

石质文物加固中细菌诱导碳酸钙生成的研究

孙延忠, 陈 青

(中国文化遗产研究院, 北京 100029)

摘要: 为探讨细菌生物矿化法加固石质文物, 利用枯草杆菌 II 在特殊含钙培养基上进行诱导矿化研究。结果表明, 筛选出的菌株枯草杆菌 II 在 M-3+ASP 固体和液体培养基上能诱导生成白色物, 白色诱导物经 X 衍射分析为碳酸钙; 电子显微镜下观察发现碳酸钙在细菌周围生成, 并包裹细菌菌体, 使细菌菌体钙化。

关键词: 细菌; 诱导; 生物矿化; 石质文物

中图分类号: K876.2 Q39.99 文献标识码: A

0 引言

我国石质古迹文物资源丰富, 含钙岩石是历史上遗存下来的大量石质文物中最常用的基质材料。石质文物饱受环境大气、酸雨、生物和地表温湿度变化等因素影响, 导致石构件风化、分解等。目前, 保护手段多采用无机或有机高分子材料来加固石质文物, 但由于高分子材料的力学性能与原文物基材不匹配及保护材料老化等原因, 经常会造成文物变色、硬壳形成和文物表层剥落等问题, 且有些材料老化后很难去除, 以至于使保护的文物受到二次破坏, 严重时甚至会导致文物的毁灭。因此, 寻找一种新型的有效的保护措施是保护石质文物的一个新思路。

自然界微生物种类繁多, 有些微生物在石质文物的孔隙间能诱导碳酸钙结晶沉积并矿化。通过微生物诱导生成碳酸钙结晶沉积并矿化对风化的石质文物进行加固保护, 是近年来国际石质文物保护修复领域研究的重点。这些碳酸钙结晶能与石质原材料成分相结合, 从而对风化脆弱的石质文物进行加固。国外利用细菌生物矿化进行文物保护的研究较早。1995 年, 意大利人 Tiano 利用从海洋贝壳中提取的有机大分子 OMM 诱导碳酸钙结晶的沉积, 获得了较好的结果^[1-2]; Perito 研究了枯草杆菌 II (*Bacillus subtilis*) 诱导碳酸钙结晶并对石质文物的加固情况, 获得较好的效果^[3]; 2003 年, 西班牙 Granada 大学的矿物学家 Carlos Rodríguez Navarro 发现

了一种土壤细菌 (*Mycrococcus xanthus*), 并利用此细菌对石质文物进行保护加固^[4]。这类细菌能够在石质文物内部诱导产生碳酸钙结晶^[5-10]。一般的化学加固剂渗透性都有一定的限制, 且容易堵塞石质文物的孔隙, 使内部的湿气不能出来, 可能会进一步破坏文物; 而细菌能够最大限度的渗透到石质文物内部中, 诱导产生的碳酸钙结晶也不会堵塞石质的孔隙。

采用微生物生物矿化保护文物成为国内研究的新思路, 微生物的代谢产物即是保护文物的材料, 与文物材质一致, 无老化及不可预知的隐患^[1]。国内利用自主筛选的细菌并诱导碳酸钙加固保护石质文物方面的研究未见报道, 探索微生物方法对风化的石质文物进行加固保护具有重要意义。按照文物保护的要求, 利用微生物诱导生成的碳酸钙加固风化严重的石灰岩、大理石和汉白玉等石质文物, 从而达到保护文物的目的。这种生物矿化加固法将克服有机和无机加固剂对文物产生的副作用, 其诱导产物持久、成本低、对人和环境没有危害, 满足文物保护的要求, 在文物保护的实践中具有重要意义。利用微生物及生物技术进行文物保护将成为未来具环保型且行之有效的保护途径。本文主要介绍利用自行筛选的细菌在特定培养液内诱导生成碳酸钙, 并对生成的碳酸钙进行 X-衍射分析和电镜观察。

1 试验材料和方法

1.1 试验菌种及培养基

收稿日期: 2009-04-02 修回日期: 2009-06-17

基金项目: 国家文物局 (编号 20050110)

