强度试验结论一致。

胶结液浓度相同时(1 mol/L)，固化轮次越多，胶结厚度越厚。固化轮次相同时(10 轮)，原位激发 1 mol/L 胶结液处理后的砂样胶结厚度可达 16.9 mm，而 0.5 mol/L 和 1.5 mol/L 胶结液处理后的胶结厚度分别为 8.7 mm 和 10.5 mm。这与表面强度试验结果规律一致，也是因为过低或过高浓度的胶结液都不利于碳酸钙的生成，缺乏足够的碳酸钙连接砂颗粒，尾矿砂胶结厚度下降。

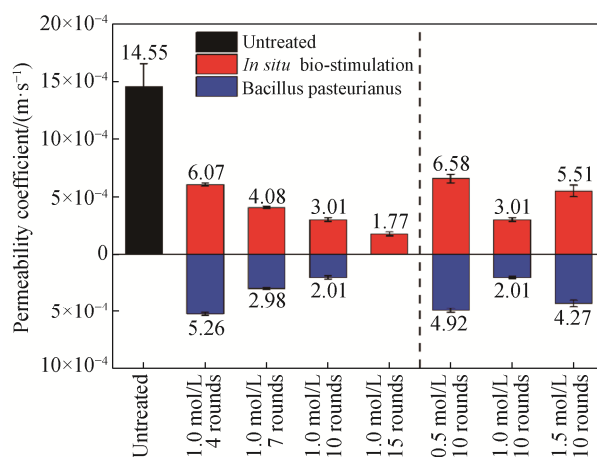


图 12 渗透系数

Fig. 12 Permeability coefficient

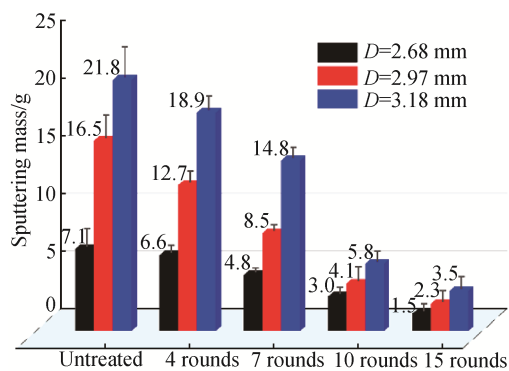
图 12 为不同胶结液浓度、不同固化轮次下 2 种方法处理后的尾矿砂渗透系数。固化后砂样的渗透系数均显著下降，约为处理前的 1/3~1/10。砂颗粒间的孔隙被生成的碳酸钙填充，孔隙率下降，渗透系数降低，渗透系数与碳酸钙含量呈负相关，故固化轮次相同时(10 轮)，1 mol/L 胶结液处理后的砂样渗透系数下降幅度最大。相同胶结液浓度及固化轮次下，原位激发处理后砂样渗透系数高于芽孢杆菌，但原位激发 15 轮后的砂样渗透系数较芽孢杆菌 10 轮后的更低，说明多轮原位激发亦可达到较好的固化效果。

相同胶结液浓度处理的砂样渗透系数随着固化轮次的增加而降低，原位激发 1 mol/L 胶结液处理 4、7、10、15 轮后砂样的渗透系数分别下降了 58.3%、72.0%、79.3%、86.5%。结构强度高、渗透系数小的砂土抗雨水侵蚀能力强。

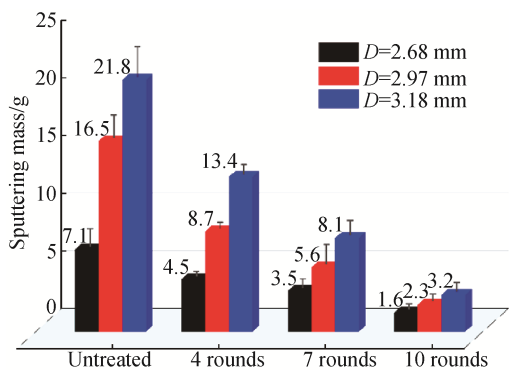
2.4 雨滴击溅测试

以上试验结果表明，胶结液浓度为 1.0 mol/L 时碳酸钙含量最高，表面强度最大，渗透系数最低。因此选择 1.0 mol/L 胶结液下 2 种方法处理的砂样进

行雨滴击溅试验。图 13 为 3 种雨滴直径下 2 种方法处理砂样的溅蚀质量。在 MICP 过程中, 尾矿砂颗粒表面和颗粒间孔隙内形成的碳酸钙晶体显著提高了其力学性能。故固化后砂样溅蚀质量低于未处理砂样。同一处理方法下, 溅蚀质量随雨滴直径的增大而增加, 这是因为雨滴直径越大, 降雨强度越大, 雨蚀能力越强。相同条件下, 原位激发处理砂样较芽孢杆菌溅蚀质量多, 这是因为芽孢杆菌较原位激发生成了更多的碳酸钙。相同降雨条件下, 随着固化轮次的增加, 碳酸钙生成量越多, 溅蚀质量越少, 砂样抗雨蚀能力越强。芽孢杆菌处理 10 轮的砂样侵蚀量较未处理砂样减少了 77.5%~86.1%, 原位激发处理 15 轮的砂样侵蚀量较未处理砂样减少了 78.9%~86.1%, 两者抗雨蚀能力相当。降雨试验结束后, 未处理砂样表面出现明显的侵蚀坑, 且随着雨滴直径的增大, 侵蚀坑越明显。而处理后砂样表面基本无变化。



(a) In situ bio-stimulation



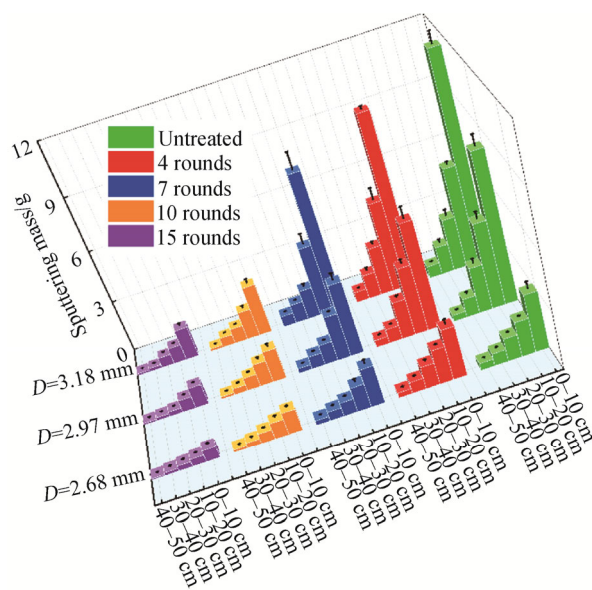
(b) Bacillus pasteurianus

图 13 溅蚀总量

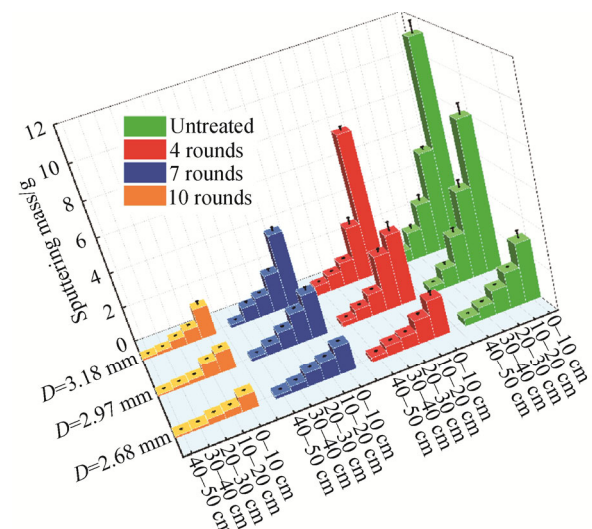
Fig. 13 Splash erosion mass

不同降雨条件下 2 种方法处理后砂样溅蚀量与溅蚀距离的关系如图 14 所示。总的来说, 同一降雨条件下, 各砂样的溅蚀量随溅蚀距离的增加而减小。这是因为溅起的砂颗粒受到自身大小和质量的影

