

黄龙嗜冷细菌两种胞外单糖对碳酸钙矿化影响

于璐嘉, 李琼芳, 陈超, 吕治州, 王旭辉

(西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010)

摘要: 为了探究黄龙水体中嗜冷细菌的胞外代谢产物对钙华沉积速率及沉积产物的影响, 本文从黄龙钙华水体中分离到优势土著嗜冷细菌, 并以其标志性胞外代谢产物 D-葡萄糖和 D-核糖作为研究对象, 研究了两种单糖组分在低温环境下对钙华沉积的影响, 并通过 X 射线衍射 (XRD)、扫描电子显微镜 (SEM)、红外吸收光谱 (FT-IR) 等分析手段对碳酸钙晶型、形貌以及结构组成进行了表征。实验表明: D-葡萄糖在低温条件下能促进方解石型碳酸钙的沉积, 并加快沉积速率。低浓度下 (20 mg/L 和 40 mg/L) 的沉积产物均为方解石型碳酸钙并对其形貌有一定的影响; 高浓度下 (80 mg/L 和 160 mg/L) 能诱导少量的文石型碳酸钙的合成。D-核糖在低温条件下能促进碳酸钙的沉积, 加快沉积速率。与 D-葡萄糖不同, D-核糖仅能合成方解石型碳酸钙, 但对方解石晶面的生长表现为抑制作用, 且随浓度增大抑制作用益明显。此结果可为黄龙钙华生物成因的探究提供一定的理论研究基础。

关键词: 嗜冷细菌; 单糖组分; 碳酸钙沉积; 晶型和形貌

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2018)03-0497-08

The effects of two kinds of extracellular monosaccharides on the mineralization of calcium carbonate

YU Lu-jia, LI Qiong-fang, CHEN Chao, LÜ Zhi-zhou and WANG Xu-hui

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

Abstract: In order to explore the effect of extracellular metabolites of psychrophilic bacteria in Huanglong water on the travertine deposition rate and deposition products, the authors started with the Huanglong travertine water isolated advantage of indigenous psychrophilic bacteria, and took its landmark extracellular metabolites D-glucose and D-ribose as the object of study. The effects of two kinds of monosaccharide components on the deposition of travertine were investigated and, by means of X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscope (SEM), infrared absorption spectroscopy (FT-IR) analysis, the types of calcium carbonate crystal morphology and structural composition were characterized. The results are as follows: D-glucose could promote the deposition of calcite-type calcium carbonate at low temperature and accelerate the deposition rate. The deposition products of low concentration (20 mg/L, 40 mg/L) were all calcite calcium carbonate and had a certain effect on their morphology; high concentrations (80 mg/L and 160 mg/L) could induce the synthesis of small amounts of aragonite calcium carbonate. D-ribose could promote the deposition of calcium carbonate at low temperature and accelerate the deposition rate. Unlike D-glucose, D-ribose could only synthesize calcite-type calcium carbonate, but it was an inhibitory effect on the growth of calcite crystal face, and its inhibitory effect was obvious with increasing concentration. The results can

收稿日期: 2017-09-04; 接受日期: 2017-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41472309, 41572035)

作者简介: 于璐嘉(1992-), 男, 汉, 在读硕士研究生, 环境微生物矿化, E-mail: 822510483@qq.com; 通讯作者: 李琼芳(1973-), 女, 副教授, 博士, 环境微生物生态学, E-mail: liqiongfang1992@126.com。

provide a theoretical basis for the exploration of Huanglong travertine.

Key words: psychophilic bacteria; monosaccharide components; calcium carbonate deposition; crystal form and morphology

Fund support: National Natural Science Foundation of China(41472309, 41572035)

黄龙风景区以其美丽和独特的钙华景观为世人所熟知,并于1992年被联合国教科文组织列为世界自然遗产。而近年来,众多的国内外学者对黄龙风景区钙华景观的形成产生了极大的兴趣并开始从多方面进行探索。得出结论认为钙华景观是由 $\text{CaCO}_3\text{-H}_2\text{O-CO}_2$ 三相互相作用形成的(杨俊义等,2004)。同时有学者认为,生物因素的影响也不可忽视(戴永定等,1995),即水中存在的藻类和微生物通过呼吸作用和光合作用对大气和水体的 CO_2 分压进行调节,通过改变水体中溶解的无机碳和pH值,对碳酸钙饱和度进行调控,以控制沉积作用的发生。同时研究发现,藻类和微生物分泌的胞外产物在一定程度上也能对 CaCO_3 的沉积产生影响。田友萍等(1998)通过对九寨沟等地的石灰华生物成因的探索,发现微生物对石灰石沉积的发生和形成具有调控作用。

胞外聚合物(EPS)是微生物分泌于体外并附着于微生物细胞表面的一类有机多聚物(Alan *et al.*, 2009),其中含有有机酸、氨基酸、多糖、蛋白质、核酸等多种化学组分。而这些化学组分上富含着大量的负电官能团,包括羟基、羧基、磷酸基等,同时也存在大量的正电官能团(如氨基酸基团)。这些官能团能够通过静电、晶核几何匹配、立体化学互补等作用,使其对无机矿物的成核及形貌具有调控作用(张刚生等,2000)。近年来,已相继报道了一些关于胞外聚合物对碳酸钙矿物晶型和形貌调控的研究结果(李骐言等,2013; Kawaguchi and Decho, 2002)。

