黄原胶对克雷伯氏杆菌诱导碳酸钙沉淀的调控

高佳文[1,2]，朱家华[1,2]，崔　朝[1,2]，李　婷[1,2]，李广悦[1,2*]

（1.南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室，湖南 衡阳　421001；
2.南华大学 资源环境与安全工程学院，湖南 衡阳　421001）

摘　要　生物聚合物对微生物矿化过程和沉淀特性具有重要的影响及调控作用。本研究以黄原胶为生物聚合物，克雷伯氏杆菌（*Klebsiella aerogenes*）为碳酸盐矿化菌，系统研究了黄原胶质量浓度对克雷伯氏杆菌诱导碳酸钙沉淀的沉淀量、粒径、晶型和形貌的调控作用。结果表明，黄原胶质量浓度为 0.50 g/L（钙源浓度 0.25 mol/L）和 0.75 g/L（钙源浓度 0.50 mol/L）时，碳酸钙沉淀量较对照组分别提高了 25.00%和 9.60%。随着黄原胶质量浓度增加，低钙源浓度（0.25 mol/L）时，方解石型碳酸钙占比降低，球霰石型碳酸钙占比增高，并逐渐趋于稳定；高钙源浓度（0.50 mol/L）时，方解石占比先升高后降低，球霰石呈相反趋势，并逐渐趋于稳定。在两个钙源浓度条件下，碳酸钙晶体平均粒径分别比对照组减小了 44.50%和 64.40%。同时，黄原胶促进了球状或类球状碳酸钙晶体的生成。本研究为实现微生物矿化的精准定向调控提供了新思路。

关键词　克雷伯氏杆菌（*Klebsiella aerogenes*）；生物矿化调控；碳酸钙；黄原胶；方解石；球霰石

中图分类号　Q939.97　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005-7021(2026)01-0014-10

doi：10.3969/j.issn.1005-7021.2026.01.002

Regulation Effect of Xanthan Gum on Calcium Carbonate Precipitation Induced by *Klebsiella aerogenes*

GAO Jia-wen[1,2], ZHU Jia-hua[1,2], CUI Zhao[1,2], LI Ting[1,2], LI Guang-yue[1,2*]

(1.*Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy*, *University of South China*, *Hengyang* 421001; 2.*School of Resources*, *Environment and Safety Engineering*, *University of South China*, *Hengyang* 421001)

Abstract　Biopolymers have significant influences and regulatory effect on microbial mineralization processes and precipitate characteristics. In this study, xanthan gum (XG) served as the biopolymer, and *Klebsiella aerogenes* was utilized as the carbonate mineralizing bacterium, the regulatory effects and mechanisms of XG concentrations on the precipitation yield, particle size, crystalline polymorph, and morphological characteristics of calcium carbonate precipitation induced by *K. aerogenes* were explored systematically. The results showed that when the calcium concentrations were 0.25 mol/L and 0.50 mol/L, and the XG concentrations were 0.50 g/L and 0.75 g/L, respectively, the precipitation yield of calcium carbonate was 25.00% and 9.60% greater than that of the control group, respectively. With the amount of XG addition increasing, at low calcium concentrations (0.25 mol/L), the proportion of calcite decreases and the proportion of vaterite increases, and gradually to be stabilizing. At high calcium concentration (0.50 mol/L), the proportion of calcite tends to increase first and then to decrease, whereas the proportion of vaterite tends to decrease and then gradually to stabilize. Compared with those of the control group, the average particle sizes of the calcium carbonate crystals in the two calcium concentrations groups decreased by 44.50% (0.25 mol/L) and 64.40% (0.50 mol/L). Meanwhile, the addition of XG promoted the formation of spherical or spheroidal-like calcium carbonate morphology. These findings provide a new strategy for the precise and customized regulation of microbial mineraliza-

基金项目：国家自然科学基金项目（U20A20267）

作者简介：高佳文　男，硕士研究生。研究方向为微生物固化。E-mail：1970639555@qq.com

* 通讯作者。男，教授，博士，博士生导师。研究方向为铀矿开采及其环境问题。Tel：0734-8281862，E-mail：lgy673@163.com

收稿日期：2025-06-03

tion.

Keywords *Klebsiella aerogenes*; biomineralization regulation; calcium carbonate; xanthan gum; calcite; vaterite

