基于响应曲面法的微生物矿化工业级培养基配比优选*

张志军[1,2],白皓[1,2],黄梅钟[3],郑槐淼[1,2],田亚坤[1,2],胡林[1,2],伍玲玲[1,2]

(1.南华大学 资源环境与安全工程学院, 湖南 衡阳市 421001;
2.湖南省矿山岩土工程灾害预测与控制工程技术研究中心, 湖南 衡阳市 421001;
3.济南轨道交通集团建设投资有限公司, 山东 济南 250014)

摘要:为了降低微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)的成本,研究了工业级的牛骨蛋白胨掺量、大豆蛋白胨掺量、氯化钠掺量、尿素掺量对培养16 h的巴氏芽孢杆菌微生物OD_{600}值和脲酶活性的影响。利用响应曲面法优选工业级培养基的最佳配比。对最佳配比下的菌液进行微生物OD_{600}值和脲酶活性检测。将培养16 h的菌液与不同浓度的胶结液反应,对两者反应的碳酸钙生成量进行测定,并对碳酸钙晶体进行扫描电子显微镜(SEM)分析。结果表明:最佳配比为牛骨蛋白胨25 g/L、大豆蛋白胨7.5 g/L、工业氯化钠5 g/L、工业尿素22.2 g/L及纯水1 000 mL。该配比下培养16 h的巴氏芽孢杆菌菌液的OD_{600}值为1.672,脲酶活性为0.037 mmol/(L·min),均在预测值误差之内,结果具有可行性。两种培养基下的胶结生成的碳酸钙量相差不大,且工业级培养基菌液的胶结效果强于分析纯培养基菌液。研究结果可为MICP的工程大范围应用提供一个成本较低的培养基配比方案。

关键词:微生物诱导碳酸钙沉淀;工业级培养基;培养基配比;响应曲面法

中图分类号:X172 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-2763(2026)02-0239-12

Optimization of Industrial-Grade Culture Medium Ratio in Microbial Mineralization Based on Response Surface Methodology

ZHANG Zhijun[1,2], *BAI Hao*[1,2], *HUANG Meizhong*[3], *ZHENG Huaimiao*[1,2],
TIAN Yakun[1,2], *HU Lin*[1,2], *WU Lingling*[1,2]

(1.School of Resources Environment and Safety Engineering,
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;
2.Hunan Province Engineering Technology Research Center for Disaster Prediction and
Control on Mining Geotechnical Engineering, Hengyang, Hunan 421001, China;
3.Jinan Rail Transit Group Co., Ltd., Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: In order to reduce the cost of microbially induced carbonate precipitation (MICP), the effects of industrial-grade bovine bone protein peptone dosages, soya peptone dosages, sodium chloride dosages and urea dosages on the microbial quantity OD_{600} value and urease activity of *Sporosarcina pasteurii* cultured for 16 hours were studied. Response surface methodology was used to optimize the optimal ratio of industrial culture medium. And the microbial quantity OD_{600} value and urease activity of the bacterial solution under the optimal ratio were detected. After the bacterial solution cultured for 16 hours reacting with different concentrations of cementing solution, the amount of calcium carbonate produced by the two reactions was measured, and the calcium carbonate crystals was analyzed using scanning electron microscopy (SEM). The results show that the optimal medium ratio is 25 g/L of bovine bone protein peptone, 7.5 g/L of soya peptone, 5 g/L of industrial sodium chloride, 22.2 g/L of industrial urea, and 1 000 mL of pure water. The OD_{600} value of *Sporosarcina pasteurii* liquid cultured for 16 hours under this ratio is 1.672, and the urease activity is 0.037 mmol/(L·min), both of which are within the prediction error, indicating feasibility of the results. The content of calcium carbonate generated by cementation under the two media is not much different, and the cementation effect of industrial-grade culture medium bacterial solution is stronger than that of analytical pure culture medium bacterial solution. The research results can provide a low-cost medium ratio scheme for the large-scale engineering application of MICP.

Key words: Microbially induced carbonate precipitation, Industrial-grade culture medium, Culture medium ratio, Response surface methodology

---

* **收稿日期**:2025-02-28

基金项目:国家科技重大专项项目(2025ZD1010700,2025ZD1010708);国家自然科学基金项目(52274167);湖南省"揭榜挂帅"重大科技攻关项目(2021SK1050);湖南省自然科学基金项目(2022JJ40374,2023JJ30516,2024JJ9074);湖南省教育厅重点项目(23A0329,24A0306)

作者简介:张志军(1978—),男,河北邢台人,博士,教授,主要研究方向为矿山岩土灾害预测与控制。E-mail:zzj181@163.com

通信作者:伍玲玲(1987—),女,湖南耒阳人,博士,高级实验师,主要从事矿业资源开发利用的研究。E-mali:wllshmily@foxmail.com

0 引言

传统的土体加固方法常采用水泥、石灰和化学材料进行注浆加固,这些方法需要消耗大量的材料和能源,还有可能导致生态系统受到破坏。在这一背景下,微生物诱导碳酸钙沉积技术(Microbially Induced Carbonate Precipitation,MICP)由于具有污染小等环境友好的特点,成为土体加固、污染物处理等方面的研究热点。MICP 的基本原理是尿素水解酶例如巴氏芽孢杆菌,通过其自身的新陈代谢活动将尿素水解成 CO_3^{2-},不断吸附溶液环境中的 Ca^{2+},使其聚集在细菌细胞外表面,结合水解生成的 CO_3^{2-} 以细胞为晶核,在细菌周围析出碳酸钙结晶[1]。大量研究结果表明,利用微生物生化活动沉淀产生的碳酸钙晶体可以将土壤颗粒黏结在一起,从而大大增加土体的强度和刚度[2-4]。

针对微生物诱导碳酸钙沉淀技术,国内外学者开展了一些工程应用,并取得了较好的加固效果。马锋玲等[5]在海南省三亚某码头进行了混凝土表面修复防护试验研究。刘汉龙等[6]展了人工吹填岛礁地基加固试验研究。GOMEZ 等[7]开展了沙漠表面原位覆膜防风蚀现场试验研究。刘璐等[8]用 MICP 技术对堤坝表层进行加固,成功地改善了表面砂的力学性能。张越等[9]展了地下室防渗漏现场试验研究。ZOMORODIAN 等[10]采用 MICP 技术对地表沙层表面进行喷雾处理。

虽然目前 MICP 在工程中有不少应用,人们对其加固机理有了深入的了解,但是在现有的研究中,菌液培养基通常使用分析纯蛋白胨试剂,存在成本较高的问题[11]。伴随着研究的不断深入以及大规模普及的需要,材料成本的降低已成为一个不可忽视的问题。OMOREGIE 等[12]使用成本较低的工业级蛋白胨和尿素代替分析纯蛋白胨和尿素,两者的加固效果差异不大。陈文杰[13]使用纯度较低的大豆蛋白胨开展微生物生长曲线试验,结果表明,低纯度大豆蛋白胨总量中的营养物质可满足微生物的生长需求。刘世豪[14]应用 MICP 技术对盐渍土进行加固,在配置培养基时不加入氯化钠,直接用盐渍土里的盐分代替,仍有较好的加固效果。CUZMAN 等[15]用肥料尿素替代分析纯尿素,对一个生长周期内的细菌的数量和脲酶活性曲线进行测定,结果表明,肥料尿素完全适合用作纯实验室级尿素的替代品。以上的研究结果说明,选取成本较低的菌液培养基所需的蛋白胨代替分析纯蛋白胨试剂是可行的。