目前有关黄龙风景区钙华成因的相关报道相对较少,前人曾在黄龙水体中发现大量的藻类和约为 10^6 cfu/mL的嗜冷微生物,李骐言等(2013)曾对嗜冷微生物EPS进行了分析,发现含有大量的有机酸、氨基酸并有糖类存在,遂利用黄龙嗜冷菌株的EPS特征琥珀酸组分进行了碳酸钙的诱导沉积,结果发现不仅沉积出了方解石,而且还沉积出了文石和球霏石两种不同种类的碳酸钙矿物。除此之外,还对特征柠檬酸组分进行了碳酸钙诱导沉积,结果表明柠檬酸主要诱导合成棒状方解石碳酸钙沉积,并且其浓度、pH值、温度对碳酸钙沉积均有一定的影响(李琼芳等,2015)。本文采用的D-葡萄糖和D-核糖

均来自于黄龙嗜冷微生物的胞外特征代谢产物。因此本文通过模拟黄龙沉积环境,探讨嗜冷细菌特征单糖组分在低温环境下对碳酸钙沉积的影响,此结果可为黄龙钙华生物成因的探究提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器

主要试剂有 CaCl_2 、 NaHCO_3 、D-葡萄糖、D-核糖等,均为分析纯试剂。主要仪器包括ThermoFisher iCAP6500型等离子发射光谱仪(ICP); PANalytical X'Pert PRO型X射线衍射仪(XRD); Nicolet-5700(傅里叶变换)红外吸收光谱仪(FT-IR); Leica Cambridge LTD S440型扫描电子显微镜(SEM); 赛多利斯BSA124S型分析天平; BANTE PHS-3CW台式数显酸度计。

1.2 溶剂配制

本实验通过模拟黄龙水体中高浓度 Ca^{2+} 和 HCO_3^- 的沉积环境来建立矿化体系,并多次实地检测,测得 Ca^{2+} 浓度为330 mg/L, HCO_3^- 浓度为1 000 mg/L。 CaCl_2 溶液:准确称取3.639 g CaCl_2 于洁净烧杯中,用超纯水溶解并定容至1 L。 NaHCO_3 溶液:准确称取5.508 g NaHCO_3 于洁净烧杯中,用超纯水溶解并定容至1 L。 D-葡萄糖溶液:分别称取40、80、160及320 mg D-葡萄糖于洁净烧杯中,用超纯水溶解并定容至1 L。 D-核糖溶液:分别称取40、80、160及320 mg D-核糖于洁净烧杯中,用超纯水溶解并定容至1 L。

1.3 钙化体系

钙化体系所有初始数据均由黄龙水体环境实地勘测得来,因此,各个钙化体系初始pH值均设置为7.5,沉积反应环境均设置为6℃。同时,为了探讨不同的单糖组分及其浓度对碳酸钙沉积的影响,依次将D-葡萄糖浓度设置为20 mg/L(G1)、40 mg/L(G2)、80 mg/L(G3)和160 mg/L(G4);同样,D-核糖浓度依次设置为20 mg/L(R1)、40 mg/L(R2)、80

mg/L (R3) 和 160 mg/L (R4)。

A 实验组: 先于培养瓶底部放置 2~3 张洁净盖玻片, 再分别加入 30 mL 各浓度 D-葡萄糖和 D-核糖溶液、15 mL NaHCO₃ 和 CaCl₂ 溶液于培养瓶中, 静置于 6℃ 培养箱。

B 空白组: 先于培养瓶底部放置 2~3 张洁净盖玻片, 再分别加入 30 mL 超纯水、15 mL NaHCO₃ 和 CaCl₂ 溶液于培养瓶中, 静置于 6℃ 培养箱。

1.4 钙离子浓度的测定、晶型的表征及形貌的表征

在沉积第 2 天后, 每隔 48 h 测定 1 次各钙化体系中 Ca²⁺ 浓度 (ICP), 重复 3 次并取其平均值。通过指数衰减方程 $[Ca^{2+}] = e^{kt+b}$ (张道勇等, 2008) 对各体系钙化动力学过程进行拟合, 式中, $[Ca^{2+}]$ 为钙离子浓度 (mg/L), t 为时间 (d), k 为钙化速率常数, $d[Ca^{2+}]/dt$ 为钙化速率 (mg/d), b 为截距。

沉积 9 天后, 收集各钙化体系中的碳酸钙沉淀, 并用超纯水洗涤 3 次, 于 50℃ 烘箱内干燥。干燥后分别用 X 射线衍射仪 (XRD) 和红外吸收光谱仪 (FT-IR) 对矿物晶型和结构组成进行表征。沉积 9

天后, 将盖玻片取出, 于 50℃ 烘箱内干燥, 干燥后用扫描电镜 (SEM) 对碳酸钙晶体的形貌进行观察。

2 结果与分析

2.1 D-葡萄糖和 D-核糖对 CaCO₃ 钙化体系的影响

2.1.1 体系中钙离子浓度变化与钙化速率的结果分析

通过各实验体系中钙离子浓度和钙化速率可以反映出钙离子的沉积速率, 结果见图 1。

图 1a 表示在 D-葡萄糖作用下钙离子浓度的变化。可知, 各浓度钙化体系中的钙离子浓度与时间呈反比, 沉积时间越长, 浓度越低。沉积 1 天时, 各浓度体系中钙离子浓度几乎相同, 说明在 1 天时间内钙离子沉降速率可能不受 D-葡萄糖影响, 沉积 4 天后, 各浓度钙化体系中钙离子浓度均低于对照组, 说明 D-葡萄糖能够在低温条件下促进碳酸钙的沉积, 加快其沉积速度, 沉积 9 天后, 除空白组外各浓度体系中钙离子浓度几乎相同, 说明钙离子降

