

网纹藤壶壳板矿化结构及其碳酸钙含量测定

赖水发¹, 陈 新^{1,2}, 彭明栋¹, 张彬山³, 王 芳¹, 张哲进¹, 唐 敏^{1,2}

(1. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 热带岛屿资源先进材料教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 3. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228)

摘要:采用X射线衍射技术,初步研究了网纹藤壶(*Balanus reticulates Utinomi*)壳板矿化结构特征,并采用钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂三种方法测量了来自不同海域藤壶壳板的碳酸钙含量。实验发现,网纹藤壶壳板中的矿化组织主要由方解石构成,碳酸钙微晶体排列有一定的取向,较为复杂。海口和陵水两地藤壶壳板中碳酸钙含量没有显著差异($P<0.05$),最大值为93.87%,最小值90.77%。尽管三种碳酸钙含量测量法的结果没有显著性差异($P<0.05$),但进一步综合分析发现钙黄绿素法测定结果最为稳定,且简单易操作,可作为首选方法。

关键词:网纹藤壶(*Balanus reticulates Utinomi*); 壳板; 矿化; 碳酸钙

中图分类号: P7.74 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)06-0032-05

碳酸钙是自然界生物矿化物的重要组成之一,无脊椎动物的很多钙化结构,如软体动物的外壳、钙质海绵纲的骨针、珊瑚的外骨骼以及部分甲壳动物外壳等的主要无机成分都是碳酸钙,含量常可达90%以上^[1]。这些矿化组织作为可再生的优质钙源,在化工、医药及材料等领域应用广泛^[2-3]。此外,生物矿化形成的碳酸钙一般是高度有序的结晶复合体,常具有一些特殊的理化性质,如强度比普通的碳酸钙晶体矿物高约1 000~3 000倍^[4-5],这对生物仿生学研究具有很好的启示作用,引起了生物、材料及建筑等领域学者们的普遍关注^[6-7]。

双壳贝类因具有很高的经济价值和巨大的养殖规模,目前是海洋经济资源种类的主要研究和开发对象,国内外对经济贝类的矿化成分、结构及其矿化机理进行了广泛而深入的研究,取得了一系列有价值的成果^[8]。与贝类相比,对甲壳类藤壶(*Balanus*),外壳的矿化组织研究尚不多^[9],对其关注多集中在与生物污损密切相关的藤壶生态分布、粘附及藤壶胶等方面^[10-11]。藤壶因其坚硬的石灰质外壳和牢固的粘附特性,是危害严重的主要大型海洋污损生物之一,一直是生物污损防除工作中亟待解决的难题。显然,对藤壶外壳的组成和结构进行深入研究将有利于更好地理解藤壶外壳的形成机理和控制因素,对采取有效的防污措施具有重要的启迪意义,这也对合理开发藤壶的经济价值和应用前景提供了重要的参考资料。此外,近期研究发现,形成目前地球上主要三种生物矿化物(磷酸钙、碳酸钙和二氧化硅)

的生物学机制,几乎是同期演化而成,通过对藤壶碳酸钙矿化结构及其机理的深入研究也将为动物进化研究提供一定的参考依据^[5]。

本实验采用的三种测定藤壶壳板碳酸钙含量的方法,即钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂法,目前在化工或医药方面都较常使用^[12],但对藤壶壳板碳酸钙含量的测定方面还未见报道,对这三种方法的优劣比较也未见分析。本实验通过测定网纹藤壶壳板中碳酸钙含量及其矿化微观结构,以较全面地了解藤壶的矿化组织特征;从精确、简便而经济的角度综合考虑,优选藤壶壳板碳酸钙含量的测定方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验材料是南海近岸海域常见的网纹藤壶(*Balanus reticulates Utinomi*),采集于海南海口海甸岛(20°1'N, 110°19'E)近岸海域的礁石表面和陵水贝类养殖场海域(18°15'N, 109°30'E)。将网纹藤壶及其固着的基底材料一起带回实验室,选取底板直径约在1 cm左右、发育正常的网纹藤壶,仔细清洗去除其

