

DOI: 10.11779/CJGE20230255

# 液滴微流控芯片系统研发与微生物矿化机理研究

张瑾璇, 刘汉龙, 肖 杨\*

(重庆大学土木工程学院, 重庆 400045)

**摘 要:** 微生物诱导碳酸钙沉积 (MICP) 技术是一种基于生物矿化作用的新型土体加固和修复技术。由于生物反应过程复杂, 结晶影响因素多, MICP 矿化机理目前还不明确。MICP 微流控系统能够对微细尺度下的微生物矿化沉积规律进行可视化研究, 但观测晶体生长尺度仍较大。设计了一种液滴微流控芯片, 通过调控不相溶两相流体的流速, 生成了直径约 450  $\mu\text{m}$  的扁球体弹状液滴作为 MICP 微反应器, 从而搭建了精度更高的微生物矿化液滴微流控芯片系统。通过该系统观测表明: 碳酸钙结晶点周围的细菌分布均无变化, 随着反应进行, 晶体尺寸逐渐扩大, 形貌不变; 在晶体生长过程中, 部分细菌吸附到晶体表面, 但晶体周围无明显的细菌聚集现象。此外, 采用扫描电镜进一步观测到碳酸钙表面细菌吸附部位存在孔洞。液滴微流控芯片系统为微生物矿化提供了一个精细的微米尺度反应器, 为探究 MICP 成核机理提供了一种有效的分析方法。

**关键词:** 液滴微流控; 微流控芯片; MICP; 碳酸钙; 微生物矿化

中图分类号: TU411

文献标识码: A

文章编号: 1000-4548(2024)06-1236-10

**作者简介:** 张瑾璇(1995—), 女, 博士研究生, 主要从事微生物岩土工程方面的研究。E-mail: ss501xuan@163.com。

## Development of droplet microfluidic system and regime of biomineralization

ZHANG Jinxuan, LIU Hanlong, XIAO Yang

(School of Civil Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

**Abstract:** The microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) is a novel technique for soil reinforcement based on biomineralization. The MICP regime has not been fully explored due to the complexity of biomineralization process with so many factors affecting nucleation and growth of minerals. Recently, biomineralization evolution can be visually observed at microscale by using the microfluidic system, whereas the magnification for observation of crystal growth is still limited. In this study, a droplet microfluidic chip is designed to generate oblate droplet cells with 450 $\mu\text{m}$  in diameter by adjusting the flow velocities of two immiscible liquids, which can be used for MICP microreactor, i.e., the droplet microfluidic system for biomineralization with high precision. With the help of the system, it is found that the distribution of bacteria around  $\text{CaCO}_3$  crystals is almost unchanged with the  $\text{CaCO}_3$  crystals growing proportionally, and the crystal morphology remains the same. Some bacterial cells nearby the crystal are adsorbed on the crystal surface during the crystal growth with no obvious bacterial aggregation around the crystal. In addition, with the help of SEM, some caves on the crystal surface are found to be the sites that bacterial cells are adsorbed. Consequently, the droplet microfluidic system can provide a precise microreactor for biomineralization and an effective method for exploring nucleation regimes in MICP.

**Key words:** droplet microfluidics; microfluidic chip; MICP; calcium carbonate; biomineralization

## 0 引 言

生物矿化是一种常见的由生物介导生成矿物的自然现象<sup>[1]</sup>, 一些微生物可以通过与环境相互作用沉积矿物质来参与地球系统的生物地球化学循环<sup>[2]</sup>。将这类微生物应用到土体中, 通过改变其周边物理化学条件来催化矿物在土颗粒间沉淀<sup>[3]</sup>, 可以填充土体孔隙并以“桥梁”作用将松散土颗粒胶结在一起<sup>[4]</sup>, 实现“固化剂”的效果, 达到良好的工程目的。相较于传统土木材料, 微生物矿物对环境影响小、反应过程较

温和、能耗低、工程扰动小, 具有明显的应用优势。

微生物诱导碳酸钙沉积 (microbially induced calcium carbonate precipitation, 简称 MICP) 技术是一种基于生物矿化作用的新型土体加固和修复技术, 常见的 MICP 微生物以细菌为主<sup>[5]</sup>, 包括反硝化细菌<sup>[6]</sup>、

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (52078085); 国家自然科学基金重点项目 (41831282); 重庆市规划和自然资源局项目 (KJ-2021048)

收稿日期: 2023-03-24

\*通信作者 (E-mail: hhuxyanson@163.com)

Fe(II)氧化细菌<sup>[7]</sup>、尿素水解细菌<sup>[8]</sup>等。其中, 尿素水解菌的相关研究最丰富, 这类细菌通过分泌脲酶水解尿素, 生成铵根离子和碳酸根离子, 提高溶液的 pH 值, 在高浓度碳酸根和碱性环境中, 碳酸钙可成核沉积<sup>[9]</sup>。

针对 MICP 反应参数调控<sup>[10]</sup>、工艺优化<sup>[11]</sup>及其加固土体的应用效果<sup>[12]</sup>等相关研究已日益成熟, 但关于细菌是如何诱导碳酸钙生成的反应机理目前还不明确<sup>[13]</sup>。在反应过程中, 微生物首先通过代谢活动引起反应溶液的过饱和, 与碳酸钙在纯化学溶液中直接析出的情况不同, 微生物矿物是由特定有机分子触发成核, 后续矿物的生长也受细菌分泌物的调控<sup>[14]</sup>。目前研究普遍认为碳酸钙围绕着带负电的细菌细胞壁生成<sup>[8]</sup>, 但 Zhang 等<sup>[15]</sup>对细菌和晶体生长进行动态原位实时观测发现, 碳酸钙不仅未在细胞上沉积, 也未在表面带负电荷的聚苯乙烯微球上生长。碳酸钙沉淀可以发生在无机模板<sup>[16]</sup>、生物聚合物或其他有机基质上<sup>[17]</sup>, 还可以发生在细胞内<sup>[18]</sup>。Wang 等<sup>[19]</sup>在壳聚糖-磷脂-胆固醇体系中成功模拟了生物矿化过程, 这些生物有机大分子在矿化模板上起着重要的作用, 关于碳酸钙的成核位点还有待研究。

在晶体生长方面, 细胞外基质中的生物聚合物会对碳酸钙晶体形态和结构造成影响<sup>[20]</sup>, 进而影响加固试样的强度。Rui 等<sup>[21]</sup>发现, 碳酸钙形貌和尺寸受培养基中大分子有机物、细菌分泌物和细胞影响; 胞外多糖和氨基酸可以促进球形碳酸钙的生成<sup>[22]</sup>; Kumari 等<sup>[23]</sup>发现, 多聚-L-赖氨酸的添加可以使反应液析出更多碳酸钙, 增强矿化效果, 此外, 还可以使晶体形貌由菱形转变为椭球形聚集体。因此, 研究细菌在碳酸钙成核、晶体生长中的作用, 可以从生物机制的角度调控晶体性能, 优化反应工艺, 提高矿化效率, 降低应用成本, 大大提高该技术的工程应用性。