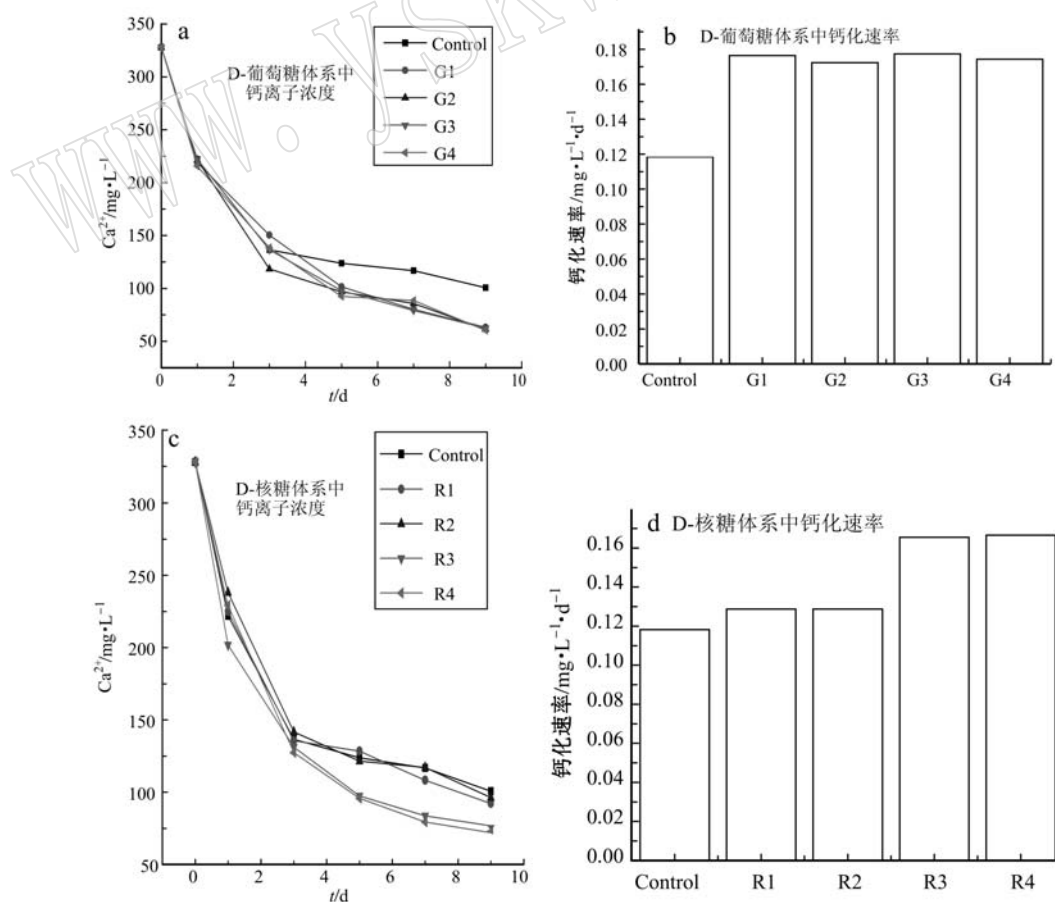


图 1 不同浓度的 D-葡萄糖和 D-核糖对钙化体系的影响

Fig. 1 The effects of D-glucose and D-ribose with different concentrations on the calcification system

低速率只与 D-葡萄糖有关,和其浓度并无直接关系。

图 1b 表示 D-葡萄糖作用下钙化速率。可知,各浓度 D-葡萄糖钙化体系中钙化速率相差无几,而对照组的钙化速率约为各浓度钙化体系的 2/3,这与上述 D-葡萄糖作用下钙离子浓度变化所得出的结论一致。

图 1c 表示在 D-核糖作用下钙离子浓度变化。可知,各浓度钙化体系中的钙离子浓度与时间呈反比,沉积时间越长,浓度越低。沉积 3 天时,各浓度钙化体系中钙离子浓度几乎相同,说明前 3 天钙离子沉降速率可能不受 D-核糖影响,沉积 3 天后,高浓度的 D-核糖钙化体系(R3 和 R4)中钙离子的浓度均低于对照组和低浓度的 D-核糖钙化体系(R1 和 R2),说明高浓度 D-核糖能够在低温条件下促进碳酸钙的沉积,并加快其沉积速度,沉积 9 天,高浓度

的 D-核糖钙化体系(R3 和 R4)中钙离子的浓度基本相同,低浓度的 D-核糖钙化体系(R1 和 R2)与对照组中钙离子的浓度也相差无几,且高浓度的 D-核糖钙化体系(R3 和 R4)中钙离子浓度均高于低浓度的 D-核糖钙化体系和对照组,说明低浓度 D-核糖对碳酸钙沉积的影响很小。

图 1d 表示 D-核糖作用下钙化速率。由图可知,低浓度的 D-核糖钙化体系(R1 和 R2)与对照组的钙化速率相差无几,而低浓度钙化体系和对照组的钙化速率约为高浓度 D-核糖钙化体系的 3/4,这与上述 D-核糖作用下钙离子浓度变化所得出的结论一致。

