

## 研究报告

*Curvibacter* sp. HJ-1 菌株诱导碳钙镁石的形成

孙君 李福春\* 吕杰杰 张宠宏 杨果果

南京农业大学资源与环境科学学院 江苏 南京 210095

**摘要:**【背景】无论是在自然界还是在模拟实验产物中,碳钙镁石均是比较罕见的碳酸盐矿物类型。

【目的】探究在实验过程中意外发现的碳钙镁石的成因,在对包括本文在内的所有有关碳钙镁石的实验条件进行综合分析的基础上,进一步探究此类矿物的形成机理。【方法】在 Mg/Ca 为 5.0 条件下对 *Curvibacter* sp. HJ-1 菌株进行了为期 30 d 的培养,定期测定细菌数量、pH 值、Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>浓度,利用扫描电子显微镜对沉淀物形态进行观察,利用 X-射线衍射仪对矿物成分进行测定。【结果】随着培养时间的延长,细菌培养液的 pH 值总体上呈现逐渐升高的趋势,而 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>浓度呈现逐渐降低的趋势。对于无菌对照实验(CK),上述 3 项指标均保持稳定。在 HJ-1 菌株实验体系中,第 8 天开始形成碳钙镁石,至实验结束(第 30 天)一直以该矿物为主。在 CK 体系中自始至终未形成任何矿物。随着培养时间的延长,X-射线衍射图谱上显示的碳钙镁石晶面数有逐渐增多的趋势,这意味着其结晶程度趋于变好。【结论】Mg/Ca≥2.0、钙和镁离子浓度之和介于 0.03–0.07 mol/L、饱和指数>1.95 并存在微生物的溶液环境比较有利于碳钙镁石的形成。

**关键词:** 生物矿化, 碳钙镁石, *Curvibacter* sp., 饱和指数

*Curvibacter* sp. strain HJ-1 induces the formation of huntite

SUN Jun LI Fuchun\* LÜ Jiejie ZHANG Chonghong YANG Guoguo

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

**Abstract:** [Background] Whether in the nature or in experimental products, huntite is rare carbonate mineral. [Objective] Explore the cause of the unexpected discovery of the huntite during the culture experiments, on the basis of comprehensive analysis of the condition of all experiments related to huntite, to further explore the formation of the minerals. [Methods] A series of cultural experiments in the medium with *Curvibacter* sp. strain HJ-1 and initial Mg/Ca ratio of 5.0 were carried out for 30 days. During the incubation, cell density, pH, concentration of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in the medium were determined according to the scheduled time. Mineral type was identified by X-ray diffraction (XRD) and the morphology was observed by scanning electron microscopy (SEM). [Results] The pH value of the medium with strain HJ-1 increased, while the concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> decreased gradually with incubation time. For

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41673083); China Postdoctoral Science Foundation (2019M661859); The Second Tibetan Plateau Scientific Expedition and Research Project (STEP 2019QZKK0707)

\*Corresponding authors: E-mail: fchli@njau.edu.cn

Received: 25-03-2020; Accepted: 12-01-2021; Published online: 17-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(41673083); 中国博士后科学基金(2019M661859); 第二次青藏高原综合科学考察研究项目(STEP 2019QZKK0707)

\*通信作者: E-mail: fchli@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-03-25; 接受日期: 2021-01-12; 网络首发日期: 2021-03-17

control experiments (CK) without bacteria, the above three indicators were stable. The precipitation of huntite began to form on the 8<sup>th</sup> day and continued to the end of the experiment (30<sup>th</sup> day), while any minerals were not formed in the CK system. XRD patterns indicated that the number of crystal planes of huntite is increasing gradually. This means that the crystallinity of huntite tends to be better with incubation time. **[Conclusion]** The culture with Mg/Ca ratio of  $\geq 2.0$ , the total concentration of calcium and magnesium ions of 0.03–0.07 mol/L, saturation index above 1.95 and presence of microorganisms is favorable for the formation of huntite.

**Keywords:** biomineralization, huntite, *Curvibacter* sp., saturation index

最近 10 多年来, 微生物促进碳酸盐矿化机理逐渐成为地质微生物学研究的新热点。该领域的研究不仅有可能为解决地球历史时期形成的微生物岩的成因和困惑地质学家的“白云石成因之谜”提供科学线索, 而且还有可能成为固定大气 CO<sub>2</sub> 和对纪念碑等石质文物进行环境友好式修复的有效途径之一<sup>[1]</sup>。

碳钙镁石是 20 世纪 50 年代才被发现的一种富镁的碳酸盐矿物 [CaMg<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>[2]</sup>。在自然环境中, 碳钙镁石主要见于石灰岩和白云岩<sup>[3]</sup>, 偶尔见于湖泊沉积物<sup>[3]</sup>和洞穴沉积物<sup>[4]</sup>等。实验结果表明, 在含有微生物的 Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 体系中, 最常出现的矿物是含镁方解石, 与此同时或单独出现的还有文石、球霏石、单水碳钙石和非晶态碳酸钙(Amorphous Calcium Carbonate, ACC) 等<sup>[1,5]</sup>。当以硫酸盐还原细菌<sup>[6]</sup>和产甲烷细菌<sup>[7]</sup>为实验材料时还有可能出现(无序)白云石。截至目前, 在微生物培养实验体系中观察到碳钙镁石的报道仅有几例。Zaitseva 等在蓝细菌培养过程中观察到的白云石+碳钙镁石组合可能是报道最早的生物成因碳钙镁石<sup>[8]</sup>。后来, 在中等嗜盐好氧细菌的培养物中观察到白云石+碳钙镁石+方解石+水碳镁石组合<sup>[9]</sup>。再后来, 徐青龙等在利用赖氨酸芽孢杆菌进行矿化实验时也观察到碳钙镁石(碳钙镁石+高镁方解石+ACC 组合)<sup>[10]</sup>。总之, 无论是在天然样品还是在模拟实验产物中, 碳钙镁石均不是常见的碳酸盐矿物类型。这是因为其稳定性较差, 较易转变为稳定的矿物相——白云石<sup>[8]</sup>或高镁方解石<sup>[10]</sup>等。