微生物诱导碳酸钙沉淀(microbially induced carbonate precipitation, MICP)是自然界中一种广泛存在的生物矿化现象。近二十年来,MICP 技术开辟了碳酸钙生物合成的新途径,为岩土工程加固、环境污染修复、生物固碳、生态建筑材料生产、生物医学、土壤改良和文物古建筑修复等领域提供了新的解决方案,推动了相关领域的深入研究[1-3]。作为 MICP 技术的核心产物,生物碳酸钙的形成过程与性状特征直接影响 MICP 技术的应用效果[4-5]。碳酸钙有三种常见的无水晶型:方解石、文石和球霰石,其热力学稳定性依次降低,溶解度则依次升高[6-7]。由于碳酸钙各晶型性状存在显著差异,其物理化学特性会随其晶型和占比的变化而发生相应变化,展现出不同的特性[8]。目前,对于 MICP 过程和产物特性(质量、多晶型、粒径和形貌)的调控主要集中在环境因素的优化和外源添加剂的使用上。尽管相关研究已取得一定进展,但此类方法仍存在操作复杂、环境敏感和生物相容性较差等局限性[9-10]。为此,研究人员开始关注微生物内源性生物分子在矿化过程中的调控潜能。研究发现,胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的组分差异显著影响微生物矿化产物的产率和特性[11]。因此,以 EPS 作为模板或诱导剂调控微生物矿化是一种直接有效的方法,可实现对微生物矿化产物组成与性能的优化和定向调控[12]。Lian 等[13]研究发现,巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的 EPS 可以诱导形成多孔状方解石。Tourney 等[14]研究发现,地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的 EPS 可有效提高其矿化产物的产量及方解石晶体的形成效率。Xue 等[15]研究发现,微生物分泌的 EPS 能够使金属离子与其官能团结合,既限制了金属离子的自由流动,又增加了其与碳酸根结合的概率,从而促进矿化产物的生成。Wu 等[16]研究发现,EPS 的官能团增强了对金属离子的吸附,促进了矿化反应的发生。同时,EPS 还降低了晶体的比表面积和活性位点,提高了晶体的结晶度。由此可见,使用微生物自身的 EPS 不仅能提高微生物矿化效率,还有助于实现对矿化产物的定向设计与控制。然而,利用微生物的 EPS 调控微生物矿化仍面临诸多挑战,如 EPS 的提取与纯化工艺复杂、成本较高,难以实现大规模应用;微生物 EPS 的产量和矿化沉淀量的最优调控条件存在一定差异,二者难以实现同步。因此,根据 EPS 的化学组分与结构,选择和开发具有等效功能的 EPS 替代物,将是兼顾 EPS 对微生物矿化调控优势,又能克服 EPS 自身缺陷的有效途径[17]。本研究使用克雷伯氏杆菌(*Klebsiella aerogenes*)作为矿化菌株。前期研究表明,该菌株 EPS 中多糖的主要组分为甘露糖(48.3%)、葡萄糖(36.7%)、半乳糖醛酸(7.4%)、半乳糖(4.1%)、核糖(2.9%)和葡萄糖醛酸(0.7%)[18-19]。黄原胶是一种微生物发酵产生的胞外杂多糖,由葡萄糖、甘露糖和葡萄糖醛酸按 2∶2∶1 组成的多糖高分子化合物,基本化学结构是一个由 D-葡萄糖组成的线性主链,该主链通过氢键与一个三糖侧链相连[20-21]。由此可见,黄原胶与克雷伯氏杆菌的胞外多糖在物理特性和化学成分上具有高度相似性。此外,黄原胶的胶黏性有利于改善并提高 MICP 的固化效果。为此,本研究以黄原胶作为克雷伯氏杆菌 EPS 的功能替代物,探究黄原胶对克雷伯氏杆菌诱导碳酸钙沉淀的调控作用和机制,为 MICP 过程和产物特性的调控提供新思路,对开发绿色、高效的微生物矿化及固化技术具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 本研究使用的克雷伯氏杆菌(*Klebsiella aerogenes*)分离自南华大学铀矿冶生物实验室附近的高有机质土壤。该菌株(*Klebsiella* sp.11027)的 16S rDNA 序列已上传至 GenBank,登录号为 ON139648,并保存于中国典型培养物保藏中心(武汉),保藏编号为 M20211523。同时作为待研究的菌株保存于南华大学铀矿冶生物实验室。

1.1.2 培养基 液体培养基:乙酸钠 20 g/L,酵母浸粉 4 g/L,pH 值自然。固体培养基:在液体培

养基中加入 2%(质量分数)琼脂。培养基 121 ℃灭菌 20 min 后备用。

1.1.3 *主要试剂与仪器设备* 乙酸钠、乙酸钙($Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$)(分析纯,西陇科学股份有限公司),酵母浸粉(上海盛思生化科技有限公司),黄原胶(食品级,健隆生物科技有限公司)。超纯水制造机(Cenpure Uv/UF,德国 TKA 公司);雷磁 pH 计(PHSJ-3F,上海仪电科学仪器有限公司);超低温冰箱(MDF-86V408,安徽中科都菱商用电器股份有限公司);恒温振荡培养箱(ZQZY-78AV,上海知楚仪器有限公司);高压灭菌锅(GI54DS,致微仪器有限公司);扫描电子显微镜(Regulus8100,日本日立);X 射线衍射仪(Bruker D8 ADVANCE,德国布鲁克);微米粒度分析仪(Malvern Panalytical Mastersizer 2000,英国马尔文)。

1.2 方法

1.2.1 *菌种的活化和扩大培养* 取出-80 ℃冻存的克雷伯氏杆菌菌株种子液甘油管于室温解冻。将解冻的种子液接种于灭菌的液体培养基中 30 ℃、100 r/min 培养 24 h 活化。然后将活化的种子液涂布于固体培养基,30 ℃恒温培养 24 h。用无菌接种环挑取固体培养基上生长状态良好的单菌落转接于液体培养基中静置后,30 ℃、100 r/min 恒温培养 24 h,得到用于扩大培养的种子菌悬液。

1.2.2 *MICP 实验方法与设计* 前期实验已经研究了环境因素对克雷伯氏杆菌矿化的影响并优化了该菌的矿化条件。结果显示,当体系温度为 30 ℃、pH 10、自然菌液密度 $OD_{600}=5.10$ 时,矿化产物生成量最大[22]。实验使用的菌液提前培养 120 h,此时微生物处于稳定期,具有更好的适应性和稳定性。使用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液调节菌液 pH 值为(10±0.05),此时的菌液为矿化反应的标准细菌溶液。为了便于比较和分析,设计了“1.2.3 和 1.2.4”中的两类摇瓶实验。

1.2.3 *无黄原胶条件下钙源浓度和矿化时间对碳酸钙沉淀的影响* 为探究无黄原胶条件下的钙源浓度和矿化时间对克雷伯氏杆菌矿化过程及其产物的影响,以确定其沉淀量及晶型的稳定时间,为后续的黄原胶调控 MICP 实验提供基础。实验设计了不同钙源(乙酸钙)浓度(0.25、0.50 mol/L)和矿化时间(0.5、1、2、4、6、12、24、36、48、60 h)条件下的微生物矿化实验。各取 100 mL 不同浓度的钙源溶液分别与 100 mL 菌液混合均匀,30 ℃恒温静置培养,每个钙源浓度和培养时间组合均设置 3 个平行样本。培养至预设时间(0.5、1、2、4、6、12、24、36、48、60 h)后取出,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,并用超纯水清洗沉淀 3 次。清洗后的沉淀 70 ℃干燥 48 h,称重并记录。

1.2.4 *黄原胶对碳酸钙沉淀的影响* 为探究黄原胶对克雷伯氏杆菌矿化产物的影响,根据 1.2.3 中确定的碳酸钙沉淀量和晶型达到稳定时的时间点,设计不同钙源浓度(0.25、0.50 mol/L)和黄原胶浓度(0.05、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、3.00 g/L)条件下的微生物矿化实验。分别向 100 mL 菌液中加入不同质量的黄原胶并搅拌均匀,得到特定浓度梯度的含黄原胶菌液(0.05、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、3.00 g/L)。各取 100 mL 不同钙源浓度溶液分别与 100 mL 不同质量浓度的含黄原胶菌液混合均匀,分别于 30 ℃恒温静置培养 12 h(钙源浓度 0.25 mol/L)和 36 h(钙源浓度 0.50 mol/L),每个钙源浓度和培养时间组合均设置 3 个平行样本。随后 8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液并用超纯水清洗沉淀 3 次。清洗后的沉淀 70 ℃干燥 48 h,称重并记录。