响, 溅蚀距离越近, 砂颗粒所需的动能越小, 故溅蚀的尾矿砂颗粒多分布于 0~10 cm 之间。



(a) In situ bio-stimulation



(b) Bacillus pasteurianus

图 14 溅蚀量与溅蚀距离的关系

Fig. 14 Relationship between erosion mass and splash distance

2.5 重金属浸出毒性及形态变化

图 15 为未处理及 2 种方法 1.0 mol/L 胶结液固化 10 轮后尾矿砂中 Fe、Zn、Cd 3 种重金属的浸出浓度变化。未处理尾矿砂的 TCLP 浸出液中含有较高浓度的 Fe(225.20 mg/L)、Zn(7.31 mg/L) 和 Cd(0.038 mg/L), 固化后 3 种重金属浸出浓度较未处理砂样均显著降低, 因为 MICP 过程中产生的碳酸钙根通过吸附或结合游离的重金属离子, 将其转化为不溶的碳酸盐沉淀, 从而降低了重金属污染土的毒性。原位激发处理后砂样的重金属浸出毒性低于芽

孢杆菌处理组,说明原位激发固定重金属能力优于芽孢杆菌,与力学性能试验结果相反。这是由于原位激发的产脲酶微生物为尾矿砂中自有的,虽然脲酶活性较芽孢杆菌低,但重金属耐受性高,且其在尾矿砂中分布均匀,提供了更多的碳酸盐沉淀成核位点, MICP 过程中生成的碳酸根更容易与尾矿砂中的游离重金属离子结合,提高了重金属固定率。原位激发处理后砂样 Fe、Zn、Cd 的浸出浓度分别下降了 66.7%、56.8%、74.5%。

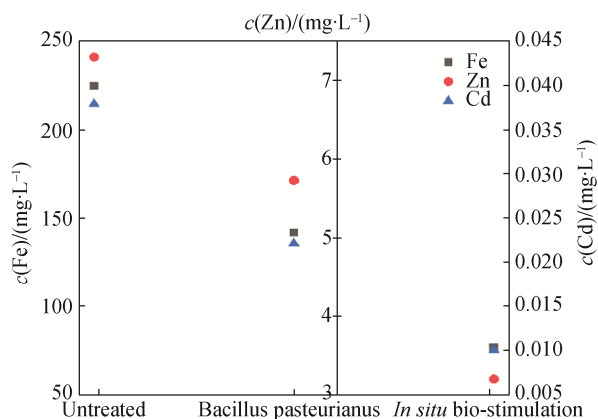


图 15 Fe、Zn、Cd 浸出毒性

Fig. 15 Leaching concentration of Cd, Zn, and Fe

图 16 为未处理及 2 种方法 1.0 mol/L 胶结液固化 10 轮后尾矿砂中 Fe、Zn、Cd 3 种重金属的形态变化。Tessier 五步法测定金属形态的稳定性为:可交换态最低,其次是碳酸盐结合态、铁锰氧化物结合态和有机结合态,残余态最稳定。残余态是前 4 步萃取完成后残余物中的金属,通常表现为结合紧密的固体络合物、共沉淀物、固相氧化物,在大多数条件下不会出现明显的形态变化^[18]。未处理尾矿砂中 Fe 含量虽高(平均 13.27%),但 89.2%为残余态,这是因为尾矿砂经过磁选、浮选等选矿工艺,形态相对不稳定的 Fe 都被留下,作为选矿废弃物排出的尾矿砂中残余的铁大多相对稳定。尾矿砂中的 Zn 主要表现为可交换态(41.76%)和残余态(35.87%),稳定性不如 Fe。尾矿砂中的 Cd 超过一半为可交换态(63.86%),残余态占比很低(18.21%),稳定性差,毒性大,环境危害大,这也解释了尾矿库周边农田土壤 Cd 中度污染、Zn 含量处于警戒线的原因。

固化前后尾矿砂中 Fe、Zn、Cd 5 种形态分布差异最大的是可交换态和碳酸盐结合态。未处理前尾矿砂中可交换态的 Fe、Zn、Cd 分别为 3.67%、41.76%、63.86%,原位激发处理后分别下降了

2.63%、25.49%、44.72%,碳酸盐结合态的 Fe、Zn、Cd 分别增加了 1.65%、20.5%、39.36%。由此推断, MICP 过程中,降低重金属毒性和迁移能力的主要方式是从可交换态向碳酸盐结合态转化。这在前人的研究中也得到了印证^[25–27]。且原位激发处理后砂样重金属从可交换态向碳酸盐结合态转化的转化率均高于芽孢杆菌处理后砂样,与重金属浸出毒性试验结果一致。

3 种重金属的有机结合态在固化前后也出现了一定程度的改变。未处理前尾矿砂中有机结合态的 Fe、Zn、Cd 分别占 2.35%、5.07%、3.77%,芽孢杆菌处理后砂样分别增加了 0.26%、0.72%、0.2%,差异不大。而原位激发处理后砂样分别增加了 1.34%、4.55%、4.62%,较芽孢杆菌高。有机结合态占比的增加主要来源于重金属离子与细菌的吸附及络合,提高了稳定性。说明本土细菌与重金属离子吸附及络合能力强于巴氏芽孢杆菌。

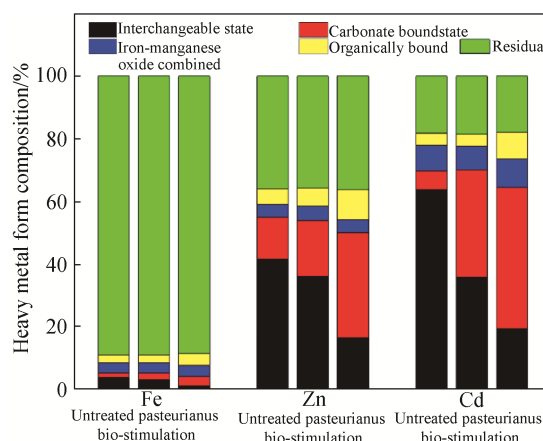


图 16 Fe、Zn、Cd 重金属形态变化

Fig. 16 Form change of Cd, Zn, and Fe

铁锰氧化物结合态和残余态的重金属在固化前后基本没有改变。未处理前尾矿砂中 Fe、Zn、Cd 的铁锰氧化态分别占比 3.44%、4.05%、8.19%;残余态分别为 89.25%、35.87%、18.21%,原位激发处理后 Fe、Zn、Cd 的铁锰氧化态分别占比 3.54%、4.29%、9.21%;残余态分别为 88.79%、36.07%、17.93%。说明 MICP 过程对重金属中较稳定的铁锰氧化物结合态和残余态无明显影响。