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160098); 海南省自然科学基金项目(313104); 海南大学博士科研启动基金项目(kyqd1046)

作者简介: 赖水发(1988-),男,本科生,福建龙岩人,研究方向:生物工程专业, E-mail: lai-109901-shuifa@163.com; 唐敏,通信作者,副教授,博士,主要从事水生生物研究, E-mail: cxtangmin@yahoo.com

表面附着的泥污和其他杂物，备用。

1.2 试验方法

1.2.1 试验样品制备

将选取好的藤壶从其基底表面用机械外力取下，并清除藤壶内部脏器，取壳板，用流水清洗干净，超声波清洗两次，每次10 min，然后用蒸馏水润洗3遍。置于80℃烘箱烘干后待用。用于XRD的样品机械切割成2 mm×2 mm大小的方块，清洗干净，干燥备用。

用于碳酸钙含量测定的样品，研磨成粉末，过100目筛子。将四种样品粉末标记、干燥、保存备用。

1.2.2 矿化结构测定

结构测试采用X射线衍射分析(XRD仪)(Bruker D8 ADVANCE)，测试条件为CuK α 射线，扫描范围2 θ =2°~70°，扫描速度为3(°/min)。

1.2.3 碳酸钙含量测定

采用三种方法，即钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂法来测定样品中碳酸钙的含量。实验中使用的各试剂均为分析纯，除非特殊说明。

1.2.3.1 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)标准溶液的配制和标定

配制EDTA标准溶液，称取EDTA-2Na·2H₂O约26.10 g，溶于300 mL温水中，用蒸馏水稀释至500 mL，混匀待用。

使用基准CaCO₃对EDTA标准溶液进行标定^[12]。根据耗用的EDTA标准溶液的体积，计算出EDTA溶液的物质的量浓度为0.1402 mol/L。

1.2.3.2 采用三种不同指示剂进行藤壶壳板含钙量的测定，所用计算公式如下：

$$x = \frac{V \times C \times 100.09}{1000 \times m} \times 100\%$$

式中：x—CaCO₃含钙量(%)

V—EDTA标准溶液的体积(mL)

C—EDTA标准溶液的浓度(mol/L)

m—样品质量(g)

100.09—CaCO₃的摩尔质量

1.2.3.3 钙黄绿素法

精确称取每种样品各4份，每份约0.14 g左右，置锥形瓶中，添加稀盐酸5 mL，加热使之溶解，继续加热至近干。加入100 mL蒸馏水和甲基红指示剂2滴，滴加6.5%氯氧化钾溶液，使溶液呈浅黄色，再继续加入10 mL后，加钙黄绿素指示剂适量，此时溶液变成黄绿色，上层呈绿色，下层为黄色。用已标定的

EDTA标准溶液滴定至黄绿色荧光消失并显稳定的橙色即可。记录每次所用的EDTA溶液体积。

1.2.3.4 钙-羧酸指示剂法

称取样品，加盐酸溶解同钙黄绿素法。随后添加100 mL蒸馏水和甲基红指示剂2滴，加10%三乙醇胺15 mL，滴加10%氢氧化钠溶液至溶液呈浅黄色，再继续加入10 mL后，滴加钙-羧酸指示剂10滴，可见溶液呈现酒红色。用已标定的EDTA标准溶液滴定至溶液由酒红色变为纯蓝色即得。记录每次所用的EDTA溶液体积。

1.2.3.5 铬黑T指示剂法

精确称取每种样品各4份，每份约0.5 g左右，置锥形瓶中，加蒸馏水10 mL，摇匀。加5 mL稀盐酸使其完全溶解。加15 mL氨性缓冲液(pH=10)和1.5 mL三乙醇胺，充分振摇后，添加约0.01 g铬黑T指示剂，用已标定的EDTA标准溶液滴定至溶液由酒红色变为纯蓝色。记录每次所用的EDTA溶液体积。