1.2.5 *矿化产物的表征* 使用配备 Cu Kα 光源的 X 射线衍射仪(XRD)对沉淀产物进行表征,扫描角度为 5°~90°,步进为 0.02°,速度为 8°/min。利用 JADE 6.0 进行物相分析,并通过 Rietveld 精修法定量计算各晶型所占比例。使用扫描电子显微镜(SEM)观测沉淀产物的微观形貌,使用微米粒度分析仪检测矿化沉淀产物的粒径。

2 结果与分析

2.1 钙源浓度和矿化时间对碳酸钙沉淀量的影响

无黄原胶条件下,不同钙源浓度(0.25、0.50 mol/L)和矿化时间(0.5、1、2、4、6、12、24、36、48、60 h)条件下碳酸钙沉淀生成量的变化曲线见图 1。当钙源浓度为 0.25 mol/L 时,碳酸钙沉淀量在 0~6 h 随着矿化时间延长而急剧增加,6 h 时达到 3.50 g/L,随后小幅下降,并在 12 h 降至3.40 g/L,之后随着时间延长而缓慢增加,于 48 h 达到峰值 3.70 g/L,最终在 60 h 降低至 3.60 g/L。当钙源浓度为 0.50 mol/L 时,碳酸钙沉淀量在0~6 h内的变化趋势与 0.25 mol/L 时一致,其 6 h 的沉淀量为

4.00 g/L,随后逐渐增加,12 h 时达到峰值 4.15 g/L,较 0.25 mol/L 钙源浓度组增加了 12.16%,之后,碳酸钙沉淀量随着矿化时间的延长逐渐降低,60 h 时为 4.05 g/L。结果表明,在无黄原胶条件下,高钙源浓度(0.50 mol/L)有利于增加碳酸钙沉淀量。前 6 h 主要形成碳酸钙,而6~60 h碳酸钙沉淀量基本保持稳定,确定 6 h 后为碳酸钙沉淀量的稳定时间。

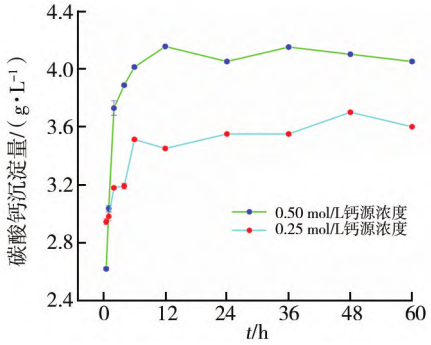


图 1 钙源浓度和矿化时间对碳酸钙沉淀量的影响

Fig.1 Effect of calcium source concentration and mineralization time on calcium carbonate precipitation

在矿化过程中,钙源浓度对钙离子的可用性起着关键作用。高钙源浓度(0.50 mol/L)时体系过饱和度较高,加速了晶体的成核与生长,促进碳酸钙沉淀快速析出[23-24]。因此,钙源浓度为 0.50 mol/L 时碳酸钙的沉淀量大于钙源浓度为 0.25 mol/L 时沉淀量。同时,沉淀量积累导致微生物表面成核位点被碳酸钙晶体包裹而减少,且高钙源浓度时表面钝化效应更为显著,抑制了晶体的成核与生长[25],使 6~60 h 时碳酸钙沉淀量变化不显著。

2.2 钙源浓度和矿化时间对碳酸钙沉淀晶型的影响

无黄原胶条件下,钙源浓度为 0.25 mol/L、矿化时间为 6~60 h 时碳酸钙沉淀的 XRD 图谱和各晶型占比见图 2A、2B。如图 2A 所示,6 h 时在 23.1°、29.4°、36.0°、39.5°和 48.5°出现五处低强度方解石衍射峰,在 27.2°和 32.8°出现两处低强度球霰石衍射峰。12 h 后球霰石衍射峰消失,方解石衍射峰强度增加,峰形逐渐尖锐。由图 2B 可知,球霰石占比由 6 h 的 11.20%骤降至 12 h 时的 1.65%并保持稳定;方解石占比由 6 h 的 88.80%升高至 12 h 的 98.35%并趋于稳定。表明尽管钙源浓度较低,但在矿化初期,较高的过饱和度有利于亚稳定态的球霰石形成。而随着矿化进行,体系过饱和度降低,球霰石逐渐溶解。一部分溶解的球霰石通过奥斯瓦尔德熟化作用在方解石表面再结晶,一部分则在溶液中再结晶并转化形成方解石。这两种转化路径促使结构稳定且结晶度更高的方解石形成[26]。

钙源浓度为 0.50 mol/L、矿化时间为 6~60 h 时碳酸钙沉淀的 XRD 图谱和晶型占比见图 2C、2D。如图 2C 所示,6 h 时在 29.4°、36.0°、40.0°和 48.5°出现四处低强度的方解石衍射峰,在 25.0°、27.2°、32.8°和 44.9°出现四处低强度的球霰石衍射峰。12 h 时方解石的衍射峰数量增加,峰形尖锐、强度增强,而球霰石衍射峰数量减少、峰强较弱。随着矿化时间延长,方解石衍射峰强度逐渐降低,峰形变宽,而球霰石衍射峰数量和强度均增加,峰形尖锐。如图 2D 所示,在 60 h 内,方解石的占比从 6 h 的 68.80%升高至 12 h 的 81.40%,随后缓慢降低,在 36 h 降至50.20%后趋于稳定;球霰石的占比从 6 h 的31.20%降至 12 h 的 18.60%,随后缓慢升高,在 36 h 升至 49.80%后趋于稳定。由此可知,12 h 前高钙源浓度的晶型变化趋势与低钙源浓度时相同,即方解石占比升高,球霰石占比降低。12 h 后,由于钙源浓度较高,电负性的菌体吸附更多的钙离子改变了微环境的过饱和度,有利于球霰石的形成[26]。此外,大量的碳酸钙沉淀会吸附在球霰石表面,使晶体表面钝化,抑制了相变发生[27]。