MICP 矿化效果通常是通过监测反应液的电化学参数<sup>[24]</sup>, 或是在反应结束后对加固体的最终状态进行分析测试<sup>[25]</sup>来表征, 微生物的矿化过程需要在溶液环境下进行, 现有的常规微尺度观测手段难以对液体试样进行长时间高分辨率的原位实时观测。细菌尺寸小、生物反应系统复杂、晶体成核及生长过程影响因素众多, 开发更高精度、更直观的分析检测方法对探究 MICP 矿化机理具有重要意义。微流控技术是近年来新兴的一种将流体通道、反应器等结构集合在微流控芯片上的微尺度分析技术, 具有试剂消耗量小、操作精确、检测快速等特点<sup>[26]</sup>, 在研究酶促碳酸钙沉积方面已有学者开展了相关应用<sup>[27]</sup>, 但观测晶体生长尺度仍较大, 且研究主要针对持续注浆下晶体聚集物的生长情况<sup>[28]</sup>。

液滴微流控技术是在微流控系统的基础上制得分散液滴的技术, 同样也是通过控制液体在芯片中微管道内的流动, 来实现操纵微液滴的生成、传输、存储, 液滴内溶液反应等功能。液滴的生成方法简单, 将两种不相溶的流体从不同的交叉管道注入, 两种液体接触后因界面张力的作用一相被另一相包裹, 即可形成分散的液滴。其中被包裹的液体为分散相, 通道内液体为连续相。液滴体量大、生成数量多、检测灵敏快速, 在生物生化检测、纳米粒子合成等领域具有广阔的应用前景。

相较于 MICP 传统的大体系研究, 液滴内的液体可以小至纳升和飞升, 液滴内出现的晶核较少, 可以观测到单晶结晶; 每个液滴都是独立的研究单元, 为微生物矿化提供了一个独立的微米尺度反应器, 可以实现反应参数的精准调控, 并通过显微镜实时观测碳酸钙的生长情况来探究细菌对晶体的调控作用, 在 MICP 这类复杂的微生物矿化反应体系研究中具有独特的应用优势。

在微流控 MICP 可视化系统的基础上<sup>[29]</sup>, 设计了 1 种液滴微流控芯片, 通过调节不相溶两相流体的流速, 生成了尺寸可控的微米尺度液滴作为 MICP 微反应器, 从而搭建了精度更高的微生物矿化液滴微流控芯片系统。通过该系统实时观测了细菌在液滴中的分布以及碳酸钙单晶的生长过程, 初步探究了细菌与碳酸钙结晶的关系, 验证了液滴微流控技术在微生物矿化可视化研究中的可行性和应用效果, 研究结果为探究 MICP 矿化机理提供了一种有效的分析方法。

## 1 微生物矿化液滴微流控可视化平台

液滴微流控实时观测平台与微流控 MICP 可视化研究平台<sup>[30]</sup>主体部分相同, 如图 1(a) 所示, 包括: 由进样泵、注射器、连接管组成的进样系统; 由搭载了彩色相机的奥林巴斯 IX73 荧光倒置显微镜、电脑、白光光源、荧光光源组成的实时观测系统; 以微流控芯片为核心的 MICP 反应系统。

如图 1(b) 所示, 微流控芯片上设计有注液口及出液口, 溶液通过进样泵由连接管注入微流控芯片, 并在通道内进行 MICP 反应, 最后从管道末端的出液口由连接管排出。通道内溶液的整个反应过程均可通过显微镜和相机在电脑上实时观测。平台研发的关键技术为 MICP 反应器作用的液滴微流控芯片, 通过对芯片进行管道设计或添加功能装置, 可以实现对液滴的操控以及各类分析检测的目的。本文设计的液滴微流控芯片包括反应液混合系统、液滴生成装置, 以及用于微生物矿化过程观测的微腔室检测系统 3 部分。

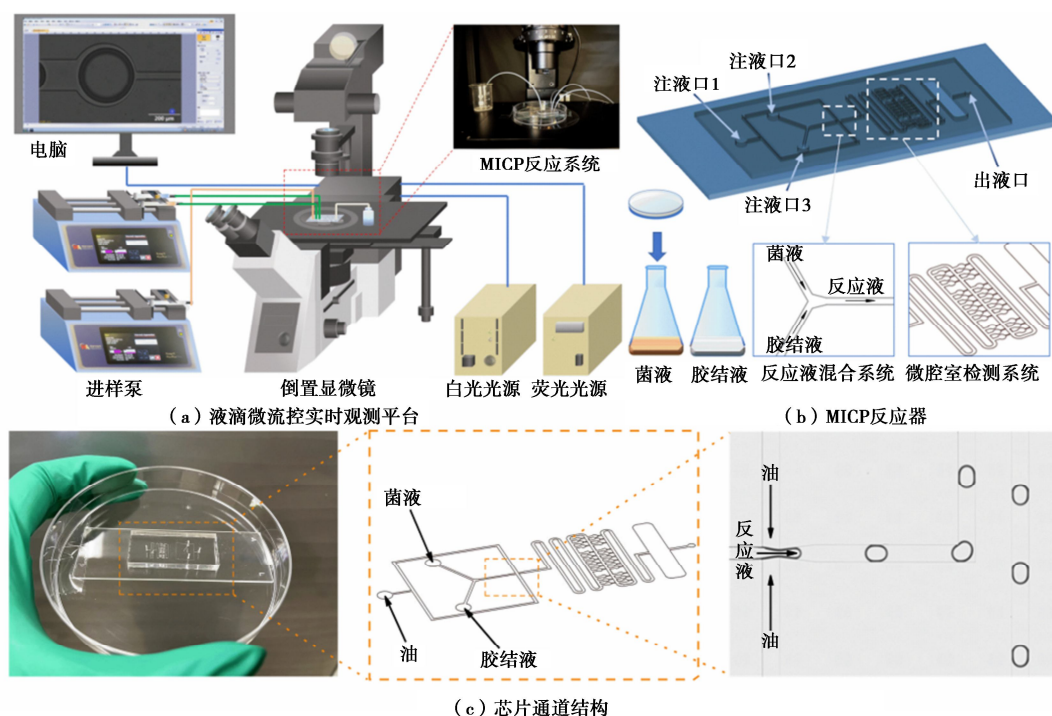


图1 液滴微流控系统

Fig.1 Schematic diagram of droplet microfluidic system

## 2 液滴微流控 MICP 反应系统

微生物 MICP 反应液包括细菌溶液和由尿素、钙溶液制成的胶结液。如图 1 (b) 所示, 将芯片前端的反应液混合系统设计为 Y 型管道, 细菌溶液和胶结液由注液口 2、注液口 3 分别注入后混合为 MICP 反应液。