作者简介: 孙延忠 (1977-), 男, 研究生, 2003 年毕业于华中农业大学微生物专业。北京朝阳区北四环东路高原街 2 号, 100029 E-mail: yanzhongsun@sohu.com

(1) 试验菌种。枯草杆菌-II: 本课题组自行筛选的一株具有诱导碳酸钙生成的细菌。

(2) 培养基。M-3+ASP 乙酸钙、酪蛋白胨 (Casitone)、天冬氨酸 (ASP)、琼脂粉。pH=8.0

1.2 试验方法

(1) 细菌诱导生成碳酸钙。将枯草杆菌-II 均匀涂抹在 M-3+ASP 固体培养基上, 28℃ 培养, 观察细菌在培养基上生长情况。培养 3 天后从培养基表面刮下白色粉状物, 在三维视频显微镜下观察白色粉状物的形态。

(2) 细菌形态观察。采用革兰氏染色法对枯草杆菌-II 诱导生成碳酸钙前后的菌体分别进行染色, 镜检, 观察其形态。把枯草杆菌-II 在 M-3+ASP 培养基上生成的白色粉状物研磨成粉末, 并按照细菌革兰氏染色法进行染色, 显微镜观察。

(3) 诱导物分析检测及微观结构观察。为确定培养基表面生成的白色诱导产物的成分, 我们对白色诱导物进行 X 衍射分析。在解剖显微镜下用刮刀轻轻刮下白色粉状物 (勿刮及培养基), 将白色粉状物研磨成粉末, 进行 X 衍射分析, 为避免培养基成分影响分析结果的准确性, X 衍射以 M-3+ASP 培养基为对照进行分析。同时, 刮取培养基表面的白色诱导物, 直接进行电子显微镜镜检, 观察其碳酸钙生成的情况。

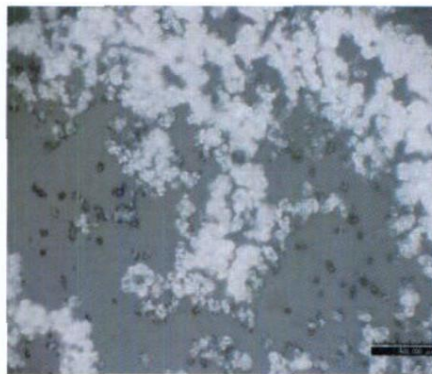


图 2 诱导生成物显微形态 (左: 100×; 右: 300×)

Fig 2 Precipitation by *Bacillus subtilis* in medium M-3+ASP

2.2 细菌的形态

从图 3 可以看出, 诱导生成物经革兰氏染色, 菌体呈紫色, 菌体周围的白色物未被染色, 推测是诱导生成的碳酸钙。

2.3 诱导物的分析检测

(1) X 衍射分析。X 衍射分析结果见图 4 和图 5。结果表明, 白色粉状物为碳酸钙, 说明枯草杆菌-II 在 M-3+ASP 培养基上能诱导碳酸钙的生

2 结果与讨论

2.1 细菌诱导生成碳酸钙

枯草杆菌-II 在 M-3+ASP 培养基上培养 3 天后, 培养基表面开始出现白色诱导物, 继续培养 2 天后, 白色诱导物布满培养基表面 (图 1)。

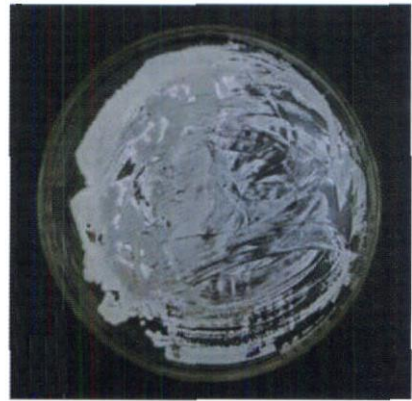


图 1 在培养基表面诱导生成白色物

Fig 1 Precipitation by *Bacillus subtilis* in medium

从 M-3+ASP 培养基表面刮下白色粉状物, 在三维视频显微镜下观察白色粉状物的形态。观察结果表明, 低倍率 (100×) 下观察白色物呈颗粒状; 高倍率 (300×) 下观察, 白色颗粒是细菌的聚集体, 菌体杆状形态明显可见, 且菌体表面覆盖有白色粉状物 (图 2)。