为了降低 MICP 技术工程应用的成本,本研究采用成本较低的工业级蛋白胨试剂和尿素代替分析纯蛋白胨试剂和尿素配置巴氏芽孢菌液的培养基,研究使用工业级试剂进行 MICP 加固的可行性,探析不同配比的工业级培养基的菌液活性,并利用响应曲面法优选出最佳的工业级培养基配比。

1 试验材料

1.1 菌液

在微生物土体加固的研究中,常用的解脲细菌为巴氏芽孢杆菌(*Sporosarcina pasteurii*)。本试验采用的菌种为巴氏芽孢杆菌,购自于中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号为 CGMCC 1.3687。试验采用的分析纯培养基配比见表 1。

表 1 分析纯培养基配比

Table 1 Ratio of analytical pure culture medium g/L

酪蛋白胨	大豆蛋白胨	氯化钠	尿素
15.0	5.0	5.0	20.0

试验表明,采用该培养基可以获得较高的菌液活性[16]。为了降低成本,本试验采用牛骨蛋白胨代替分析纯酪蛋白胨,用工业级大豆蛋白胨、工业级氯化钠和工业级尿素分别代替分析纯级大豆蛋白胨、分析纯级氯化钠和分析纯级尿素。按目前的产品市场价格估算,分析纯级培养基的原料成本约为 460 元/kg,而工业级培养基的原料成本约为 110 元/kg,远低于分析纯培养基。为了优选出最佳的工业级培养基,参考分析纯级培养基的配比,拟定工业级的配比为:牛骨蛋白胨 15 g/L、大豆蛋白胨 5 g/L、工业氯化钠 5 g/L、工业级尿素 20 g/L、纯水 1 000 mL。以此配比为基础开展单因素试验。

1.2 胶结液

胶结液为氯化钙和尿素的混合溶液,前期试验表明,由 1 mol/L 的分析纯尿素溶液和 1 mol/L 的分析纯氯化钙溶液按等体积混合而成的胶结液,与菌液反应生成的碳酸钙有较好的加固效果[17]。

2 试验方法

2.1 菌液中微生物数量和活性检测

2.1.1 微生物数量检测

吸光度测试法是测定微生物数量的常见方法,

其原理是用紫外分光光度计测定波长为 600 nm 时的菌液吸光度值(OD_{600}),可用待测菌液的吸光度表征其生物量。

分析纯培养基的巴氏芽孢杆菌 OD 生长曲线,如图 1 所示。在培养 6 h 之前,菌液中微生物 OD_{600} 值增长较为缓慢;在培养 6～18 h 期间,微生物 OD_{600} 值呈几何式增长;在培养 18 h 之后,由于培养基中的营养物质已被大量消耗,同时伴随细菌代谢物的积累,从而导致细胞的分裂速度降低,微生物 OD_{600} 值趋于稳定。

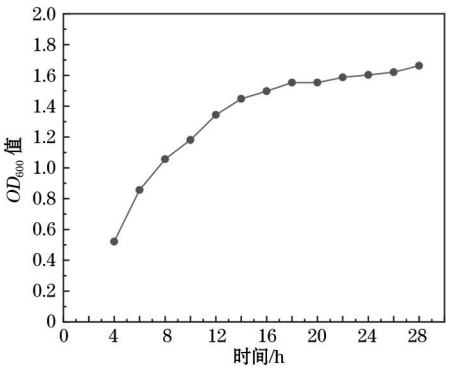


图 1 分析纯培养基的巴氏芽胞杆菌 OD 生长曲线

Fig.1 OD growth curve of *Sporosarcina pasteurii* in analytical pure culture medium

2.1.2 微生物脲酶活性检测

巴氏芽孢杆菌在新陈代谢活动中产生的脲酶。脲酶能够提高尿素水解的反应效率,加速碳酸根离子和铵根离子的生成。分析纯培养基中巴氏芽孢杆菌的脲酶活性生长曲线,如图 2 所示。由图 2 可以看出,14 h 之前,脲酶活性增加速率较为缓慢;14～24 h,脲酶活性增加速率加快,是细菌的生长区;24 h 之后,脲酶活性降低并趋向稳定。

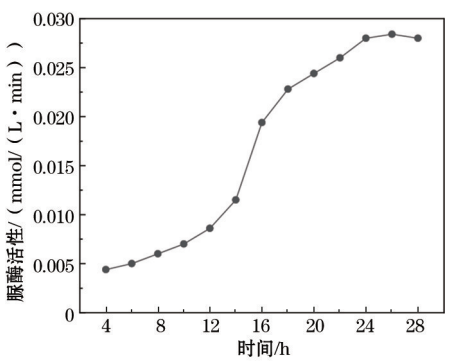


图 2 分析纯培养基脲酶活性生长曲线

Fig.2 The activity growth curve of urease in analytical pure culture medium

上述试验结果表明,当生长至 16 h 时,课题组所用分析纯培养基下的巴氏芽孢杆菌的细菌数量和脲酶活性已经较为可观。因此本研究在后续的单因素试验和响应面优化试验中只接取生长 16 h 的菌液进行微生物 OD_{600} 值和脲酶活性检测。

2.2 最佳配比优选及验证

优选出最佳配比后,按该配比配置出液体培养基,待菌液在培养基中扩培后,分别配置浓度为 0.5,1,1.5 mol/L 的胶结液,然向 10 mL 菌液中加入 20 mL 胶结液,待完全反应后测定碳酸钙生成量。并对生成的碳酸钙进行扫描电子显微镜(SEM)分析。

3 单因素试验与结果分析

3.1 工业级尿素掺量对微生物生长的影响

分别选取工业尿素掺量为 10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L,其他条件与表 1 中的分析纯培养基配比相同,通过单因素试验考察工业级尿素掺量对微生物生长的影响。如图 3 所示。

由图 3 可知,当工业尿素掺量为 20 g/L 时,微生物 OD_{600} 值最高,之后 OD_{600} 值随着工业尿素掺量的增加而降低;微生物脲酶活性则一直随着工业尿素掺量的增加而降低,但尿素掺量为 10 g/L 和 20 g/L 时,脲酶的活性相差很小。尿素浓度在一定范围内增加,水解产生的铵根离子增多,促进微生物代谢,但铵根离子过多,会抑制脲酶表达。综合考虑微生物 OD_{600} 值和脲酶活性,将工业尿素掺量为 20 g/L 选为多因素试验的工业尿素掺量中心点,选取工业尿素掺量 10～30 g/L 为响应曲面优化试验的适宜范围。

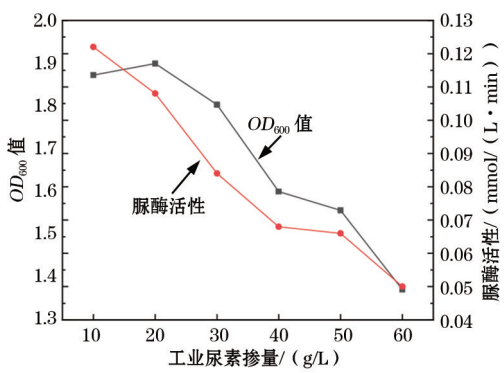


图 3 工业尿素掺量对菌液 OD_{600} 值和脲酶活性的影响

Fig.3 The effect of industrial urea dosage on OD_{600} and urease activity of bacterial solution

3.2 牛骨蛋白胨掺量对微生物生长影响

分别选取牛骨蛋白胨的掺量为 0 g/L、5 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L,其他工业级培养基的成份配比与表 1 中的数量相同,单因素试验考察牛