我们在利用 *Curvibacter* sp. HJ-1 菌株研究细菌促进碳酸盐矿化机理的过程中, 意外地发现了碳钙镁石。采用多种方法对液相和固相产物进行了动态监测和表征分析, 包括细菌的生长曲线、pH 值变化曲线、离子浓度和矿物的矿物相、形貌等, 讨论碳钙镁石形成的条件问题, 以期有助于理解微生物参与下碳酸盐的矿化机理问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 HJ-1 菌株特征

*Curvibacter* sp. HJ-1 菌株从南京农业大学牌楼试验田土壤中筛选得到<sup>[11]</sup>。HJ-1 菌株在固体培养基上形成表面光滑、边缘整齐、白色透明的菌落(直径约 1 mm), 其细胞呈杆状, 直径和长度分别为 0.5–1.0  $\mu\text{m}$  和 1.5–3.0  $\mu\text{m}$ , 革兰氏染色呈阴性; 可以在较高的镁钙比条件下正常生长, 并促进碳酸盐矿物沉淀<sup>[11]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

胰蛋白胨, 赛默飞世尔科技公司; PTFE 微孔膜, 北京市振泰园艺设施公司。离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES), Agilent Technologies 公司; 分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; X-射线衍射仪(X-Ray Diffraction, XRD), 理学株式会社; 扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscopy, SEM), 卡尔·蔡司股份有限公司。

M-2 培养基(g/L): MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.16, CaCl<sub>2</sub> 1.11, 胰蛋白胨 10.00, 琼脂粉 20.00 (固体培养基添加)。用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 8.0, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

### 1.3 细菌参与的矿化实验方法

将 HJ-1 菌株接种于 M-2 固体培养基中, 在 30 °C 恒温培养 48 h。挑取单菌落接种于 M-2 液体培养基中, 在 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 48 h, 获得种子液(经测定, 初始细菌密度为  $0.8 \times 10^8$  CFU/mL)。向装有 90 mL 液体培养基的三角瓶中分别接入 10 mL 种子液, 用 PTFE 微孔膜 (0.3  $\mu$ m) 封口后迅速放入恒温培养箱中 30 °C 静置培养, 并定期取样。在培养第 5 h (即 0.21 d) 获得第一个样品, 而后取样时间依次为 2、4、6、8、10–20、25 d, 第 30 天获得最后一个样品。用去离子水代替细菌种子液作为对照(CK)。培养实验结束后, 5 000 r/min 离心 10 min 将固相和液相分离, 获得上清液和沉淀物。

### 1.4 液相产物的测定

细菌数量的测定利用稀释平板法: 在无菌操作台上取出 1 mL 细菌培养液定容至 10 mL 蒸馏水中, 记稀释梯度为  $10^{-1}$ ; 而后继续稀释浓度梯度至  $10^{-9}$ 。取不同稀释度的菌悬液各 0.1 mL, 均匀涂布于 M-2 固体培养基平板上, 30 °C 恒温培养 48 h 后统计平板上的细菌菌落, 计算得出单位体积的细菌数量。用 pH 计测定上清液的 pH 值。将上清液 10 000 r/min 离心 15 min, 再用 0.22  $\mu$ m 孔径滤膜过滤获得待测溶液。利用 ICP-OES 测定溶液中的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度。

### 1.5 固相产物的测定

利用 XRD 测定矿物成分。测定条件: Cu 靶电压 30 kV, 电流 25 mA, 扫描范围为  $10\text{--}60^\circ$  ( $2\theta$ ), 扫描速度为  $2^\circ/\text{min}$ 。利用配备能谱仪(Energy Dispersive Spectrometer, EDS)的 SEM 观察沉淀物形貌。制样方法: 将固体颗粒转移至载物台上, 自然风干后喷上约 8 nm 厚的金膜后上机观察。工作电压 20 kV, 电流 60  $\mu$ A。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养液中细菌数量、pH 值和 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度的动态变化

HJ-1 菌株在培养实验过程中经历了迟缓期、

对数期、稳定期和衰亡期。细菌数量在第 12 天时达到最大( $2.84 \times 10^8$  CFU/mL)。之后逐渐减少, 至实验结束时(第 30 天)仍保持在  $3 \times 10^7$  CFU/mL 以上(图 1A)。

经测定得知, 细菌培养液的初始 pH 值为 7.6。在细菌培养过程中, pH 值总体上呈现随时间延长而逐渐升高的趋势, 第 25 天时达到最大值(8.2) (图 1A)。溶液 pH 值升高的主要原因可能是: (1) 细菌在繁殖和生长过程中消耗有机氮源并产生氨气; (2) 细菌细胞死亡后发生自溶, 释放氨气。氨气溶于水, 使溶液的碱度提高<sup>[10]</sup>。CK 的 pH 值基本上保持稳定。

细菌培养液中  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  浓度总体上呈现逐渐降低的趋势(图 1B 和 C)。 $\text{Mg}/\text{Ca}$  比在第 10 天之前显示逐渐升高的趋势, 之后降低(图 1D)。CK 的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mg}/\text{Ca}$  比均未发生明显的变化。