2.1.2 反应体系中 pH 值变化趋势

各实验组沉积过程中 pH 值的变化曲线,结果见图 2。

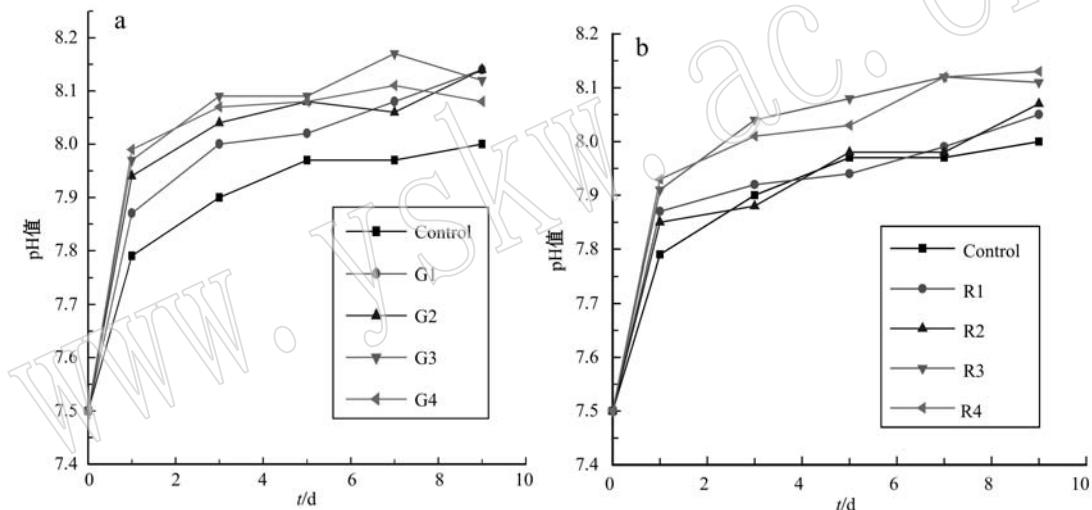


图 2 D-葡萄糖和 D-核糖钙化体系 pH 值随时间变化曲线
Fig. 2 pH versus time curve of D-glucose and D-ribose calcification system

图 2a 表示不同浓度 D-葡萄糖钙化体系中 pH 值的变化规律。由图可知,pH 值在第 1 天上升最大而且上升速度最快,沉积 5 天后,各浓度钙化体系 pH 值趋于稳定。在沉积过程中各浓度钙化体系的 pH 值均高于对照组,在达到稳定状态后,各浓度钙化体系 pH 值相差不大,均在 8.0~8.2 之间。

图 2b 表示不同浓度 D-核糖反应体系中 pH 值的变化规律。由图可知,pH 值在第 1 天上升最大而且上升速度最快,沉积 5 天后,各浓度钙化体系 pH 值趋于稳定。在沉积过程中高浓度钙化体系(R3 和 R4)的 pH 值均高于对照组、低浓度钙化体系(R1 和 R2),而且高浓度钙化体系(R3 和 R4) pH 值上升的速度比对照组、低浓度钙化体系(R1 和 R2)快,对照

组 pH 值的变化程度与低浓度(R1 和 R2)钙化体系的变化程度大抵相同。

总结:两种不同的单糖组分的 pH 值曲线的变化规律均与钙离子浓度、钙化速率的变化趋势相同。在一定程度上印证了上述结论。

2.1.3 D-葡萄糖与 D-核糖对沉积晶型变化的影响

各实验组沉积物的晶型和结构组成见图 3。

图 3a 为不同浓度 D-葡萄糖钙化体系的 XRD 图谱。由图可知,各浓度钙化体系的沉积物中均有方解石型碳酸钙(C)衍生峰的出现,并且在 G4 组还有文石型碳酸钙(A)衍射峰出现,其衍射角度 2θ 在 26.2° 、 27.2° 、 33.1° 处分别对应文石(111)、(021)、(012)等晶面,说明 G4 浓度可以诱导文石的合成,