2.3 黄原胶质量浓度对碳酸钙沉淀量和粒径的影响

不同黄原胶质量浓度对碳酸钙沉淀量和粒径的影响如图 3 所示。由图 3A 可知,未添加黄原胶时,0.25 mol/L 和 0.50 mol/L 钙源浓度的碳酸钙沉淀量分别为 3.40 g/L 和 4.15 g/L。加入黄原胶后,两种钙源浓度下的碳酸钙沉淀量均显著增加,在黄原胶质量浓度为 0.50 g/L(钙源浓度 0.25 mol/L)和 0.75 g/L(钙源浓度 0.50 mol/L)时达到最大值,分别为 4.25 g/L 和 4.55 g/L,增幅分别为 25.00%和 9.60%。继续增加黄原胶质量浓度,碳酸钙沉淀量均逐渐下降,当黄原胶质量浓度为 3.00 g/L 时,碳酸钙沉淀量分别降至 3.05 g/L 和 3.75 g/L,均低于未添加黄原胶时的沉淀量。

低黄原胶质量浓度时,溶液黏度增加,降低了离子的扩散速率,抑制了晶体的无序聚集,增加了离子的有效接触频率和时间,为碳酸钙沉淀的成核和生长提供了相对稳定的环境,有利于碳酸钙沉淀的生成[28]。黄原胶的羧基、羟基和多糖结构也可通过静电吸附或配位作用与钙离子形成离子键或配位点,促进微生物与之结合并析出结晶。此外,黄原胶可作为微生物代谢的碳源,增加微生物密度,增强其活性,促进微生物矿化。当黄原胶质量浓度过高时,导致溶液黏度过高使其流动性降低,抑制了体系内营养物质及代谢产物的转移和扩散。过多的黄原胶还会覆盖及包裹部分菌体和成核位点,阻断其与钙离子的接触,抑制晶体的成核与生长,由此导致碳酸钙沉淀量降低[29]。当黄原胶的质量浓度相同时,高钙源浓度的碳酸钙沉淀量明显高于低钙源浓度,这与未加黄原胶的结果相一致,表明钙离子浓度对碳酸钙沉淀量有重要影响。

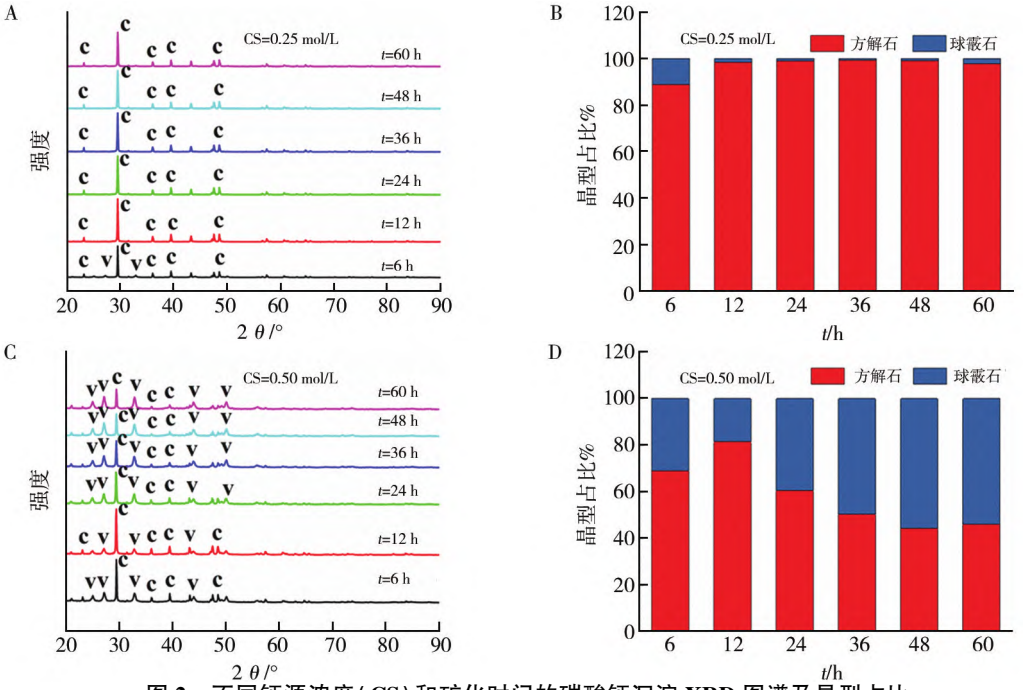


图 2 不同钙源浓度(CS)和矿化时间的碳酸钙沉淀 XRD 图谱及晶型占比

Fig.2 XRD patterns and crystalline proportions of calcium carbonate precipitates at different calcium source concentrations(CS) and mineralization times

黄原胶质量浓度对碳酸钙沉淀粒径的影响如图 3B 所示。未添加黄原胶时,钙源浓度为 0.25 mol/L和 0.50 mol/L 时的碳酸钙沉淀平均粒径分别为(12.80±0.09) μm 和(14.60±0.06) μm。当黄原胶的质量浓度为 0.05 g/L 时,碳酸钙沉淀的平均粒径分别为(7.70±0.03) μm(钙源浓度 0.25 mol/L)和(6.70±0.04) μm(钙源浓度 0.50 mol/L),均比未添加黄原胶时明显减小,表明黄原胶对碳酸钙沉淀粒径具有显著的调控作用。随着黄原胶质量浓度的增加,碳酸钙沉淀的平均粒径整体呈现减小趋势。当黄原胶质量浓度为 3.00 g/L 时,0.25 mol/L 和 0.50 mol/L 钙源浓度的碳酸钙沉淀平均粒径分别为(7.10±0.08) μm 和(5.20±0.07) μm,较未添加黄原胶时分别减小了 44.50%和 64.40%,且高钙源浓度的粒径减小的更为显著。加入黄原胶导致碳酸钙沉淀粒径显著降低的原因:①黄原胶的加入为微生物矿化提供了更多的成核位点,促进晶核形成并减少单个晶核上吸附的离子;②黄原胶的加入使部分菌体和晶体被覆盖,阻碍离子向晶体表面扩散和附着,抑制了晶体的生长速率;③黄原胶的加入提高了溶液的饱和度,促进了晶体快速结晶析出,缩短了晶体的生长时间,形成了粒径更小的晶体[30]。

