

黄龙嗜冷细菌胞外琥珀酸组分对碳酸钙矿化的影响

李骐言¹, 李琼芳¹, 代群威², 赵学钦², 安德军³, TENG Huihenry⁴

(1. 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 2. 西南科技大学 固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010; 3. 黄龙国家级风景名胜管理局, 四川 松潘 623300; 4. 美国乔治华盛顿大学 化学系, Washington, DC, 20052, USA)

摘要:为探索黄龙钙华的生物成因, 本研究以黄龙嗜冷细菌的胞外特征有机酸组分——琥珀酸为研究对象, 通过模拟黄龙水体的低温沉积环境, 利用 X 射线粉末衍射 (XRD) 和扫描电镜 (SEM), 考察了琥珀酸对钙化体系中的钙化动力学过程、碳酸钙晶型和形貌的影响。结果表明: ① 高浓度琥珀酸、低 pH 值、低温都会在一定程度上抑制碳酸钙沉积。② 高浓度琥珀酸可以诱导球霏石型碳酸钙的形成; ③ 高温促进了体系中碳酸钙微晶的聚合。综上所述, 黄龙嗜冷细菌的胞外琥珀酸组分在一定程度上参与了碳酸钙的沉积过程, 对晶体的晶型和形貌具有一定的调控作用。其结果可为黄龙钙华生物成因的探究提供理论基础。

关键词: 碳酸钙, 黄龙嗜冷细菌, 琥珀酸, 钙化速率, 晶型和形貌

中图分类号: P578.6; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2013)06-0773-09

The effects of extracellular succinic acid of psychrotrophic bacteria isolated from Huanglong on the calcification process of calcium carbonate at low temperatures

LI Qi-yan¹, LI Qiong-fang¹, DAI Qun-wei², ZHAO Xue-qin², AN De-jun³ and TENG Hui-henry⁴

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 2. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle, Ministry of Education, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 3. Huanglong National Scenic Spot Administration, Songpan 623300, China; 4. Department of Chemistry, George Washington University, Washington, DC 20052, USA)

Abstract: In order to explore the biogenic theory of Huanglong travertine, the authors studied succinic acid, the typical extracellular organic acid of psychrotrophic bacteria isolated from Huanglong. By simulating the low-temperature sedimentary environments of Huanglong water body, the authors investigated the effects of succinic acid on the calcification kinetics as well as the morphology and polymorphism of CaCO₃. Scanning electron microscope (SEM) and X-ray diffraction (XRD) were used to characterize the morphology and polymorphs of CaCO₃ precipitation. The results were listed as follows: ① High concentration, low pH value and temperature inhibit the calcification to a certain extent. ② High concentration of succinic acid induces the formation of vaterite. ③ High temperature improves the aggregations of microcrystals. In conclusion, succinic acid, as the typical extracellular organic acid of Huanglong psychrotrophic bacteria, participates in the process of sedimentation to a certain extent and plays a role in regulating the morphology and polymorphism of CaCO₃. The results can provide a

收稿日期: 2013-08-30; 修订日期: 2013-10-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41040004); 国家自然科学基金重点资助项目(41130746)

作者简介: 李骐言(1988-), 女, 研究生在读, 研究方向为环境微生物, E-mail: leeqiyan@163.com; 通讯作者: 李琼芳(1973-), 女, 副教授, 博士, 主要从事环境微生物相关研究, E-mail: liqiongfang1992@126.com.

basis for biogenic theory of Huanglong travertine.

Key words: CaCO₃; Huanglong psychrotrophic bacteria; succinic acid; calcification rate; morphology and polymorphs

碳酸钙作为自然界中丰富的矿化资源之一,其合成过程往往受到生命活动的影响。而微生物作为地球化学循环的主要参与者,与碳酸钙的沉积过程密切相关(Brehm *et al.*, 2003; Kenward *et al.*, 2009; Sanchez-Moral *et al.*, 2012)。一般认为,微生物碳酸盐岩的形成是胞外分泌物对游离的钙离子粘附、捕捉的结果(温志峰等, 2004; 韩作振等, 2009)。为此大量体外模拟矿化的研究相继展开,主要是通过添加生物提取物或人工合成物的方式来探究生物组分对碳酸钙晶型和形貌的影响。Tourney等(2009)发现 *Bacillus licheniformis* S-86 的胞外聚合物(EPS)抑制了球霏石型碳酸钙的形成。Xie等(2005a)、Manoli等(2002)研究发现不同氨基酸对碳酸钙晶体生长的影响各异。可见生物基质对碳酸钙晶体的成核和生长具有一定的调控作用。

黄龙作为我国享负盛名的钙华景观之一,其钙华成因机制仍在不断的探索之中(郭建强等, 2002; 刘再华等, 2003; 周绪论, 2006; 李永新等, 2011),目前,研究内容还主要集中在地质成因的探讨上,以CO₂来源成因为主要争论焦点。就生物成因而言,藻类以其庞大的生物量及独特的生理代谢方式被研究的最为广泛,一般认为藻类主要通过着色(傅华龙等, 1989)改变水体CO₂分压(王福星等, 1998)以及分泌粘性有机质(王福星等, 1993)等方式来影响碳酸钙的沉积。然而,对存在于水体中的大量嗜冷微生物(如嗜冷细菌),其生命活动在钙华沉积过程中的参与程度仍未见报道。笔者在前期工作中发现黄龙水体中的嗜冷细菌有着惊人的数量和极显著的生物多样性,因而这些嗜冷细菌必然会或多或少地参与到钙华的形成过程中。通过对分离自黄龙水体嗜冷细菌的胞外有机酸组分分析,发现琥珀酸为其特征组分之一。而有机酸往往被认为具有一定的溶蚀性,其对碳酸钙晶体成核和生长方面的研究还不够完善。鉴于此,本文系统研究了琥珀酸在模拟黄龙水体环境下对碳酸钙钙化体系中的动力学过程、碳酸钙晶型和形貌的影响,为探究嗜冷细菌在黄龙钙华成因中的参与程度及作用机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