1.2.4 数据分析与处理

采用方差分析和t检测方法分别对三种碳酸钙含量测定方法、两个不同地域的网纹藤壶中碳酸钙含量进行比较和分析。

2 结果

2.1 藤壶壳板晶体结构特征

XRD结果显示，网纹藤壶壳板的矿化结构主要由方解石构成，由各峰的分布情况和相对强弱，可知方解石的分布存在一定的取向(图1)。

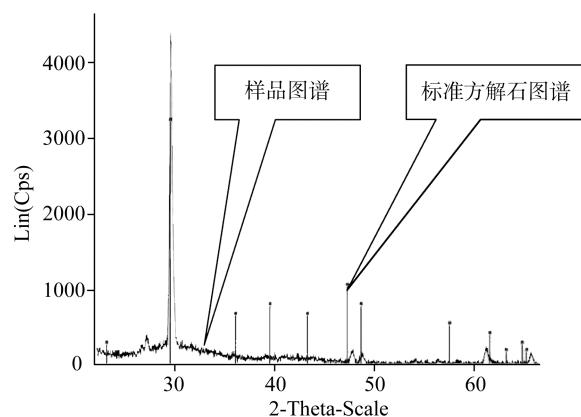


图1 网纹藤壶壳板矿化结构的XRD图谱

Fig.1 XRD diffraction patterns of the biomineralized plates of *Balanus reticulatus* Utinomi (The continuous pattern is for the biomineralized plates, the other is the pattern of the calcite standard)

2.2 藤壶壳板碳酸钙含量测定

经测定, 海口和陵水两地网纹藤壶壳板的碳酸钙含量均在90%以上, 最大值为93.87%, 最小值90.77% (表1、表2; 图2、图3)。

表1 不同方法测定的海口地区网纹藤壶壳板的碳酸钙含量(%)

Tab. 1 The calcium carbonate content (%) of barnacle wall plate samples from Haikou by different testing methods

方法	碳酸钙含量(%)			平均值	方差
钙黄绿素法	92.86	92.24	91.42	91.64	92.04
钙指示剂法	93.24	92.32	94.84	93.47	1.0412
K-B指示剂法	90.77	92.61	94.17	91.89	1.4245

表2 不同方法测定的陵水地区网纹藤壶壳板的碳酸钙含量(%)

Tab. 2 The calcium carbonate content (%) of barnacle wall plate samples from Lingshui by different testing methods

方法	碳酸钙含量(%)			平均值	方差
钙黄绿素法	91.86	92.18	91.82	92.23	0.2123
钙指示剂法	90.78	92.89	93.20	93.87	1.3342
K-B指示剂法	93.40	93.53	93.32	93.40	0.0869

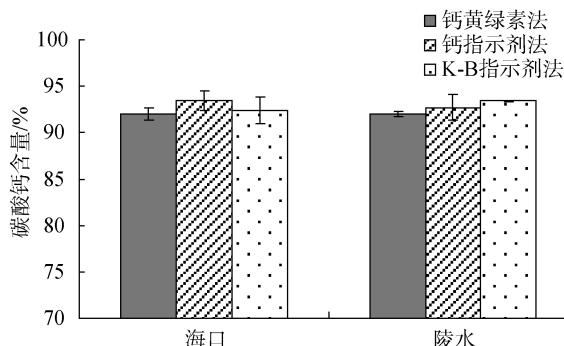


图2 三种方法测定海口地区网纹藤壶壳板的碳酸钙含量

Fig. 2 The calcium carbonate content (%) of barnacle wall plate samples from Haikou by different testing methods

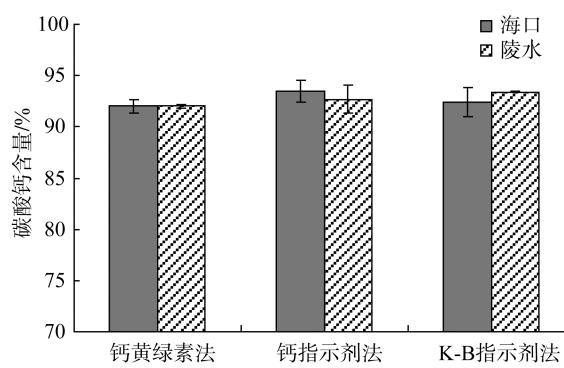


图3 三种方法测定陵水地区网纹藤壶壳板的碳酸钙含量

Fig. 3 The calcium carbonate content (%) of barnacle wall plate samples from Lingshui by different testing methods