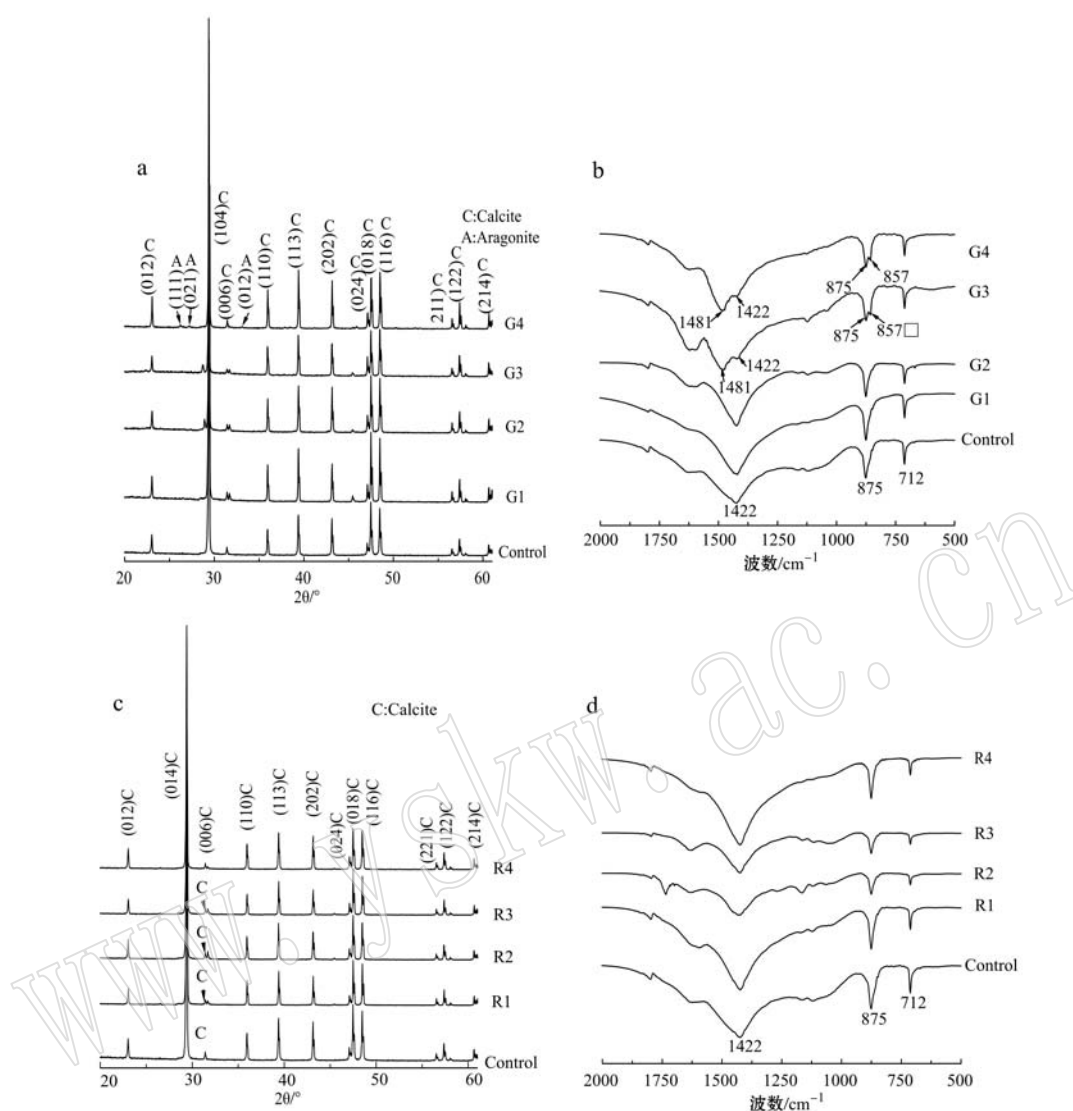


图3 不同浓度D-葡萄糖和D-核糖处理下碳酸钙晶体的XRD和FT-IR图谱
Fig. 3 XRD and FT-IR spectrum of CaCO_3 prepared with different concentrations of D-glucose and D-ribose

文石含量约为5%，而低浓度的D-葡萄糖对碳酸钙沉积物的晶体晶型及形貌影响甚微。

图3b为不同浓度D-葡萄糖钙化体系的FT-IR图谱。由图可知，各浓度钙化体系均出现的红外吸收峰为 712 cm^{-1} 处为面内弯曲振动(V4)吸收峰、 875 cm^{-1} 处为面外弯曲振动(V2)吸收峰和 1422 cm^{-1} 处为非对称伸缩振动(V3)吸收峰，这些吸收峰均为方解石型碳酸钙吸收峰。除此之外，G3和G4组出现了其他红外吸收峰，其分别为 857 cm^{-1} 处面外弯曲振动(V2)吸收峰和 1481 cm^{-1} 处不对称伸缩振动(V3)吸收峰，这2处吸收峰为文石型碳酸钙吸收峰。说明G3和G4组不仅能合成方解石型碳酸钙，而且还可以诱导文石型碳酸钙形成，结合XRD图谱结果分析，原因可能是G3组浓度略低，导致诱

导合成的文石型碳酸钙含量过少。

图3c为不同浓度D-核糖钙化体系的XRD图谱。由图可知，各浓度钙化体系的沉积物中仅有方解石型碳酸钙衍生峰的出现，说明D-核糖对碳酸钙沉积物的晶型影响很小。

图3d为不同浓度D-核糖钙化体系的FT-IR图谱。由图可知，各浓度钙化体系均出现的红外吸收峰为 712 cm^{-1} 处为面内弯曲振动(V4)吸收峰、 875 cm^{-1} 处为面外弯曲振动(V2)吸收峰和 1422 cm^{-1} 处为非对称伸缩振动(V3)吸收峰，这些吸收峰均为方解石型碳酸钙吸收峰，所以，各浓度钙化体系均仅合成方解石型碳酸钙。这与XRD图谱得出的结论一致。