2.6 经济及环境效益分析

表 7 为 2 种固化方法的成本核算,胶结液为 1.0 mol/L。可以看出原位激发每轮的固化成本仅需 89.4 元,而芽孢杆菌每轮的固化成本需 405.1 元,是原位激发的 4.53 倍。这是因为细菌培养液配制成

本较高，原位激发无需培养细菌且激发液配制成本较低。由前述试验可知，尾矿砂经原位激发固化 15 轮与芽孢杆菌固化 10 轮后的力学性能相当，且重金

属固定率和胶结厚度均高于芽孢杆菌。原位激发固化 15 轮的成本为 1341 元，芽孢杆菌固化 10 轮的成本为 4051 元，是前者的 3 倍。

表 7 原位激发与芽孢杆菌组成本比较

Table 7 Cost analysis and comparison between biostimulation and *S.pasteurii*

	Method	Material	Concentration/(g·L ⁻¹)	Unit Price/(¥·g ⁻¹)	Amount/round/(L·m ⁻²)	Cost/(¥·m ⁻²)
Bacillus pasteurianus	Bacterial solution	YE	20	0.318	12.7	405.1
		ammonium sulfate	10	0.032		(1 round)
		Tris buffer	15.75	1.240		
	Cementation solution	calcium chloride	110.98	0.035		4051
		urea	60.06	0.030		(10 rounds)
<i>In situ</i> bio-stimulation	Bio-stimulation solution	Sodium acetate	2.94	0.039	12.7	89.4
		Ammonium sulfate	7.08	0.032		(1 round)
		Urea	28.89	0.030		
		YE	0.2	0.318		894
	Cementation solution	Nickel chloride	0.001	0.243		(10 rounds)
		Sodium hydroxide	1.44	0.058		
		Calcium chloride	110.98	0.035		1341
		Urea	60.06	0.030		(15 rounds)

原位激发本土产脲酶微生物的脲酶活性较巴氏芽孢杆菌确实较低，但本土产脲酶微生物更适应尾矿砂中的环境，生存时间更长，MICP 过程分解尿素的持续时间也 longer。且由于其在尾矿砂中分布均匀，减轻了碳酸钙在砂样表面的堵塞现象，提高了固化深度及均匀性。此外，由于无需细菌培养和运输过程，原位激发显著降低了固化成本，又避免了外来物种的引入对当地环境的影响。因此原位激发具有更好的经济及环境效益。

2.7 基于高通量测序的微生物群落分析

前述试验结果证明了原位激发固化尾矿砂的有效性，但其固化机制和对微生物群落的影响仍需进一步探究。微生物群落是指生态系统中各种微生物的组成和结构，对环境的变化和干扰非常敏感。通过对比原位激发前后尾矿砂微生物群落的变化，可揭示原位激发对尾矿砂生态系统的影响及固化机制。

使用 OMEGA 公司的 E.Z.N.A™ Mag-Bind Soil DNA Kit 作为 DNA 提取试剂盒，从尾矿库 A、B、C 3 个区各取 1 个样本 I1、I8、I12，采用 1.0 mol/L 胶结液原位激发 10 轮后的尾矿砂中选取 3 个平行样 S1、S2、S3，对这 6 个样分别提取总 DNA 并进行 PCR 扩增和测序。测序的过程根据上海 Sangon 生物技术公司的 Illumina16S ROD 数据库测序文库制备指南进行。

2.7.1 Alpha 多样性指数分析 Alpha 多样性指数分析包括一系列统计学分析指数，用于估计微

生物群落的物种丰富程度和多样性。原位激发前后尾矿砂基于 OTU 的 Alpha 多样性各指数计算结果见表 8。

表 8 基于 OTU 的 Alpha 多样性指数

Table 8 OTU-Based Alpha Diversity Index

Sample	Chao	Ace	Simpson	Shannon	Shannoneven
S1	111.18	123.81	0.24	1.66	0.37
S2	94.06	101.03	0.27	1.54	0.35
S3	127	128.35	0.28	1.56	0.34
I1	231.4	231.99	0.08	3.2	0.59
I8	160.5	160.91	0.15	2.83	0.56
I12	208	207.73	0.08	3.33	0.62

其中，Chao、Ace 是用来估计群落中含有 OTU 数目的指数，代表群落中物种的丰富程度，Chao、Ace 指数越大，说明物种丰富程度越高。Shannon 和 Simpson 指数用于反映群落多样性，Shannon 指数越大，说明群落多样性越高；Simpson 指数越大，说明群落多样性越低。Shannoneven 是用于反映物种个体数目在群落中分配的均匀程度的指数，Shannoneven 指数越大，说明物种在群落中分布越均匀。可以看出原位激发后尾矿砂的群落多样性及丰富程度低于处理前，且物种在群落中的分布也较处理前更集中。这是因为针对尾矿砂优化后的激发液为尾矿砂中具备分解尿素能力和与生物矿化相关的细菌提供了更适宜的生长繁殖环境，抑制了其他

细菌的生长成为优势菌群，故处理后的尾矿砂中多为筛选后的产脲酶菌，种类较少且分布较集中。

2.7.2 相对丰度分析 图 17 为各样本在属水平上的相对丰度图。从图中可以看出，处理前尾矿砂中占比较大的菌群主要有 5 种，其中 *Phenylobacterium*(苯基杆菌属)是一种革兰氏阴性、严格好氧的不动菌属，可在氯代矿物盐上生长^[28]；*Acinetobacter*(不动杆菌属)是革兰氏阴性菌的一个属，属于更广泛的 γ -变形菌纲，为氧化酶阴性，可促进芳香化合物的代谢^[29]；*Limnobacter*(伯克氏菌属)是一种革兰氏阴性、需氧、具有单极鞭毛的运动型细菌，为氧化酶和过氧化氢酶阳性，具有氧化硫代硫酸盐的能力^[30]；*Novosphingobium*(新鞘氨醇菌属)是一种专性需氧细菌，能产生过氧化氢酶，可将戊糖、己糖及二糖转变成酸，它可以降解苯酚、苯胺、硝基苯和苯等芳香族化合物^[31]；*Thiobacillus*(硫杆菌属)是一种专性自养细菌，使用硫元素、硫代硫酸盐或连多硫酸盐作为能源，可以使用来自二甲