采用方差分析法, 比较3种碳酸钙含量测定方法, 发现在海口和陵水, 这三种方法的测定结果都没有显著性差异($F_{\text{海口}}=1.904$, $F_{\text{陵水}}=3.126$ 均小于 $F_{0.05, 29}=4.26$)。

采用t检测法比较海口和陵水两地网纹藤壶壳板

碳酸钙含量的差异, 发现使用三种方法测定海口和陵水两地的网纹藤壶壳板碳酸钙含量没有显著性的地区差异(表3)。

表3 t 检测法比较海口和陵水两地网纹藤壶壳板碳酸钙含量的地区差异性

Tab. 3 Comparison of the calcium carbonate content (%) of barnacle wall plate samples from Haikou and Lingshui by t-test

测定方法	钙黄绿素法	钙-羧酸指示剂法	铬黑T指示剂
$ t $	0.0513	0.903	1.475
$t_{0.05, 6}$	1.943	1.943	1.943

3 讨论

3.1 网纹藤壶壳板中矿化结构特征

网纹藤壶壳板的矿化结构主要由方解石构成, 微结晶体的排列及其取向复杂。这与主要产自美洲的鹦南巨藤壶(*Austromegabalanus psittacus*)壳板的检测结果类似^[9]。但与大多数软体动物的矿化外壳同时具有方解石和文石的结构有较大差异^[3, 13-15]。方解石是 CaCO_3 晶体最稳定的晶型, 有利于跟有机质结合形成稳定的高性能复合物。本实验中测得无机碳酸钙含量在90%以上, 剩余的有机质含量应在10%以下。一般情况下, 矿化组织中有机质含量尽管很少, 但已在贝类, 腹足类动物的外壳研究中发现有机质对碳酸钙微晶体的排列和生长起着重要的调节作用, 并影

响其宏观组织的力学性能^[16-21]。故推测藤壶壳板中参与生物矿化的有机质与贝类的可能有较大差异，亟待进一步的研究。网纹藤壶壳板中由方解石跟有机质构成的高级自组装结构使其具有优异的力学性能和理化性质。网纹藤壶主要生活在潮间带和近岸浅水区，风浪冲刷腐蚀和退潮时的干燥环境使其生存面临严酷的考验，坚韧的藤壶矿化外壳起了重要的保护作用，这对网纹藤壶能适应苛刻的生活环境并广泛分布意义重大。

3.2 比较三种碳酸钙含量测定方法

滴定试验结果的精密度和准确度与检测终点的方法密切相关，所以如何选择适宜的指示剂灵敏地确定终点是实验的关键。钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂三种方法都属于EDTA络合滴定法，主要差异体现在指示剂的不同。

实验结果显示，在检测海口或陵水地区的藤壶壳板碳酸钙含量时，钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂三种方法的测定结果在统计学上没有显著性差异。这一方面表明，这三种方法均可用于藤壶壳板碳酸钙含量的测定，都能获得较精确的结果，重复性较好(表1和表2)；另一方面，三种检测方法能获得无显著性差异的实验结果也相互验证了本次实验过程及结果的可靠性。