如图 1 (c) 所示, 芯片的液滴生成装置采用“十字”流动聚焦结构, 并将两相交汇处的液滴生成平行方向的管道宽度设计为由窄到宽。将液体石蜡作为连续相 (后文简称油相) 由注液口 1 注入, MICP 反应液作为分散相 (后文简称水相), 反应液通过管道“十字”交叉结构时, 在两侧油相压力的作用下形成颈部, 当水相颈点被持续拉长, 剪切力在上述管道最窄位置达到最大, 两相表面张力随之失稳, 从而形成液滴。这种通道结构可以让分散相断裂的位置固定, 生成的液滴更稳定。

由于芯片中的通道为微米尺度, 管道内流体的流动为层流, 雷诺数较低, 反应液混合系统中的这类 Y 型管道内的液体混合主要是通过分子扩散作用。为了提高微流体的混合效率, 芯片将液滴生成装置之后的通道设计为弯曲形状, 液滴生成后在经过管道“U 型”连接处时, 内部液体会形成不对称循环流, 加速反应液的混合。

为了稳定观测液滴内的微生物矿化过程, 在管道

的后半段设计了微腔室检测系统, 腔室为直径  $500\ \mu\text{m}$  的圆形存储空间, 可以让管道中的部分液滴分散于各腔室中。液滴稳定生成并经过连接管进入微腔室区域后停止液体注入, 随后油封芯片表面, 即可对腔室内的液滴进行观测。由于腔室相互独立, 可以在不添加表面活性剂的情况下防止液滴融合, 确保液滴内的反应稳定进行。

本研究的液滴微流控芯片为双层聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 结构, 上层是 PDMS 主体管道层, 下层为覆盖了一层 PDMS 的载玻片基底, 由浇注法制备。芯片模具采用由光刻蚀技术制作的硅板。将 PDMS 和固化剂以 10:1 比例充分混合后抽真空直至气泡完全消除, 随后将其分别倒在载玻片和芯片模具表面, 置于烘箱 2 h 固化后取出, 前者即为下层载玻片基底; 将后者脱模切割打孔, 即可制得芯片上层的管道层。对上层通道一侧和下层 PDMS 一侧进行 plasma 处理后立即将两侧键合, 即制备出了液滴微流控芯片。如图 1 (c) 所示, 芯片主体为标准载玻片大小, 其中管道深  $100\ \mu\text{m}$ 、主通道宽  $250\ \mu\text{m}$ , 注液口、出液口孔洞直径均为  $0.8\ \mu\text{m}$ 。

## 3 液滴生成条件

微管道几何结构, 两相流量, 以及流体的黏性应力、两相流间的界面张力等作用力对液滴的生成过程均有显著影响。采用进样泵调控油相、水相的流速,

通过对液滴的生成过程进行实时观测, 初步探究流体流速对液滴生成特性的影响, 并成功生成了形态良好的液滴。

如图2(a)所示, 调节两相流量, 可以生成平行流、弹状流、滴状流3种流型的液滴。当水相流量不变, 油相流量较小时, 油相对水相的“挤压”较小, 水相未被切断, 以平行流方式通过管道的“十字”交叉结构, 油相在水相两侧与水相一同以层流的状态流动; 随着油相流量增加, 水相被油相切割为分散的液滴, 开始生成尺寸大于管道截面的弹状流; 随着油相流量进一步增加, 生成的液滴尺寸逐渐变小直至小于管道截面, 此时的液滴为相界面清晰的球体滴状流。当油相流量不变, 随着水相流量的增大, 液滴流型也会发生从滴状流到弹状流, 再到平行流的变化。

弹状流液滴生成过程如图2(b)所示, 水相在“十字”结构处继续流动直至占据交汇点管道, 油相与不相溶的水相接触后, 在管道的限制下积累压力并作用于水相, 使水相前端呈“收缩颈”的形态。随着颈点处受到两侧的挤压力加大, 颈点收缩越来越剧烈直至两相界面失稳, 水相被切断形成离散的液滴, 液滴分离后颈部的一部分被拉回归位, 继续生成下一个液滴。

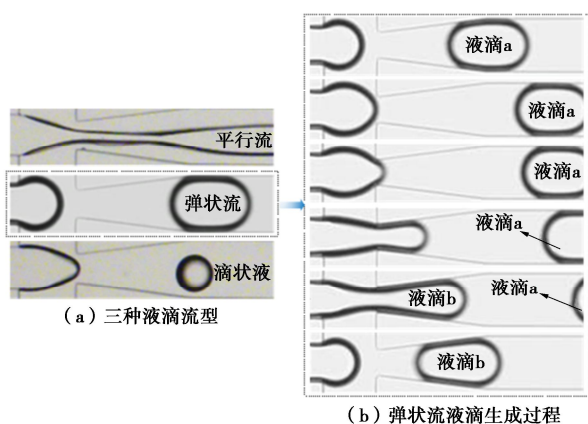


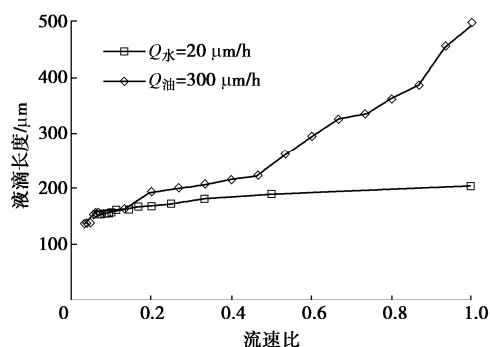
图2 液滴生成过程

Fig. 2 Droplet generation process

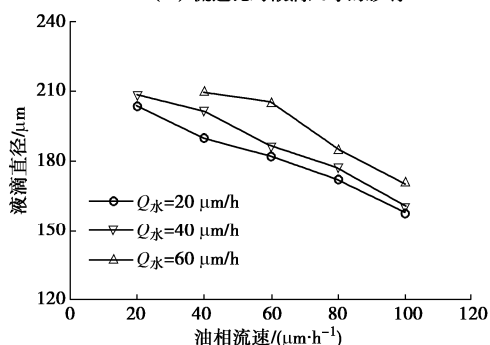
两相流流速对液滴尺寸的影响效果如图3所示, 从图3(a)中可以看到, 液滴尺寸取决于流速比( $u_{\text{水}}/u_{\text{油}}$ )的变化。控制水相流速不变, 以  $20 \mu\text{L/h}$  的间隔调节油相, 随着流速的增加, 液滴直径逐渐变小, 但流速比变化较小, 所以液滴尺寸变化不大; 油相流速越快, 对水相颈点的挤压作用越大, 生成液滴速度更快。控制油相流速不变, 调节水相, 随着流速的增加, 流速比变大, 液滴直径也越来越大。