骨蛋白胨掺量对微生物生长的影响。如图 4 所示。

由图 4 可知,微生物 OD_{600} 值随着牛骨蛋白胨掺量的增加而提高,当牛骨蛋白胨掺量为 20 g/L 时,微生物 OD_{600} 值最高,之后随着牛骨蛋白胨掺量的增加而迅速降低,且下降幅度较大;微生物脲酶活性的变化也和微生物 OD_{600} 值的变化趋势一样。蛋白胨的功能在于供给微生物生长所需的氮源及营养物质,牛骨蛋白胨掺量增大时,蛋白胨所供给的氮源也随之增大,水解产生氨含量升高,从而对微生物造成损伤,对脲酶活性表达产生抑制作用,使微生物活性减弱,微生物繁殖速度减小,进而使微生物数量减少。综合考虑微生物数量和微生物脲酶活性,将牛骨蛋白胨掺量为 20 g/L 选为多因素试验的牛骨蛋白胨掺量的中心点,选取牛骨蛋白胨掺量 15～25 g/L 为响应曲面优化试验的适宜范围。

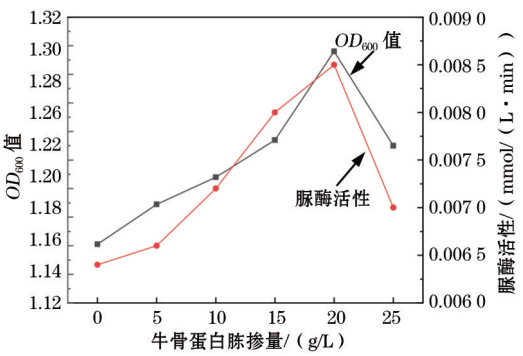


图 4 牛骨蛋白胨掺量对菌液 OD_{600} 值和脲酶活性的影响

Fig.4 The effect of bovine bone protein peptone dosage on OD_{600} and urease activity of bacterial solution

3.3 大豆蛋白胨掺量对微生物生长的影响

分别选取大豆蛋白胨的掺量为 0 g/L、2.5 g/L、5 g/L、7.5 g/L、10 g/L、12.5 g/L,其他工业级培养基的成份配比与表 1 中的数量相同,通过单因素试验考察牛骨蛋白胨掺量对微生物生长的影响,如图 5 所示。

由图 5 可知,当大豆蛋白胨掺量为 10 g/L 时,微生物 OD_{600} 值和脲酶活性最大,掺量低于或高于 10 g/L 时,微生物 OD_{600} 值和脲酶活性均有所降低,但降低幅度相比牛骨蛋白胨掺量较小。大豆蛋白胨对培养基的影响与牛骨蛋白胨一样,都是向微生物提供氮源及营养物质,因此大豆蛋白胨掺量过大也会使微生物 OD_{600} 值减少,脲酶活性降低。不同氮源的产酶效果是不同的[18],当大豆蛋白掺量过高时,微生物 OD_{600} 值和脲酶活性的降低幅度相比牛骨蛋白胨掺量较小。综合考虑微生物 OD_{600} 值和脲酶活性,将大豆蛋白胨掺量为 10 g/L 选为多因素试验大豆蛋白胨掺量的中心点,选取大豆蛋白胨掺量为 7.5～12.5 g/L 为响应曲面优化试验的适宜范围。

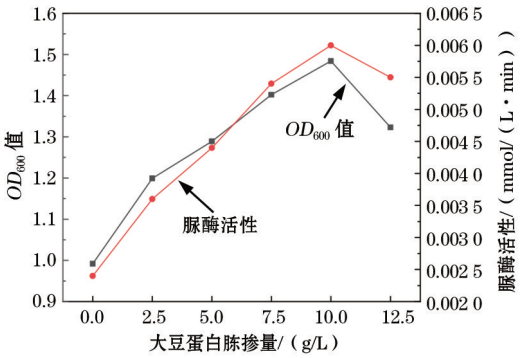


图 5 大豆蛋白胨掺量对菌液 OD_{600} 值和脲酶活性的影响

Fig.5 The effect of soya peptone dosage on OD_{600} and urease activity of bacterial solution

3.4 工业氯化钠掺量对微生物生长影响

分别选取工业氯化钠掺量为 0 g/L、2.5 g/L、5 g/L、7.5 g/L、10 g/L、12.5 g/L,其他工业级培养基的成份配比与表 1 中的数量相同,通过单因素试验考察工业氯化钠掺量对微生物生长的影响,如图 6 所示。

由图 6 可知,当工业氯化钠掺量为 20 g/L 时,微生物 OD_{600} 值最高,之后随着工业尿素掺量的增加而降低;脲酶活性的变化也和微生物活性变化趋势一样。随着工业氯化钠掺量的增加,溶液中盐浓度增大,盐析作用增强[19],大量中和蛋白质颗粒上的电荷,从而使溶液中蛋白质颗粒积聚而沉淀析出,导致微生物生长所需的营养物质降低,微生物 OD_{600} 值也因此下降。综合考虑微生物 OD_{600} 值和脲酶活性,将工业氯化钠掺量 7.5 g/L 选为多因素试验工业氯化钠掺量的中心点,选取工业氯化钠掺量 5～10 g/L 作为响应曲面优化试验的适宜范围。

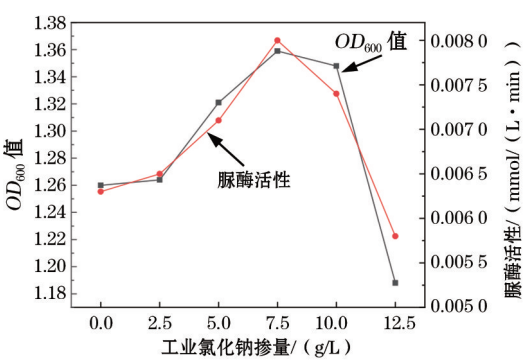


图 6 工业氯化钠掺量对菌液 OD_{600} 值和脲酶活性的影响

Fig.6 The effect of industrial sodium chloride dosage on OD_{600} and urease activity of bacterial solution

4 响应面优化试验与试验结果分析

4.1 响应面优化试验

根据单因素试验结果,选取牛骨蛋白胨掺量 20 g/L、大豆蛋白胨掺量 10 g/L、工业氯化钠掺量 7.5 g/L、工业尿素掺量 20 g/L 为 Box-Behnken 组合试验设计的中心点进行响应面优化试验,4 个因素分别用 A(牛骨蛋白胨掺量)、B(大豆蛋白胨掺量)、C(工业氯化钠掺量)、D(工业尿素掺量)表示。以培养 16 h 后的巴氏芽孢杆菌微生物 OD_{600} 值和微生物活性作为评价指标,用 Minitab 2022 软件进行 Box-Behnken 组合试验设计,以期优选工业级培养基的最佳配比。因素水平及编码见表 2。响应曲面设计方案与试验数据见表 3。

表 2 因素水平及编码

Table 2 Factor levels and code

水平编码	牛骨蛋白胨掺量 A/(g/L)	大豆蛋白胨掺量 B/(g/L)	工业氯化钠掺量 C/(g/L)	工业尿素掺量 D/(g/L)
−1	15	7.5	5.0	10
0	20	10.0	7.5	20
1	25	12.5	10.0	30