主要试剂有CaCl₂、NaHCO₃、琥珀酸,均为分析纯,购自成都科龙化工试剂厂。

主要仪器有荷兰飞利浦X'Pert PRO型X射线衍射仪(XRD)、Leica Cambridge LTD S440型扫描电子显微镜(SEM)、美国ThermoFisher iCAP6500型等离子发射光谱仪(ICP)、赛多利斯BSA₁₂4S型分析天平、BANTE PHS-3CW台式数显酸度计。

1.2 测试方法

据黄龙水质特性分析结果,分别设定Ca²⁺、HCO₃⁻浓度为330 mg/L和1000 mg/L。溶液体积为60 mL,钙化反应于静置的培养瓶(300 mL)中进行。

以前期琥珀酸含量测定结果为据,依次设定琥珀酸浓度分别为22 mg/L(S1)、44 mg/L(S2)、88 mg/L(S3)、176 mg/L(S4)。

以黄龙水质分析结果为据,分别调制体系的初始pH值为6.5、7、7.5、8、8.5和9。

以黄龙水温测定结果为据,分别设置体系温度为5℃、8℃、11℃和14℃。

用ICP测定体系Ca²⁺浓度的变化,从沉积第2天起,每两天测定1次,重复3次。用衰减指数方程 $[Ca^{2+}] = e^{kt} + l$ (张道勇等, 2008)对体系钙化动力学过程进行拟合,其中 $[Ca^{2+}]$ 为钙离子浓度, t 为时间, k 为钙化速率常数。

收集沉积一天后的碳酸钙沉淀,去离子水冲洗3次,自然干燥后用XRD进行晶型表征;在培养瓶底部放置洁净盖玻片,沉积一天后用SEM进行晶体形貌观察。

2 结果与分析

2.1 琥珀酸浓度的影响

由图1a可看出,体系中琥珀酸浓度增加并没有导致相应钙离子浓度的减少,表明琥珀酸的加入抑制了钙离子的沉积,低浓度琥珀酸对碳酸钙的沉积

作用影响较小(如 S1、S2),但随着浓度的增加,影响作用加大,因而钙化作用受到了明显的抑制。同时钙化速率也随着琥珀酸浓度的增加而表现出依次降低,当浓度增加到最高时(S4),体系钙化速率降低到只有对照组的 56%(图 1b),这可能是因为琥珀酸的加入降低了体系的初始 pH 值,加入量越多,体系的

初始 pH 值降低越明显(图 1c),而低 pH 值则抑制了碳酸钙的沉积。从图 1c 还可看出各琥珀酸体系的 pH 值在第一天迅速增高,此后变化缓慢,并随着沉积时间的延长最终在 7.9~8.1 范围内波动,这可能是由于第一天为碳酸钙的最快沉积时段,期间溶液迅速释放 CO_2 ,促使溶液的 pH 值快速升高。

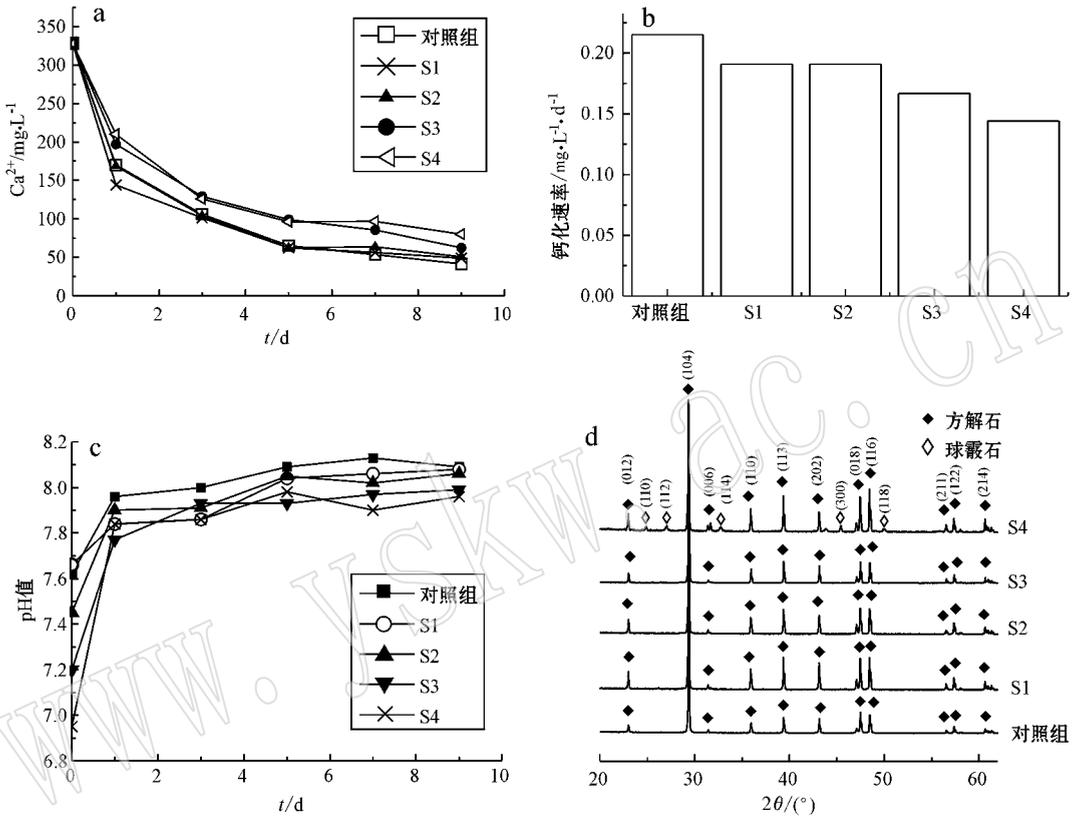


图 1 不同浓度的琥珀酸对钙化体系的影响

Fig. 1 The effects of succinic acid with different concentrations on the calcification system
a— Ca^{2+} 浓度随时间变化曲线; b—钙化速率; c—pH 值随时间变化曲线; d—碳酸钙的 XRD 图谱

a—curve of Ca^{2+} concentration variation with time; b—calcification rate; c—curve of pH variation with time; d—XRD spectrum of CaCO_3