当油相流速为  $300 \mu\text{L/h}$ 、水相流速小于  $140 \mu\text{L/h}$ , 流速比小于 0.46 时, 液滴流型为滴状流; 随着水相流速的增加, 液滴流型逐渐过渡为弹状流, 弹状流液滴

受管道宽度限制被压缩为椭球体, 液滴尺寸用其沿管道轴向方向的长度表示, 当水相流速为  $300 \mu\text{L/h}$ 、流速比为 1 时, 可以生成长度约  $300 \mu\text{m}$  的弹状流液滴; 当水相流速增加至  $320 \mu\text{L/h}$  时, 液滴转变为平行流。



(a) 流速比对液滴尺寸的影响



(b) 两相流速对液滴尺寸的影响

图3 两相流速对液滴直径的影响

Fig. 3 Influences of two-phase flow velocity on droplet diameter

对两相流速同时进行小范围调节, 如图3(b)所示, 可以发现油相流速对液滴尺寸的影响更大。由于液滴尺寸越小越不稳定, 所以本研究以弹状流液滴作为 MICP 微反应器。

## 4 液滴中的细菌分布

采用购于中国国家菌种库的尿素水解细菌巴氏芽孢八叠球菌(*Sporosarcina pasteurii*)作为试验菌种。将细菌平板上的单菌落接种至 pH 值为 9 的  $\text{NH}_4\text{-YE}$  液体培养基内, 在  $30^\circ\text{C}$ 、200 rpm 的条件下培养 14 h 后即制得新鲜菌液, 将菌液在  $4^\circ\text{C}$ 、10000 rpm 的条件下离心 15 min 后, 弃上清液再加入等量生理盐水混匀, 重复离心、重悬浮操作两次后即制得试验用细菌溶液。采用电导率法<sup>[31]</sup>进行细菌活性的测定, 细菌活性为  $15 \text{ mM urea/min}$ , 胶结液为 0.5M 等浓度尿素、氯化钙混合液<sup>[29]</sup>。

将液体石蜡以  $250 \mu\text{L/h}$  的流速, 细菌溶液和胶结液以  $100 \mu\text{L/h}$  的流速注入芯片, 在  $25^\circ\text{C}$  条件下开展微生物矿化实验, 如图4(a)所示, 可以生成直径约  $450 \mu\text{m}$  的扁球体液滴。为了检测细菌的存活状态, 采用赛默飞 LIVE/DEAD BacLight 细菌细胞活性测定试剂



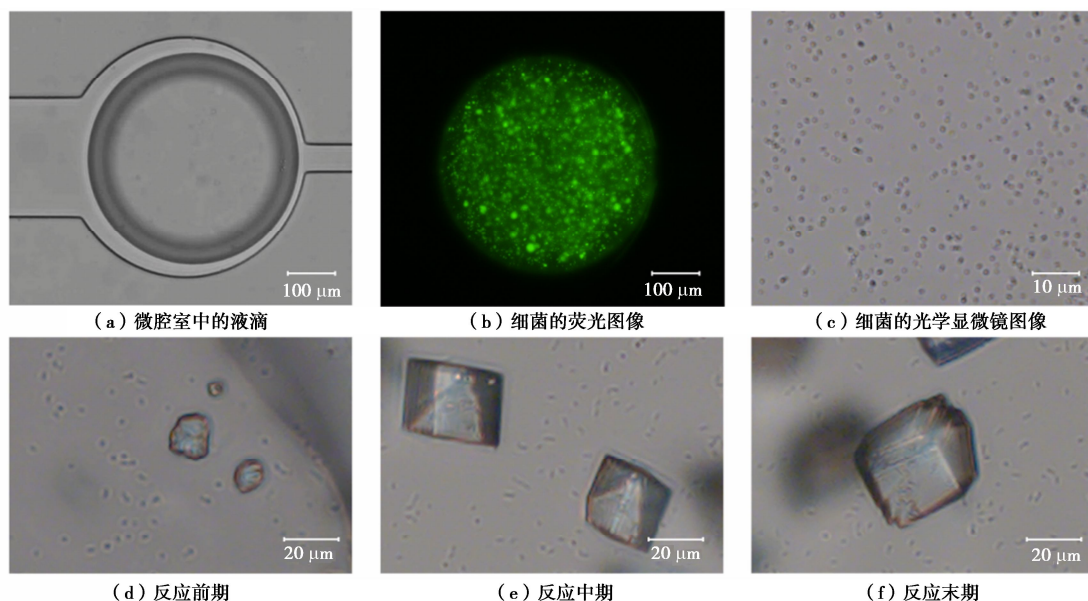


图4 液滴中的细菌分布

Fig. 4 Bacterial distribution in droplet

盒对细菌进行核酸染色标记,在荧光下衰亡的细菌显黄色,活性良好的细菌显绿色。如图4(b)所示,反应液中的细菌被完全包裹在液滴中,状态良好。

对液滴中的微生物矿化过程进行实时观测,如图4(c)所示,从物镜放大倍数为40x的显微镜图像中可以看到在溶液中持续运动的细菌细胞,反应刚开始时液滴内无晶体生成,细菌短时间内运动范围不大,菌群分布无规律,部分细胞有细端首尾相连的情况。反应进行到20 min时碳酸钙陆续开始结晶,所有液滴中的晶体均在30 min内生成,但大部分晶体的结晶位置未观测到细菌,且晶体成核位置周围的细菌均无明显位移,说明细菌细胞不是碳酸钙成核位点的必要条件。反应过程中细菌持续摆动,但运动模式无明显变化。图4(d)~(f)是其中3个液滴在反应前期、中期、末期不同阶段的内部细菌分布情况,可以看到晶体所在位置均未出现细菌聚集现象,菌体分布同样无规律,MICP反应过程没有影响细菌的运动行为。此外,如图4(e)所示,部分晶体表面可以观察到细菌吸附现象。

## 5 液滴内矿化过程的实时观测

在微生物岩土加固技术中,微生物诱导碳酸钙沉积于土颗粒间填充土体孔隙,若碳酸钙生成在相邻土颗粒的接触点处,即可进一步将独立的土颗粒胶结在一起,进而提升土体的强度<sup>[32]</sup>。通常通过调控细菌的生长情况<sup>[33]</sup>,碳酸钙的生成速率<sup>[34]</sup>、含量<sup>[35]</sup>及其在土体中的分布<sup>[36]</sup>来控制土体加固的效果,因此,研究碳