硫、二甲基二硫化物或二硫化碳的硫来支持自养生长^[32]。尚未有文献直接证明以上 5 种菌属具有生物矿化功能。

原位激发后尾矿砂中主要优势菌群发生了显著变化，占比较高的有 5 种。其中 *Sphingomonas*(鞘氨醇单胞菌属)是由 103 个种组成的革兰氏阴性细菌^[33]，在生物修复及环境污染物的生物降解中起着重要作用^[34–35]，Pan 等证明 *Sphingomonas* 具有较强的重金属耐受性，可用于固定游离镉^[36]；*Aquabacterium*(水杆菌属)是一类具有高效反硝化和生物矿化能力的兼性厌氧细菌^[37]。Zhang 等^[38]证明面对复杂的水体污染，*Aquabacterium* 属中的 CZ3 能以苯酚为补充碳源，在兼性厌氧条件下通过诱导碳酸钙沉淀(MICP)去除硝酸盐、氟化物、钙和苯酚。*Pseudomonas*(假单胞菌属)是硝酸盐还原菌中的常见类别^[39]，常存在于土壤和水中。Ersan 等^[40]将 *Pseudomonas* 用于混凝土裂缝自修复。Boquet 等^[41]指出，包括 *Pseudomonas* 在内的近 200 种土壤细菌，能够诱导碳酸钙沉淀。*Streptococcus*(链球菌属)是成对或成链出现的不动球菌，大多数为兼性厌氧菌，有些是专性(严格)厌氧菌。Di Jin 等^[42]发现 *Streptococcus* 和前面提到的 *Pseudomonas* 对添加尿素呈阳性反应。*Marmoricola*(海球菌属)是类诺卡氏菌科的革兰氏阳性细菌属，不是产脲酶菌，但属于钙化微生物，也与生物矿化有关^[43]。*Sphingomonas*、*Aquabacterium*、*Pseudomonas* 在样本 I8、I12 中出现，*Streptococcus* 在样本 I1、I12 中出现，但占比均较低。*Marmoricola* 未在未处理尾矿砂丰度图中出现，可能是由于其占比低于 1%。可见，原位激发通过选择活化和种群富集，使得尾矿砂中能利用尿素的细菌成为优势菌种，提高了尾矿砂的脲酶活性，促进了 MICP 反应进程。

2.7.3 PICRUST 功能预测分析 PICRUST 是由美国哈佛大学的 Curtis Huttenhower 课题组开发的菌群代谢功能预测工具，通过将现有的 16S rRNA 基因测序数据与代谢功能已知的微生物参考基因组数据库相对比，从而实现对细菌和古菌代谢功能的预测。选取优势种群进行 PICRUST 预测，结合 COG 功能谱数据库，可以获得各样本对应的注释信息，以及预测得到的功能类群的丰度矩阵，再根据丰度矩阵绘制热图。图 18 给出了各样本的 COG 热度图，其中 COG0830 是一种脲酶辅助蛋白，其在原位激发后尾矿砂中的丰度显著大于处理前，说明原位激发确实提高了尾矿砂中菌群的产脲酶能力。

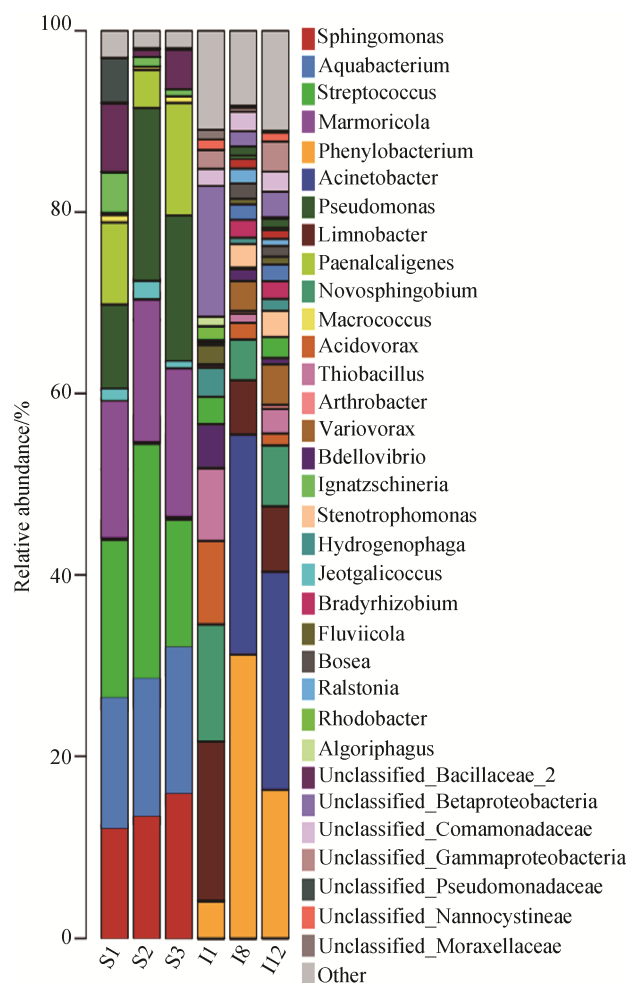


图 17 各样本在属水平上相对丰度图

Fig. 17 Relative abundance at genus level of differed samples

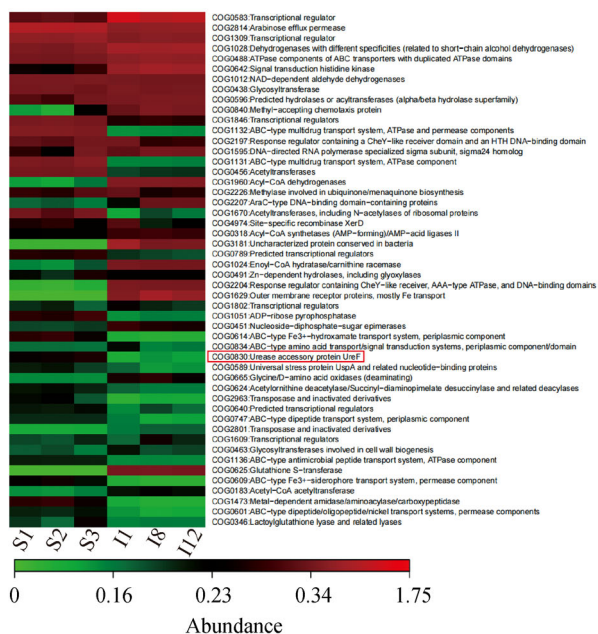


图 18 各样本 COG 热度图
Fig. 18 COG heatmap of different samples

3 尾矿砂固化机制

3.1 加固机制分析

图 19 为不同胶结液浓度下 2 种方法固化 10 轮后的尾矿砂扫描电子显微镜(SEM)照片。可见固化后砂样表面发生了明显变化, MICP 生成的碳酸钙晶体附着于砂颗粒表面或胶结于砂颗粒之间, 这是固化后砂样强度增加的主要原因。图中的矿化产物均以较稳定的棱状方解石晶体为主, 但数量和尺寸差异较大。图 20 XRD 谱中的方解石衍射峰的存在也证实了这一点。

在 MICP 过程中, 碳酸钙晶体的成核与其生长存在着竞争关系^[44]。原位激发激活的本土产脲酶微生物在尾矿砂中分布较广且均匀, 提供了更多的成核位点, 且原位激发的产脲酶菌脲酶活性较低, 诱导生成碳酸钙较慢, 更有利于新碳酸钙晶体的成核; 芽孢杆菌是往尾矿砂中引入外来细菌, 细菌扩散迁移范围有限, 多在局部聚集, 且巴氏芽孢杆菌脲酶活性高, 可在短时间内诱导生成大量碳酸钙沉淀, 导致碳酸钙更容易在现有晶体上沉淀(即晶体生长), 故同一胶结液浓度下, 图 19a、图 19c、图 19e 方框中碳酸钙晶体尺寸小于 图 19b、图 19d、图 19f 方框中碳酸钙。此外, 原位激发生成的碳酸钙较少且分布较为零散, 芽孢杆菌生成的碳酸钙较多且分布较为集中。

