

汉阳陵文物表面硫酸盐形成原因微生物学证据

李冬娟¹ 王翀² 王卫卫^{1*} 熊本涛¹

- (1. 西北大学 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 陕西 西安 710069)
(2. 砖石质文物保护国家文物局重点科研基地 西安文物保护修复中心 陕西 西安 710075)

摘要: 用仅含硫源的无机盐培养基对采自汉阳陵 13 号和 15 号遗址坑文物表面的土样进行细菌富集筛选实验, 并对分离的菌株进行生理生化特性研究、16S rDNA 序列分析及硫代谢能力测试。分离得到 5 株细菌: TD1、TD2、TD3、TD15 及 PL13。其中 TD1 属于 *Alcaligenes*, TD3 属于 *Bacillus*; 硫代谢能力测试结果显示 TD2、TD15 和 PL13 代谢产生硫酸盐的速率远远小于 TD3 和 TD1, TD3 氧化硫源生成硫酸盐的速率是 TD1 的 1.4 倍。实验证实这些菌株均能氧化 S、 $S_2O_3^{2-}$ 和 S^{2-} 生成硫酸盐从而获得能量, 这表明微生物氧化土壤中硫化物是汉阳陵文物表面硫酸盐增加的原因, 从而为汉阳陵文物表面硫酸盐的形成原因提供了微生物学依据。

关键词: 汉阳陵, 文物, 硫酸盐, 微生物, 16S rDNA

Microbiological Evidence of the Formation of Sulfate on the Surface of Yangling Mausoleum

LI Dong-Juan¹ WANG Chong² WANG Wei-Wei^{1*} XIONG Ben-Tao¹

- (1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)
(2. Key Scientific Research Base on the Conservation of Stone and Brick Materials, Xi'an Centre for the Conservation & Restoration of Cultural Heritage, State Administration of Cultural Heritage, Xi'an, Shaanxi 710075, China)

Abstract: Soil samples were from the surface of delves 13 and 15 of the Yangling Mausoleum. After cultured in mineral salt media with only sulfur source, five bacterial strains were isolated and assigned as TD1, TD2, TD3, TD15 and PL13. According to their physiobiochemical characteristics and 16S rDNA sequences, TD1, TD3 were identified as *Alcaligenes* and *Bacillus* respectively. The ability of metabolizing sulfide was also studied. TD2, TD15 and PL13 can produce a little sulfide. The speed of producing sulfide by TD3 is 1.4 times to that by TD1. These strains feed on sulfide, such as S, $S_2O_3^{2-}$, S^{2-} , and can oxidize sulfide to sulfate. The conclusion provides a microbiological evidence for the formation of sulfate on the surface of Yangling Mausoleum.

Keywords: Yangling Mausoleum, Antiquity, Sulfate, Microbe, 16S rDNA

近年来,生物腐蚀石质问题日益受到重视^[1-4]。据初步估计有 20%–30%的岩石表层腐蚀是生物作用的结果^[5]。微生物代谢可产生有机酸(如葡糖酸和乳酸)、无机酸、亚硝酸、硝酸和硫酸等,它们直接与石材的无机组分反应(螯合或酸化)^[5],已经发现硝化细菌和硫杆菌都是石材腐蚀的主要祸害之一^[6-7]。汉阳陵作为中国第一座大型原址保护博物馆^[8],通过全封闭式玻璃通道将发掘现场进行展示。封闭式保存方式可有效调节遗址区环境温度、湿度,也可控制降尘及游客带来的微生物侵入,但恒温高湿度环境也为土壤中微生物的大量繁殖提供了适宜的生长条件。自开馆以来,封闭遗址区局部位点出现了土遗址返碱、陶俑风化等现象,前期研究表明硫酸盐是造成文物表面出现风化返碱的主要原因。酸雨、冻融、盐结晶、风沙、干湿循环等因素都是自然界中硫酸盐形成的主要原因,沙尘气溶胶可以为空气中的二氧化硫提供反应界面,最终形成硫酸盐^[9],沙尘暴也可以促使硫酸盐的形成^[10-11];此外,微生物也可以氧化低价硫产生硫酸盐^[12]。本研究以返碱现象最为显著的 13 号和 15 号遗址坑为研究对象,对土壤中的硫酸盐生成菌进行分离、鉴定及氧化硫能力测试,探讨文物风化与微生物活动的关系,为汉阳陵文物表面硫酸盐形成原因提供依据。