### 2.2 矿物种类

XRD 图谱显示(图 2 和表 1), 第 6 天之前未形成任何结晶相。第 8、10、11 和 12 天, 沉淀物的 XRD 图谱上显示出碳钙镁石(202)晶面的衍射峰( $d$  值约 0.283 nm)。从第 13 天开始, XRD 图谱上同时显示碳钙镁石(202)和(401)晶面的衍射峰(后者  $d$  值约 0.199 nm)。此外, 第 25 天的图谱上除碳钙镁石(202)和(401)晶面以外, 还出现了碳钙镁石(214)晶面( $d$  值约 0.163 nm)以及  $d$  值为 0.326 nm 的衍射峰[疑是球霏石(101)晶面]。也就是说, 随着培养时间的延长, XRD 图谱显示的碳钙镁石晶面数有逐渐增多的趋势, 即其结晶程度趋于变好。利用 Bischoff 提出的经验公式  $\text{MgCO}_3$  (%) =  $1\ 104.05 - 363.96d^{[12]}$  估算了碳钙镁石中  $\text{MgCO}_3$  的含量。计算结果表明, 其中  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{MgCO}_3$  所占比例分别为 25 mol% 和 75 mol% 左右, 其化学式与碳钙镁石的标准化学式  $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$  十分吻合。在 CK 实验体系的沉淀物中, 未检测到任何矿物的 X-射线衍射峰。

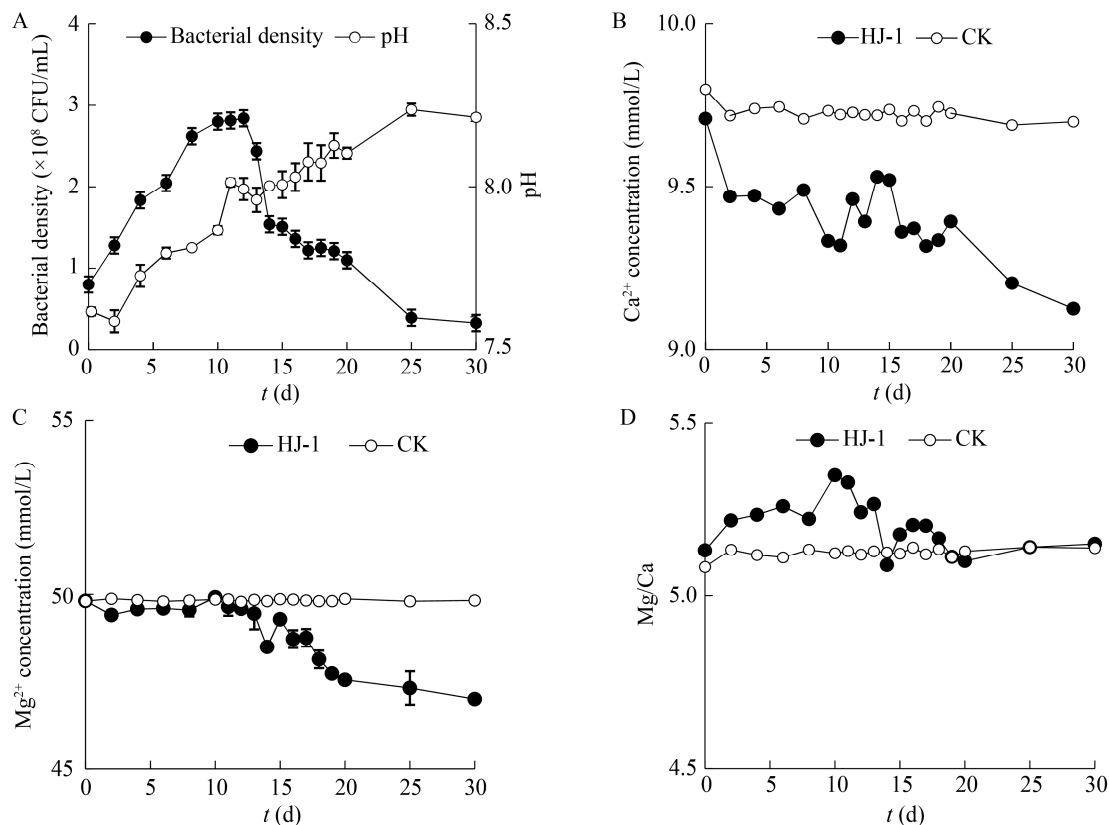


图 1 细菌数量和 pH 值(A)、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度(B)、 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度(C)和 Mg/Ca 比(D)的动态变化

Figure 1 Temporal changes of bacterial density and pH value (A),  $\text{Ca}^{2+}$  (B) and  $\text{Mg}^{2+}$  (C) concentrations, as well as Mg/Ca ratio (D) in the solution

### 2.3 沉淀物的形貌特征

利用 SEM 进行的观察发现(图 3), HJ-1 菌株诱导形成的矿物形态多样, 主要有球状、块状和不规则状等。能谱分析证实这些矿物的化学成分以 Ca、Mg、C、O 为主, 并且其 Mg/Ca (原子)比近