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface test

处理组	A	B	C	D	OD_{600} 值 Y_1	脲酶活性 Y_2/(mmol/(L·min))
1	−1	1	0	0	1.575	0.022
2	1	0	−1	0	1.562	0.016
3	−1	0	−1	0	1.396	0.032
4	0	−1	0	−1	1.649	0.030
5	0	0	−1	−1	1.573	0.036
6	0	1	0	1	1.717	0.024
7	0	0	0	0	1.560	0.016
8	1	−1	0	0	1.596	0.032
9	−1	0	1	0	1.597	0.024
10	−1	0	0	−1	1.629	0.030
11	0	−1	−1	0	1.510	0.036
12	1	0	0	−1	1.456	0.036
13	−1	−1	0	0	1.403	0.036
14	1	0	1	0	1.383	0.034
15	1	0	0	1	1.597	0.020
16	0	0	−1	1	1.672	0.024
17	−1	0	0	1	1.374	0.034
18	0	0	1	−1	1.432	0.036
19	0	1	0	−1	1.534	0.042
20	0	0	1	1	1.507	0.038
21	0	−1	0	1	1.671	0.036
22	1	1	0	0	1.679	0.034
23	0	1	−1	0	1.538	0.036
24	0	1	1	0	1.527	0.036
25	0	−1	1	0	1.575	0.022
26	0	0	0	0	1.562	0.016
27	0	0	0	0	1.396	0.032

由表 3 的结果可知,在 27 组数据中,培养 16 h 后,巴氏芽孢杆菌微生物的数量在 1.396～1.717 之间,包含了分析纯的 1.498;脲酶活性在 0.016～0.042 mmol/(L·min)之间,包含了分析纯的 0.019 4 mmol/(L·min)。试验结果表明,工业级培养基与分析纯培养基一样可以给巴氏芽孢杆菌提供较好的生长环境。

4.2 回归方程及其方差分析结果

对表 3 数据进行处理,进行多元二次回归拟合,得到回归方程:

$$Y_1=1.571\ 3-0.026\ 1A-0.005\ 9B+0.022\ 8C-0.093\ 2D-0.010\ 8AB-0.036\ 5AC+0.009\ 0AD+0.020\ 3BC-0.033\ 2BD-0.016\ 0CD+0.011\ 6A^2+0.023\ 8B^2+0.014\ 6C^2-0.087\ 4D^2$$

$$Y_2=0.034+0.003\ 33A+0.001\ 67B-0.000\ 83C+0.007\ 17D+0.000\ 33A^2+0.001\ 83B^2-0.000\ 92C^2-0.006\ 92D^2-0.000\ 5AB+0.001AC-0.001\ 5AD-0.001BC-0.001\ 5BD-0.001\ 5CD$$

回归方程方差分析结果表明,微生物数量 Y_1 和脲酶活性 Y_2 模型的 F 值分别为 3.85、8.37,P 值分别为 0.012、0.000。P 值反映该因素的显著性,$P\leqslant 0.01$ 为显著项,F 值越大,对应因素对响应结果的影响就越显著[20-21]。这表明该模型的可靠性和拟合程度高。Y_1、Y_2 对应的决定系数(R^2)与校正决定系数(R^2_{adj})分别为 $R^2=0.918$、$R^2_{adj}=0.805$ 和 $R^2=0.907$、$R^2_{adj}=0.798$,表明 80.5%的微生物数量变化可由该模型进行预测,79.8%的微生物脲酶活性可由该模型进行预测。这两个二次回归方程拟合度高、误差小。

4.3 多因素交互作用分析

响应曲面图和等高线图能够直观地反映出两种因素交互作用对响应值的影响是否显著,根据回归方程,做出响应面分析图,图 7 至图 12 为多因素交互作用对工业级培养基下的微生物数量的影响。图 13 至图 18 为多因素交互作用对工业级培养基下的

微生物脲酶活性的影响。

4.3.1 多因素交互作用对微生物数量的影响

由图 7(a)可知,曲面坡度较陡,凹凸度较大,但水平方向和竖直方向上最高点与最低点间的差距较小,表明 A 与 B 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 7(b)可知,微生物数量随着牛骨蛋白胨掺量(A)的变化幅大于大豆蛋白胨掺量(B)的变化幅度,表明 A 对微生物数量的影响要大于 B 的影响。

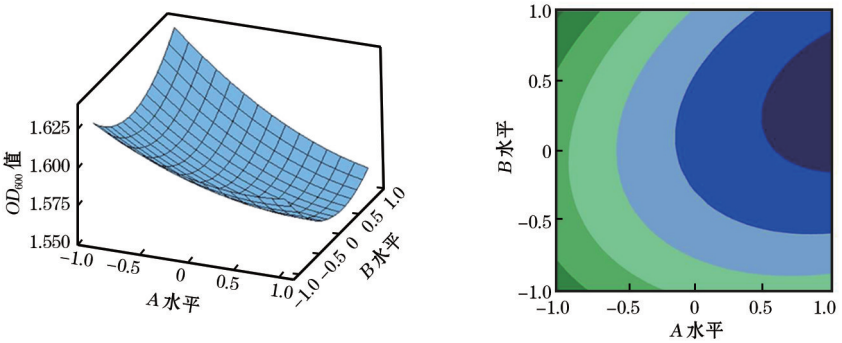
由图 8(a)可知,曲面坡度较陡,凹凸度大,竖直方向上最高点与最低点间的差距极大,表明 A 与 C 的交互作用对微生物数量的影响较大。由图 8(b)可知,等高线分布较均匀,表明牛骨蛋白胨掺量(A)和工业氯化钠掺量(C)对微生物数量的影响相差不大,减少牛骨蛋白胨掺量或者增加工业氯化钠掺量都能提高微生物数量。

由图 9(a)可知,曲面坡度较陡,凹凸度较大,但水平方向和竖直方向上最高点与最低点间的差距极小,说明 A 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 9(b)可知,微生物数量随牛骨蛋白胨掺量(A)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 A 对微生物数量的影响小于 D 的影响。

由图 10(a)可知,曲面坡度较平缓,但凹凸度较大,水平方向和竖直方向上最高点与最低点间的差距较大,表明 B 与 C 的交互作用对微生物数量的影响适中。由图 10(b)可知,微生物数量随大豆蛋白胨掺量(B)变化的幅度小于随工业氯化钠掺量(C)变化的幅度,表明 B 对微生物数量的影响小于 C 的影响。

由图 11(a)可知,曲面坡度较陡,凹凸度较大,水平方向上最高点与最低点间的差距较大,表明 B 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较大。由图 11(b)可知,微生物数量随大豆蛋白胨掺量(B)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 B 对微生物数量的影响小于 D 的影响。

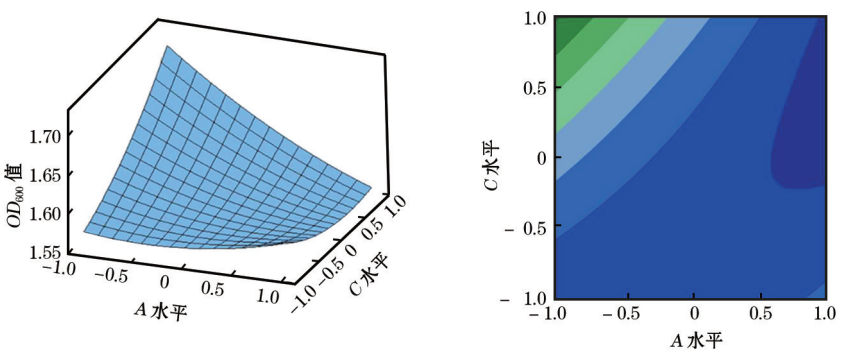
由图 12(a)可知,曲面坡度较陡,凹凸度较大,但水平方向和竖直方向上最高点与最低点间的差距较小,表明 C 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 12(b)可知,微生物数量随工业氯化钠掺量(C)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 C 对微生物数量的影响小于 D 的影响。



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 7 牛骨蛋白胨掺量(A)和大豆蛋白胨掺量(B)对微生物数量的影响