成。

(2) 电子显微镜观察。扫描电子显微镜观察结果见图 5。在培养基表面枯草杆菌-II 诱导生成的白色粉末聚集成球状 (图 6 左)。高倍率 (300×) 下可以看到, 球状物是由无数菌体聚集而成。菌体经能谱分析, 结果表明钙含量较高, 说明菌体已经钙化, 形成钙化细菌 (图 6 右)。

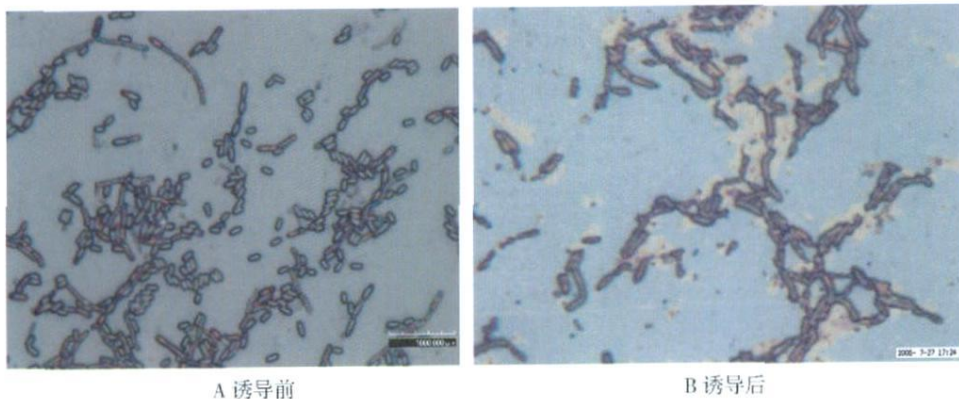


图 3 枯草杆菌-II 诱导碳酸钙生成前后显微观察
 Fig. 3 Optical morphology of *Bacillus subtilis* before and behind of precipitation

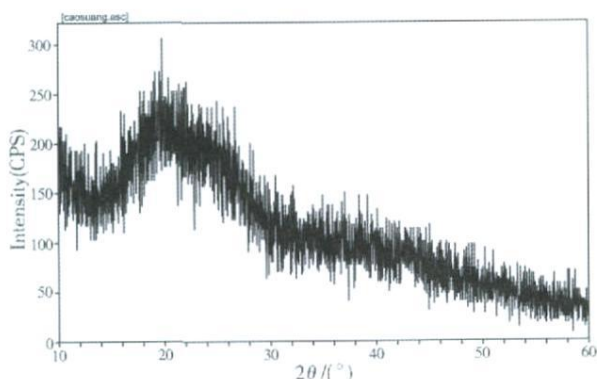


图 4 培养基 X-射线衍射分析谱图
 Fig. 4 XRD patterns of medium

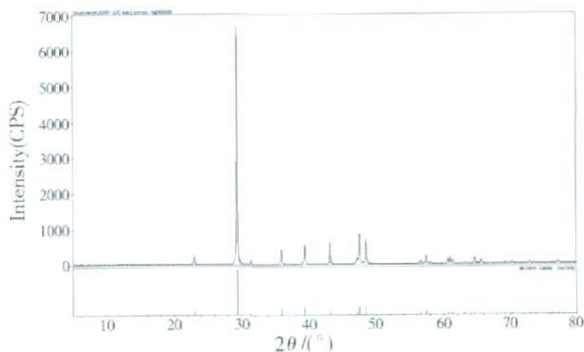


图 5 白色粉状物 X-射线衍射分析谱图
 Fig. 5 XRD patterns of precipitation by *Bacillus subtilis*