似等于 3。在矿物颗粒表面及颗粒之间, 常见形状和大小均与细菌接近的杆状物。

## 3 讨论

### 3.1 碳钙镁石形成的化学基础

Dupraz 等认为, 当某化合物的饱和度指数 (Saturation Index, SI) 大于 0.8 即可自发地沉淀<sup>[13]</sup>。我们希望通过计算 SI 来讨论碳钙镁石形成的化学基础。SI =  $\text{Log}_{10}(\text{IAP}/K_{\text{sp}})$ , 其中  $K_{\text{sp}}$  为溶度积常数, IAP (Ion-Activity Product) 为离子活度积。一般来说, 常见化合物的  $K_{\text{sp}}$  均可查到。碳钙镁石不是常见矿物, 因而未能查得其  $K_{\text{sp}}$ 。Busenberg 等提出, 可利用公式(1)计算含镁碳酸盐矿物的  $K_{\text{sp}}$ <sup>[14]</sup>:

$$\ln K_{\text{sp}} = \frac{x(x-1)}{RT} [A_0 + A_1(2x-1)] + (1-x) \ln [K_{\text{C}}(1-x)] + x \ln (K_{\text{D}x}) \quad (0 < x < 1) \quad (1)$$

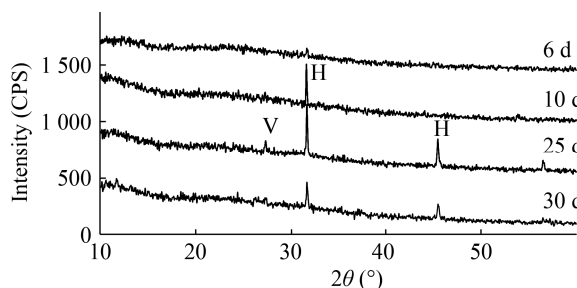


图 2 代表性样品的 XRD 图谱

Figure 2 XRD patterns of the representative samples

注: H: 碳钙镁石; V: 球霏石

Note: H: Huntite; V: Vaterite

表 1 在 HJ-1 菌株培养过程中形成的碳酸盐矿物及其衍射峰  $d$  值Table 1 Carbonate minerals formed during the culture experiments with strain HJ-1 and  $d$  value (nm) of their diffraction peak

实验类型 Experiment	时间 Time (d)	碳钙镁石 Huntite			球霏石 Vaterite
		(202)晶面 (202) Faces 0.282–0.283	(401)晶面 (401) Faces 0.199–0.200	(122)晶面 (122) Faces 0.163	(101)晶面 (101) Faces 0.326
HJ-1	0.21–6	—	—	—	—
	8–12	+	—	—	—
	13–19	+	+	—	—
	20	+	+	—	—
	25	+	+	+	+
	30	+	+	—	—
CK	0.21–30	—	—	—	—

注：+：有该衍射峰；—：没有该衍射峰

Notes: + indicates the existence and — indicates the absence of this diffraction peak

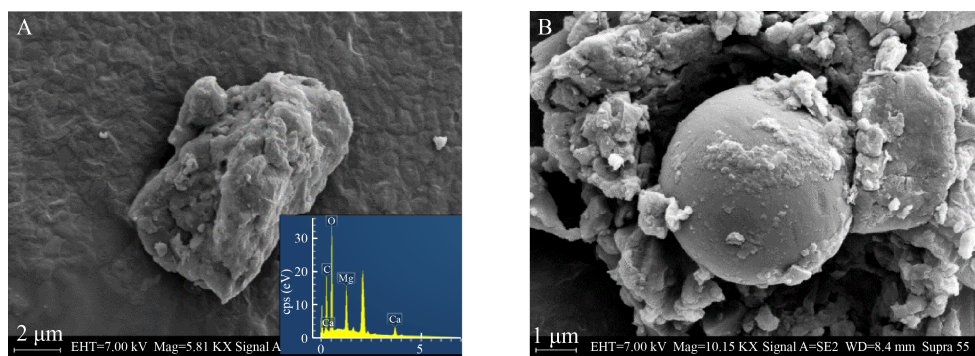


图 3 沉淀物的 SEM 照片和 EDS 图

Figure 3 SEM images and EDS spectra of the precipitates

注：A：第 25 天，块状沉淀物，EDS 显示其由 Ca、Mg、C、O 组成，其 Mg/Ca (原子)比近似等于 3；B：第 30 天，球状和块状沉淀物

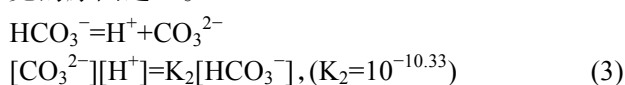
Note: A: 25 d, massive precipitate, EDS spectra showing that it is composed of Ca, Mg, C and O, the Mg/Ca ratio is approximately 3; B: 30 d, showing spherical and massive precipitates

其中， $R$  为气体常数[8.314 J/(mol·K)]， $T$  为热力学温度(本文实验在 30 °C 条件下进行，即  $T=303.15$  K)、 $A_0=6.29\pm0.2$  KJ/mol， $A_1=1.77\pm1.0$  KJ/mol<sup>[14]</sup>， $K_C=10^{-8.327}$ ， $K_D=10^{-7.8}$ ， $x$  和  $1-x$  分别代表矿物中  $\text{CaCO}_3$  和  $\text{MgCO}_3$  的摩尔分数。对于碳钙镁石[其化学式为  $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ ]来说， $x=0.25$ ， $\ln K_{sp}=-19.43$ 。

$$\text{IAP}=[\text{Ca}^{2+}]^x[\text{Mg}^{2+}]^{(1-x)}[\text{CO}_3^{2-}] \quad (0<x<1) \quad (2)$$

其中， $[\text{CO}_3^{2-}]$  为未知，但可根据实测 pH 值和  $[\text{HCO}_3^-]$ ，利用公式(3)计算得出(图 4 和表 2)。由