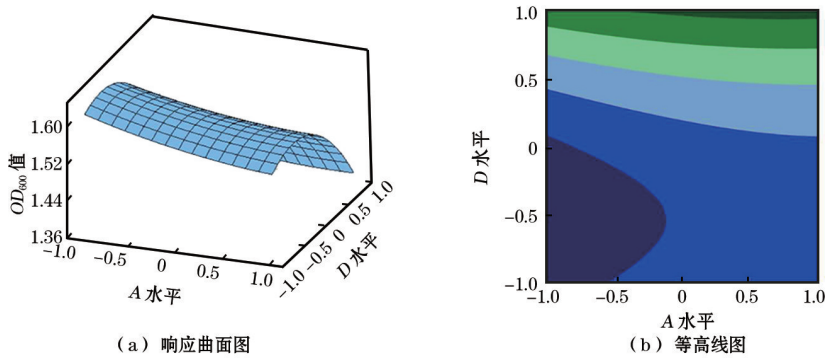
Fig.7 The effect of bovine bone peptone dosage (A) and soya peptone dosage (B) on microbial quantity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 8 牛骨蛋白胨掺量(A)和工业氯化钠掺量(C)对微生物数量的影响

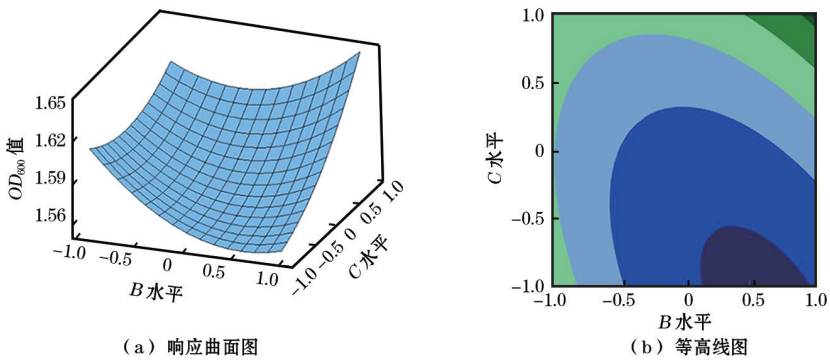
Fig.8 The effect of bovine bone peptone dosage (A) and industrial sodium chloride dosage (C) on microbial quantity



（a）响应曲面图　　（b）等高线图

图 9　牛骨蛋白胨掺量(*A*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物数量的影响

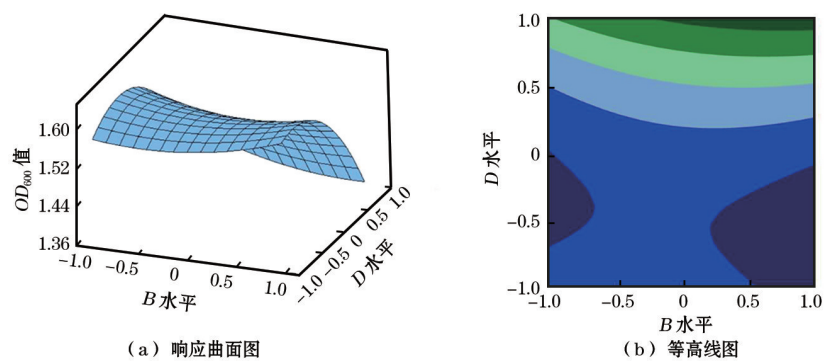
Fig.9　The effect of bovine bone peptone dosage (*A*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial quantity



（a）响应曲面图　　（b）等高线图

图 10　大豆蛋白胨掺量(*B*)和工业氯化钠掺量(*C*)对微生物数量的影响

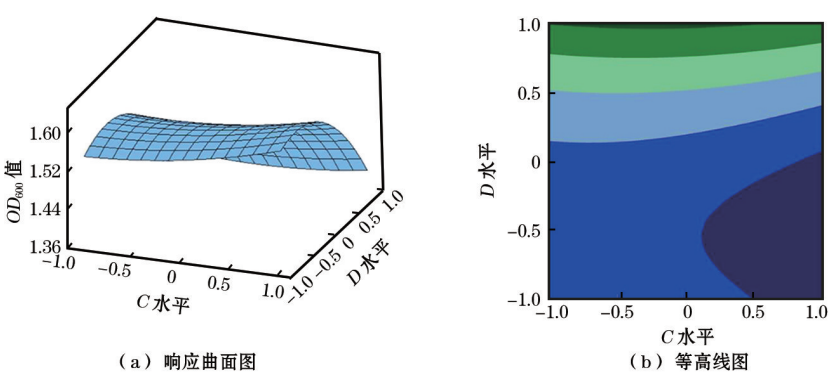
Fig.10　The effect of soya peptone dosage (*B*) and industrial sodium chloride dosage (*C*) on microbial quantity



（a）响应曲面图　　（b）等高线图

图 11　大豆蛋白胨掺量(*B*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物数量的影响

Fig.11　The effect of soya peptone dosage (*B*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial quantity



（a）响应曲面图　　（b）等高线图

图 12　工业氯化钠掺量(*C*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物数量的影响

Fig.12　The effect of industrial sodium chloride dosage (*C*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial quantity

4.3.2 多因素交互作用对脲酶活性的影响

由图 13(a)可知,曲面坡度平缓,凹凸度小,曲面接近平面,表明 A 与 B 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 13(b)可知,微生物脲酶活性随牛骨蛋白胨掺量(A)变化的幅度大于随大豆蛋白胨掺量(B)变化的幅度,表明 A 对微生物脲酶活性的影响大于 B 的影响。

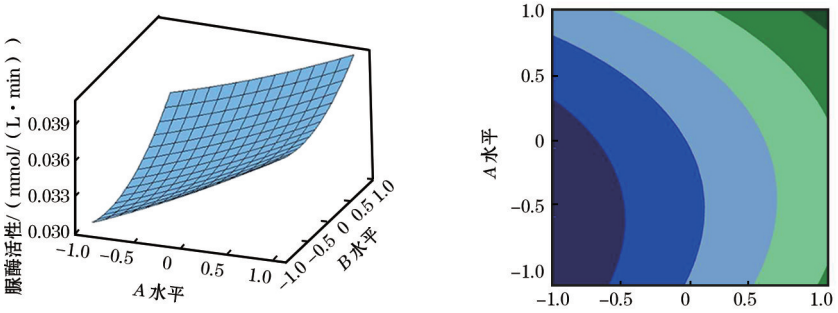
由图 14(a)可知,曲面坡度平缓,凹凸度小,表明 A 与 C 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 14(b)可知,微生物脲酶活性随牛骨蛋白胨掺量(A)变化的幅度大于随工业氯化钠掺量(C)变化的幅度,表明 A 对微生物脲酶活性的影响大于 C 的影响。

由图 15(a)可知,竖直方向上最高点与最低点间差距较大,曲面坡度较陡,凹凸度大,表明 A 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较大。由图 15(b)可知,微生物脲酶活性随牛骨蛋白胨掺量(A)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 A 对微生物脲酶活性的影响小于 D 的影响。

由图 16(a)可知,曲面凹凸度较大,但竖直方向上最高点与最低点间的差距较小,表明 B 与 C 的交互作用对微生物数量的影响较小。由图 16(b)可知,微生物脲酶活性随大豆蛋白胨掺量(B)变化的幅度大于随工业氯化钠掺量(C)变化的幅度,表明 B 对微生物脲酶活性的影响大于 C 的影响。