胶结液浓度对碳酸钙晶体的形成也有较大影响。当碳酸根离子浓度较低时, 其主要用于新碳酸

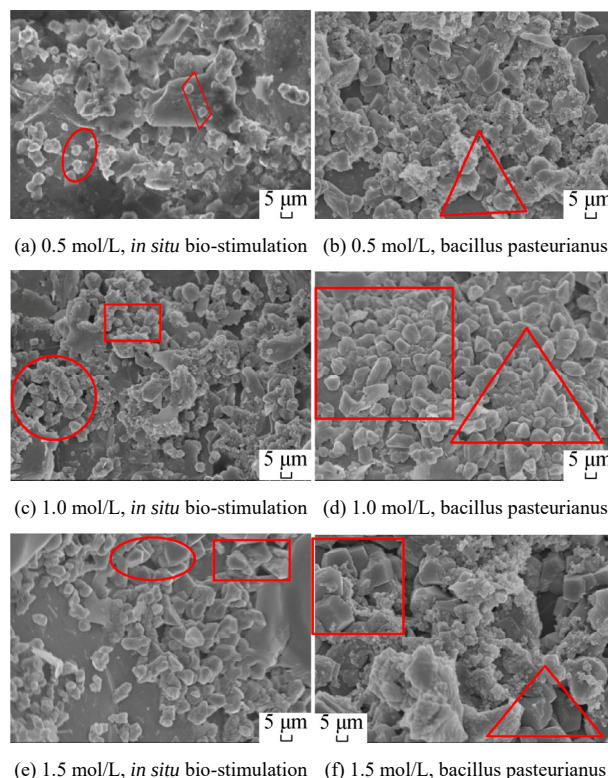


图 19 不同胶结液浓度下 2 种方法固化后尾矿砂 SEM 照片
Fig. 19 SEM images of tailings sand solidified by two methods at different cementation solution concentrations

钙晶体的成核, 而不用用于晶体的生长; 当碳酸根离子浓度过高时, 碳酸钙更倾向于在现有晶体上沉淀(即晶体生长), 而不是在新的位置成核^[45-46]。原位激发处理的砂样中(圆圈标注), 当胶结液浓度为 0.5 mol/L 时, 砂土孔隙中碳酸根离子浓度较低, 有利于新的碳酸钙晶体的成核, 因此图 19a 中的棱状晶体尺寸较小; 当胶结液浓度为 1.0 mol/L 时, 砂土孔隙中碳酸根离子的浓度仍然有利于新晶体的成核, 与图 19a 相比, 图 19c 中的棱状晶体尺寸并无明显变化, 但由于碳酸根和钙离子浓度增加, 生成了更多碳酸钙, 故图 19c 中晶体数量较图 19a 明显增多; 当胶结液浓度为 1.5 mol/L 时, 砂土孔隙中高浓度的碳酸根离子促使碳酸钙在已有晶体上沉淀, 进而形成较大的晶体, 故图 19e 中的晶体尺寸大于图 19a 和 19c。但由于钙离子浓度过高, 抑制了本土产脲酶菌的脲酶活性^[22], 生成的碳酸钙减少, 晶体数量明显少于图 19c。这一规律在芽孢杆菌处理的砂样中也得到了验证(三角形标注): 图 19b 和 19d 中的晶体尺寸相当, 但图 19d 较图 19b 晶体数量多, 图 19f 中的晶体尺寸较图 19b 和图 19d 大, 但晶体数量不如图 19d 多。从图 9 表面强度及碳酸钙含量也可以看出, 同种方法、同一固化轮次下, 1 mol/L 胶结液诱导矿化生成的碳酸钙最多;

同种方法、同一胶结液浓度下,原位激发诱导矿化生成的碳酸钙较少。

总的来说,同种固化方法下,1.5 mol/L 胶结液处理的砂样生成的碳酸钙晶体虽然尺寸较大,但数量太少,且在局部聚集;而 1.0 mol/L 胶结液处理的砂样生成的碳酸钙晶体尺寸略小,但数量多且分布均匀,说明 1.0 mol/L 胶结液更有利于碳酸钙的形成。Cheng 等^[21]和 Liu 等^[47]也得出了类似结论。同一胶结液浓度下,与芽孢杆菌相比,原位激发处理的砂样生成的碳酸钙晶体尺寸略小,数量较少且分布均匀。

3.2 重金属固定机制分析

产脲酶微生物中脲酶的结构对 MICP 过程起着关键作用。脲酶是一种含镍的金属酶,具有复杂 3 级和 4 级结构的多聚体蛋白质,活性位点包含关键的氨基酸残基和镍离子。其结构特点使其能够高效、特异地催化尿素的水解反应。不同微生物的脲酶在活性位点结构上可能存在差异。原位微生物的脲酶活性位点对尾矿砂中的重金属离子有较强的排斥或选择性结合能力,可能有更多或不同类型的金属结合位点,可以与尾矿砂中的重金属离子结合而不影响脲酶的核心活性位点。这种结构特征可以保护酶的功能性活性位点,避免重金属造成的毒害作用。

图 20 为未处理及 2 种方法 1.0 mol/L 胶结液固化 10 轮后尾矿砂 XRD 谱。在未处理的尾矿砂中,主要成分是石英、氧化钙和硅酸盐钙化物,两种方法处理后的尾矿砂中出现了方解石、碳酸锌和钙铁氧化物。说明在 MICP 过程中,碳酸钙最终以方解石形式沉淀,这是固化后尾矿砂强度提高的直接原因。与此同时铁、锌、镉等重金属离子以金属碳酸

盐沉淀或与碳酸钙共沉淀的方式被固定。由于尾矿砂中镉浓度较低,XRD 谱未检测到碳酸镉沉淀,但 2.5 实验结果中镉的碳酸盐结合态的增加,证明了这一结论。芽孢杆菌处理的砂样方解石较多、碳酸锌和钙铁氧化物较少;原位激发处理的砂样方解石较少、碳酸锌和钙铁氧化物较多,说明芽孢杆菌生成碳酸钙较多,原位激发重金属固定率较高,与前述试验结果一致。

重金属五形态中的可交换态可以通过离子交换而释放到尾矿砂溶液中,在雨水径流的冲刷下造成周边环境的污染,将可交换态转变为稳定的结合态是固定重金属的关键。

在 MICP 过程中,重金属离子以碳酸盐沉淀或与碳酸钙共沉淀的方式被固定,流动性和生物利用率显著降低,限制了重金属向周边环境的释放。除了 MICP 过程,铁锰氧化物也有可能通过沉淀和特定的吸附反应降低砂土金属浓度。铁锰氧化物和铝硅酸盐具有较高的金属结合能力,当砂土 pH 值高于 5.5 时,可交换的 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 可被 Ca^{2+} 取代,并沉淀为 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 和 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 。这种新形成的氧化物和氢氧化物为吸附锌、镉提供了额外的位置。随着原位激发后 pH 值的增加,导致表面负电荷增加或 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 在铁、铝氧化物上的吸附,这将进一步减少重金属迁移。J Fan^[48]等在固定污染土壤中的铜时也得到类似结论。