图 4 可以看出，在实验初始阶段，培养液对于碳钙镁石的 SI 来说为 1.61，而且随着培养时间的延长逐渐增大。XRD 研究结果表明，在第 8 天之前并未生成碳钙镁石沉淀，直到第 8 天(SI 达到 1.95)时开始碳钙镁石沉淀。这可能意味着，在 SI 达到 1.95 (而不是像常见矿物的 0.8)以上时，碳钙镁石才能够自发地沉淀。这可能也是碳钙镁石比较罕见的原因之一。



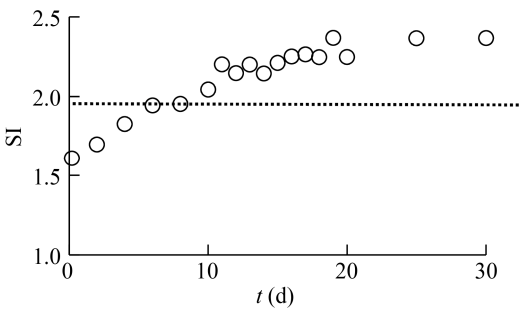


图 4 培养液相对于碳钙镁石的饱和度指数动态变化  
Figure 4 Temporal change of saturation index with respect to huntite in the solution

表 2 培养液中碳钙镁石的饱和度指数  
Table 2 The saturation index of huntite in the medium

时间 Time (d)	培养液中的离子浓度 Ion concentration in the medium			Log <sub>10</sub> [IAP] (×10 <sup>-7</sup> )	SI
	Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (×10 <sup>-6</sup> mol/L)		
0.21	9.71	49.82	4.39	-6.84	1.61
2	9.47	49.41	5.46	-6.75	1.70
4	9.47	49.58	7.33	-6.62	1.83
6	9.43	49.60	9.59	-6.50	1.95
8	9.49	49.56	9.78	-6.49	1.95
10	9.33	49.92	12.02	-6.40	2.04
11	9.32	49.65	17.42	-6.24	2.20
12	9.46	49.59	15.31	-6.30	2.15
13	9.39	49.45	17.38	-6.25	2.20
14	9.53	48.49	15.44	-6.30	2.15
15	9.52	49.29	17.75	-6.24	2.21
16	9.36	48.72	19.79	-6.20	2.25
17	9.37	48.76	20.39	-6.18	2.27
18	9.32	48.13	19.77	-6.20	2.25
19	9.34	47.73	26.30	-6.08	2.37
20	9.39	47.54	19.97	-6.20	2.25
25	9.20	47.31	26.42	-6.08	2.37
30	9.20	46.99	26.65	-6.08	2.37

3.2 碳钙镁石的形成条件

碳钙镁石是自然界中不常见的矿物。在模拟碳酸盐矿化的实验产物中，碳钙镁石也是比较罕见的矿物。即使碳钙镁石出现在某矿物组合中，它通常也不是实验产物中的主要矿物相。在标准碳钙镁石中，Mg/Ca 比为 3.0。这使研究者很自然

地想到其应该形成于较高 Mg/Ca 比环境。Zaitseva 等在 Mg/Ca 比为 42.8 的条件下培养蓝细菌过程中检测到了碳钙镁石<sup>[8]</sup>。后来，Sánchez-Román 等在 Mg/Ca 比分别为 5.0 和 11.5 条件下培养嗜盐好氧细菌时也检测到碳钙镁石<sup>[9]</sup>。这 2 个实例强化了碳钙镁石形成于较高 Mg/Ca 比环境的认识。徐青龙等在 Mg/Ca 比为 2.0 的赖氨酸芽孢杆菌培养液中检测到碳钙镁石<sup>[10]</sup>，这使我们对碳钙镁石的形成条件产生疑惑。为此，我们收集了已发表的、在微生物参与(以及部分无微生物参与)下 Ca-Mg-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 体系中形成的碳酸盐矿物方面的资料(表 3 和图 5)，并对碳钙镁石的形成条件进行简单的讨论。

3.2.1 碳钙镁石形成的盐度环境

除了 1 个钙镁浓度极高的点(Mg/Ca 比为 42.8，C<sub>Mg</sub>+C<sub>Ca</sub>为 2.14 mol/L)以外，5 个形成碳钙镁石体系的 C<sub>Mg</sub>+C<sub>Ca</sub> 均介于 0.03–0.07 mol/L 之间。可见，并不是钙镁总浓度越高越有利于碳钙镁石的形成。从图 5 可以看出，相对于空心圈和实心方框的标记点(共 44，代表未形成碳钙镁石的实验)，空心方框(共 6 个，包括 1 个未显示的点，代表形成碳钙镁石的实验)仅占很小的比例。需要指出的是，本文远未将未形成碳钙镁石的微生物实验数据收集齐全。相反，我们尽力收集了形成碳钙镁石的所有实验(包括有微生物参与和无微生物参与的)数据。这些数据本身就进一步说明了碳钙镁石的稀有性。表 3 显示，对于蜡样芽孢杆菌，在 Mg/Ca 比为 5.0 时形成碳钙镁石，而 Mg/Ca 比为 1.0 时则未形成<sup>[15]</sup>。*Curvibacter* sp.也如此，在 Mg/Ca 比为 5.0 时形成碳钙镁石，而 Mg/Ca 比为 1.0<sup>[15]</sup>、2.0<sup>[11]</sup>和 3.0<sup>[16]</sup>时则均未形成碳钙镁石。再如，在多种嗜盐菌作用下，在 Mg/Ca 比分别为 2.0、2.7、3.3、4.0、4.4、5.0、5.5、5.7、8.2、11.5 的多组实验中，仅在 5.0 和 11.5 的实验产物中检测到碳钙镁石<sup>[9]</sup>。图 5 显示，碳钙镁石形成的最低 Mg/Ca 比为 2.0。