2.1.4 D-葡萄糖和D-核糖对沉积晶体形貌的影响

各实验组处理后沉积物晶体的形貌见图4和

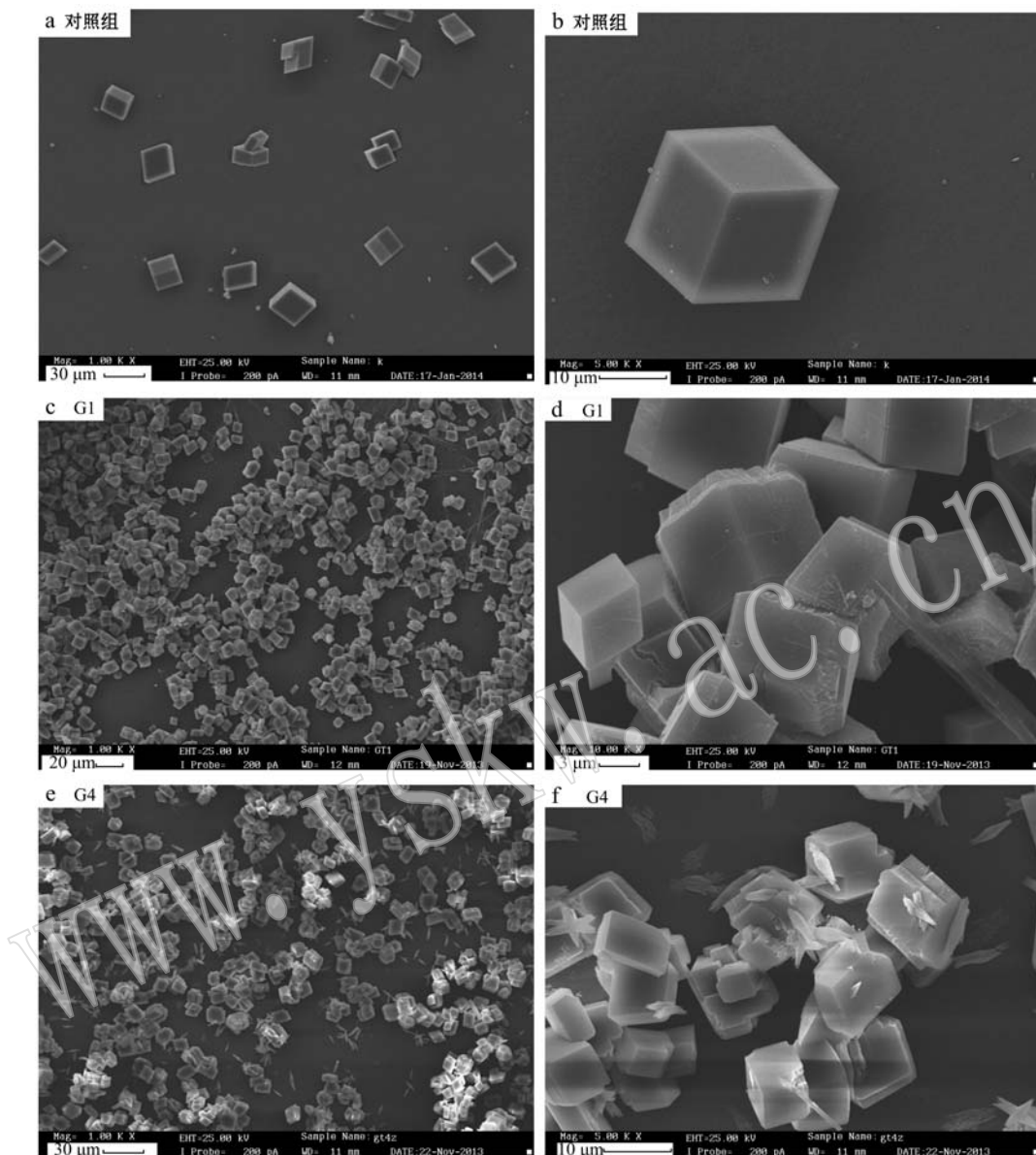


图4 不同浓度D-葡萄糖处理下碳酸钙SEM图片

Fig. 4 SEM images of CaCO_3 obtained under different concentrations of D-glucose

图5。

如图4所示,对照组合成的方解石菱面体面角发育得非常完善,其粒径大约为 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 。在低浓度D-葡萄糖(G1)的处理下,碳酸钙沉积物合成了具有典型形态的方解石菱面体,但其角落与棱边并没有发育完善,有较为明显的台阶特征,说明在低温

如图5所示,在低浓度D-核糖钙化体系(R1)处理下,体系中合成了发育不完善但有典型方解石形态的菱面体,并且还发现了部分角落呈阶梯状,是由于D-核糖在低温条件下抑制了菱面体晶面

条件下低浓度D-葡萄糖对碳酸钙晶体的形貌有一定的影响。在高浓度D-葡萄糖(G4)的处理下,碳酸钙沉积物合成了大量发育不完善并带有方解石特征的菱面体,除此,还有少量梭状形貌的晶体合成并聚集在一起成簇状团体。通过结合XRD和FT-IR图谱分析可以确定,这些梭状晶体为文石型碳酸钙晶体。(104)边缘的生长(平行于 c 轴)所致。在高浓度D-核糖钙化体系(R4)处理下,体系中合成了大量具有多面的立方体形态的菱面体,其棱角发育被抑制得尤为明显。