酸钙的生长情况是必要的。

液滴内生成的晶体分布较分散,主要以单晶形式生长,选取了3处具有代表性的晶体对晶体的生长过程进行持续观测,如图5所示,晶体1随着反应进行尺寸逐渐扩大但形貌不变;晶体2反应前期生长稳定,但反应进行到390 min时,可以看到晶体虽然呈立方体状,但明显其中一个晶面生长更快;晶体3是由两个相邻单晶聚集生长而成的,在反应的前210 min内均以各自的初始形貌稳定生长,随着反应进行,两个晶体逐渐结合在了一起并以结合时的形态进一步扩大生长。

在反应过程中,可以观测到显微镜聚焦所在层面上的细菌数量逐渐减少,且细菌的运动性也逐渐降低。是因为注入的反应液中不含培养基,细菌没有得到持续的营养物供应,细菌生命活动受到抑制,在代谢结束后陆续衰亡并沉积。细菌死亡后不再分泌脲酶,碳酸钙的生长也因受到了反应物的限制而逐渐减缓,18h后液滴内的MICP反应基本结束,碳酸钙基本停止生长,同时溶液中运动的细菌大大减少,多数已处于静止状态。

对碳酸钙晶体进行图像处理来进一步量化碳酸钙的生长情况<sup>[37]</sup>。由于液滴内的晶体在显微镜观测视角下的平面形状没有显著变化,本研究即以碳酸钙的平面面积来表示晶体的生长情况。使用ImageJ软件,采用Otsu阈值方法,对不同反应时间的碳酸钙图像进行二值化处理,然后通过统计像素点数量来对识别出的碳酸钙进行面积计算。

图5中的3处晶体在生长过程中的面积变化情况

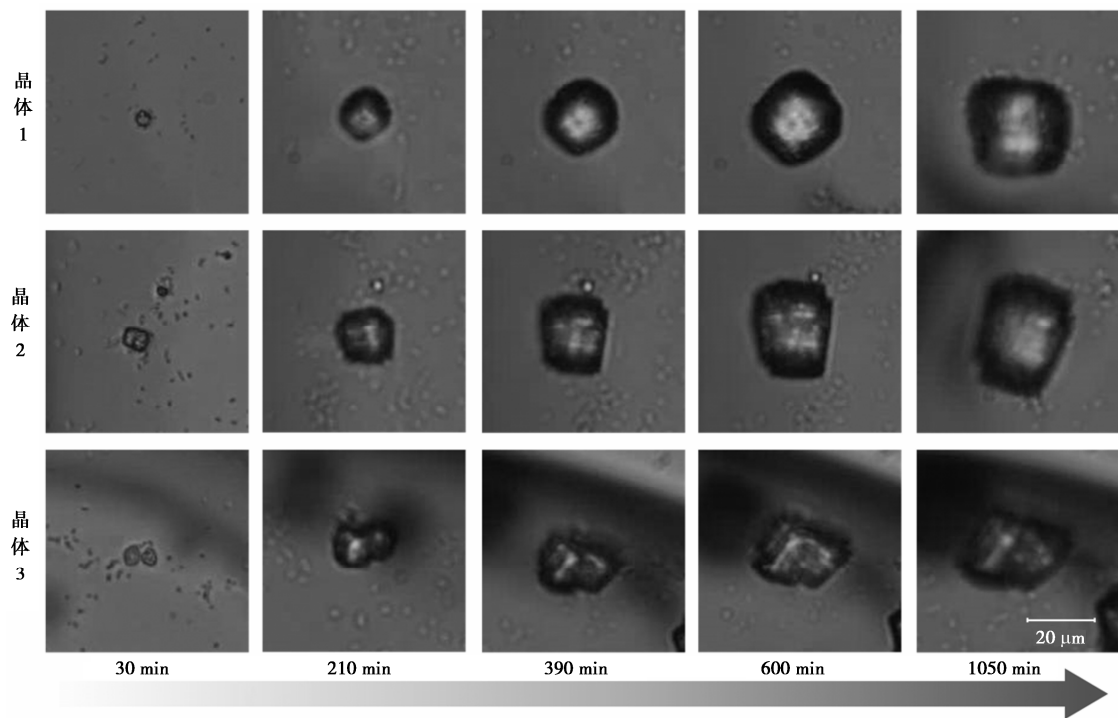


图 5 碳酸钙单晶生长过程

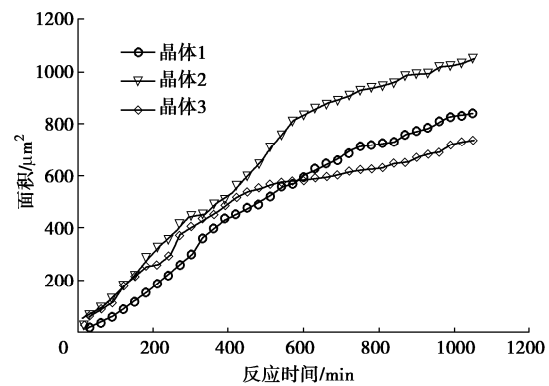
Fig. 5 Process of single crystal growth of calcium carbonate

如图 6 (a) 所示, 其中晶体 3 的面积以晶体总数面积计算。反应 30 min 时, 晶体 1 面积最小, 而在整个生长过程中, 晶体 1 的面积也始终小于晶体 2, 晶体 1 生长速率更稳定, 形貌不变; 晶体 2 在反应 400~500 min 间, 其中一轴方向的生长速率较另一轴更快, 在图 6 (a) 中可以看到, 在这段时间内其面积增加更快, 推测是因为该液滴内的其他晶体对其产生了扰动, 晶体周边离子及细菌分泌物的变化均会影响晶体的生长过程, 600 min 后晶体形貌趋于稳定并继续等比扩大增长, 其生长速率也趋于稳定; 晶体 3 在单晶结合前各单晶生长速率也较稳定, 结合后速率有所减缓, 但增长同样较稳定。

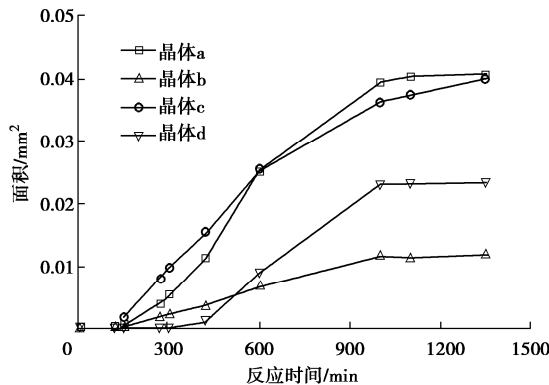
将液滴中碳酸钙的生长情况与在微流控管道内持续注浆情况下的碳酸钙生长情况<sup>[38]</sup>进行对比, 如 6(b) 所示, 可以看到持续注浆时碳酸钙生长快速, 1200 min 后晶体 a 和 c 均可生长至 0.04 mm<sup>2</sup>, 但由于该体系不是纯溶液环境, 受反应条件影响, 晶体形貌复杂。液滴是封闭的纯溶液体系, 生成的晶体形貌规则, 但随着反应进行, 反应物被消耗, 碳酸钙的最终尺寸会受到限制; 而持续向微流控管道中注浆可以提供充足的反应物, 以促进反应的进一步进行。