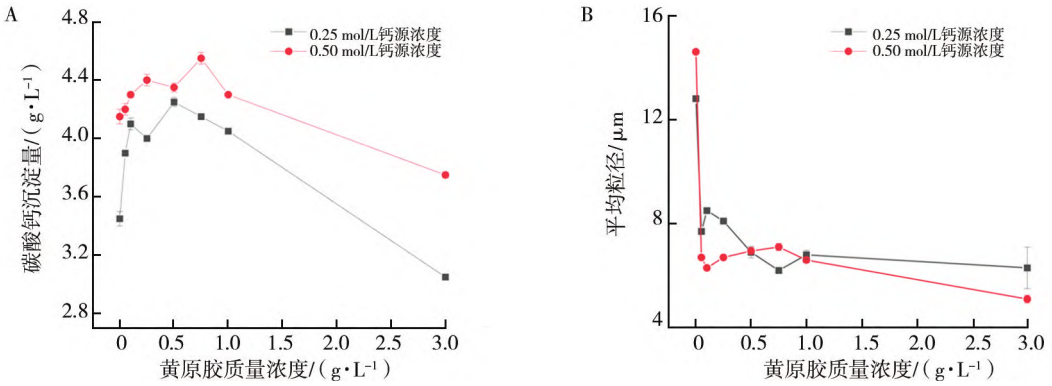


图 3　黄原胶质量浓度对碳酸钙沉淀量(A)和粒径(B)的影响

Fig.3　Effect of XG concentration on calcium carbonate precipitation (A) and particle size (B)

2.4　黄原胶质量浓度对碳酸钙沉淀晶型和形貌的影响

黄原胶不仅能够调控微生物诱导碳酸钙的沉淀量,还能对其晶型和形貌产生显著影响。钙源浓度为 0.25 mol/L 时,不同黄原胶质量浓度下碳酸钙沉淀的 XRD 图谱和晶型占比见图 4A、4B。未添加黄原胶时,在 23.1°、29.5°、36.0°、43.2°、48.5°和 57.4°出现六处强度较高且峰形尖锐的方解石衍射峰,仅在 39.5°出现一处强度较弱且峰形较宽的球霰石衍射峰(图 4A),此时方解石和球霰石的占比分别为 98.35%和 1.65%,且方解石结晶度和占比均较高(图 4B)。随着黄原胶质量浓度的增加,方解石的衍射峰数量减少、峰强降低,而球霰石的衍射峰数量增加、峰强增强(图 4A);方解石的占比逐渐降低,球霰石占比逐渐升高,且在黄原胶质量浓度为 0.25 g/L 时二者趋于稳定,分别为 66.60%和 33.40%(图 4B)。这是由于未添加黄原胶时,低钙源浓度的体系饱和度较低,因此沉淀产物主要是方解石。而黄原胶的加入导致体系黏度和局部过饱和度增加,不但提供了球霰石的生成和稳定存在的条件,而且造成了晶体表面钝化、抑制了方解石的生长和转化,因此方解石的占比降低、球霰石的占比升高[31]。

钙源浓度为 0.50 mol/L 时,不同黄原胶质量浓度下碳酸钙沉淀的 XRD 图谱和晶型占比见图 4C、4D。未添加黄原胶时,仅在 26.7°和 29.5°出现两处强度较弱且较宽的方解石衍射峰,但在 25.0°、39.5°、32.8°、43.8°和 50.1°出现五处强度较强且峰形尖锐的球霰石衍射峰(图 4C),此时方解石和球霰石的占比分别为 54.20%和 45.80%(图 4D)。当黄原胶质量浓度为 0.05~0.50 g/L 时,相较于对照组,方解石衍射峰数量均增加,峰强和峰高均升高,峰形相对尖锐;球霰石的衍射峰数量均减少,且强度较弱,此时方解石和球霰石的占比分别为 92.95%~97.85%和 2.15%~7.05%,且相对稳定。随着黄原胶质量浓度进一步增加,方解石的衍射峰数量减少,峰强和峰高均降低,而球霰石衍射峰数量增加,峰强增强(图 4C)。此时,方解石的占比逐渐降低,球霰石的占比逐渐增加,并在黄原胶质量浓度大于 1.00 g/L 后趋于稳定,当黄原胶质量浓度为 3.00 g/L 时方解石和球霰石的占比分别为 56.10%和 43.90%(图 4D)。高钙源浓度时,黄原胶的加入导致体系过饱和度升高,其羧基、羟基等官能团通过吸附或离子键作用与钙离子结合形成的-COO^-/Ca^{2+}络合物与碳酸根结合,生成了高表面能且不稳定的无定型碳酸钙,在液态环境中通过溶解-沉淀机制转化为方解石结晶析出,导致钙离子的缓释,改变了晶体的生长速度,诱导方解石稳定的形成[32]。因此黄原胶质量浓度为 0.05~0.50 g/L 时,相较于对照组,方解石占比显著增加,球霰石的占比显著降低。当黄原胶质量浓度进一步增加时,在球霰石形成过程中,黄原胶吸附在晶体表面并最终包裹进入其内部形成难溶结构的球霰石,阻碍其发生相变为方解石,因此球霰石的占比逐渐增加。