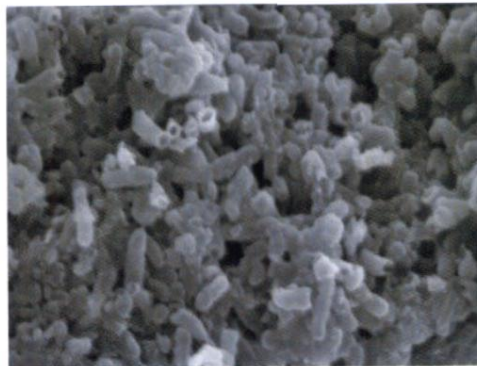
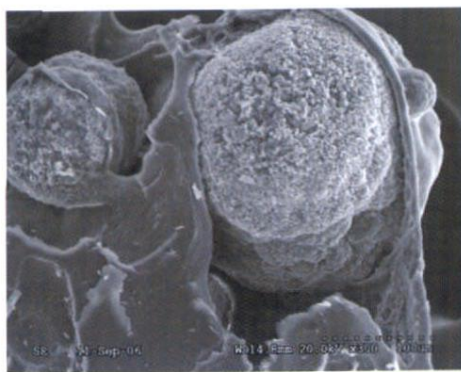


图 6 白色诱导物的微观形态(左:300 × ;右:5000 ×)
 Fig. 6 SEM photomicrographs of precipitation

3 结 论

自行筛选的枯草杆菌-II 在 M-3+ASP 培养基上能生成白色诱导物;白色诱导物经 X 衍射分析表明为碳酸钙。在特定的条件下,可作为碳酸钙粘合剂,并在生物矿化过程中起协同作用,当给细菌提供适宜的营养成分时,可生成更多的碳酸钙以加固和

保护石质文物。对于优化培养条件选育高产碳酸钙菌株,有待于作进一步研究。

参考文献:

[1] Perito B, Biagiotto L, Dal'Ve S et al. Bacterial genes involved in calcite crystal precipitation. *Mol Cell Biochem* 2000; 219: 230-234.

- [2] Ranalli G, Belli C, Baracchini C, et al. Deterioration and bioremediation of fresco: A case study. // Sajz Jimenez C. Molecular biology and cultural Heritage. Sevilla: Taylor & Francis, 2003: 243-246.
- [3] Tiano P. Stone reinforcement by calcite crystal precipitation induced by organic matrix macromolecules. J. Stud Conserv, 1995, 40: 171-176.
- [4] Uz C, De Leo F. Biodegradation of cultural heritage in Italy. State of art. EB/OJ, [2003-07]. www.archip.cz/w08/w08_de_Leo.pdf
- [5] Perito B, Mastromei G. Conservation of monumental stones by bacterial biomineralization. J. Microbiol Today, 2003, 30: 113.
- [6] Rodríguez-Navarro C, Rodríguez-Gallego M, Chekroun K, et al. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus* induced carbonate biomineralization. J. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(4): 2182-2193.
- [7] Pietro T. Biomediated calcite precipitation for monumental stone reinforcement. G. Plenary Sessions 1999: 48-51.
- [8] Sajz Jimenez C. Biodegradation: An overview of the state of the art and assessment of future directions. EB/OJ, [2003-11]. www.archip.cz/w08/w08_sajz_jimenez.pdf
- [9] May E. Microbes on building stone: for good or ill. J. Culture, 2003, 24(2): 5-8.
- [10] Biaisant Q, Cailliau G, Dupraz C, et al. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. J. J. Sedim Res, 2003, 73: 485-490.

Study of stimulated calcite precipitation by bacteria in historic stone consolidation

SUN Yan_zhong, CHEN Qing

(China Academy of Cultural Heritage Beijing 100029 China)

Abstract: With the aim of using bacterial biomineralization to reinforce stone relics, *Bacillus subtilis* was selected to study stimulated biomineralization with calcite (calcium carbonate) in special cultures containing calcium. The results showed that *Bacillus subtilis* could induce calcite precipitation in solid and liquid M-3+ASP cultures. The white precipitation was shown to be calcite crystals by XRD analysis. Under optical and scanning electron microscopy (SEM), calcite was observed around the bacterial cells, wrapping and calcifying them.

Key words: Bacteria; Stimulation; Biomineralization; Stone relics

(责任编辑 谢 燕)