此外, 对不同微腔室内的液滴进行观测统计, 发现在可视情况下, 晶体主要以单晶形式生长, 部分晶体因初始结晶位置较接近, 持续生长并相互接触后会进一步结合为一个整体, 但晶体的结晶位置和结晶时

间均无明显规律。



(a) 液滴中碳酸钙晶体生长情况



(b) 持续注浆下碳酸钙晶体生长情况<sup>[38]</sup>

图 6 碳酸钙单晶生长情况

Fig. 6 Growth of single crystal of calcium carbonate

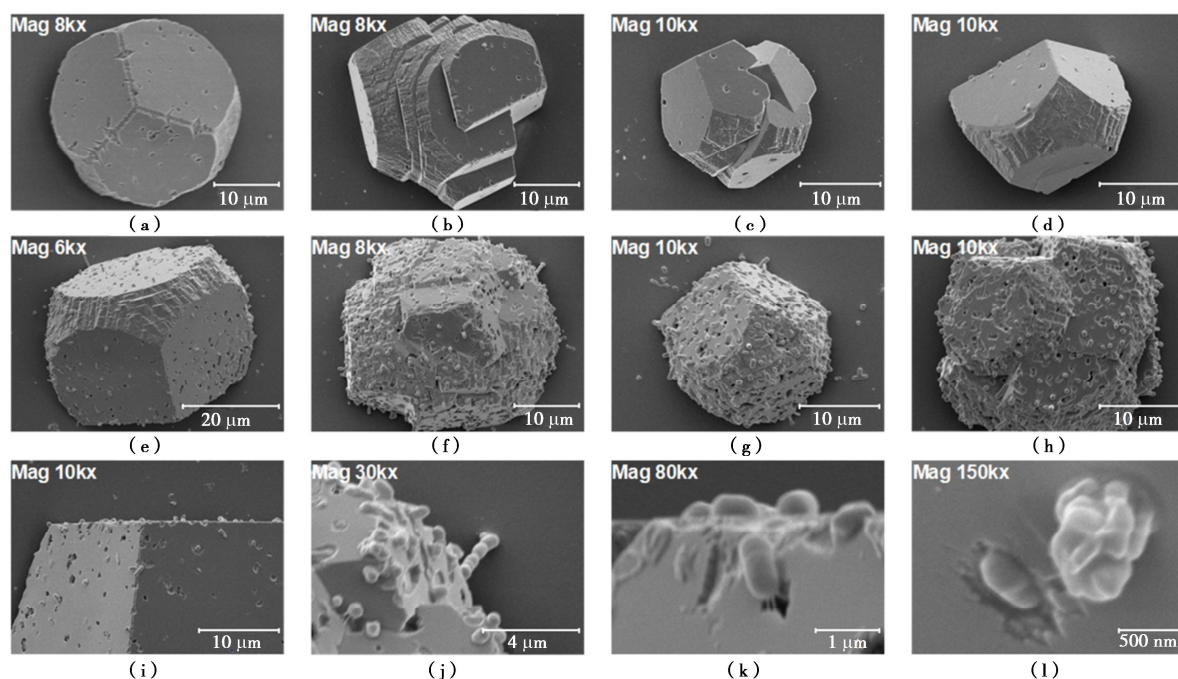


图 7 液滴内不同层面的碳酸钙及其表面细菌的 SEM 图像

Fig. 7 SEM images of calcium carbonate and its surface bacteria in different horizontal planes of droplet

## 6 液滴内碳酸钙的形貌

反应结束后,使用无水乙醇冲洗芯片及内部管道,随后进行真空干燥。将芯片管道层和基底层剥离,对通道内碳酸钙进行扫描电镜 (SEM) 测试,如图 7 所示,可以观测碳酸钙单晶的形貌及晶体表面细菌的形态。

图 7 (a) ~ (d) 为液滴上层生成的晶体,图 7 (e) ~ (h) 为液滴下层的晶体,晶体形貌均为立方体状。上层晶体粒径为 20~30  $\mu\text{m}$ ,晶棱清晰,晶面整体光滑平整,生长稳定,表面可见部分细菌碎片及细菌留下的孔洞;下层晶体粒径为 20~40  $\mu\text{m}$ ,晶粒尺寸普遍大于上层,晶体表面粗糙且存在大量细菌孔洞,多数晶体形貌不规则,例如图 7 (h) 所示晶体其晶面为台阶状,晶棱不清晰,结构复杂。由于液滴内不含细菌生长所需的营养物质,随着反应进行,细菌活性逐渐降低,在衰亡过程中因重力作用逐渐下沉,所以下层晶体吸附的细菌细胞也更多,这也是当显微镜聚焦在液滴内某一层面时,观测到该层面的细菌数量在反应后期逐渐减少的原因,同时也说明,细菌细胞会显著影响晶体的表面形貌,且细菌数量越多影响越大。

对下层晶体表面的细菌进一步放大观察,如图 7 (i) ~ (l) 所示,可以看到部分形态完整的细菌细胞和大量细菌碎片。从图 7 (k) 中可以看到,细菌吸

附在碳酸钙表面并出现了拉伸现象。由于静电作用,在晶体生长过程中部分细菌吸附到晶体表面,会导致晶体出现掺杂的现象,细菌作为碳酸钙生长体系的“杂质”改变了晶体的晶格结构,影响晶面的均匀生长,吸附至晶体表面的细菌溶解后,即在碳酸钙上留下了与细菌同形状、大小的孔洞,若细菌数量过多,则会进一步改变晶体的形貌,如图 7 (f) 所示,该晶体结构复杂,晶面不连续,晶体表面吸附了大量细菌细胞。

## 7 讨 论

本文采用液滴微流控技术实现了微尺度下的细菌生命活动状态和碳酸钙生长过程的实时观测,明确了微生物矿化过程中细菌群的运动、分布情况,以及碳酸钙晶体形貌的变化规律。结果表明,碳酸钙可以在没有细菌分布的区域内结晶,与早期文献认为细菌悬浮液与胶结液混合后,细菌因为细胞壁带负电荷而立即聚集为絮凝体的结论<sup>[39]</sup>不同,本文观测到细菌在整个矿化过程中均没有出现聚集现象,其运动模式也无明显变化,细菌细胞本身不是碳酸钙成核位点的必要条件,实验结果与目前普遍认为细菌细胞壁吸附钙离子<sup>[40]</sup>,进而以细菌细胞为成核位点生成碳酸钙晶体<sup>[8]</sup>的研究结果不一致,细菌在晶体成核中的具体作用需要进一步研究。