由 XRD 结果(图 1d)可知,在较低浓度琥珀酸作用下,碳酸钙沉积物仅出现了方解石的特征衍射峰,衍射角度 $2\theta = 23.0^\circ, 29.4^\circ, 31.4^\circ, 35.9^\circ, 39.3^\circ, 43.1^\circ, 47.5^\circ, 48.5^\circ$ 处分别对应方解石(012) λ (104) λ (006) λ (110) λ (113) λ (202) λ (018) λ (116)晶面;当浓度进一步增加(S4),除方解石的衍射峰外,还出现了球霏石(110) λ (112) λ (114) λ (300) λ (118)等晶面的特征衍射峰,这表明有球霏石型晶体的生成,此结论在 SEM 观察结果中得到了证实。

由 SEM 结果(图 2)可知,随着琥珀酸浓度的增加,晶体的数量和形貌都发生了明显的变化。低浓度(S1)下,体系中方解石的菱面体形态发育不完善,

粒径约 $3\sim 20\ \mu\text{m}$ (图 2a),放大后可见晶体边缘呈阶梯层状(图 2b)。当琥珀酸浓度增至 S4 时,晶体数量明显减少,体系由大量的菱面体形态的方解石和少量的球霏石组成(图 2c),且球霏石粒径($3\sim 8\ \mu\text{m}$)明显小于方解石粒径($10\sim 30\ \mu\text{m}$)。球霏石晶体呈“球形卡片状”,表现为多孔疏松外观(图 2d)。