1 方法与材料

1.1 细菌的富集、分离

1.1.1 培养基组成: 选择培养基 1 (td 培养基): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 g, KNO_3 2 g, KH_2PO_4 2 g, NaHCO_3 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0–7.6, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

选择培养基 2 (pl 培养基): $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 g, NH_4Cl 0.2 g, NaHCO_3 2 g, Na_2HPO_4 0.4 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 蒸馏水 1 L, pH 6.6–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。其中 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 NaHCO_3 溶于少量水后单独灭菌,再加入其他已灭菌的盐溶液中,使用前加 2 滴经过滤除菌的 FeSO_4 (浓度为 10 g/L) 溶液。

硫酸盐检测培养基: KNO_3 0.5 g, K_2HPO_4 0.2 g, Na_2CO_3 0.2 g, CaCO_3 2 g, 硫磺粉 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0–7.6, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。其中硫磺粉经紫外线照射 30 min 后加入已灭菌的液体培养基中。

1.1.2 样品采集与微生物富集分离: 根据汉阳陵石质文物表面硫酸盐含量的差异(表 1), 13 号坑 SO_4^{2-} 含量是 15 号坑的 2.85 倍, 选取 13 号坑和 15 号坑两个采样点。经实地检测得到两个取样地点的理化参数如表 1 所示。

表 1 采样环境条件
Table 1 Environmental conditions of sampling

坑号 Delve	空气湿度 Humidity (%)	土壤含水量 Soil moisture (%)	采样温度 Temperature (°C)	SO_4^{2-} 含量 SO_4^{2-} concentration (mg/L)	pH	地表距离 Distance (cm)
13	100	3.0–3.5	20.9	11.5641	9.1	10
15	99–100	2.5–3.0	20.7	4.0577	8.7	10

以 100 g/L 的比例将土样加入选择培养基中, 20°C 静态培养。定时转接, 取富集培养液适当稀释后于选择培养基平板涂布分离, 20°C 培养, 将获得的单菌落反复纯化后于斜面保存。

1.2 菌株形态观察及生理生化特性研究参见文献[13–14]。

1.3 硫酸盐检测

用铬酸钡分光光度法^[15]检测硫酸盐含量。其具体实验步骤如下:

(1) 取 50 mL 待测样, 置于 150 mL 锥形瓶中。

(2) 另取 150 mL 锥形瓶 8 个, 分别加入 0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 及 10.00 mL 硫酸根标准溶液, 加蒸馏水至 50 mL。

(3) 向待测样及标准液中各加 1 mL 2.5 mol/L 盐酸溶液, 加热煮沸 5 min 左右。取下后再各加 2.5 mL 铬酸钡悬浊液, 再煮沸 5 min 左右。

(4) 取下锥形瓶, 稍冷却后, 向各瓶逐滴加入 (1+1) 氨水至呈柠檬黄色, 再多加 2 滴。

(5) 待溶液冷却后, 用慢速定性滤纸过滤, 滤液收集于比色管内(如滤液混浊, 应重复过滤至透明)。用蒸馏水洗涤锥形瓶及滤纸 3 次, 滤液收集于比色管中。

(6) 在 420 nm 波长下测量吸光度, 绘制标准曲线。

(7) 计算:

$$\text{硫酸盐 (mg/L)} = \frac{M}{V} \times 1000$$

M ——由标准曲线查得 SO_4^{2-} 量(mg);