表3 部分微生物实验和化学实验条件及形成的矿物组合一览表

Table 3 A list of the conditions of some microbial and chemical experiments and formed mineral assemblages

体系特征 Experiment model	[Mg <sup>2+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]	Mg/Ca	pH	矿物(组合) Mineral (composition)	形成时间 Formation time (d)	文献 References
<i>Curvibacter</i> sp.	0.010	0.010	1.0	7.6–8.4	C	17–30	[15]
<i>Curvibacter</i> sp.	0.075	0.050	1.5	7.6–8.3	A+LMC	20–50	[16]
<i>Curvibacter</i> sp.	0.100	0.050	2.0	7.2–9.1	C+A	8–50	[11]
<i>Curvibacter</i> sp.	0.150	0.050	3.0	7.7–8.4	HMC	30–50	[16]
<i>Curvibacter</i> sp.	0.050	0.010	5.0	7.6–8.2	H	6–30	This study
<i>Curvibacter</i> sp. EPS	0.050	0.010	5.0	—	A	1–5	[15]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	0.010	0.010	1.0	7.6–8.4	C	19–30	[15]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	0.050	0.010	5.0	7.6–8.2	H	15–30	[15]
蜡样芽孢杆菌 EPS <i>Bacillus cereus</i>	0.050	0.010	5.0	—	HMC+A	1–5	[15]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.075	0.050	1.5	—	HMC	15–50	[17]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.093	0.057	1.6	7.5–8.7	HMC	10–50	[18]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.150	0.050	3.0	7.2–8.4	HMC	20–50	[17]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.050	0.010	5.0	7.6–8.5	HMC+A	30–40	[19]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.300	0.050	6.0	7.2–8.4	HMC+A	20–50	[17]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.450	0.050	9.0	—	HMC+Ca-Dol	40–50	[17]
节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	0.600	0.050	12.0	—	—	—	[17]
赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus</i> sp.	0.028	0.014	2.0	7.2–8.8	ACC+H+HMC	20–50	[10]
弗氏柠檬酸杆菌	0.076	0.013	6.0	7.1–7.4	HMC+M	35–50	[17]
<i>Citrobacter freundii</i>							
梭菌 <i>Clostridium</i> sp.	0.076	0.013	6.0	7.1–7.5	HMC+M	35	[20]
梭菌 <i>Clostridium</i> sp.	0.076	0.013	6.0	7.3–7.7	C+M	10–80	[21]
SRB	0.013	0.013	1.0	7.9	HMC	35	[21]
SRB	0.026	0.013	2.0	7.8	HMC	35	[22]
SRB	0.052	0.013	4.0	7.9	HMC	35	[22]
SRB	0.076	0.013	6.0	7.8	HMC+Ca-Dol+M	35	[22]
SRB	0.104	0.013	8.0	7.7	HMC+Ca-Dol+M	35	[22]
蓝细菌 <i>Cyanobacteria</i>	2.140	0.050	42.8	8.4	H+Dol	3 h–300 d	[8]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.046	0.022	2.0	7.2–9.0	HMC	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.046	0.017	2.7	7.2–9.0	HMC	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.019	0.006	3.3	7.2–9.0	D+C+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.037	0.011	3.3	7.2–9.0	D+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.093	0.022	4.0	7.2–8.5	HMC	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.074	0.017	4.4	7.2–8.5	D+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.028	0.006	5.0	7.2–9.0	Dol+H+C+HMC	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.093	0.017	5.5	7.2–8.5	D+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.065	0.011	5.7	7.2–8.5	HMC+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.092	0.011	8.2	7.2–8.5	D+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.187	0.022	8.2	7.2–9.0	D+HM+S	30	[9]
嗜盐菌 <i>Halophilic bacteria</i>	0.065	0.006	11.5	7.2–9.0	Dol+H+HMC	30	[9]

(待续)

(续表 3)							
无菌 No bacteria involved	0.050	0.050	1.0	—	Mg-C	10	[23]
无菌 No bacteria involved	0.100	0.050	2.0	—	MHC+A+Mg-C	10	[23]
无菌 No bacteria involved	0.200	0.050	4.0	—	MHC	10	[23]
无菌 No bacteria involved	0.300	0.050	6.0	—	MHC	10	[23]
无菌 No bacteria involved	0.400	0.050	8.0	—	MHC	10	[23]
无菌 No bacteria involved	0.500	0.050	10.0	—	MHC	10	[23]

注：C：方解石；D：白云石；HMC：高镁方解石；A：文石；V：球霏石；H：碳钙镁石；M：单水碳钙石；ACC：非晶态碳酸钙；HM：水菱镁矿；S：鸟粪石；Mg-C：镁方解石；MHC：单水方解石

Notes: C: Calcite; D: Dolomite; HMC: High-Mg calcite; A: Aragonite; V: Vaterite; H: Huntite; M: Monohydrocalcite; ACC: Amorphous calcium carbonate; HM: Hydromagnesite; S: Struvite; Mg-C: Mg-Calcite; MHC: Monocalcite

3.2.2 碳钙镁石的形成需要微生物参与

在无细菌的实验中，在 Mg/Ca 比高达 10.0、 $C_{Mg}+C_{Ca}$  达到 0.55 mol/L 的条件下仍未见碳钙镁石形成<sup>[23]</sup>。对于蜡样芽孢杆菌<sup>[15]</sup>和本研究的 *Curvibacter* sp.，在 Mg/Ca 比为 5.0 时均形成了碳钙镁石。但是，在相同的 Mg/Ca 比(5.0)和  $C_{Mg}+C_{Ca}$  (0.6 mol/L)条件下，分别利用从上述 2 种