2.2 初始 pH 值的影响

根据前面的研究结果,176 mg/L (S4)浓度下体系合成了球霏石晶型的碳酸钙,故将此浓度作为后续实验部分的琥珀酸统一处理浓度。

由图 3a 可知,处理 9 d 后,低 pH 值(6.5)条件下体系中的钙离子浓度明显高于其他高 pH 值条件,

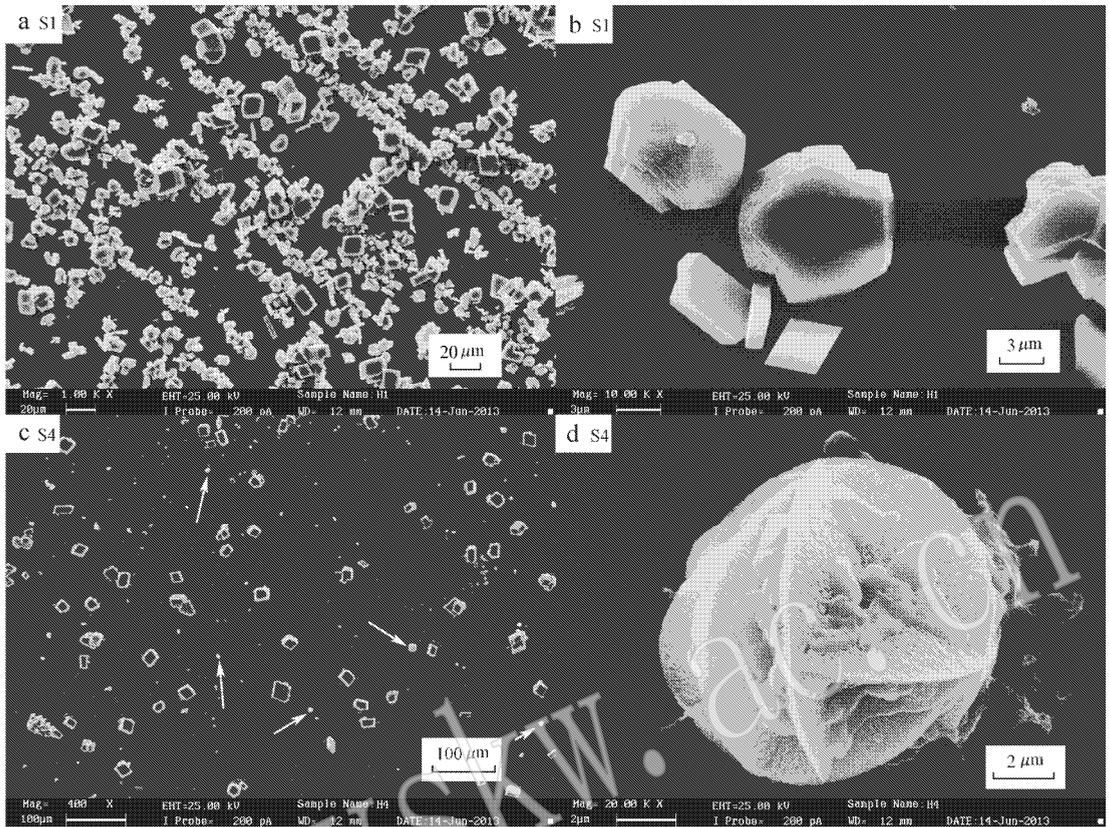


图 2 不同浓度的琥珀酸处理下碳酸钙的 SEM 照片

Fig. 2 SEM imagines of CaCO_3 obtained under different concentrations

表明低 pH 值抑制了钙化体系中碳酸钙的沉积。随着 pH 值升高,钙化速率逐渐增高, pH=9 时体系的钙化速率为 pH=6.5 时的 2.5 倍(图 3b)。图 3c 表示的是各体系的 pH 值变化规律,在沉积第一天时各体系 pH 值迅速调整至 7.9 左右,随着沉积时间的延长, pH 值变化趋于平缓。这可能是由于在酸性环境中 H^+ 抑制了 HCO_3^- 的解离,使反应朝 CO_2 生成方向推进,而 CO_2 的逸出促使体系 pH 值升高,而碱性条件下, OH^- 与 HCO_3^- 反应生成 H_2O 和 CO_3^{2-} ,致使体系 pH 值迅速下降。

由 XRD 结果显示,不同 pH 值体系均只出现了方解石的特征衍射峰,衍射角度 $2\theta = 23.0^\circ, 29.4^\circ, 35.9^\circ, 39.3^\circ, 43.1^\circ, 47.5^\circ, 48.5^\circ$ 处分别对应方解石 (012) (104) (110) (113) (202) (018) (116) 晶面(图 3d)。由 SEM 图片可知(图 4),在 pH=6.5 时,出现了不规则纺锤形、圆形、椭圆形及菱面体形貌晶体;在 pH=7.5 时,形成了不规则粒状体、菱面体聚集体和极少量的球状结构的晶体(图 4b 箭头所示)这同 S4 直接作用结果类似,而 pH=9 时只观察

到了方解石的菱面体形态(图 4c)。尽管出现了球状结构的碳酸钙晶体,但只有方解石信号被检出,究其原因,推测为以下两点:合成球霏石晶体含量较少,以致信号无法检出,球霏石不稳定,在水中极易向方解石、文石相转变(Manoli and Dalas, 2000)。综上,不同初始 pH 值下加入琥珀酸,能对钙化体系中碳酸钙形貌进行多样调控,但就其对晶型的影响结果来看,只能确定沉积产物主要为方解石型碳酸钙。

2.3 温度的影响

根据课题组前期对黄龙沟水质现场测定的结果,发现地表水的 pH 值常年保持在 7.5 左右,因而将体系初始 pH 值统一设置为 7.5,以考察温度对琥珀酸钙化体系的影响。

由图 5a 可知,相比于低温体系(5℃、8℃),高温体系(11℃和 14℃)中钙离子浓度在沉积过程中下降得更快,变化较大。同时升高温度一定程度上促进了钙化速率的增加(图 5b)。可见高温条件有利于碳酸钙的沉积。不同温度下的 pH 值都趋于升高,最后稳定在 8.1 附近。

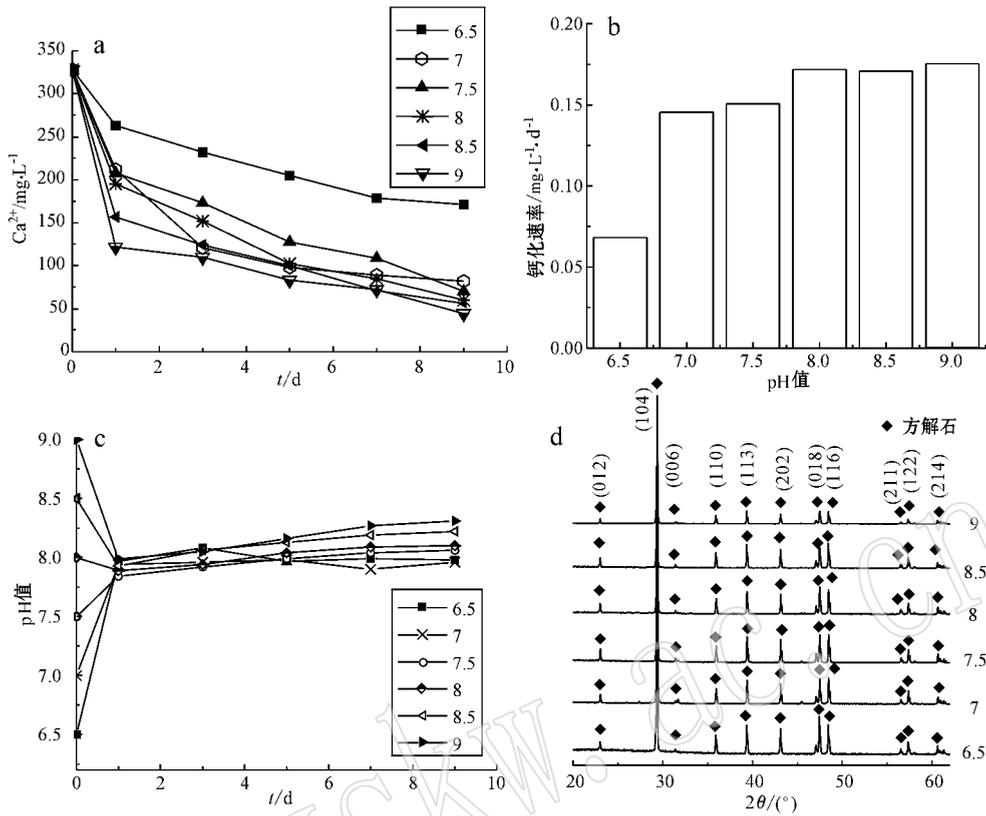


图 3 初始 pH 值对琥珀酸钙化体系的影响

Fig. 3 Effects of initial pH on the calcification system of succinic acid

a— Ca^{2+} 浓度随时间变化曲线；b—钙化速率；c—pH 值随时间变化曲线；d—碳酸钙的 XRD 图谱

a—curve of Ca^{2+} concentration variation with time ; b—calcification rate ; c—curve of pH variation with time ; d—XRD spectrum of $CaCO_3$