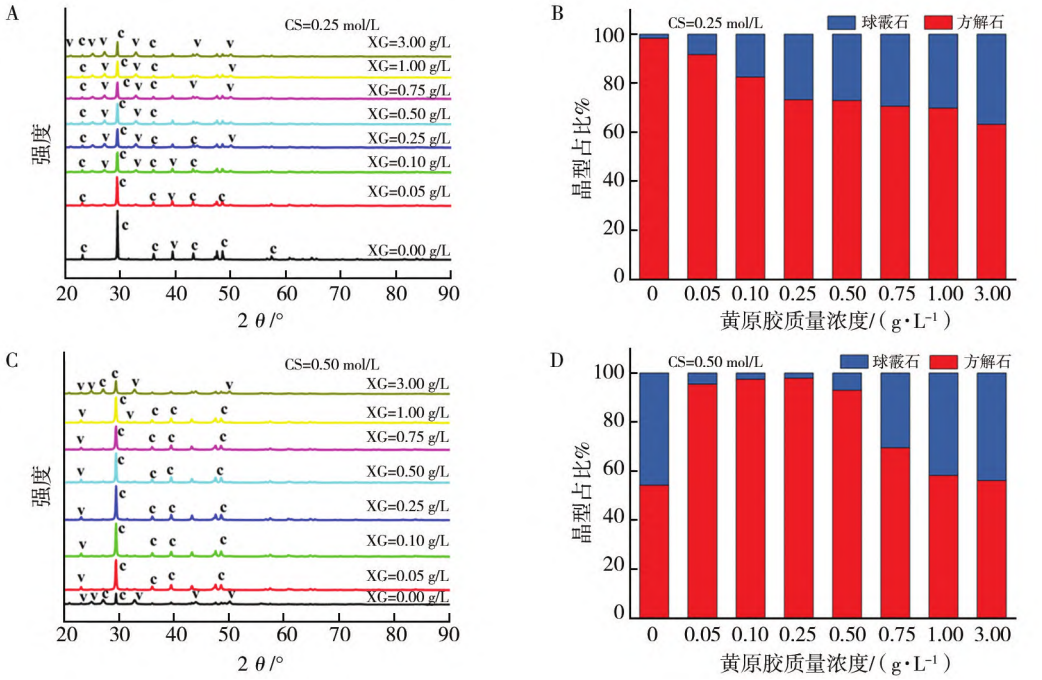
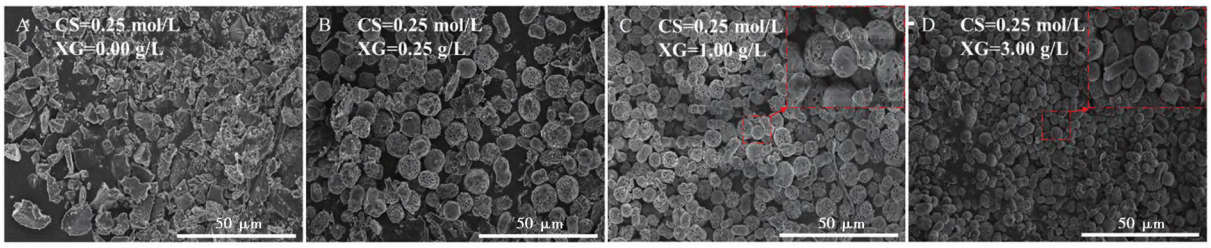


图 4 不同黄原胶质量浓度(XG)和钙源浓度(CS)的碳酸钙沉淀 XRD 图谱及晶型占比

Fig.4 XRD patterns and crystalline proportions of calcium carbonate precipitates at different XG mass concentrations and calcium source concentrations(CS)

在微生物矿化过程中,沉淀产物通过成核结晶、析出、溶解与再结晶等动态过程来保持稳定。这些动态过程影响着晶体结构和结晶度,进而调控晶体的形貌和粒径。此外,由于微生物参与矿化沉淀的成核与生长,部分附着于晶体表面的细菌在衰亡后发生自溶,因此在沉淀表面形成独特的孔洞结构和微生物活动痕迹[33]。由图 5A、5E 可知,未添加黄原胶时,克雷伯氏杆菌诱导形成的碳酸钙沉淀主要为不规则多面体或球形。在高钙源浓度(0.50 mol/L)时,体系过饱和度较高,有利于晶体快速成核析出并保持稳定,因此沉淀表面较光滑且形貌完整;在低钙源浓度(0.25 mol/L)时,体系过饱和度较低,形成的晶体结晶度较低并产生缺陷,易发生结晶析出-溶解-再结晶,导致晶体呈现聚集黏结现象,且表面细菌痕迹明显。加入黄原胶后,由于黄原胶的空间位阻效应抑制了晶体间的团聚,提高了体系内各种离子和沉淀的分散性,抑制了棱面体结构生长,因此促进了粒径均匀且圆润的球状或类球状晶体生成(图 5B~D、F~H)[34]。当黄原胶质量浓度过高时,其会吸附或覆盖在部分晶体表面,使晶体表面粗糙或褶皱(图 5F)。此外,过量的黄原胶会吸附在晶体的曲面和阶梯面上,并在其羟基和羧基的作用下降低晶面能,抑制曲面和阶梯面的生长速率,由此形成了具有不均匀层间距的层状晶体;加之黄原胶的桥联作用导致了层状或聚集体形态晶体的形成,且随着晶体的生长逐渐形成规则的层状叠加六面体结构(图 5H)[35-37]。



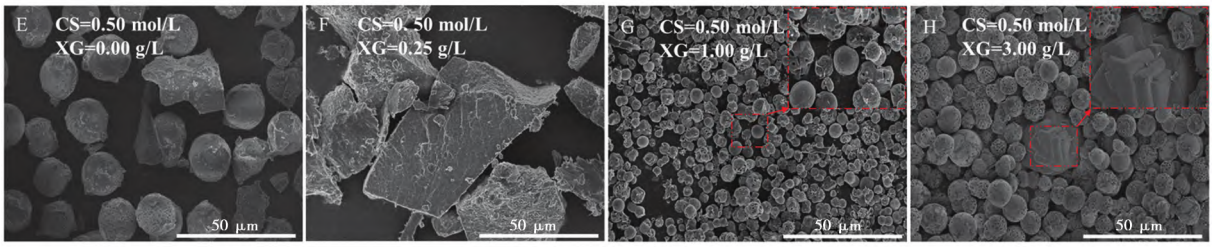


图 5 不同钙源浓度(CS)和黄原胶质量浓度(XG)的碳酸钙沉淀形貌图

Fig.5 Morphology of calcium carbonate precipitation at different calcium source concentration(CS) and XG mass concentration