V ——待测样体积。

1.4 菌株 16S rDNA 序列测定和系统发育树构建

将纯化的菌株通过 PCR 扩增, 所得产物委托大连宝生物公司进行 16S rDNA 测序。将基因序列输入 NCBI GenBank 数据库, 进行 BLAST 比对。利用 Clustal 和 MEGA 软件建立系统发育树。用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学观察

经过反复分离、培养和纯化, 获得 5 个菌株: TD1、TD2、TD3、TD15 和 PL13, 其中 TD1、TD15 分离自 15 号坑, 其余菌株则分离自 13 号坑, 其形态特征如下。

TD1: 在 td 培养基上 28°C 恒温培养 3 d 后, 开始出现菌落, 5–6 d 时菌落为白色不透明针尖状, 呈圆形, 边缘光滑, 大小 1.2 mm, 表面光滑, 不易挑起, 整个菌落像一颗小沙粒一样可在培养基上滑动。TD1 也可在牛肉膏培养基上生长。菌株 TD1 革兰氏染色阴性; 芽孢染色阴性, 菌体细胞呈杆状, 两端钝圆, 大小为 $(0.15-0.20) \mu\text{m} \times (0.50-0.80) \mu\text{m}$; 侧生鞭毛。图 1 为 TD1 经液体牛肉膏培养 11 h 后经磷钨酸负染色后的透射电镜照片。



图 1 TD1 透射电镜

Fig. 1 TEM photo of strain TD1 ($\times 20000$)

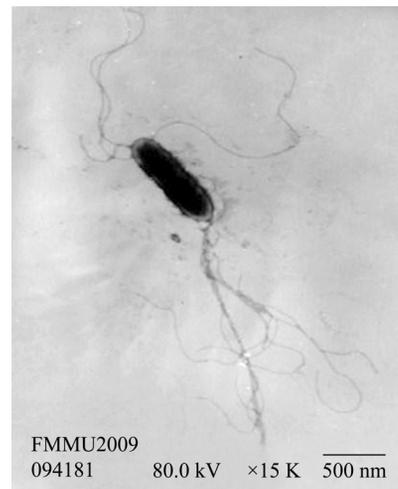


图 2 TD3 透射电镜

Fig. 2 TEM photo of strain TD3 ($\times 15000$)

TD2: 在 td 培养基上 28°C 恒温培养 3 d 后, 隐约可见菌落, 菌落无色透明, 6 d 时, 其菌落大小为 0.6 mm, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑。TD2 也可在牛肉膏培养基上生长。革兰氏染色阴性, 芽孢染色阴性, 菌体细胞呈杆状, 大小为 $(0.15-0.20) \mu\text{m} \times (0.80-1.50) \mu\text{m}$ 。

TD3: 在 td 培养基上 28°C 恒温培养 5 d 后, 出现透明无色菌落, 待 8 d 后菌落为半透明水滴状, 呈圆形, 边缘绒毛状, 大小 0.7 mm–1.3 mm, 表面湿润光滑, 易挑起。可在牛肉膏培养基上生长。幼龄菌革兰氏染色阳性, 老龄菌革兰氏染色阴性^[4]。菌体细胞呈杆状, 两端钝圆, 大小为 $(0.2-0.5) \mu\text{m} \times (0.6-1.0) \mu\text{m}$ 。两端生鞭毛。图 2 为 TD3 在牛肉膏液体培养基中培养 17 h 后经磷钨酸负染色后的透射电镜照片。芽孢染色阳性, 其芽孢呈圆形。

TD15: 在 td 培养基上 28°C 恒温培养 2 d 后, 出现白色菌落。5 d 时, 菌落不透明, 淡黄色, 圆形, 边缘绒毛状, 中间凸起, 大小 0.5 mm–0.7 mm, 有运动性。在牛肉膏培养基上时菌落呈砖红色, 菌落直径可达 3 mm。革兰氏染色阳性, 芽孢染色阴性, 菌体细胞球状, 大小 $1.5 \mu\text{m}-2 \mu\text{m}$ 。