阳离子交换容量(CEC)指的是每千克砂土中所含有的全部交换性阳离子(K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NH_4^+ 、 H^+ 、 Al^{3+} 等)的厘摩尔数。优化后的激发液和尾矿砂水溶液均呈碱性,激发液加入尾矿砂后 pH 值升高,使砂土胶体上吸附的 H^+ 和其他阳离子减少,更多的自由阳离子与其他阳离子交换,导致 CEC 升高。升高的 pH 值加强了砂土胶体的负电荷,有助于增加砂土中正电荷阳离子的吸附。原位激发过程中,砂土中形成了必要的官能团,导致碳酸钙或金属碳酸盐沉淀。原位激发后表面含氧官能团如羧基伸缩振动的增加也能提高 CEC。砂土 CEC 的增加,可以使更多的阳离子在交换过程中成为砂土中微生物的营养物质,是固定重金属后改善砂土肥力的一种有效措施。

虽然原位激发的本土产脲酶菌的脲酶活性较低,但其更适应尾矿砂中的环境,对重金属耐受性好,生存时间更长, MICP 过程分解尿素的持续时间也更长。与非矿化菌相比,产脲酶菌表面带更多负电荷^[49],且其在尾矿砂中分布均匀,能更好地结

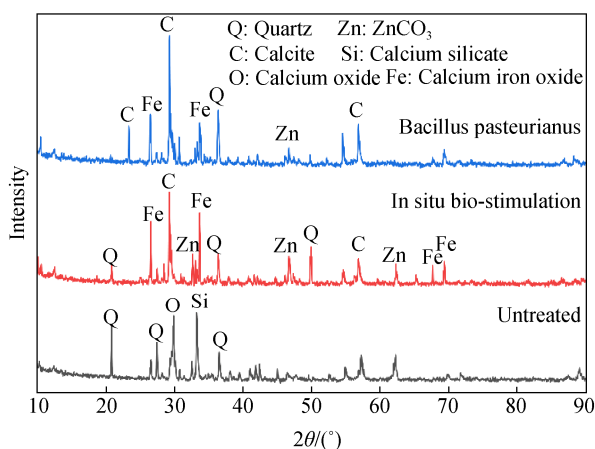


图 20 未处理及 2 种方法固化后尾矿砂 XRD 谱

Fig. 20 XRD spectra of untreated tailings sand and those solidified by two methods

合钙离子和捕获游离的重金属离子, 通过将可交换态的重金属转变为金属碳酸盐沉淀、金属-碳酸钙共沉淀或被铁、铝氧化物吸附, 降低了重金属的流动性和生物利用率, 限制了重金属向周边环境的迁移。同时, 通过提高砂土中阳离子交换容量(CEC), 改善了砂土肥力, 有利于尾矿库的复垦和减少植物根系对重金属的吸收和积累。

4 结论

本工作提出了一种基于 PB-CCD 优化的原位激发本土产脲酶微生物方案用于尾矿砂固化, 在提升尾矿砂力学性能的同时固定了尾矿砂中的重金属。具体结论如下:

1) PB-CCD 优化后的激发液培养的尾矿砂, 脲酶活性是初始激发液的 1.944 倍。尾矿砂最优激发液组分为: 乙酸钠 35.85 mmol/L, 硫酸铵 53.59 mmol/L, 尿素 481.0 mmol/L, YE 0.2 g/L, 氯化镍 0.01 mmol/L, pH 值为 8.70。

2) 相同固化轮次下, 原位激发具有更强的重金属固定能力和更好的固化深度和均匀性。虽然相同固化轮次下原位激发处理的砂样的力学性能较芽孢杆菌差, 但通过增加固化轮次, 原位激发处理 15 轮的砂样与芽孢杆菌处理 10 轮的砂样力学性能相当。

3) 原位激发每轮的固化成本仅为芽孢杆菌的 1/5, 达到相当的力学性能时原位激发(15 轮)的固化成本仅为芽孢杆菌(10 轮)的 1/3。原位激发无需细菌培养和运输过程, 又避免了外来物种的引入对当地环境的影响, 具有更好的经济及环境效益。

4) 原位激发成功激活了尾矿砂中原本丰度较低的产脲酶菌, 通过抑制其他微生物的生长成为绝对优势菌群, 相对丰度提高至 70%~90%, 群落多样性和均匀性下降。

5) 尾矿砂中的产脲酶菌对重金属耐受性好, 生存时间长, 可持续将可交换态的重金属转变为金属碳酸盐沉淀、金属-碳酸钙共沉淀或被铁、铝氧化物吸附, 从而实现原位固定尾矿砂中重金属。

原位激发产脲酶微生物固化尾矿砂通过提高阳离子交换容量(CEC), 改善了砂土肥力, 有利于矿山植被修复, 具有良好的工程适用性和经济环境效益。本研究设计优化的原位激发方案是针对尾矿砂的, 但设计初始激发液配方、选取碳氮源、采用 PB-CCD 优化的方法可推广至其他土体, 选用配制成本较低的激发液激活本土产脲酶菌加固土体, 可大幅度降低固化成本。此外, 本工作是基于室内模

拟试验进行的, 后续可以结合尾矿库现场试验进行进一步的验证。将需要考虑更多因素, 如天气、温度、地形、周边植被等, 从而验证该方法在实际工程应用中的可行性。

参考文献:

- [1] DEJONG J T, FRITZGES M B, NÜSSEIN K. Microbially induced cementation to control sand response to undrained shear[J]. *J Geotech Geoenviron Eng*, 2006, 132(11): 1381–1392.
- [2] DEJONG J T, SOGA K, KAVAZANJIAN E, et al. Biogeochemical processes and geotechnical applications: Progress, opportunities and challenges[M]//LALLOUI L, ed. *Bio- and Chemo-Mechanical Processes in Geotechnical Engineering*. S.L.: ICE Publishing, 2014: 143–157.
- [3] ONAL OKYAY T, FRIGI RODRIGUES D. High throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification[J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 95(3): 324–326.
- [4] 黄小松, 章荣军, 崔明娟, 等. 巴氏芽孢杆菌生物修复重金属污染溶液试验研究[J]. *土木与环境工程学报*, 2022, 44(3): 160–167. HUANG Xiaosong, ZHANG Rongjun, CUI Mingjuan, et al. *J Civ Environ Eng*, 2022, 44(3): 160–167.
- [5] CHENG L, SHAHIN M A, CHU J. Soil bio-cementation using a new one-phase low-pH injection method[J]. *Acta Geotech*, 2019, 14(3): 615–626.
- [6] GOMEZ M G, GRADDY C M R, DEJONG J T, et al. Stimulation of native microorganisms for biocementation in samples recovered from field-scale treatment depths[J]. *J Geotech Geoenviron Eng*, 2018, 144(1): 04017098.
- [7] GAT D, RONEN Z, TSESARSKY M. Soil bacteria population dynamics following stimulation for ureolytic microbial-induced CaCO₃ precipitation[J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(2): 616–624.
- [8] GOMEZ M G, GRADDY C M R, DEJONG J T, et al. Biogeochemical changes during bio-cementation mediated by stimulated and augmented ureolytic microorganisms[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11517.
- [9] PAKBAZ M S, GHEZELBASH G R, AFZAL A. Sugarcane Molasses: A Cheap Carbon Source for Calcite Production in Different Class of Soils using Stimulation of Indigenous Urease-producing Bacteria[J]. *Geomicrobiol J*, 2020, 37(3): 213–229.
- [10] WANG Y J, HAN X L, JIANG N J, et al. The effect of enrichment media on the stimulation of native ureolytic bacteria in calcareous sand[J]. *Int J Environ Sci Technol*, 2020, 17(3): 1795–1808.
- [11] LAI Y M, YU J, LIU S Y, et al. Experimental study to improve the mechanical properties of iron tailings sand by using MICP at low pH[J]. *Constr Build Mater*, 2021, 273: 121729.
- [12] Chen X H, Guo H X, Cheng X H. Experimental study of the improvement of the properties of the tailing by biomaineralization[J]. *Indust Constr*, 2016, 46(6): 94–98.
- [13] 生态环境部南京环境科学研究所、中国科学院南京土壤研究所、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、中国环境科学研究院. GB 15618—2018 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [14] 中华人民共和国生态环境部. HJ/T 166—2004 土壤环境监测技术规范[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004.