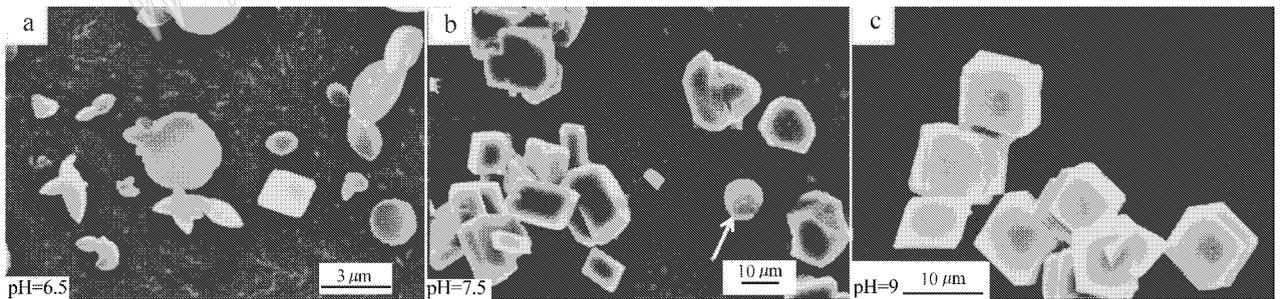


图 4 琥珀酸浓度为 176 mg/L 时不同初始 pH 值影响下碳酸钙的 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of $CaCO_3$ obtained at different initial pH values in the presence of 176 mg/L succinic acid

由图 5d 可以看出,不同温度影响下,碳酸钙沉积物的 XRD 图谱基本一致,检出结果为方解石晶型。衍射角度 $2\theta = 23.0^\circ, 29.4^\circ, 35.9^\circ, 39.3^\circ, 43.1^\circ, 47.5^\circ, 48.5^\circ$ 时的衍射峰分别对应方解石 (012) (104) (110) (113) (202) (018) (116) 晶面。结合 SEM 扫描图谱发现,除了大量的棱角不规则的粒状体外,体系还出现了少量的球状结构晶体(图 6c),这

与 2.2 实验结果类似,同样只能确定温度影响下,琥珀酸钙化体系中沉积产物主要为方解石型碳酸钙。此外,高温 (14℃) 体系的晶体数量较低温 (5℃) 体系多(图 6a, 6c),且随着温度的升高,碳酸钙晶体出现了明显的聚合现象(图 6b, 6d),此结果与钙化速率结果吻合,表明高温会促进碳酸钙的沉积。

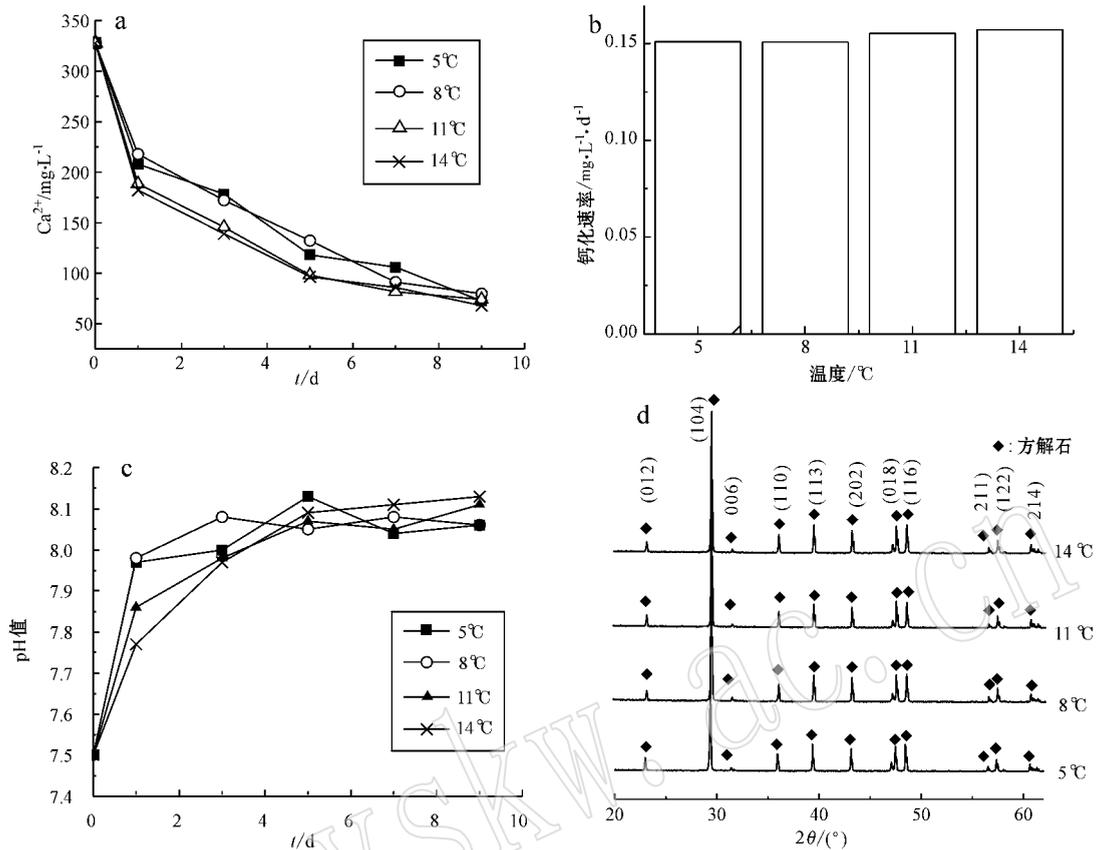


图 5 温度对琥珀酸钙化体系的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the calcification system of succinic acid

a— Ca^{2+} 浓度随时间变化曲线 ; b—钙化速率 ; c—pH 值随时间变化曲线 ; d—碳酸钙的 XRD 图谱a—curve of Ca^{2+} concentration variation with time ; b—calcification rate ; c—curve of pH variation with time ; d—XRD spectrum of CaCO_3