3 讨 论

目前使用最普遍的碳酸盐矿化菌是产脲酶菌,尽管其矿化效率较高,但其副产物或中间产物(如 NH_3、NH_4^+)对环境存在潜在风险,因此选用环境友好型矿化微生物具有重要意义。本研究选用克雷伯氏杆菌作为碳酸盐矿化菌,其可以将乙酸钙分解为碳酸根离子和钙离子,并在碱性条件下以自身为成核位点生成碳酸钙沉淀[22]。其矿化机理见公式(1)~(4)。

克雷伯氏杆菌代谢过程中,通过氧化还原反应将乙酸根分解为 CO_2、H_2O 和 CO_3^{2-}:

$$2C_2H_3O_2^- + 4O_2 \xrightarrow{\text{克雷伯氏杆菌}} CO_3^{2-} + H_2O_3 + CO_2 \quad (1)$$

带正电的 Ca^{2+} 被吸附在菌体表面:

$$Cell + Ca^{2+} \longrightarrow Cell-Ca^{2+} \quad (2)$$

菌体作为成核位点促进晶体的成核与结晶,形成碳酸钙沉淀:

$$Cell-Ca^{2+} + CO_3^{2-} \longrightarrow Cell-CaCO_3\downarrow \quad (3)$$

其总反应机制:

$$Ca(C_2H_3O_2)_2 + 4O_2 \xrightarrow{\text{克雷伯氏杆菌}} CaCO_3\downarrow + 3CO_2 + 3H_2O \quad (4)$$

此外,为克服环境因素、外源外加剂和细菌 EPS 等方法调控微生物矿化过程和产物特性时存在的局限,本研究以黄原胶作为克雷伯氏杆菌 EPS 的替代物,探究其对克雷伯氏杆菌矿化过程和沉淀特性的影响和调控作用。目前,国内外采用黄原胶作为外加剂调控生物矿化主要用于产脲酶微生物的生物固化研究,且大多侧重于固化效果,对其调控生物矿化过程和碳酸钙特性的研究不够全面系统。本研究系统探究了黄原胶对碳酸钙的沉淀量、粒径、晶型和形貌的调控作用。吴敏等[38]利用大豆脲酶和黄原胶联合固化风积沙时发现,碳酸钙沉淀量随黄原胶质量浓度的升高而增加。当黄原胶质量浓度为 1.00 g/L、钙源浓度为 0.30 mol/L 时,碳酸钙沉淀量最大,约为 0.15 g/L。本研究在相同黄原胶质量浓度且钙源浓度为 0.25 mol/L 时,碳酸钙沉淀量为 4.05 g/L,明显高于前者。这可能源于两方面原因:一是钙源种类不同,前者钙源采用氯化钙,本研究采用乙酸钙;二是反应体系不同,前者为石英砂柱,本研究为摇瓶实验。Xu 等[39]以黄原胶作为有机基质采用化学沉淀法合成碳酸钙发现,1.00 g/L 的黄原胶调控下生成的碳酸钙粒径为 5.00~8.00 μm,与本研究结果相近;其碳酸钙沉淀为砖状晶体,而本研究的碳酸钙沉淀多为球状或类球状晶体,仅在黄原胶质量浓度较高(3.00 g/L)时生成部分层状六面体,该差异可能是由于黄原胶质量浓度和沉淀方法不同而引起的。Hang 等[40]利用黄原胶和 MICP 联合加固石英砂时发现,钙源浓度为 0.67 mol/L,黄原胶质量浓度为 0.50 g/L 和 3.00 g/L 时,生成的碳酸钙沉淀均以方解石为主。本研究在相同黄原胶质量浓度且钙源浓度为 0.50 mol/L 时,方解石占比分别为 92.95% 和 56.10%,碳酸钙沉淀中均以方解石为主,与前者结论一致。

本研究结果表明,控制黄原胶的质量浓度可调控克雷伯氏杆菌诱导碳酸钙沉淀过程,提高碳酸钙沉淀量,减小碳酸钙晶体粒径,调控其晶型和形貌。这不仅深化了对微生物矿化机制的理解,简化了微生物矿化的调控策略,还为实现微生物矿化的精准调控提供了新思路。此外,黄原胶作为一种天然阴离子生物聚合物具有绿色环保等优良特性,尤其是其可有效增强 MICP 的胶结作用,提高固化体的力学性能,因此在生物胶结领域具有良好的发展前景。

参考文献:

[1] Konstantinou C, Wang Y. Unlocking the potential of microbially

induced calcium carbonate precipitation (MICP) for hydrological applications: A review of opportunities, challenges, and environmental considerations[J]. Hydrology, 2023, 10(9): 178.

[2] Jiang L, Xia H, Wang W, et al. Applications of microbially induced calcium carbonate precipitation in civil engineering practice: A state-of-the-art review[J]. Construction and Building Materials, 2023, 404: 133227.

[3] Zhang YS, Liu Y, Sun XD, et al. Application of microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) technique in concrete crack repair: A review[J]. Construction and Building Materials, 2024, 411: 134313.

[4] DeJong JT, Mortensen BM, Martinez BC, et al. Bio-mediated soil improvement[J]. Ecological Engineering, 2010, 36(2): 197-210.

[5] Li Q, Zhang B, Ge Q, et al. Calcium carbonate precipitation induced by calcifying bacteria in culture experiments: Influence of the medium on morphology and mineralogy[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 134: 83-92.

[6] Cheng L, Cord-Ruwisch R, Shahin MA. Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation[J]. Canadian Geotechnical Journal, 2013, 50(1): 81-90.

[7] Wan C, Wang LT, Sha JY, et al. Effect of carbon nanoparticles on the crystallization of calcium carbonate in aqueous solution[J]. Nanomaterials, 2019, 9(2): 179.

[8] Koning K, McFarlane R, Gosse JT, et al. Biomineralization in cave bacteria: Popcorn and soda straw crystal formations, morphologies, and potential metabolic pathways[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 933388.

[9] 汪琦航. 生物矿化过程启示的无定形碳酸钙结晶和致密化研究[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2025.

[10] 邢一. 氨基与羧酸分子在碳酸钙生物矿化中的协同作用[D]. 天津: 天津大学, 2024.

[11] Zheng T, Hou D, Leng W, et al. Preparation, characterization, and formation mechanism of different biological calcium carbonate ($CaCO_3$) induced by *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus alcalophilus*[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2023, 25(9): 189.