- [15] 中华人民共和国生态环境部. GB/T 50123—2019 土工试验方法标准[S]. 北京: 中国计划出版社, 2019.
- [16] DE MUYNCK W, DEBROUWER D, DE BELIE N, et al. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials[J]. Cem Concr Res, 2008, 38(7): 1005–1014.
- [17] GERLACH G F, CLEGG S, NICHOLS W A. Characterization of the genes encoding urease activity of *Klebsiella pneumoniae*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1988, 50(2/3): 131–135.
- [18] PENG W H, LI X M, SONG J X, et al. Bioremediation of cadmium- and zinc-contaminated soil using *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Chemosphere, 2018, 197: 33–41.
- [19] SW-846 Test Method 1311: Toxicity Characteristic Leaching Procedure <http://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-1311-toxicity-characteristic-leaching-procedure>
- [20] NEMATI K, ABU BAKAR N K, ABAS M R, et al. Speciation of heavy metals by modified BCR sequential extraction procedure in different depths of sediments from Sungai Buloh, Selangor, Malaysia[J]. J Hazard Mater, 2011, 192(1): 402–410.
- [21] CHENG Y J, TANG C S, PAN X H, et al. Application of microbial induced carbonate precipitation for loess surface erosion control[J]. Eng Geol, 2021, 294: 106387.
- [22] KUNST F, RAPOPORT G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 1995, 177(9): 2403–2407.
- [23] LIU S Y, DONG B W, YU J, et al. Evaluation of biostimulation efficacy on the reinforcement of calcareous sand[J]. J Test Eval, 2021, 49(6): 4181–4200.
- [24] DAGLIYA M, SATYAM N, SHARMA M, et al. Experimental study on mitigating wind erosion of calcareous desert sand using spray method for microbially induced calcium carbonate precipitation[J]. J Rock Mech Geotech Eng, 2022, 14(5): 1556–1567.
- [25] XUE Z F, CHENG W C, RAHMAN M M, et al. Immobilization of Pb(II) by *Bacillus megaterium*-based microbial-induced phosphate precipitation (MIPP) considering bacterial phosphorolysis ability and Ca-mediated alleviation of lead toxicity[J]. Environ Pollut, 2024, 355: 124229.
- [26] XUE Z F, CHENG W C, WANG L, et al. Immobilizing lead in aqueous solution and loess soil using microbially induced carbonate/phosphate precipitation (MICP/MIPP) under harsh pH environments[J]. J Hazard Mater, 2024, 480: 135884.
- [27] CHEN X Y, ACHAL V. Biostimulation of carbonate precipitation process in soil for copper immobilization[J]. J Hazard Mater, 2019, 368: 705–713.
- [28] OH Y S, ROH D H. *Phenylobacterium muchangponense* sp. nov., isolated from beach soil, and emended description of the genus *Phenylobacterium*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012, 62(P4): 977–983.
- [29] CHEN T L, LEE Y T, KUO S C, et al. Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(P9): 1154–1159.
- [30] LU H S, SATO Y, FUJIMURA R, et al. *Limnobacter litoralis* sp. nov., a thiosulfate-oxidizing, heterotrophic bacterium isolated from a volcanic deposit, and emended description of the genus *Limnobacter*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2011, 61(P2): 404–407.
- [31] LIU Z P, WANG B J, LIU Y H, et al. *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(P3): 1229–1232.
- [32] HALLBERG K B, LINDSTRÖM E B. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile[J]. Microbiology, 1994, 140 (12): 3451–3456.
- [33] WHITE D C, SUTTON S D, RINGELBERG D B. The genus *Sphingomonas*: Physiology and ecology[J]. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7(3): 301–306.
- [34] YU F B, SHAN S D, LUO L P, et al. Isolation and characterization of a *Sphingomonas* sp. strain F-7 degrading fenvalerate and its use in bioremediation of contaminated soil[J]. J Environ Sci Health B, 2013, 48(3): 198–207.
- [35] CHEN J L, WONG M H, WONG Y S, et al. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment[J]. Mar Pollut Bull, 2008, 57(6–12): 695–702.
- [36] PAN F S, MENG Q, WANG Q, et al. Endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 promotes cadmium accumulation by increasing glutathione biosynthesis in *Sedum alfredii* Hance[J]. Chemosphere, 2016, 154: 358–366.
- [37] PHAM V H T, JEONG S W, KIM J. *Aquabacterium olei* sp. nov., an oil-degrading bacterium isolated from oil-contaminated soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2015, 65(10): 3597–3602.
- [38] ZHANG R J, WANG X M, ALI A, et al. Single-step removal of calcium, fluoride, and phenol from contaminated water by *Aquabacterium* sp. CZ3 via facultative anaerobic microbially induced calcium precipitation: Kinetics, mechanism, and characterization[J]. Bioresour Technol, 2022, 361: 127707.
- [39] ZHANG J G, ZHOU A J, LIU Y Z, et al. Microbial network of the carbonate precipitation process induced by microbial consortia and the potential application to crack healing in concrete[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14600.
- [40] ERSAN Y, BOON N, BELIE N. Microbial self-healing concrete: Denitrification as an enhanced and environment-friendly approach[C]//5th International conference on Self-Healing Materials (ICSHM 2015). Duke University, 2015.
- [41] BOQUET E, BORONAT A, RAMOS-CORMENZANA A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon[J]. Nature, 1973, 246: 527–529.
- [42] JIN D, ZHAO S G, WANG P P, et al. Insights into abundant rumen ureolytic bacterial community using rumen simulation system[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1006.
- [43] BAI Y H, CHANG Y Y, LIANG J S, et al. Treatment of groundwater containing Mn(II), Fe(II), As(III) and Sb(III) by bioaugmented quartz-sand filters[J]. Water Res, 2016, 106: 126–134.
- [44] GANDHI K S, KUMAR R, RAMKRISHNA D. Some basic aspects of reaction engineering of precipitation processes[J]. Ind Eng Chem Res, 1995, 34(10): 3223–3230.
- [45] JIANG N J, TANG C S, YIN L Y, et al. Applicability of microbial calcification method for sandy-slope surface erosion control[J]. J Mater Civ Eng, 2019, 31(11): 04019250.
- [46] SOMANI R S, PATEL K S, MEHTA A R, et al. Examination of the polymorphs and particle size of calcium carbonate precipitated using still effluent (i.e., CaCl₂ + NaCl solution) of soda ash manufacturing process[J]. Ind Eng Chem Res, 2006, 45(15): 5223–5230.
- [47] LIU S Y, YU J, PENG X Q, et al. Preliminary study on repairing tabia cracks by using microbially induced carbonate precipitation[J]. Constr Build Mater, 2020, 248: 118611.
- [48] FAN J H, HE Z L, MA L Q, et al. Immobilization of copper in contaminated sandy soils using calcium water treatment residue[J]. J Hazard Mater, 2011, 189(3): 710–718.
- [49] UCHIMIYA M, LIMA I M, KLASSON K T, et al. Contaminant immobilization and nutrient release by biochar soil amendment: Roles of natural organic matter[J]. Chemosphere, 2010, 80(8): 935–940.