在对碳酸钙晶体的生长过程进行原位实时观测时发现,晶体均为立方体形貌,且在整个生长过程中形

貌均无显著变化, 这与 Xiao<sup>[41]</sup>的观测结果一致, 说明 MICP 的反应过程较温和, 晶体生长稳定, 但晶体结晶位置无规律; 晶体均以单晶形态独立生长, 少数晶体因结晶点距离较近, 在生长过程中相互接触后进一步发展为聚集生长; 此外, 根据晶体的分布位置, 推测相邻晶体之间存在的作用力<sup>[42]</sup>也会影响晶体的生长过程, 如导致某一晶面的生长速率更快。在本次试验中, 每个液滴内均生成了多个晶体, 所以未能对单晶成核速率进行探究。后续可以通过调控反应条件, 使每个液滴内只生成一个晶体, 即可对 MICP 的结晶过程开展更详细的研究。

矿化反应结束后, 对生成的碳酸钙晶体进行扫描电镜测试, 可以观测到晶体均为立方体, 晶体表面可见吸附的细菌以及与细菌同尺寸的孔洞, 且吸附的细菌越多, 晶面形貌越粗糙, 晶体越不规则, 表面呈复杂“阶梯态”。密集附着的细菌会影响尿素水解过程中氨的生成速率<sup>[43]</sup>从而影响晶体的生长, 细菌附着作用对晶体形貌的影响效果值得更深入的研究。

在晶体生长过程中, 由于微生物反应过程复杂, 细菌的活性状态以及晶体的生长过程受环境因素的影响较大, 晶体的最终形貌个体间存在较大差异, 不同反应条件下的细菌在碳酸钙结晶过程中的作用也有待进一步探究。

## 8 结论和展望

在微流控 MICP 可视化系统的基础上, 进一步搭建了精度更高、反应条件更可控的液滴微流控平台, 并对液滴中的微生物矿化过程进行了初步观测, 得到 3 点结论。

(1) 液滴微流控技术在微生物矿化可视化研究中具有可行性。采用自主设计的液滴微流控芯片将 MICP 反应液包裹在分散的液滴内, 在微流控可视系统中可以实现对液滴内的细菌分布及碳酸钙生长过程的实时观测。

(2) 不相溶两相流体的流速对液滴的生成特性具有显著影响。控制分散相流速不变, 调节连续相, 随着速率的增加, 液滴的尺寸逐渐变小; 控制连续相流速不变, 调节分散相, 随着流速的增加, 流速比变大, 液滴直径也越来越大; 液滴尺寸主要取决于流速比( $u_{\text{水}}/u_{\text{油}}$ )的变化, 油相流速对液滴尺寸影响更大, 液滴尺寸越小越不稳定。

(3) 大部分晶体的结晶位置未观测到细菌, 细菌在整个矿化过程中均没有出现聚集现象, 随着 MICP 反应进行, 晶体尺寸逐渐扩大, 形貌不变; 在晶体生长过程中, 部分细菌吸附到晶体表面并在碳酸钙上留

下了与细菌同形状、大小的孔洞, 细菌细胞本身对晶体表面形貌影响较大。

由于生物反应过程复杂, 结晶影响因素多, 液滴微流控技术在矿化机理分析方面呈现了良好优势, 如: 该技术可以快速生成大量单分散液体微球, 简单高效, 有利于定量研究的开展; 液滴相互独立, 为微生物反应提供了一个封闭的微环境, 受外力影响小, 对反应条件的控制更精准, 稳定性好; 液滴的生成特性可控, 可以制备出适用于生成碳酸钙单晶、碳酸钙聚集体等不同溶剂量要求的微反应单元。液滴微流控技术在研发集合控制和检测装置芯片时需要交叉融合微液滴力学原理、微流体力学原理、生物矿化结晶动力学等诸多学科, 需要进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] GUIDO A, SPOSATO M, PALLADINO G, et al. Biomineralization of primary carbonate cements: a new biosignature in the fossil record from the Anisian of Southern Italy[J]. *Lethaia*, 2022, **55**(1): 1-21.
- [2] COSMIDIS J, BENZERARA K. Why do microbes make minerals?[J]. *Comptes Rendus Géoscience*, 2022, **354**(G1): 1-39.
- [3] JIMENEZ-MARTINEZ J, NGUYEN J, OR D. Controlling pore-scale processes to tame subsurface biomineralization[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2022, **21**(1): 27-52.
- [4] 崔昊, 肖杨, 孙增春, 等. 微生物加固砂土弹塑性本构模型[J]. *岩土工程学报*, 2022, **44**(3): 474-482. (CUI Hao, XIAO Yang, SUN Zengchun, et al. Elastoplastic constitutive model for biocemented sands[J]. *Chinese Journal of Geotechnical Engineering*, 2022, **44**(3): 474-482. (in Chinese))
- [5] BINDSCHEDLER S, CAILLEAU G, VERRECCHIA E. Role of fungi in the biomineralization of calcite[J]. *Minerals*, 2016, **6**(2): 41.
- [6] O'DONNELL S T, HALL C A, KAVAZANJIAN E Jr, et al. Biogeochemical model for soil improvement by denitrification[J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2019, **145**(11): 04019091.
- [7] SCHÄDLER S, BURKHARDT C, HEGLER F, et al. Formation of cell-iron-mineral aggregates by phototrophic and nitrate-reducing anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, **26**(2): 93-103.
- [8] ANBU P, KANG C H, SHIN Y J, et al. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple



- applications[J]. SpringerPlus, 2016, **5**: 250.
- [9] SIDDIQUE R, CHAHAL N K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties[J]. Construction and Building Materials, 2011, **25**(10): 3791-3801.
- [10] NAWARATHNA T H K, NAKASHIMA K, KAWABE T, et al. Artificial fusion protein to facilitate calcium carbonate mineralization on insoluble polysaccharide for efficient biocementation[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021, **9**(34): 11493-11502.
- [11] XIAO Y, WANG Y, DESAI C S, et al. Strength and deformation responses of biocemented sands using a temperature-controlled method[J]. International Journal of Geomechanics, 2019, **19**(11): 04019120.
- [12] XIAO Y, HE X A, ZAMAN M, et al. Review of strength improvements of biocemented soils[J]. International Journal of Geomechanics, 2022, **22**(11): 03122001.
- [13] 刘汉龙, 赵 常, 肖 杨. 微生物矿化反应原理、沉积与破坏机制及理论: 研究进展与挑战[J/OL]. 岩土工程学报, 1-12[2024-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1124.tu.20230601.2133.011.html>. (LIU Hanlong, ZHAO Chang, XIAO Yang. Reaction principle, deposition and failure mechanisms and theory of biomineralization: progress and challenges[J/OL]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 1-12[2024-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1124.tu.20230601.2133.011.html>. (in Chinese))
- [14] BENZERARA K, MIOT J, MORIN G, et al. Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization[J]. Comptes Rendus Geoscience, 2011, **343**(2/3): 160-167.
- [15] ZHANG W C, JU Y, ZONG Y W, et al. In situ real-time study on dynamics of microbially induced calcium carbonate precipitation at a single-cell level[J]. Environmental Science & Technology, 2018, **52**(16): 9266-9276.
- [16] GAO X, HAN Y, XIA Q Y, et al. Combined effects of microorganisms and inorganic templates on the nucleation and precipitation of magnesium-calcium minerals: experimental evidences and theoretical calculations[J]. Applied Surface Science, 2022, **598**: 153813.
- [17] DECLET A, REYES E, SUAREZ O M. Calcium carbonate precipitation: a review of the carbonate crystallization process and applications in bioinspired composites[J]. Reviews on Advanced Materials Science, 2016, **44**(1): 87-107.
- [18] YAN H X, OWUSU D C, HAN Z Z, et al. Extracellular, surface, and intracellular biomineralization of bacillus subtilis daniel-1 bacteria[J]. Geomicrobiology Journal, 2021, **38**(8): 698-708.
- [19] WANG J M, YAO S N. The study on calcium carbonate mimetic biomineralization in the chitosan/phospholipid/cholesterol system[J]. Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2001, **17**(2): 202-208.
- [20] AZULAY D N, CHAI L. Calcium carbonate formation in the presence of biopolymeric additives[J]. Journal of Visualized Experiments, 2019(147): e59638.
- [21] RUI Y F, QIAN C X. The regulation mechanism of bacteria on the properties of biominerals[J]. Journal of Crystal Growth, 2021, **570**: 126214.
- [22] BRAISSANT O, CAILLEAU G, DUPRAZ C, et al. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids[J]. Journal of Sedimentary Research, 2003, **73**(3): 485-490.
- [23] KUMARI N T H. Enhancement of microbially induced carbonate precipitation using organic biopolymer[J]. International Journal of GEOMATE, 2018, **14**(41): 7-12.
- [24] 赵 常, 何 想, 胡 冉, 等. 微生物矿化动力学理论与模拟[J]. 岩土工程学报, 2022, **44**(6): 1096-1105. (ZHAO Chang, HE Xiang, HU Ran, et al. Kinetic theory and numerical simulation of biomineralization[J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2022, **44**(6): 1096-1105. (in Chinese))
- [25] XIAO Y, XIAO W T, WU H R, et al. Fracture of interparticle MICP bonds under compression[J]. International Journal of Geomechanics, 2023, **23**(3): 04022316.
- [26] CAI G Z, XUE L, ZHANG H L, et al. A review on micromixers[J]. Micromachines, 2017, **8**(9): 274.
- [27] WEINHARDT F, DENG J X, HOMMEL J, et al. Spatiotemporal distribution of precipitates and mineral phase transition during biomineralization affect porosity-permeability relationships[J]. Transport in Porous Media, 2022, **143**(2): 527-549.
- [28] XIAO Y, CAO B F, SHI J Q, et al. State-of-the-art review on the application of microfluidics in biogeotechnology[J]. Transportation Geotechnics, 2023, **41**: 101030.
- [29] 何 想. 基于微流控技术的微生物矿化胶结时空演化规律研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2021. (HE Xiang. Spatiotemporal Evolution of Biomineralized Cementation Based on Microfluidics[D]. Chongqing: Chongqing

- University, 2021. (in Chinese))
- [30] 何 想, 马国梁, 汪 杨, 等. 基于微流控芯片技术的微生物加固可视化研究[J]. 岩土工程学报, 2020, **42**(6): 1005-1012. (HE Xiang, MA Guoliang, WANG Yang, et al. Visualization investigation of bio-cementation process based on microfluidics[J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2020, **42**(6): 1005-1012. (in Chinese))
- [31] WHIFFIN V S. Microbial  $\text{CaCO}_3$  Precipitation for the Production of Biocement[D]. Perth: Murdoch University, 2004.
- [32] LIN H, SULEIMAN M T, BROWN D G, et al. Mechanical behavior of sands treated by microbially induced carbonate precipitation[J]. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 2016, **142**(2): 04015066.
- [33] FUJITA M, NAKASHIMA K, ACHAL V, et al. Whole-cell evaluation of urease activity of *Pararhodobacter* sp. isolated from peripheral beachrock[J]. Biochemical Engineering Journal, 2017, **124**: 1-5.
- [34] YI H H, ZHENG T W, JIA Z R, et al. Study on the influencing factors and mechanism of calcium carbonate precipitation induced by urease bacteria[J]. Journal of Crystal Growth, 2021, **564**: 126113.
- [35] CUI M J, ZHENG J J, ZHANG R J, et al. Influence of cementation level on the strength behaviour of bio-cemented sand[J]. Acta Geotechnica, 2017, **12**(5): 971-986.
- [36] PHILLIPS A J, GERLACH R, LAUCHNOR E, et al. Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review[J]. Biofouling, 2013, **29**(6): 715-733.
- [37] XIAO Y, HE X, WU W, et al. Kinetic biomineralization through microfluidic chip tests[J]. Acta Geotechnica, 2021, **16**(10): 3229-3237.
- [38] 何 想, 刘汉龙, 韩 飞, 等. 微生物矿化沉积时空演化的微流控芯片试验研究[J]. 岩土工程学报, 2021, **43**(10): 1861-1869. (HE Xiang, LIU Hanlong, HAN Fei, et al. Spatiotemporal evolution of microbial-induced calcium carbonate precipitation based on microfluidics[J]. Chinese Journal of Geotechnical Engineering, 2021, **43**(10): 1861-1869. (in Chinese))
- [39] WANG Y, SOGA K, DE J J, et al. Microscale visualization of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) processes by different treatment procedures[C]// IS-Atlanta 2018 Geo-Mechanics from Micro to Macro-ISSMGE TC 105, Atlanta, 2018.
- [40] EL MOUNTASSIR G, LUNN R J, MOIR H, et al. Hydrodynamic coupling in microbially mediated fracture mineralization: formation of self-organized groundwater flow channels[J]. Water Resources Research, 2014, **50**(1): 1-16.
- [41] XIAO Y, HE X A, STUEDLEIN A W, et al. Crystal growth of MICP through microfluidic chip tests[J]. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering, 2022, **148**(5): 06022002.
- [42] LI A, CHANG J, SHUI T, et al. Probing interaction forces associated with calcite scaling in aqueous solutions by atomic force microscopy[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2023, **633**: 764-774.
- [43] CUTHBERT M O, RILEY M S, HANDLEY-SIDHU S, et al. Controls on the rate of ureolysis and the morphology of carbonate precipitated by *S. Pasteurii* biofilms and limits due to bacterial encapsulation[J]. Ecological Engineering, 2012, **41**: 32-40.