PL13: 在 pl 培养基上 28°C 恒温培养 2 d 后, 出现无色透明菌落, 5 d 时, 菌落淡黄色, 不透明, 圆形, 边缘绒毛状, 大小 1 mm, 在牛肉膏培养基上其菌落呈橘红色。革兰氏染色阳性, 芽孢染色阴性, 菌体细胞呈球状, $0.8 \mu\text{m}-1.5 \mu\text{m}$ 。

2.2 生理生化特性研究

对分离的 5 株菌进行生理生化特性研究, 其结果如表 2 所示, 实验表明该类菌有着广泛的碳源, 既可自养也可异养生长, 除 TD15 外其他菌株都可发酵葡萄糖产酸, 而且都有很高的耐碱性, 除 TD3 外, 其他菌株都有较高的耐盐性。

鉴定特征 Characteristics	TD1	TD2	TD3	TD15	PL13
Catalase	+	+	+	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	+	-	-
Cellulose decomposing	-	-	-	-	-
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-
M. R test	-	-	+	-	+
V. P test	-	-	-	-	-
Indole production	-	+	+	+	+
Use of citrate	+	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Oxidative fermentation of glucose	+	+	+	-	+
Salt tolerance					
2%	+	+	+	+	+
5%	+	+	-	+	+
7%	+	+	-	+	+
10%	+	+	-	+	+
12%	+	+	-	-	-
Alkali resistance					
pH 8	+	+	+	+	+
pH 9	+	+	+	+	+
pH 10	+	+	-	+	+
pH 11	+	+	-	+	-
Carbon utilization					
Glucose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-
Mannite	-	+	+	+	+
Tyrosine	-	+	+	+	+
Sorbricacid	+	-	-	-	-
Rhamnose	+	-	-	-	-

2.3 硫酸盐检测

将 TD1、TD2、TD3、TD15 和 PL13 分别在牛肉膏液体培养基中培养 18、18、24、12 和 12 h 后, 以 5% 接种量分别接入硫酸盐检测培养基中, 培养 48 h 后, 每隔 24 h 测 1 次硫酸盐含量。该 5 株菌对硫源

的利用速率有明显的差异, TD1 和 TD3 代谢产生硫酸盐的速率如图 3 所示, TD2、TD15 和 PL13 代谢产生硫酸盐速率远远小于 TD1 和 TD3, 表明 TD1 和 TD3 为代谢产生硫酸盐的优势菌。

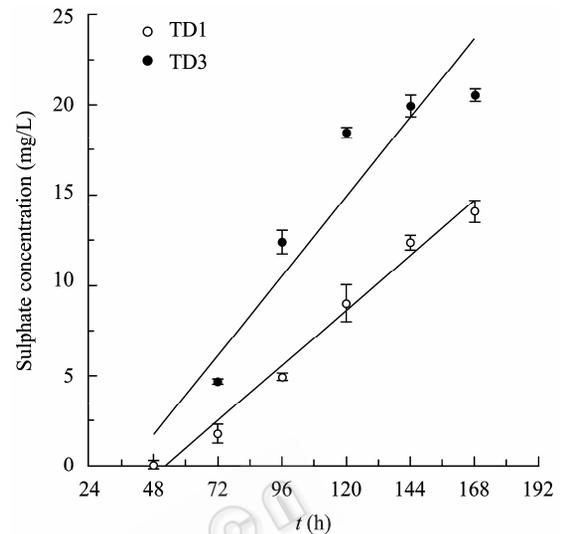


图 3 菌株 TD1 和 TD3 产生硫酸盐速率

Fig. 3 The speed of producing sulfide by strain TD1 and strain TD3

2.4 菌株 16S rDNA 序列及其系统发育分析

选取代谢产生硫酸盐的优势菌进行 16S rDNA 序列及其系统发育分析。TD1 的 16S rDNA 产物为 1410 bp, TD3 的 16S rDNA 产物为 1441 bp。菌株 TD1 和 TD3 在 GenBank 数据库中的登录号分别为 GU124637 和 GU124638。