进一步分析比较实验结果，可以发现，在三种方法中钙黄绿素法测定结果的标准误差最小，可见采用该方法测定藤壶壳板中碳酸钙含量可获得重复性好的测量结果。钙黄绿素，即3,3'-双(甲胺二乙酸)荧光素，是一种络合荧光指示剂。其钠盐在酸性条件下呈黄色，碱性时呈淡红色。 $pH < 11$ 时，钙黄绿素本身具有黄绿色荧光，Cu、Fe、Al、Pb、Mn等离子是其荧光淬灭剂；当 $pH > 12$ 时，钙黄绿素需跟一些离子络合后才能产生荧光，其中与Ca的络合反应非常灵敏，可达 $0.08 \mu\text{g}$ 的水平^[19, 22]。本实验中，当用EDTA滴定至终点时，因Ca不再与荧光指示剂结合而使溶液颜色由黄绿色变为淡红色，可非常灵敏地指示出终点。钙-羧酸指示剂，即2-羟基-1-(2-羟基-4-磺基-1-萘基偶氮)-3-萘甲酸。 $pH < 10$ 时呈红色， $pH > 13$ 为浅蓝色，能和钙形成红色螯合物，可较灵敏地显示终点，但其反应会受到Mg的影响。铬黑T是一种偶氮染料，溶于水中不稳定，易发生聚合反应和氧化反应；铬黑T的滴定终点不太明显，在本实验中也呈现出较大的标准误差。此外，如果溶液中有少量的其他离子，如 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 等时，会产生封闭现象，使终点不敏锐^[23]。所以，从检测的精确度出发，测定网纹

藤壶壳板中碳酸钙含量时可优先考虑采用钙黄绿素法。

3.3 网纹藤壶壳板碳酸钙含量的地区差异比较

通过检测和数据分析，可知海口和陵水两地的网纹藤壶壳板碳酸钙含量没有呈现出显著性的地区差异。尽管两地的生境和气候有一定差别，但对网纹藤壶壳板碳酸钙含量没有显著影响，这可能与藤壶较强的适应性以及钙代谢的稳定性相关。实验结果也初步表明影响碳酸钙测定结果的 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 等离子，可能在这两个地区生长的网纹藤壶壳板中的差异不大，不会对碳酸钙的测定结果造成显著影响。考虑到本次实验所测定网纹藤壶的数量有限，故详实确凿的结论还需今后进一步广泛采集样本进行研究和比较。

本实验从碳酸钙含量和矿化结构特征两个方面初步研究了网纹藤壶壳板。实验发现网纹藤壶壳板矿化组织主要由方解石构成，其微晶体排列取向较为复杂。海口和陵水两地藤壶壳板中碳酸钙含量没有显著差异($P < 0.05$)，最大值为93.87%，最小值为90.77%。尽管三种碳酸钙含量测量法(钙黄绿素法、钙-羧酸指示剂法和铬黑T指示剂法)结果没有显著性差异($P < 0.05$)，但进一步综合分析发现钙黄绿素法测定结果最为稳定，且易操作，可作为首选方法。实验结果将为今后进一步研究藤壶矿化结构以及通过控制矿化过程达到防污的新思路探索方面提供参考资料。此外，实验结果在生物仿生和可再生碳酸钙资源的利用方面也具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 李金志. 贝壳的综合利用[J]. 淮海工学院学报, 2001, 10: 22-23.
- [2] 吕百龄. 碳酸钙在橡胶工业中的应用[J]. 橡塑技术与装备, 2003, 29(8): 28-30.
- [3] 李凤敏. 贝壳材料的结构特征和力学性能分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2005.
- [4] 梁艳, 赵杰, 王来, 等. 贝壳的力学性能和增韧机制[J]. 机械强度, 2007, 29(3): 507-511.
- [5] Peters S E, Gaines R R. Formation of the ‘Great Unconformity’ as a trigger for the Cambrian explosion [J]. Nature, 2012, 484: 363-366.
- [6] Wang C A, Huang Y, Zan Q F, et al. Biomimetic structure design-a Possible Approach to change the brittleness of ceramics in nature [J]. Materials Science and Engineering C, 2000, 11: 9-12.
- [7] 李秀华, 袁启明, 杨正方. 贝壳结构及陶瓷的仿生研