Microbially Induced Calcite Precipitation in Tailings Sand Using *In-situ* Stimulation of Urease-Producing Microorganisms

LAI Yongming¹, KONG Qiuping²

(1. College of Resource Engineering, Longyan University, Longyan 364012, Fujian, China; 2. Fujian Yongqiang Geotechnical Co., Ltd., Longyan 364000, Fujian, China)

Extended Abstract

Introduction The remediation of tailings sand requires improving both mechanical properties and the stabilization of heavy metals. Practical engineering applications must also consider cost and feasibility. Microbially Induced Carbonate Precipitation (MICP) is an innovative technique that uses microorganisms to enhance soil properties and immobilize heavy metals. However, the traditional MICP method using *Bacillus pasteurii* has several limitations: reduced activity in high concentrations of heavy metals, calcium carbonate buildup on the soil surface that clogs and limits solidification depth, risks of introducing invasive species, and high costs associated with bacterial cultivation and transport. These factors make it unsuitable for large-scale applications.

In situ stimulation of indigenous urease-producing microorganisms in the soil offers a solution. This approach avoids species invasion, eliminates the need for bacterial cultivation and injection, reduces costs, and minimizes clogging. Developing a cost-effective and feasible *in situ* stimulation strategy for tailings sand solidification is essential for applying this technology in practical engineering.

Methods The tailings sand used in this study was sourced from the tailings reservoir of Fujian Makeng Mining Co., Ltd., moderately contaminated with cadmium and slightly with zinc. An initial stimulation solution was designed to screen and enrich urease-producing microorganisms in the tailings sand, considering the necessary carbon source, nitrogen source, urea, and other growth factors. Since urease activity is key to the effectiveness of MICP solidification, the urease activity of tailings sand suspensions after *in situ* stimulation was used as the evaluation metric for optimization.

The optimization process involved three steps: 1) Starting with the initial stimulation solution formula, single-factor experiments were conducted to vary carbon and nitrogen sources to identify those yielding the highest urease activity. 2) Using the selected optimal carbon and nitrogen sources, along with other components and pH, a Plackett-Burman (PB) design was employed to identify key factors affecting urease activity. Single-factor tests were then conducted to determine the optimal concentration range for each key factor. 3) A Central Composite Design (CCD) response surface analysis was performed, using urease activity as the response value, to calculate the optimal concentration of each key factor. This resulted in the most effective stimulation solution for tailings sand.

Different concentrations of cementation solution and numbers of solidification rounds were tested to compare the effects of indigenous urease-producing bacteria and *Bacillus pasteurii* on tailings sand in terms of surface strength, cementation thickness, permeability, raindrop erosion resistance, heavy metal leachate toxicity, and heavy metal morphological changes. Microbial community analysis, combined with scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD), was conducted to explore how *in situ* stimulation enhances mechanical properties and immobilizes heavy metals.

Results and discussion 1) The optimal *in situ* activation formula for tailings sand includes sodium acetate at 35.85 mmol/L, ammonium sulfate at 53.59 mmol/L, urea at 481.0 mmol/L, yeast extract (YE) at 0.2 g/L, nickel chloride at 0.01 mmol/L, and a pH value of 8.70, achieving a urease activity 1.944 times higher than that before optimization. 2) The best cementation solution concentration for *in situ* solidification of tailings sand is 1 mol/L. *In situ* activation demonstrated better heavy metal immobilization, deeper solidification, and more uniformity compared to *Bacillus pasteurii* at the same round count. Although the mechanical properties of *in situ*-treated sand were lower after the same number of rounds, 15 rounds of *in situ* treatment achieved comparable properties to 10 rounds with *Bacillus pasteurii*. 3) The cost per round of *in situ* activation is only one-fifth that of *Bacillus pasteurii*. Achieving similar mechanical properties, the total cost of 15 rounds of *in situ* treatment is only one-third of 10 rounds with *Bacillus pasteurii*. *In situ* activation eliminates the need for bacterial culture or transportation and avoids the risk of introducing non-native species, providing superior economic and environmental benefits. 4) The optimized activation solution effectively enriched previously low-abundance urease-producing bacteria, making them the dominant group (70%–90% relative abundance) by inhibiting other microorganisms. This also increased the abundance of the urease accessory protein COG0830. 5) The final product of MICP is calcite. Compared to *Bacillus pasteurii*, *in situ* activation produced smaller, fewer, and more scattered calcite crystals under the same conditions. Calcite crystal nucleation and growth were influenced by cementation solution concentration. 6) The urease-producing bacteria in tailings sand exhibited good tolerance to heavy metals and had a long survival time, continuously converting exchangeable heavy metals into stable forms. After *in situ* activation, the cation exchange capacity (CEC) of the tailings sand increased, effectively

enhancing soil fertility for mine site revegetation after heavy metal fixation.

Conclusions 1) *In situ* activation of urease-producing microbes offers stronger heavy metal immobilization and deeper, more uniform solidification compared to traditional MICP methods. 2) After 15 rounds of treatment, tailings sand solidified using native urease-producing bacteria achieved mechanical properties comparable to those treated with *Bacillus pasteurii* after 10 rounds, while reducing costs by two-thirds. 3) *In situ* activation altered the microbial community in the tailings sand, making urease-producing bacteria dominant. These bacteria induced calcium carbonate precipitation, filling sand particle pores, and converting exchangeable heavy metals into stable forms such as metal carbonates, metal-calcium carbonate co-precipitates, or adsorbed forms on iron and aluminum oxides. This improved both mechanical properties and heavy metal immobilization. 4) By increasing the cation exchange capacity, this method enhanced soil fertility, facilitating mine site revegetation. It is an economically and environmentally viable approach for engineering applications.

Keywords biostimulation; microbially induced carbonate precipitation; tailings sand; heavy metal immobilization