将两菌株的 16S rDNA 序列输入 GenBank 数据库中, 进行 BLAST 比对。结果显示, 菌株 TD1 和 *Alcaligenes*、*Alcaligenes faecalis* 的同源性可达 100%。菌株 TD3 和 *Bacillus*、*Aneurinibacillus thermoaerophilus*、*Brevibacillus reuszeri* 的同源性可达 100%, TD1 和 TD3 与这些菌的关系如图 4 所示。

3 结论与讨论

本课题前期研究结果表明造成返碱及风化的主要物质为硫酸钙(CaSO_4), 初步推测由大气污染物 SO_2 与土壤中碳酸盐类反应形成, 但硫离子的氧化反应机理即硫酸根离子的来源仍未被证实。本研究对不同采样地点分离的菌株硫酸盐代谢能力进行了研究。其结果(图 3)表明, TD1 和 TD3 均能以含硫化物为能源生长, 并代谢产生硫酸盐。对菌株 TD1

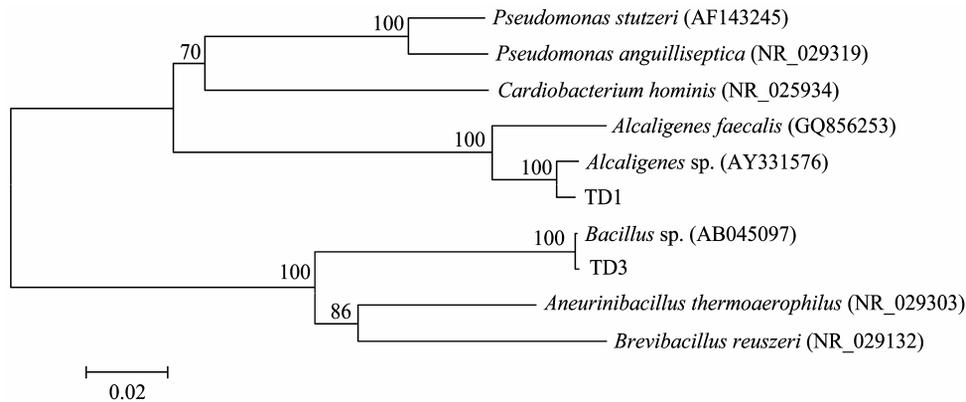


图 4 菌株 TD1 和 TD3 与不同菌株之间系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain TD1, TD3 and sequences of validly described bacteria associated

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 resampled data sets. After each bacterial name, the GenBank accession numbers are showed in parentheses. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide.

和 TD3 的硫酸盐生成量和时间之间的曲线进行拟合得到:

$$\delta\text{STD1} = 0.127 t - 6.637 \quad R^2 = 0.985 \quad (1)$$

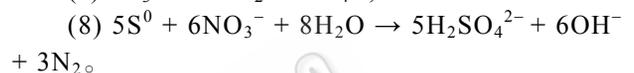
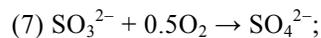
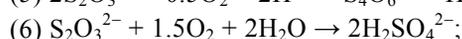
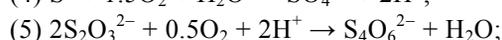
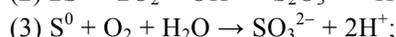
$$\delta\text{STD3} = 0.184 t - 7.147 \quad R^2 = 0.915 \quad (2)$$