3 讨论

琥珀酸作为三羧酸循环中重要的中间产物,其对需氧生物生长代谢活动的维持具有重要的意义。笔者在前期的研究工作中发现黄龙嗜冷细菌可以高产琥珀酸,为本实验钙华生物成因的探究提供了重要依据。琥珀酸往往被认为具有一定的溶蚀性而很少作为碳酸钙的晶型控制剂而研究。但其分子中的两个羧基基团,不仅可以通过整合钙离子为碳酸钙的成核提供位点,其对晶粒特定晶面的的选择性吸附也会对晶体的晶型和形貌产生一定的影响(Liang *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005b; Huang *et al.*, 2007)。

3.1 浓度对钙化体系的影响

琥珀酸的加入抑制了碳酸钙的沉积,且抑制程度随着浓度的升高明显增强。这可能是由于弱酸环

境抑制了 HCO_3^- 的解离,使得钙离子大部分以 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 形式存在。另外,随着浓度的增大,更多的羧基以 H 键的形式与晶体表面的氧原子结合,键合有同种官能团的粒子间排斥作用增强,一定程度上抑制了碳酸钙的结晶(董倩倩 2011)。

琥珀酸对碳酸钙晶型和形貌的影响也受浓度的调控,在较低浓度处理下,方解石晶体菱面体形态发育不完善,这种形貌的形成可能与 $-\text{COO}^-$ 选择性吸附有关, $-\text{COO}^-$ 通过吸附于晶面的活性生长位点,扰乱了晶格的排布规律,致使棱角呈阶梯迭层状。随浓度增高至 S4 后,体系中同时出现了方解石和球霏石两种晶型,且球霏石粒径 ($3\sim 8\ \mu\text{m}$) 明显小于方解石粒径 ($10\sim 30\ \mu\text{m}$)。笔者认为这可能就是球霏石逐渐转变为方解石的“证据”,球霏石具有较高的内能,极不稳定,在体系中不断溶出钙离子,在过饱和条件下,钙离子的浓度升高必然会促进碳酸钙的沉积,因而溶出的钙离子很快被用于方解石的生长,致使二

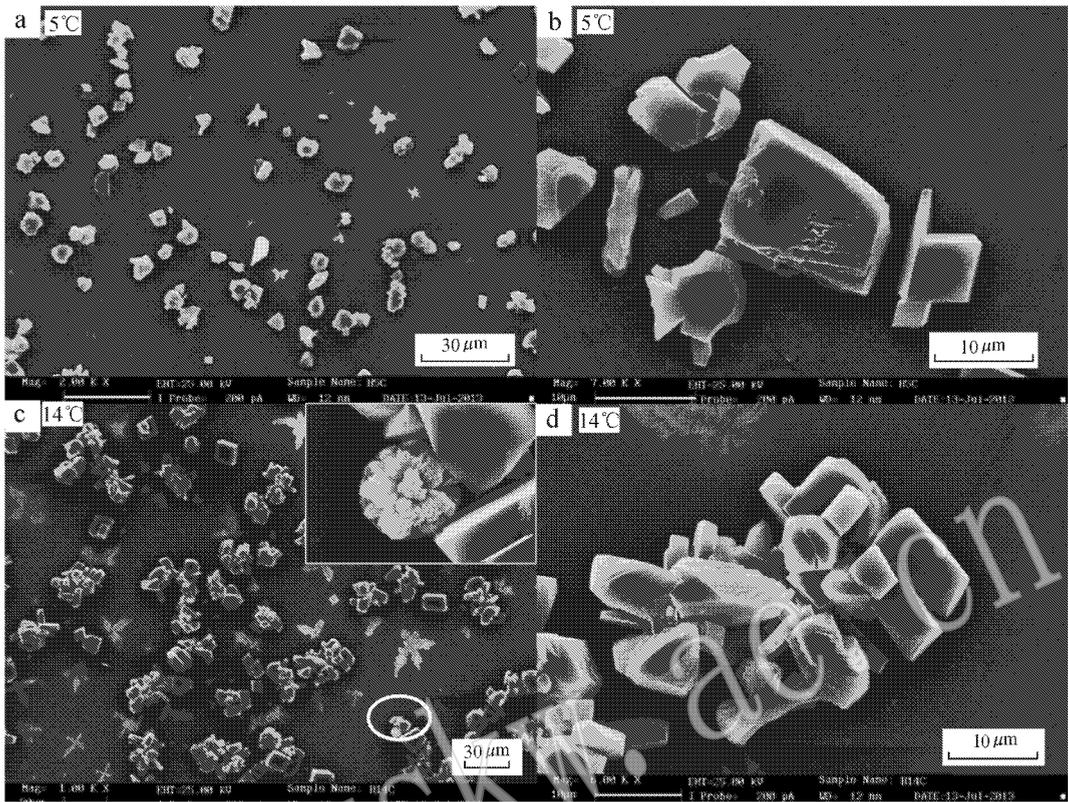


图 6 琥珀酸浓度为 176 mg/L (pH=7.5) 时不同温度影响下碳酸钙的 SEM 照片

Fig. 6 SEM images of CaCO_3 obtained in the presence of 176 mg/L succinic acid at the initial pH=7.5 at different temperatures