由图 17(a)可知,竖直方向上最高点与最低点间的差距较大,曲面坡度较陡,凹凸度大,表明 B 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较大。由图 17(b)可知,微生物脲酶活性随大豆蛋白胨掺量(B)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 B 对微生物脲酶活性的影响小于 D 的影响。

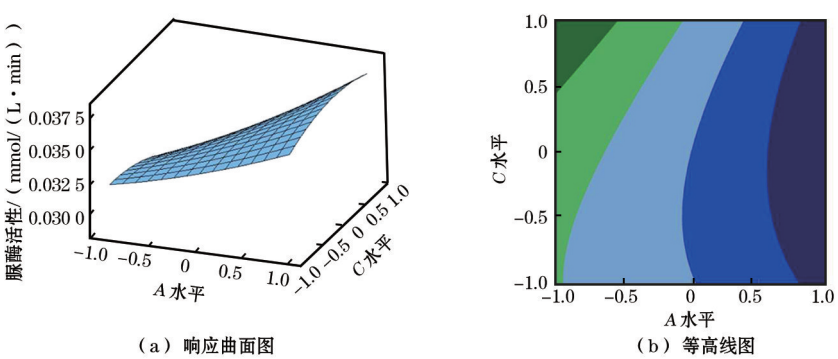
由图 18(a)可知,竖直方向上最高点与最低点间的差距较大,曲面坡度较陡,凹凸度大,表明 C 与 D 的交互作用对微生物数量的影响较大。由图 18(b)可知,微生物脲酶活性随工业氯化钠掺量(C)变化的幅度小于随工业尿素掺量(D)变化的幅度,表明 C 对微生物脲酶活性的影响小于 D 的影响。



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 13 牛骨蛋白胨掺量(A)和大豆蛋白胨掺量(B)对微生物脲酶活性的影响

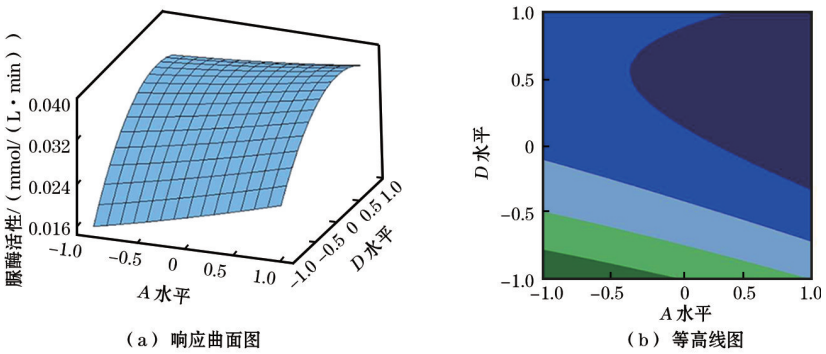
Fig.13 The effect of bovine bone peptone dosage (A) and soya peptone dosage (B) on microbial urease activity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 14 牛骨蛋白胨掺量(A)和工业氯化钠掺量(C)对微生物脲酶活性的影响

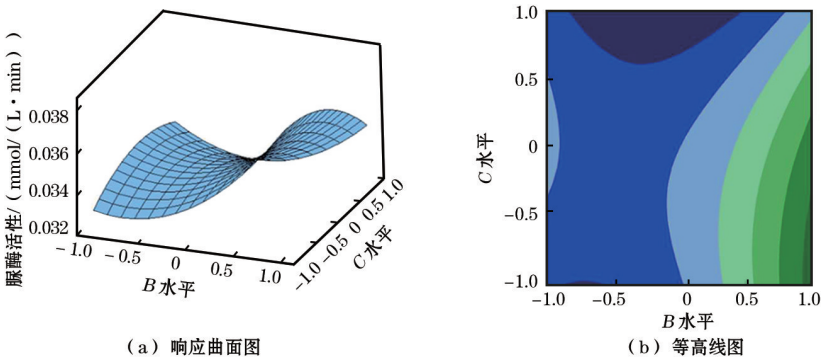
Fig.14 The effet of bovine bone peptone dosage (A) and industrial sodium chloride dosage (C) on microbial urease activity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 15 牛骨蛋白胨掺量(*A*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物脲酶活性的影响

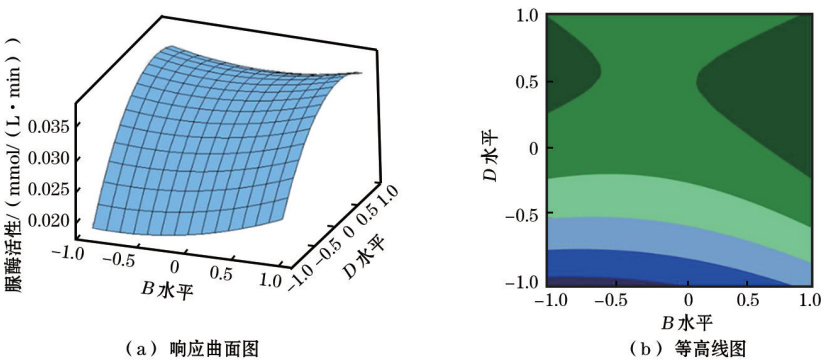
Fig.15 The effect of bovine bone peptone dosage (*A*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial urease activity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 16 大豆蛋白胨掺量(*B*)和工业氯化钠掺量(*C*)对微生物脲酶活性的影响

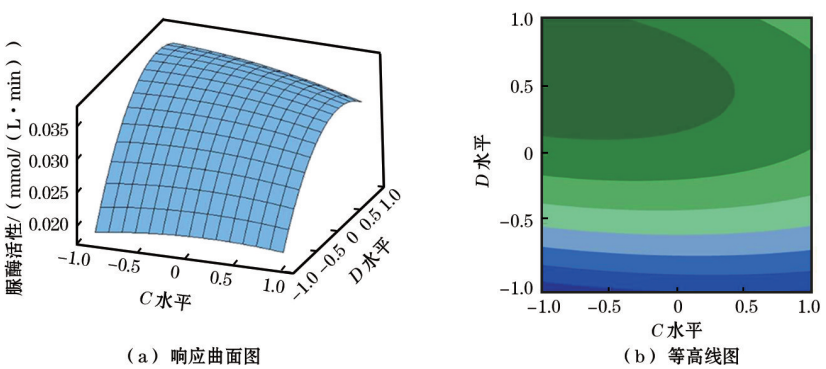
Fig.16 The effect of soya peptone dosage (*B*) and industrial sodium chloride dosage (*C*) on microbial urease activity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 17 大豆蛋白胨掺量(*B*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物脲酶活性的影响

Fig.17 The effect of soya peptone dosage (*B*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial urease activity



(a) 响应曲面图 (b) 等高线图

图 18 工业氯化钠掺量(*C*)和工业尿素掺量(*D*)对微生物脲酶活性的影响

Fig.18 The effect of industrial sodium chloride dosage (*C*) and industrial urea dosage (*D*) on microbial urease activity