式(1)和式(2)中的斜率为菌株产生硫酸盐的速率, 菌株 TD1 和 TD3 的硫酸盐产生速率分别为 0.127 mg/(L·h)和 0.184 mg/(L·h), 菌株 TD3 的硫酸盐生成速率是菌株 TD1 的 1.4 倍, 菌株 TD3 对硫化物的利用能力大于菌株 TD1, 与采样地点硫酸盐含量情况吻合(表 1), 表明文物表面存在着可以代谢硫化物产生硫酸盐的微生物, 该类微生物对硫化物的氧化是汉阳陵石质文物表面硫酸盐增加的原因之一。

菌株 TD1、TD2、TD3、TD15 和 PL13 是用无机盐选择培养基从汉阳陵文物表面分离得到的, 培养基中只含硫化物, 它们营化能无机的营养方式, 即氧化 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 为 SO_4^{2-} 而获取能量从而同化 CO_2 产生有机物, 实验中还用硫磺为硫源对其进行了硫代谢速率研究, 其化学反应方程式分别为:



除此之外, 该类菌也可以通过以下化学反应来获取能量^[16]:



通过形态观察、生理生化特征及 16S rDNA 同源性分析将其初步鉴定到属, 即菌株 TD1 应归为 *Alcaligenes*, 菌株 TD3 应归为 *Bacillus*, 菌株 TD2 与 *Pseudomonas* 的理化性质有很大的相似性, 菌株 TD15 和菌株 PL13 与 *Micrococcus* 有很大的相似性。这表明汉阳陵文物表面存在较复杂的微生物群落结构。然而此类菌都有共同的特性即化能自养性, 这些菌的生理生化特性研究结果(表 2)表明, 其不仅可以代谢产生硫酸盐等无机酸, 还可以代谢产生有机酸, 经过长期积累, 这些物质会对文物表面起到腐蚀作用。

参 考 文 献

- [1] Palmer RJ, Siebert J, Hirsch P. Biomass and organic acids in sandstone of a weathering building. *Microbial Ecology*, 1991(21): 253-266.
- [2] Bock E, Sand W. The microbiology of masonry biodeterioration. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993(74): 503-514.
- [3] Jones DA, Amy PS. A thermodynamic interpretation of microbiologically influenced corrosion. *Corrosion*, 2002(58): 638-645.
- [4] Hamilton WA. Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling*, 2003(19): 65-76.
- [5] Baer NS, Snethlage R. Saving our architectural heritage (the conservation of historic stone structures). New York:

- John Wiley & Sons, 1997: 25–36.
- [6] Roberts DJ, Nica D, Zuo G, *et al.* Quantifying microbially induced deterioration of concrete: initial studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002(49): 227–234.
- [7] Nica D, Davis JL, Kirby L, *et al.* Isolation and characterization of microorganisms involved in the biodeterioration of concrete in sewers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000(46): 61–68.
- [8] 陕西省考古研究院. 汉阳陵帝陵东侧 11-21 号外藏坑发掘简报. *考古与文物*, 2008(3): 16–30.
- [9] Kiehl JB. The relative roles of sulfate aerosols and greenhouse gases in climate forcing. *Science*, 1993(260): 311–314.
- [10] Beech IB. Biocorrosion: role of sulphate-reducing bacteria. // Bitton G. ed. *Encyclopaedia of Environmental Microbiology*. Washington: Wiley, 2002: 465–475.
- [11] Vasco F. Air pollution in relation to stone decay. The deterioration and conservation of stone. UNESCO, 1988: 111–171.
- [12] Mori I, Nishikawa M, Iwasaka Y. Chemical reaction during the coagulation of ammonium sulphate and mineral particles in the atmosphere. *The Science of Total Environment*, 1998(224): 87.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [15] 李红卫. 硫酸盐测定铬酸钡分光光度法的改进. *人民珠江*, 2005(2): 53–54.
- [16] 翁酥颖, 戚蓓静, 史家梁, 等. 环境微生物学. 北京: 科学出版社, 1985.

征订启事

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linykn@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月刊	480	www.lifescience.net.cn	cbis@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net