- 究[J]. 硅酸盐通报, 2003, 22(2): 53-56.
- [8] 何艮, 麦康森. 贝类生物矿化生物大分子与分子识别[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(4): 310-312.
- [9] Rodríguez-Navarro A, CabraldeMelo C, Batista N, et al. Microstructure and crystallographic-texture of giant barnacle (*Austromegabalanus psittacus*) shell[J]. Journal of Structural Biology, 2006, 156(2): 355-362.
- [10] Dreanno C, Kirby R R, Clare A S. Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2007, 351: 276-282.
- [11] Dickinson G H, Vega I E., Wahl K J, et al. Barnacle cement: a polymerization model based on evolutionary concepts[J]. The Journal of Experimental Biology, 2009, 212: 3499-3510.
- [12] 李轩贞, 刘文华, 卢慧卿. 不同品种珍珠母碳酸钙含量测定[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(12): 37-38.
- [13] 陈忱, 赵杰, 梁艳, 等. 鲍鱼壳的结构和力学性能[J]. 材料导报, 2009, 23: 457-459.
- [14] 贾太轩, 刘自力, 张刚生. 翡翠贻贝珍珠层的 XRD 和 FTIR 光谱特征[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(1): 131-133.
- [15] 李青梅, 黄增琼, 李浩璇, 等. 翡翠贻贝贝壳的微结构研究[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2011, 36(6): 882-886.
- [16] Marxen J C, Gehrke T, Becker W, et al. Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say)[J]. The Biological Bulletin, 1998, 194: 231-240.
- [17] 姜国良, 陈丽, 刘云. 贝壳有机基质与生物矿化[J]. 海洋科学, 2002, 6(2): 16-18.
- [18] 欧阳健明. 基质调控碳酸钙生物矿化过程及其体外模拟的研究进展[J]. 功能材料, 2005, 36(2): 173-180.
- [19] 成亮, 钱春香. 生物矿化碳酸钙机理研究进展[J]. 硅酸盐通报, 2006, 25(6): 108-116.
- [20] 梁艳, 赵杰, 王来, 等. 贝壳的力学性能和增韧机制[J]. 机械强度, 2007, 29 (3): 507-511.
- [21] Berman A, Ahn D J, Lio A, et al. Total alignment of calcite at acidic polydiacetylene films: Cooperativity at the organic-inorganic interface [J]. Science, 1995, 269: 515-518.
- [22] 张荣华, 王秀梅, 胡春燕, 等. 钙黄绿素在络合滴定中的应用[J]. 山西大学学报(自然科学版), 1996, 19(2): 165-168.
- [23] 国家坪保局. 环境监测技术规范. 北京: 中国环境科学出版社, 1986, 88-95.

Microstructure and content of biomineralizing calcium carbonate in the shell of *Balanus reticulates Utinomi*

LAI Shui-fa¹, CHEN Xin^{1,2}, PENG Ming-dong¹, ZHANG Bing-shan³, WANG Fang¹, ZHANG Zhe-jing¹, TANG Min^{1,2}

(1. Faculty of Material and Chemical Engineering, Hainan University Haikou 570228, China; 2. Key Lab of Advanced Materials of Tropical Island Resources, Ministry of Education, Hainan University Haikou 570228, China; 3. The Ocean College of Hainan University Haikou 570228, China)

Received: Dec., 10, 2012

Key words: *Balanus reticulates Utinomi*; Wall plate; Biomineralization; Calcium Carbonate

Abstract: The microstructure of wall plate of the barnacle (*Balanus reticulates Utinomi*) was studied, and the calcium carbonate content of barnacle wall plate samples from two sampling sites was compared by three testing methods including calcein method, calcium carboxylic acid indicator method and mordant black T method. It was found that the microstructure of the wall plate is mainly composed of calcite, and the array of crystalline is most probably arranged in a specific complicated form. The maximum value of the calcium carbonate content is 93.87% and the minimum is 90.77%. There is no significant difference ($P < 0.05$) between two sampling sites, and also no significant difference ($P < 0.05$) among the three testing methods. However, from the point of the view of testing stability and operability, calcein method is the best technique for the examination of calcium carbonate content of barnacle shell.

(本文编辑: 康亦兼)