者粒径差异明显。另外,实验体系 Ca^{2+} 、 HCO_3^- 设置浓度很低,可能也不足以合成足量的晶体以供球霏石信号的检出,使得后续的 pH 值和温度影响实验中,琥珀酸钙化体系未检出球霏石晶型,与电镜观察结果不相符,但可以确定的是在本实验设置的浓度范围内, pH 值和温度对碳酸钙的晶型并没有太大的影响,主要合成了方解石型碳酸钙。

3.2 初始 pH 值对钙化体系的影响

低 pH 值环境明显抑制了体系的钙化过程,而高 pH 值一定程度上促进了钙化作用的发生。碳酸钙作为难溶性电解质,其溶度积(K_{sp})为饱和溶液中 Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 浓度的乘积,为一特征常数。而溶液中各组分(H_2CO_3 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-})组成比同 pH 值存在一定的函数关系(Dreybrodt, 1988),在酸性条件下,体系中 CO_3^{2-} 活度降低,主要以 HCO_3^- 组分存在,此时 Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 离子积(IP)小于 K_{sp} ,溶液体系不饱和,促使碳酸钙溶蚀作用的发生。而碱性条件下,体系 CO_3^{2-} 活度增加,IP 大于 K_{sp} ,溶液过饱和,促进了碳酸钙的沉积。刘再华等(2005)在分析岩溶系统 CaCO_3 - CO_2 - H_2O 的平衡化学中也提到,酸

效能增加方解石溶解度而碱效应则相反促进了方解石的沉积,与本研究结果相符合。初始 pH 值对琥珀酸体系中碳酸钙晶型影响不明显(只检测到方解石晶型),但不同的 pH 值对碳酸钙晶体的形貌调控作用有差异。pH 值为 6.5 时,体系合成了不同形貌的晶体,而随着 pH 值的增高,形貌种类趋向单一,如 pH=9 时,仅观察到了菱面体形态的晶体。这说明酸性条件更利于多样晶貌的合成,初步推测是弱酸环境对碳酸钙的溶蚀作用的结果。

3.3 温度对钙化体系的影响

温度对琥珀酸体系中的 CaCO_3 晶型影响不大,产物主要为方解石型。但较高的温度在一定程度上促进了碳酸钙的沉积,究其原因,可能主要由以下两方面引起:温度的上升增大了 HCO_3^- 解离常数(杨妍妍, 2006),促使体系中 CO_3^{2-} 浓度增大,碳酸钙不断沉积;较高的温度降低了体系的 P_{CO_2} (Buttler, 1982),促进了溶液中 CO_2 的释放,使 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 不断地向 CaCO_3 合成方向推进。此外,在高温处理下,钙化体系还观察到了明显的晶体聚合现象。这可能是由于高温条件下,体系合成了更多的微小晶粒,这

些微小晶粒往往具有较高的表面能,促使它们不得以聚合的方式来改变这一不稳定的状态(Tong *et al.*, 2004)。

4 结论

(1) 低浓度琥珀酸体系合成了菱面体形态发育不完善的方解石型晶体, 棱边呈阶梯层状, 而高浓度琥珀酸可以诱导球霏石型碳酸钙的形成。

(2) 初始 pH 值的改变对碳酸钙晶型无显著影响, 主要为方解石晶型, 但对晶体形貌具有一定的调控作用。pH 值为 6.5 时, 体系合成了多样形貌的碳酸钙晶体, 但随着 pH 值的增高, 形貌种类趋向单一, 当 pH=9 时, 仅观察到了菱面体形态的晶体。

(3) 温度对碳酸钙晶型影响不大, 主要合成了方解石型碳酸钙。但高温一定程度上促进了体系中碳酸钙微晶的聚合。

(4) 高浓度琥珀酸、低 pH 值、低温都会在一定程度上抑制碳酸钙沉积。

以上结果为探究黄龙钙华的生物成因提供了一定的理论依据。然而, 黄龙嗜冷细菌的其它代谢组分, 如氨基酸、多糖及蛋白质, 它们在钙华沉积过程中的参与程度仍不明确, 还需进一步的探索研究。

References

Brehm U, Krumbein W E and Palinska K A. 2003. Microbial spheres: A novel cyanobacterial-diatom symbiosis [J]. *Naturwiss*, 90: 136~140.

Buttler J N. 1982. Carbon Dioxide Equilibria and Their Applications [M]. Addison-Wesley Publishing Company: 1~259.

Dong Qianqian. 2011. Study on the effects of magnetic field and environmental friendly agents on crystallization process and crystal of calcium carbonate [D]. Hebei: Hebei Normal University (in Chinese).

Dreybrodt W. 1988. Processes in Karst Systems [M]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 288.

Fu Hualong, Han Fushan, Zhou Xulun, *et al.* 1989. The phycophyta in travertine landscape of Huanglong, Sichuan [J]. *Resource Development & Protection*, 5(3): 40~41, 44 (in Chinese).

Guo Jianqiang, Peng Dong and Yang Junyi. 2002. A study of water circulation and genesis of travertine landscape in Huanglong [J]. *Acta Geologica Sichuan*, 22(1): 21~26 (in Chinese).

Han Zuozhen, Chen Jitao, Chi Naijie, *et al.* 2009. Microbial carbonates: A review and perspectives [J]. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 29(4): 29~37 (in Chinese).

Huang Y, Shen Q, Sui W, *et al.* 2007. Peanut-shaped aggregation of CaCO₃ crystallites in the presence of an amphiphilic derivative of carboxymethylchitosan [J]. *Colloid and Polymer Science*, 285(6): 641~647.

Kenward P A, Goldstein R H, Gonzalez L A, *et al.* 2009. Precipitation of low-temperature dolomite from an anaerobic microbial consortium: The role of methanogenic Archaea [J]. *Geobiology*, 7(5): 556~565.