4.4 最佳配比预测

对微生物数量和脲酶活性进行响应优化,多响应预测得出的工业级培养基的最优配比见表 4。

表 4 工业级培养基的最佳配比

Table 4 Optimal ratio of industrial-grade culture medium

g/L

牛骨蛋白胨	大豆蛋白胨	工业氯化钠	工业尿素
25	7.5	5	22.2

在预测的工业级培养基最优配比下,培养 16 h 后巴氏芽孢杆菌的微生物 OD_{600} 值和脲酶活性最优结果见表 5。

表 5 微生物数量和脲酶活性最优结果

Table 5 The optimal results of microbial quantity and urease activity

响应量	预测值	误差
OD_{600} 值	1.635	0.069 6
脲酶活性	0.038 mmol/(L·min)	0.003 6

5 最优结果验证试验与分析

5.1 微生物生长曲线检测

将巴氏芽孢杆菌菌液按照 4.4 节预测的最优配比进行调配,并检测出 OD_{600} 生长曲线,然后与分析纯培养基对比,如图 19 所示。由图 19 可知,工业级培养基下的菌液中微生物 OD_{600} 值和脲酶活性在培养 4~20 h 之间快速增长,培养 20 h 之后趋于稳定;培养至 16 h 时,工业级培养基菌液中微生物数量和脲酶活性均高于分析纯培养基。此时,工业级培养基菌液 OD_{600} 值为 1.672,脲酶活性为 0.037 mmol/(L·min),均在预测值误差之内。这说明本试验响应优化的配比结果具有可行性。

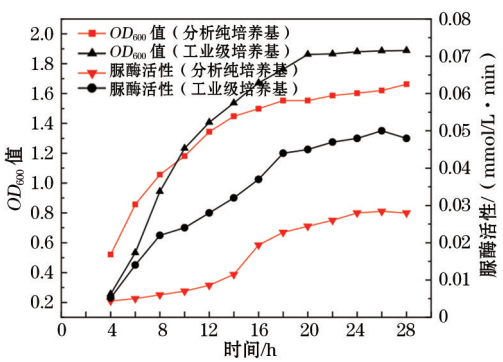


图 19 两种培养基下的巴氏芽孢杆菌微生物生长曲线

Fig.19 Microbial growth curves of *Sporosarcina pasteurii* on two different culture medium

5.2 碳酸钙含量检测

分析纯培养基与工业级培养基处理试样的碳酸钙生成量均随着胶结液浓度的提高而提高,如图 20 所示。由图 20 可知,当胶结液浓度为 0.5 mol/L 和 1 mol/L 时,分析纯培养基下的碳酸钙含量略低于工业级培养基下的碳酸钙含量。当胶结液浓度为 1.5 mol 时,分析纯培养基下的碳酸钙含量略高于工业级培养基下的碳酸钙含量。两种培养基下的碳酸钙生成量相差不多,因此用成本更低的工业级培养基代替成本较高的分析纯培养基是可行的。本试验可以为 MICP 的工程大范围应用提供一个成本较低的培养基配比方案。

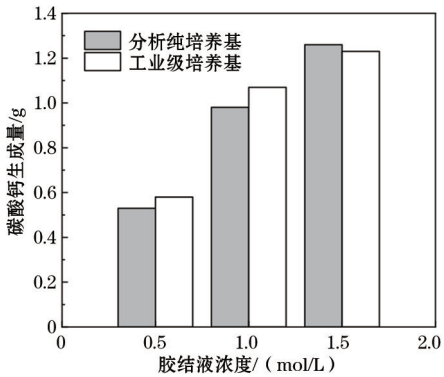
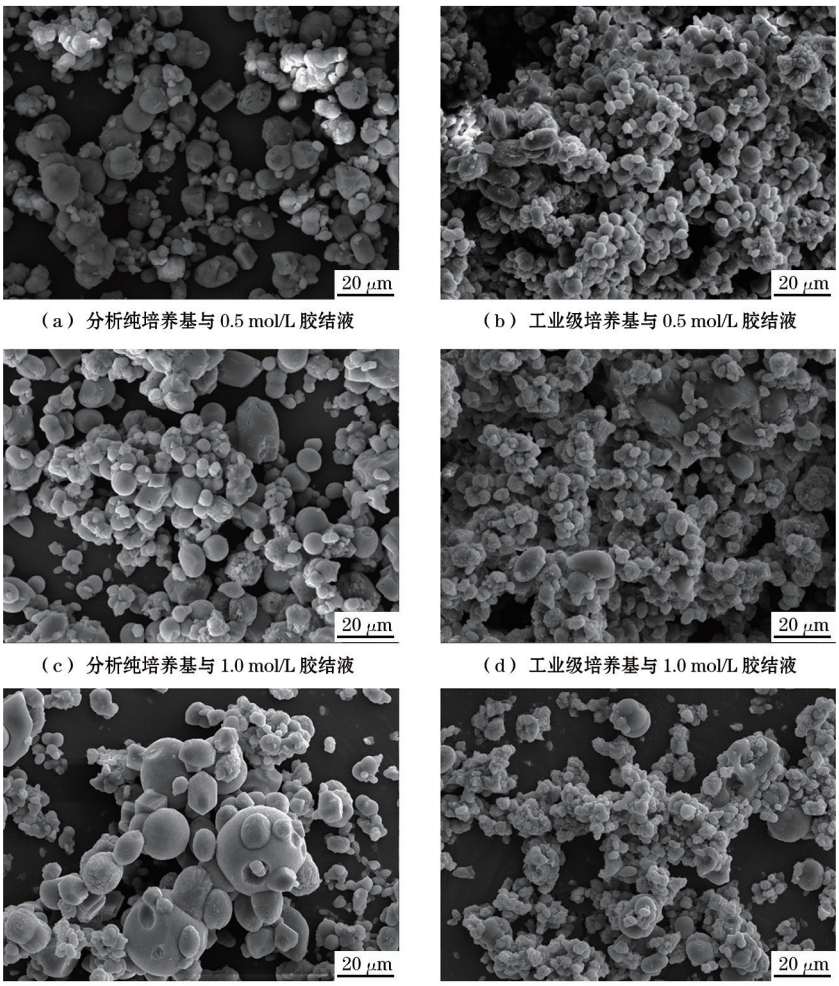


图 20 两种培养基下的碳酸钙生成量

Fig.20 Calcium carbonate production on two different culture medium

5.3 扫描电子显微镜(SEM)分析

分析纯培养基与工业级培养基水溶液中碳酸钙 SEM 扫描电镜图像如图 21 所示。从图 21 可以看出,菌液与 0.5 mol/L 的胶结液胶结后,分析纯培养基下生成的碳酸钙晶体为大小不一的球状结构,且晶体分布较为松散;工业级培养基下生成的碳酸钙晶体形状规则、粒径较小并形成较为致密的结构。菌液与 1 mol/L 的胶结液胶结后,分析纯培养基下的碳酸钙晶体出现聚集,结构相对紧密,但聚集度不如 0.5 mol/L 的工业级培养基下生成的碳酸钙晶体;工业级培养基下生成的碳酸钙晶体成团分布,聚集度提高。菌液与 1.5 mol/L 的胶结液胶结后,分析纯培养基下生成的碳酸钙晶体出现小颗粒晶体附着在大颗粒晶体表面上的现象,晶体聚集度较有所下降;工业级培养基下生成的碳酸钙晶体的聚集度也有所下降。通过 SEM 分析可以得出结论:工业级培养基与不同浓度胶结液的胶结效果强于分析纯培养基。因此用成本更低的工业级培养基来代替成本较高的分析纯培养基是可行的。



(a) 分析纯培养基与 0.5 mol/L 胶结液　(b) 工业级培养基与 0.5 mol/L 胶结液

(c) 分析纯培养基与 1.0 mol/L 胶结液　(d) 工业级培养基与 1.0 mol/L 胶结液

(e) 分析纯培养基与 1.5 mol/L 胶结液　(f) 工业级培养基与 1.5 mol/L 胶结液

图 21　各试验组碳酸钙晶体 SEM 电镜图片

Fig.21　SEM images of calcium carbonate crystals in each experimental group

6　结论

目前 MICP 研究中的培养基多使用分析纯试剂,推广至大范围应用的成本较高。本文采用成本低的工业级培养基替代分析纯培养基进行试验,得出的主要结论如下。

(1) 通过对多因素交叉作用分析结果可知,在本试验范围内,4 个因素对巴氏芽孢杆菌微生物 OD_{600} 值的影响从高到低分别为:工业尿素掺量>牛骨蛋白胨掺量>工业氯化钠掺量>大豆蛋白胨掺量;对脲酶活性的影响从高到低分别为:工业尿素掺量>牛骨蛋白胨掺量>大豆蛋白胨掺量>工业氯化钠掺量。