细菌培养液中提取的胞外多糖 (Extracellular Polysaccharides, EPS)进行气体扩散实验时却均未形成碳钙镁石<sup>[15]</sup>。这说明微生物参与对于碳钙镁石的形成至关重要。从表 2 还可以看出，并不是所有的微生物都有利于形成碳钙镁石。例如，在节杆菌参与的情况下，Mg/Ca 比分别为 1.5、3.0、6.0、9.0 和 12.0 的条件下未形成碳钙镁石<sup>[24]</sup>。其中，当 Mg/Ca 比为 12.0 时， $C_{Mg}+C_{Ca}$  达到 0.65 mol/L<sup>[24]</sup>。又如，在 SRB 参与下，Mg/Ca 比分别为 1.0、2.0、4.0、6.0 和 8.0 条件下均未见碳钙镁石生成<sup>[22]</sup>。

4 结论

(1) 在培养 *Curvibacter* sp. HJ-1 菌株 8 d 后，实验产物中出现碳钙镁石，而无菌对照实验中未生成任何矿物沉淀。随着培养时间的延长，XRD 图谱上显示的碳钙镁石晶面数从 1 个到 2 个、直至 3 个。这显示碳钙镁石的结晶程度趋于变好。

(2) 结合已有文献进行的讨论结果表明，有利于碳钙镁石形成的条件可能包括高盐度环境。虽然目前还难以准确地描述各项参数，但可以肯定的是， $C_{Mg}+C_{Ca}$  介于 0.03–0.07 mol/L 之间、 $Mg/Ca \geq 2.0$  和  $SI > 1.95$  是比较有利于碳钙镁石形成的环境条件。同时，微生物对于碳钙镁石的形成至关重要，但并不是所有的微生物都有利于碳钙镁石的形成。

(3) 碳钙镁石可以在森林物种颗粒上形成陶瓷层，因而具有阻燃性能<sup>[25]</sup>。本文实验条件下形

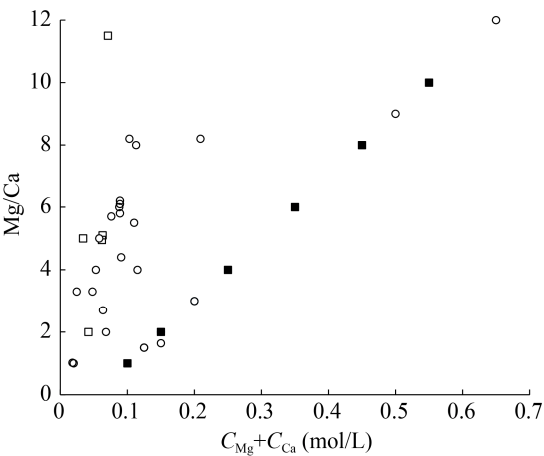


图 5 碳钙镁石形成的 Mg/Ca 比和  $C_{Mg}+C_{Ca}$   
Figure 5 The Mg/Ca ratio and total concentration of calcium and magnesium ions for the formation of huntite

注：空心方框代表形成碳钙镁石的实验(其中，Mg/Ca 比和  $C_{Mg}+C_{Ca}$  分别为 42.8 和 2.14 的空心方框未显示在图中，因其 Mg/Ca 比过大)；空心圈代表未形成碳钙镁石的实验；实心方框代表无微生物的实验结果。数据来源见表 3

Notes: The hollow squares represent the experiments with formation of huntite (one of them which Mg/Ca ratio and  $C_{Mg}+C_{Ca}$  are 42.8 and 2.14, respectively, is not shown); The hollow circles represent the experiments without formation of huntite; The solid squares represent the experiments without microorganism. The data sources are shown in table 3