Li Yongxin, Tian Youping and Li Yin. 2011. Tufa algae and biological karstification at Huanglong, Sichuan [J]. *Carsologica Sinica*, 30(1): 86~92 (in Chinese).

Liang P, Zhao Y, Shen Q, *et al.* 2004. The effect of carboxymethyl chitosan on the precipitation of calcium carbonate [J]. *Journal of Crystal Growth*, 261: 571~576.

Liu Zaihua, Yuan Daoxian, He Shiyi, *et al.* 2003. Origin and forming mechanisms of travertine at Huanglong Ravine of Sichuan [J]. *Geochimica*, 32(1): 1~10 (in Chinese).

Liu Zaihua, Dreybrodt W, Han Jun, *et al.* 2005. Equilibrium chemistry of the CaCO₃-CO₂-H₂O system and discussion [J]. *Carsologica Sinica*, 24(1): 1~14 (in Chinese).

Manoli F and Dalas E. 2000. Spontaneous precipitation of calcium carbonate in the presence of chondroitin sulfate [J]. *Journal of Crystal Growth*, 217(4): 416~421.

Manoli F, Kanakis J, Malkaj P, *et al.* 2002. The effect of aminoacids on the crystal growth of calcium carbonate [J]. *Journal of Crystal Growth*, 236(1~3): 363~370.

Sanchez-Moral S, Portillo M C, Janices I, *et al.* 2012. The role of microorganisms in the formation of calcitic moonmilk deposits and speleothems in Altamira Cav [J]. *Geomorphology*, 139~140: 285~292.

Tong H, Ma W T, Wang L L, *et al.* 2004. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a l-aspartic acid inducing process [J]. *Biomaterials*, 25(17): 3 923~3 929.

Tourney J and Ngwenya B T. 2009. Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO₃ morphology and polymorphism [J]. *Chemical Geology*, 262(3~4): 138~146.

Wang Fuxing, Cao Jianhua and Huang Junfa. 1998. Do Stromatolites occur in the dark-zone of karst caves? [J]. *Carsologica Sinica*, 17(3): 278~284 (in Chinese).

Wang Fuxing, Cao Jianhua, Huang Junfa, *et al.* 1993. Biokars [M]. Beijing: Geological Publishing House, 1~130 (in Chinese).

Wen Zhifeng, Zhong Jianhua, Li Yong, *et al.* 2004. Current study on genesis and formation conditions of stromatolites [J]. *Geological Journal of China Universities*, 10(3): 418~428 (in Chinese).

Xie A J, Shen Y H, Zhang C Y, *et al.* 2005a. Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems [J]. *Journal of Crystal Growth*, 285(3, 1): 436~443.

Xie A J, Yuan Z W and Shen Y H. 2005b. Biomimetic morphogenesis of

calcium carbonate in the presence of a new amino-carboxyl-chelating-agent[J]. *Journal of Crystal Growth*, 27(1~2):265~274.

Yang Yanyan. 2006. A study of the formation and evolution of the Wengluo hot spring and Precipitation mechanism of the nearby tuaf in Bobai, Guangxi[D]. Beijing: China University of Geosciences(in Chinese).

Zhang Daoyong, Pan Xiangliang, Zhang Jingmei, et al. 2008. Effects of environmental factors on calcification kinetics of *Synechocystis* sp. [J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 27(2): 105~110(in Chinese).

Zhou Xulun. 2006. A discussion on genesis of CO₂ in the Huanglong travertine, Sichuan[J]. *Acat Geologica Sichuan*, 26(3): 143~146 (in Chinese).

附中文参考文献

董倩倩. 2011. 磁场与环保型药剂对碳酸钙结晶过程及晶型影响的研究[D]. 河北:河北师范大学.

傅华龙, 韩福山, 周绪纶, 等. 1989. 四川黄龙钙华景观中的藻类植物[J]. *资源开发与保护*, 5(3):40~41, 44.

郭建强, 彭东, 杨俊义. 2002. 松潘黄龙水循环及钙华景观成因研

究[J]. *四川地质学报*, 22(1):21~26.

韩作振, 陈吉涛, 迟乃杰, 等. 2009. 微生物碳酸盐岩研究: 回顾与展望[J]. *海洋地质与第四纪地*, 29(4):29~37.

李永新, 田友萍, 李银. 2011. 四川黄龙钙华藻类及其生物岩溶作用[J]. *中国岩溶*, 30(1):86~92.

刘再华, 袁道先, 何师意, 等. 2003. 四川黄龙沟景区钙华的起源和形成机理研究[J]. *地球化学*, 32(1):1~10.

刘再华, Drey brodt W, 韩军, 等. 2005. CaCO₃-CO₂-H₂O 岩溶系统的平衡化学及其分析[J]. *中国岩溶*, 24(1):1~14.

王福星, 曹建华, 黄俊发. 1998. 洞穴黑暗带中有无叠层石?[J]. *中国岩溶*, 17(3):278~284.

王福星, 曹建华, 黄俊发, 等. 1993. 生物岩溶[M]. 北京:地质出版社, 1~130.

温志峰, 钟建华, 李勇, 等. 2004. 叠层石成因和形成条件的研究综述[J]. *高校地质学报*, 10(3):418~428.

杨妍妍. 2006. 广西博白温罗温泉形成演化与钙华沉积机制研究[D]. 北京:中国地质大学.

张道勇, 潘响亮, 张京梅, 等. 2008. 环境因子对 *Synechocystis* sp. 钙化动力学的影响[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 27(2):105~110.

周绪纶. 2006. 关于四川黄龙钙华 CO₂ 成因的讨论[J]. *四川地质学报*, 26(3):143~146.

www.yskw.com