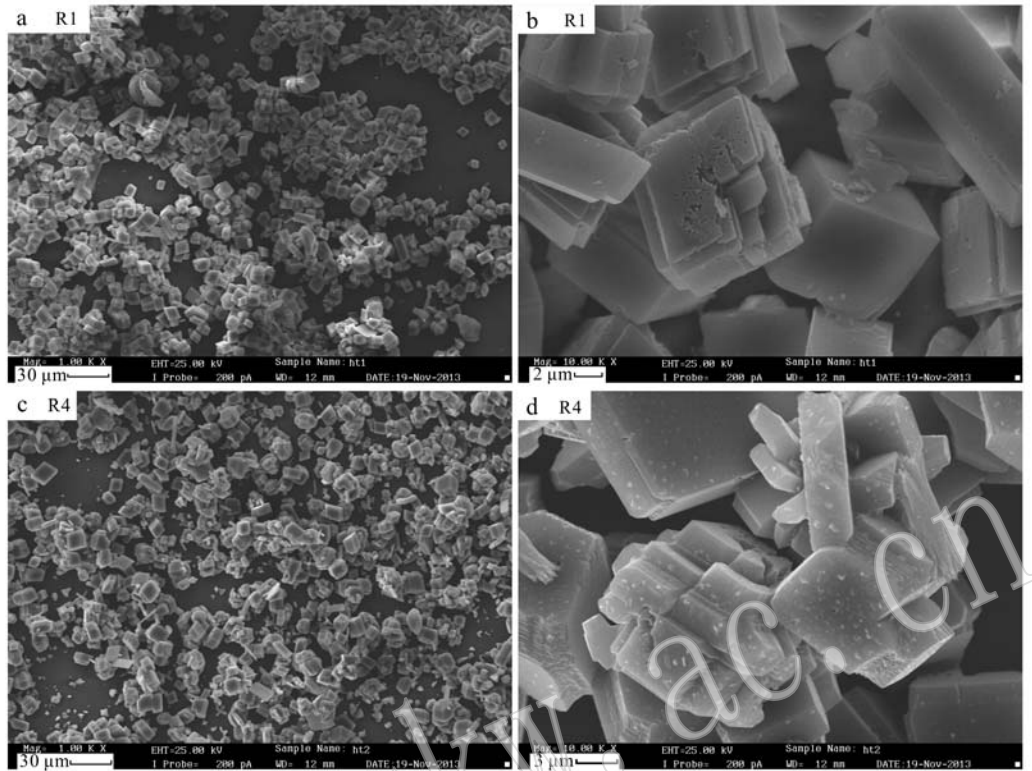


图5 不同浓度D-核糖处理下碳酸钙SEM图片

Fig. 5 SEM images of CaCO_3 obtained under different concentrations of D-ribose

3 讨论

研究EPS对碳酸钙生物矿化的影响有助于揭示生物矿化的原理。生物碳酸钙矿物中除含有无机相碳酸钙外,还含有水溶性和非水溶性有机基质, EPS与碳酸钙互相作用,从而对碳酸钙的生长、形貌等有调控作用。

EPS对碳酸钙的成核、成长、晶型以及结晶学的控制是一个十分复杂的过程。其中糖类对碳酸钙的晶型和形貌具有一定的调控作用。伊昌等(2011)研究发现控制蔗糖含量能够合成单分散性好的立方体碳酸钙。马洁等(2015)研究发现直链糖类能够影响碳酸钙的成核,而环状糖类对碳酸钙的成核及成长均有影响。

此前,本课题组也通过模拟黄龙风景区高 Ca^{2+} 和 HCO_3^- 浓度的水体环境,研究发现有机酸对碳酸钙沉积具有抑制作用。有机酸加入后降低了水环境中的pH值,并抑制了 HCO_3^- 的解离,故不利于碳酸钙的沉积。而单糖组分能加速碳酸钙沉积的速率,可能是由于反应体系中的 $-\text{OH}$ 和 Ca^{2+} 结合降低了

碳酸钙的成核活化能(马洁等,2005;伊昌等,2011;王农等,2013),进而促进碳酸钙的成核,从而加快了碳酸钙沉积的速率。除此之外,有机酸随浓度增大抑制作用益明显,因为浓度增加, H^+ 浓度增加,抑制作用亦明显,与有机酸不同,低浓度的D-葡萄糖和D-核糖均对方解石的晶型有一定的影响,可能是由于 $-\text{OH}$ 的选择吸附性所导致,其吸附于某些晶面的活性生长点上,使得这些晶面的生长收到抑制。而在高浓度D-葡萄糖钙化体系中出现了方解石和文石的混合物。从热力学角度分析,方解石为热力学稳定相,而文石为热力学亚稳定相,因为溶液中D-葡萄糖的浓度过高时,方解石和文石可以进行同时成核(Pan *et al.*, 2007)。在D-核糖钙化体系中仅出现了方解石型碳酸钙晶体,说明其对碳酸钙晶型影响不大。在高浓度D-核糖钙化体系中,出现了多面的立方体形态的晶体,可能是由于D-核糖选择性吸附晶面所导致。D-核糖吸附在晶面上,抑制了晶面的生长,使得晶体发育得不完善,且随着D-核糖浓度的增大,抑制程度也随之增大。

本实验结果表明不同单糖组分、不同浓度的单糖组分在低温条件下均会对碳酸钙沉积造成一定的

影响。同时,也证实了黄龙钙化沉积是由生物因素以及环境因素等相互作用所形成的。

4 结论

(1) D-葡萄糖在低温条件下能够促进碳酸钙的沉积,并加快沉积速率。低浓度 D-葡萄糖(G1 和 G2)钙化体系的合成产物均为方解石型碳酸钙并对其形貌有一定的影响,而高浓度 D-葡萄糖(G3 和 G4)钙化体系能够诱导少量的文石型碳酸钙的合成。