成了比较单一的矿物——碳钙镁石。若能够稳定而且低成本、大量地合成碳钙镁石，则可以考虑将其或与水菱镁矿的混合物用于制造森林阻燃剂。

## REFERENCES

- [1] Guo WW, Ma H, Li FC, Jin ZD, Li J, Ma F, Wang C. *Citrobacter* sp. strain GW-M mediates the coexistence of carbonate minerals with various morphologies[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(8): 749-757
- [2] Graf DL, Bradley WF. The crystal structure of huntite,  $\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$ [J]. *Acta Crystallographica*, 1962, 15(3): 238-242
- [3] Akbulut A, Kadir S. Huntite deposits in the Neogene lacustrine sediments of the Cameli basin, Denizli, SW Turkey[J]. *Carbonates and Evaporites*, 2003, 18(1): 1-9
- [4] Jones B. Speleothems in a wave-cut notch, Cayman Brac, British West Indies: the integrated product of subaerial precipitation, dissolution, and microbes[J]. *Sedimentary Geology*, 2010, 232(1/2): 15-34
- [5] Buczynski C, Chafetz HS. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy[J]. *Journal of Sedimentary Research*, 1991, 61(2): 226-233
- [6] Van Lith Y, Warthmann R, Vasconcelos C, McKenzie JA. Sulphate-reducing bacteria induce low-temperature Ca-dolomite and high Mg-calcite formation[J]. *Geobiology*, 2003, 1(1): 71-79
- [7] Roberts JA, Bennett PC, González LA, Macpherson GL, Milliken KL. Microbial precipitation of dolomite in methanogenic groundwater[J]. *Geology*, 2004, 32(4): 277-280
- [8] Zaitseva LV, Orleanskii VK, Gerasimenko LM, Ushatinskaya GT. The role of cyanobacteria in crystallization of magnesium calcites[J]. *Paleontological Journal*, 2006, 40(2): 125-133
- [9] Sánchez-Román M, Romanek CS, Fernández-Remolar DC, Sánchez-Navas A, McKenzie JA, Pibernat RA, Vasconcelos C. Aerobic biomineralization of Mg-rich carbonates: implications for natural environments[J]. *Chemical Geology*, 2011, 281(3/4): 143-150
- [10] Xu QL, Li FC, Zhang CH, Li XL. Formation of huntite by *Lysinibacillus* sp. GW-2 strain[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(5): 607-615 (in Chinese)  
徐青龙, 李福春, 张宠宏, 李学林. 赖氨酸芽孢杆菌 GW-2 菌株作用下碳钙镁石的形成[J]. *微生物学报*, 2015, 55(5): 607-615
- [11] Li L, Li FC, Liu L, Zhang CH, Lü JJ. *Curvibacter* sp. strain HJ-1 induced the formation of aragonite under the condition of low Mg/Ca ratio[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 434-446 (in Chinese)  
李磊, 李福春, 刘璐, 张宠宏, 吕杰杰. 低 Mg/Ca 条件下丛毛单胞菌 HJ-1 菌株诱导文石的形成[J]. *微生物学报*, 2017, 57(3): 434-446
- [12] Bischoff WD. Magnesian calcites: physical and chemical properties and stabilities in aqueous solution of synthetic and biogenic phases[D]. Evanston: Doctoral Dissertation of Northwestern University, 1985
- [13] Dupraz S, Parmentier M, Ménéz B, Guyot F. Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers[J]. *Chemical Geology*, 2009, 265(1/2): 44-53
- [14] Busenberg E, Plummer LN. Thermodynamics of magnesian calcite solid-solutions at 25 °C and 1 atm total pressure[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1989, 53(6): 1189-1208
- [15] Sun J. A comparative study of carbonate precipitation induced by two strains with different gram properties[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese)  
孙君. 两株革兰氏染色性质不同的细菌促进碳酸盐矿物形成的对比研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020
- [16] Zhang CH, Lv JJ, Li FC, Li XL. Nucleation and growth of Mg-calcite spherulites induced by the bacterium *Curvibacter lanceolatus* strain HJ-1[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2017, 23(6): 1189-1196
- [17] Ma H, Li FC, Su N, Li XL. Morphological evolution during the formation of carbonate spherulite in *Citrobacter freundii* culture[J]. *Geological Journal of China Universities*, 2009, 15(3): 429-436 (in Chinese)  
马恒, 李福春, 苏宁, 李学林. *Citrobacter freundii* 作用下球状碳酸盐矿物的形态演化过程研究[J]. *高校地质学报*, 2009, 15(3): 429-436
- [18] Xu QL, Zhang CH, Li FC, Ma F, Guo WW, Li XL, Li L, Liu L. *Arthrobacter* sp. strain MF-2 induces high-Mg calcite formation: mechanism and implications for carbon fixation[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2017, 34(2): 157-165
- [19] Sun YT. Effects of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  on the species and morphologies of carbonate minerals induced by bacteria[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese)  
孙雨婷.  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 和 $\text{Ba}^{2+}$ 对细菌成因碳酸盐矿物种类和形态的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019
- [20] Guo WW, Ma H, Li FC, Wang JP, Su N. *Clostridium* sp. MH18 strain induces the formation of carbonate minerals[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(2): 221-227 (in Chinese)

- Chinese)  
郭文文, 马恒, 李福春, 王金平, 苏宁. 梭菌 MH18 菌株诱导碳酸盐矿物的形成[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 221-227
- [21] Wang JP, Li FC, Guo WW, Wang J, Liu MY, Wang G. The temporal changes of carbonate mineral assemblages formed by *Clostridium* sp. SN-1 strain and their main mineral composition[J]. Acta Petrologica et Mineralogica, 2012, 31(4): 627-632 (in Chinese)  
王金平, 李福春, 郭文文, 汪君, 刘铭艳, 王果. 梭菌 SN-1 菌株参与下形成的碳酸盐矿物组合及其主要矿物成分的动态变化[J]. 岩石矿物学杂志, 2012, 31(4): 627-632
- [22] Su N, Li FC, Ma H, Li XL. Effects of Mg/Ca ratios on the species and morphologies of microbial carbonate minerals[J]. Acta Mineralogica Sinica, 2010, 30(1): 83-89 (in Chinese)
- 苏宁, 李福春, 马恒, 李学林. Mg/Ca 比对微生物成因的碳酸盐矿物种类和形态的影响[J]. 矿物学报, 2010, 30(1): 83-89
- [23] Shi HL, Li MH, Liu YX, Zhu LP. Synthesis of monohydrocalcite regulated by  $Mg^{2+}$  in low temperature environment[J]. Acta Petrologica et Mineralogica, 2019, 38(6): 761-769 (in Chinese)  
施翰林, 李明慧, 刘迎新, 朱立平.  $Mg^{2+}$ 调控低温环境下单水方解石的合成[J]. 岩石矿物学杂志, 2019, 38(6): 761-769
- [24] Zhang CH, Li FC, Li XL, Li L, Liu L. The roles of Mg over the precipitation of carbonate and morphological formation in the presence of *Arthrobacter* sp. strain MF-2[J]. Geomicrobiology Journal, 2018, 35(7): 545-554
- [25] Kangal O, Güney A. A new industrial mineral: huntite and its recovery[J]. Minerals Engineering, 2006, 19(4): 376-378