[12] Lang C, Li M, Dai R, et al. Discussion on the review and outlook of microbial geotechnical mineralization technology[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 455(1): 12078.

[13] Lian B, Hu Q, Chen J, et al. Carbonate biomineralization induced by soil bacterium *Bacillus megaterium*[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2006, 70(22): 5522-5535.

[14] Tourney J, Ngwenya BT. The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology[J]. Chemical Geology, 2014, 386: 115-132.

[15] Xue ZF, Cheng WC, Wang L, et al. Effect of a harsh circular environment on self-healing microbial-induced calcium carbonate materials for preventing Pb^{2+} migration[J]. Environmental Technology & Innovation, 2023, 32: 103380.

[16] Wu C, Chen Y, Qian Z, et al. The effect of extracellular polymeric substances (EPS) of iron-oxidizing bacteria (*ochrobactrum* EEELCW01) on mineral transformation and arsenic (As) fate[J]. Journal of Environmental Sciences, 2023, 130: 187-196.

[17] Wu Z, Kang J, Mao L, et al. Deciphering bioprocess responses in organic phosphorus mineralization to different antibiotic stresses: Interaction mechanisms mediated by microbial succession and extracellular polymeric substances and regulatory patterns[J]. Bioresource Technology, 2025, 417: 131874.

[18] 胡南, 李艾书, 余黄, 等. 产气克雷伯氏杆菌胞外聚合物中的单糖和蛋白质对碳酸钙晶型的影响(英文)[J]. Transactions of the Nonferrous Metals Society of China, 2024, 34(12): 4085-4098.

[19] 胡南, 姚顺超, 李艾书, 等. *Klebsiella aerogenes* 的胞外聚合物产量优化及其对碳酸钙晶型的调控作用[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2023, 54(11): 4238-4249.

[20] Hou Y, Zhao J, Yin J, et al. Structural properties of *Bletilla striata* polysaccharide and the synergistic gelation of polysaccharide and xanthan gum[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 142: 108843.

[21] Dzionek A, Wojcieszyńska D, Adamczyk-Habrajska M, et al. Xanthan gum as a carrier for bacterial cell entrapment: Developing a novel immobilised biocatalyst[J]. Materials Science and Engineering C, 2021, 118: 111474.

[22] 段重达, 姚小伟, 朱家华, 等. 环境因素对克雷白氏杆菌诱导碳酸钙沉淀的影响[J]. 化工学报, 2023, 74(8): 3543-3553.

[23] McPherson IJ, Peruffo M, Unwin PR. Role of mass transport in the deposition, growth, and transformation of calcium carbonate on surfaces at high supersaturation[J]. Crystal Growth & Design, 2022, 22(8): 4721-4729.

[24] Jiang N, Feng Y, Huang Q, et al. Effect of environmental pH on mineralization of anaerobic iron-oxidizing bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 885098.

[25] Xue ZF, Cheng WC, Wang L, et al. Effects of bacterial inoculation and calcium source on microbial-induced carbonate precipitation for lead remediation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 426: 128090.

[26] Sugiura Y, Onuma K, Yamazaki A. Growth dynamics of vaterite in relation to the physico-chemical properties of its precursor, amorphous calcium carbonate, in the $Ca\text{-}CO_3\text{-}PO_4$ system[J]. American Mineralogist, 2016, 101(2): 289-296.

[27] Song X, Hua X, Yang R, et al. Synergetic effects of initial NH^{4+} and Ca^{2+} concentration on the formation vaterite using steamed ammonia liquid waste as a direct carbonation[J]. Powder Technology, 2023, 419: 118363.

[28] Xu W, Lou Y, Xu B, et al. Mineralized calcium carbonate/

xanthan gum microspheres for lysozyme adsorption[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 2175-2179.

[29] He M, Horikawa Y. Flocculation and stabilization of allophane in the presence of an anionic microbial polysaccharide (gum xanthan) and several of its hydrolytic intermediates[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 1996, 42(3): 637-644.

[30] Safdar B, Pang Z, Liu X, et al. Structural characterization, physicochemical and rheological characteristics of flaxseed gum in comparison with gum arabic and xanthan gum[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023, 17(3): 2193-2203.

[31] Bak J, Yoo B. Rheological characteristics of concentrated ternary gum mixtures with xanthan gum, guar gum, and carboxymethyl cellulose: Effect of NaCl, sucrose, pH, and temperature [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126559.

[32] Ma M, Wang Y, Cao X, et al. Temperature and supersaturation as key parameters controlling the spontaneous precipitation of calcium carbonate with distinct physicochemical properties from pure aqueous solutions[J]. Crystal Growth & Design, 2019, 19(12): 6972-6988.

[33] 徐溪晨. 微生物矿化胶结砂土材料强度增长机理及可控性研究[D]. 北京: 清华大学, 2025.

[34] Choi SG, Chang I, Lee M, et al. Review on geotechnical engineering properties of sands treated by microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and biopolymers[J]. Construction and Building Materials, 2020, 246: 118415.

[35] Chen YQ, Wang SQ, Tong XY, et al. Crystal transformation and self-assembly theory of microbially induced calcium carbonate precipitation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(9-10): 3555-3569.

[36] Aljewicz M, Keklik M, Recio I, et al. Effect of polysaccharide-protein interactions on the multi-scale structure of hybrid micellar casein-xanthan gum systems [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 151: 109833.

[37] Yu SH, Cölfen H, Antonietti M. Polymer-controlled morphosynthesis and mineralization of metal carbonate superstructures [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2003, 107(30): 7396-7405.

[38] 吴敏, 高玉峰, 何稼, 等. 大豆脲酶诱导碳酸钙沉积与黄原胶联合防风固沙室内试验研究[J]. 岩土工程学报, 2020, 42(10): 1914-1921.

[39] Xu W, Liu H, Lou Y, et al. Biomimetic mineralisation of calcium carbonate using xanthan gum as morphology control agent [J]. Micro & Nano Letters, 2019, 14(6): 642-644.

[40] Hang L, Van Paassen LA, Ehsasi F, et al. An experimental investigation on use of xanthan gum biopolymer as additive for improving the reinforcement effect of biocementation on sandy soils[J]. Geomicrobiology Journal, 2024, 41(6): 627-635.