(2) D-核糖在低温条件下能促进碳酸钙的沉积,加快沉积速率。与 D-葡萄糖不同,D-核糖仅能合成方解石型碳酸钙,但其能够抑制方解石晶面的生长,且随浓度增大,抑制也随之增大,因此,D-核糖对碳酸钙沉积物的形貌具有一定的影响。

References

- Alan W D, Pieter T, Visscher, *et al.* 2009. Autoinducers extracted from microbial mats reveal a surprising diversity of N-acylhomoserine lactones(AHLs) and abundance changes that may related to diel pH [J]. *Environmental Microbiology*, 11(2): 409 ~ 420.
- Dai Yongding and Shen Jiying. 1995. Mechanism of biological mineralization[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 30(5): 55 ~ 58(in Chinese).
- Kawaguchi T and Decho A W. 2002. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions(EPS) in influencing CaCO₃ polymorphism[J]. *Journal of Crystal Growth*, 240(1 ~ 2): 230 ~ 235.
- Li Qiongfang, Dong Faqin, Li Qiyang, *et al.* 2015. Experimental study on the effect of citric acid on the mineralization of calcium carbonate [J]. *Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry*, 34(2): 294 ~ 300(in Chinese with English abstract).
- Li Qiyang, Li Qiongfang, Dai Qunwei, *et al.* 2013. The effects of the extracellular succinic acid components on calcium carbonate mineralization[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 32(6): 773 ~ 781(in Chinese with English abstract).
- Ma Jie, Li Chunzhong, Chen Xunhua, *et al.* 2005. The effect of carbohydrate additives on the morphology of nano-calcium carbonate[J]. *Journal of East China University of Science and Technology(Natural Science Edition)*, 31(6): 817 ~ 820(in Chinese).
- Pan Y, Zhao X, Sheng Y, *et al.* 2007. Biomimetic synthesis of dendrite-shaped aragonite particles with single-crystal feature by polyacrylic acid[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 297(1 ~ 3): 198 ~ 202(in Chinese).
- Tian Youping and He Fusheng. 1998. Studies on biogenic factors of traver-tine-travertine in places such as Sichuan, Jiuzhaigou and Guizhou Huangguoshu Waterfalls take as an example[J]. *Carsologica Sinica*, 17(1): 49 ~ 55(in Chinese).
- Wang Nong, Wang Xingquan, Yang Lijuan, *et al.* 2013. Effect of additives on the morphology and particle size of nanometer calcium carbonate[J]. *Inorganic Chemicals Industry*, 45(2): 23 ~ 26(in Chinese with English abstract).
- Yang Junyi, Wan Xinnan, Xi Bin, *et al.* 2004. Characteristics and formation of the travertine funnels in Jiuzhaigou Huanglong area[J]. *Hydrogeology and Engineering Geology*, 31(2): 90 ~ 93(in Chinese).
- Yi Chang, Zhu Yinyan and An Xueqin. 2011. The effects of sucrose citric acid and its complex pairing on nanometer calcium carbonate[J]. *Journal of Functional Materials*, 42(4): 589 ~ 592(in Chinese with English abstract).
- Zhang Daoyong, Pan Xiangliang, Zhang Jingmei, *et al.* 2008. Effect of environmental factors on calcification kinetics of *Synechocystis* sp. [J]. *Bulletin of Mineralogy Petrology and Geochemistry*, 27(2): 105 ~ 110(in Chinese).
- Zhang Gangsheng and Xie Xiande. 2000. Advances in CaCO₃ biomineralization—the control role of organic matter[J]. *Advance in Earth Sciences*, 15(2): 204 ~ 209(in Chinese).

附中文参考文献

- 戴永定, 沈继英. 1995. 生物矿化作用机制[J]. *动物学杂志*, 30(5): 55 ~ 58.
- 李琼芳, 董发勤, 李琪言, 等. 2015. 柠檬酸对黄龙碳酸钙矿化影响的模拟实验研究[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 34(2): 294 ~ 300.
- 李琪言, 李琼芳, 代群威, 等. 2013. 黄龙嗜冷细菌胞外琥珀酸组分对碳酸钙矿化的影响[J]. *岩石矿物学杂志*, 32(6): 773 ~ 781.
- 马洁, 李春忠, 陈雪花, 等. 2005. 糖类添加剂对纳米碳酸钙形貌的影响[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 31(6): 817 ~ 820.
- 田友萍, 何复胜. 1998. 石灰华的生物成因研究——以四川九寨沟和贵州黄果树等地石灰华为例[J]. *中国岩溶*, 17(1): 49 ~ 55.
- 王农, 王兴权, 杨利娟, 等. 2013. 添加剂对纳米碳酸钙形貌与粒度的影响[J]. *无机盐工业*, 45(2): 23 ~ 26.
- 杨俊义, 万新南, 席彬, 等. 2004. 九寨沟黄龙地区钙华漏斗的特征与成因探讨[J]. *水文地质工程地质*, 31(2): 90 ~ 93.
- 伊昌, 朱银燕, 安学勤. 2011. 蔗糖、柠檬酸及其复配对合成纳米碳酸钙的影响[J]. *功能材料*, 42(4): 589 ~ 592.
- 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.
- 张刚生, 谢先德. 2000. CaCO₃ 生物矿化的研究进展——有机质的控制作用[J]. *地球科学进展*, 15(2): 204 ~ 209.