(2) 根据响应曲面法中的 Box－Behnken 中心组合原理,得到工业级培养基的最优配比为:牛骨蛋白胨 25 g/L、大豆蛋白胨 7.5 g/L、工业氯化钠 5 g/L、工业尿素 22.2 g/L 及纯水 1 000 mL。培养至 16 h 时,巴氏芽孢杆菌微生物数量为 1.672,脲酶活性为 0.037 mmol/(L·min),均在预测值误差范围内,表明本文建立的两个预测模型精度高、误差小。

(3) 两种培养基下的巴氏芽孢杆菌与不同浓度的胶结液胶结后生成的碳酸钙含量相差不大。通过 SEM 分析可知,工业级培养基与不同浓度胶结液的胶结效果强于分析纯培养基。试验结果表明,用成本更低的工业级培养基代替成本较高的分析纯培养基是可行的。本试验可以为 MICP 的工程大范围应用提供一个成本较低的培养基配比方案。

参考文献(References):

[1] QIAN C X, ZHENG T W, RUI Y F. Living concrete with self-healing function on cracks attributed to inclusion of microorganisms: theory, technology and engineering applications: a review [J]. Science China Technological Sciences, 2021, 64(10): 2067-2083.

[2] 裴迪,刘志明,胡碧茹,等.巴氏芽孢杆菌矿化作用机理及应用研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2020,47(6):467-482.

PEI Di, LIU Zhiming, HU Biru, et al. Progress on mineralization mechanism and application research of sporosarcina pasteurii[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics,2020,47(6):467-482.

[3] 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 Liyang, TANG Chaosheng, XIE Yuehan, 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.

[4] 吴雨薇,胡俊,张皖湘,等.微生物矿化技术加固土研究现状综述[J].路基工程,2018(5):6-11.
WU Yuwei, HU Jun, ZHANG Wanxiang, et al. Research status review of microbial induced carbonate precipitation technology in reinforcing sand[J]. Subgrade Engineering,2018(5):6-11.

[5] 马锋玲,李文培,徐耀,等.微生物矿化修复混凝土表面缺陷的现场试验[J].中国水利水电科学研究院学报(中英文),2022,20(5):411-421.
MA Fengling, LI Wenpei, XU Yao, et al. Field experiment of repairing concrete surface defects by microbial mineralization[J]. Journal of China Institute of Water Resources and Hydropower Research,2022,20(5):411-421.

[6] 刘汉龙,马国梁,肖杨,等.微生物加固岛礁地基现场试验研究[J].地基处理,2019,1(1):26-31.
LIU Hanlong, MA Guoliang, XIAO Yang, et al. In situ experimental research on calcareous foundation stabilization using MICP technique on the reclaimed coral reef islands[J]. Journal of Ground Improvement,2019,1(1):26-31.

[7] GOMEZ M G, MARTINEZ B C, DEJONG J T, et al. Field-scale bio-cementation tests to improve sands[J]. Proceedings of the Institution of Civil Engineers: Ground Improvement,2015,168(3):206-216.

[8] 刘璐,沈扬,刘汉龙,等.微生物胶结在防治堤坝破坏中的应用研究[J].岩土力学,2016,37(12):3410-3416.
LIU Lu, SHEN Yang, LIU Hanlong, et al. Application of bio-cement in erosion control of levees[J]. Rock and Soil Mechanics,2016,37(12):3410-3416.

[9] 张越,郭红仙,程晓辉,等.微生物诱导碳酸钙沉积技术治理某地下室渗漏的现场试验[J].工业建筑,2013,43(12):138-143.
ZHANG Yue, GUO Hongxian, CHENG Xiaohui, et al. Field experiment of microbial induced carbonate precipitation technology in leakage treatment of a basement[J]. Industrial Construction,2013,43(12):138-143.

[10] ZOMORODIAN S M A, GHAFFARI H, O'KELLY B C. Stabilisation of crustal sand layer using biocementation technique for wind erosion control[J]. Aeolian Research,2019,40:34-41.

[11] 尉迟衍春,赵志峰.工业纯氯化钙应用于微生物胶结粉土的研究[J].三峡大学学报(自然科学版),2024,46(6):74-79.
YUCHI Yanchun, ZHAO Zhifeng. Study on the application of technical pure calcium chloride in silt biocementation[J]. Journal of China Three Gorges University (Natural Sciences),2024,46(6):74-79.

[12] OMOREGIE A I, PALOMBO E A, ONG D E L, et al. Biocementation of sand by sporosarcina pasteurii strain and technical-grade cementation reagents through surface percolation treatment method[J]. Construction and Building Materials,2019,228:116828.

[13] 陈文杰.培养基蛋白胨纯度及含量对 MICP 影响效果研究[D].南京:南京林业大学,2024.
CHEN Wenjie. Study on the effect of purity and content of culture medium peptone on MICP[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University,2024.

[14] 刘世豪.微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)固化粗颗粒盐渍土的试验研究[D].兰州:兰州理工大学,2021.
LIU Shihao. Experimental study on microbial induced calcium carbonate precipitation (MICP) solidification of coarse-grained saline soil[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology,2021.

[15] 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):897-906.

[16] 贾林峰.脲酶抑制剂 NBPT 作用下 MICP 对尾砂加固效果研究[D].衡阳:南华大学,2021.
JIA Linfeng. Study on the reinforcement effect of MICP on tailings under the action of urease inhibitor NBPT[D]. Hengyang: University of South China,2021.

[17] 赵志峰,彭邦阳,邵光辉.胶结液参数对微生物加固粉土的影响[J].东南大学学报(自然科学版),2021,51(3):456-462.
ZHAO Zhifeng, PEN Bangyang, SHAO Guanghui. Effects of cementation solution parameters on reinforcing silt by bio-cementation[J]. Journal of Southeast University (Natural Science Edition),2021,51(3):456-462.

[18] 刘定杭.牛骨蛋白胨中多肽分布及对工业菌株发酵的影响[D].哈尔滨:黑龙江大学,2011.
LIU Dinghang. Distribution of peptides in beef bone peptone and its effect on industrial strain fermentation[D]. Harbin: Heilongjiang University,2011.

[19] 陶治平,赵明星,阮文权.氯化钠对餐厨垃圾厌氧发酵产沼气影响[J].食品与生物技术学报,2013,32(6):1673-1689.
TAO Zhiping, ZHAO Mingxing, RUAN Wenquan. Effect of sodium chloride on biogas generation of kitchen waste by anaerobic fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2013,32(6):1673-1689.

[20] MIRAZIMI S M J, RASHCHI F, SABA M. Vanadium removal from roasted LD converter slag: optimization of parameters by response surface methodology (RSM)[J]. Separation and Purification Technology,2013,116:175-183.

[21] 甄杰,王宝祥,赵凯,等.基于响应曲面法的除尘灰与粉煤灰冷固结工艺优化[J].中国冶金,2023,33(7):130-136.
ZHEN Jie, WANG Baoxiang, ZHAO Kai, et al. Process optimization for dust removal ash and fly ash cold consolidation based on response surface methodology[J]. China Metallurgy,2023,33(7):130-136.