

泗阳汉墓埋藏环境中细菌的分析与检测

张金萍, 奚三彩, 周健林

(南京博物院, 江苏南京 210016)

摘要: 木质文物在埋藏环境中不可避免地会受到细菌的侵害, 细菌可以对木材的化学成分及超微结构造成很大的影响。本研究采用羧甲基纤维素钠(CMC)改良培养基平板法对泗阳汉墓埋藏环境中的土样及木样中的好氧纤维素分解菌、厌氧纤维素分解菌进行了筛选和纯化; 采用 CMC 培养基平板稀释法对纤维素分解菌数量进行了测定; 采用牛肉膏蛋白胨培养基法对优势菌株进行活化, 并对其中的 16 株进行了鉴定。鉴定结果表明泗阳汉墓中的细菌种类主要有奥斯陆莫拉菌、丁香假单胞菌、自养水螺菌、肠杆菌属、魔芋食酸菌、过滤弧菌、假单胞菌等。细胞的形态主要有短杆、球形、杆状等。研究埋藏环境中土样及木样中细菌的种类、数量、分布等可以对木材的劣化机理研究提供科学的分析, 为今后的文物保护工作提供理论和实践上的指导。

关键词: 埋藏环境; 木质文物; 好氧纤维素分解菌; 厌氧纤维素分解菌; 筛选和纯化; 细菌鉴定; 细胞形态

中图分类号: G264 K877.5 **文献标识码:** A

1 引言

2002 年 11 月中旬至 2003 年 1 月 22 日, 南京博物院考古研究所对泗阳县大青墩汉墓进行了抢救性的考古发掘, 共出土文物近千件。大青墩汉墓为大型土坑木椁墓。墓室有主墓室和正南外藏椁、东外藏椁、西外藏椁及主墓室和正南外藏椁之间的夹层组成, 墓道西侧有一上下两层的大型陪葬坑。墓坑方向为南略偏西 5 度、长宽约 18.5m; 墓道在墓坑正南面, 宽 4.2m, 长度 10m 以上。除封土层采用夯土层(7 层)建筑外, 墓坑内填以青膏泥, 青膏泥也采用夯筑法, 大致 20cm 一层, 每层之间有灰白色粉状土, 层线大致呈水平状, 夯筑十分讲究。青膏泥的深度超过 4m。为配合考古发掘工作的顺利进行, 使文物在出土后的第一时间就能得到及时有效的保护, 我院文保人员和考古队密切配合, 对文物进行科学的采样, 尽可能地保留出土文物资料的完整性。

2 木材样品及环境微生物样品的采集

为了较完整地反映埋藏环境中的微生物的存在状况, 必须做到采样与考古发掘同步进行, 采样点的选择必须具有代表性并且能够反映微生物自然的空间分布。根据泗阳汉墓的具体情况, 我们以 M1 和

M2 采样点进行了土壤和木材的采样, 分别定名为 M1 棺外土、M1 墓中土、M1 墓中木、M2 墓中土和 M2 墓中木。采样前需要对所有采样工具、样品袋及各种配备的容器进行杀菌消毒。每采一次样, 必须对用过的所有工具及容器进行消毒后才能进行下一次的采样。采样时动作要迅速, 以防空气中的微生物飘落到样品上, 影响分析结果。要迅速地将采集到的样品放到采集袋中并用胶带密封保管好。样品运回南京后马上进行分析鉴定。土壤中含有大量的微生物, 土壤中的细菌来自天然生活在土壤中的自养菌和腐物寄生菌以及随动物排泄物及其尸体进入土壤的细菌。^[1] 古人墓葬一般都是深埋在地下并用白膏泥、石头、木炭等材料填在棺椁的四周和上面进行密封, 也有在白膏泥上再用几米厚的清灰泥覆盖。这样可基本隔绝空气。因此墓葬中的埋藏环境基本处于稳定的平衡状态中。木材是微生物的营养源, 不可避免地会受到微生物的侵害。在所有微生物中细菌和真菌对木材的危害最大, 破坏最严重。相对于真菌而言, 细菌对木材的破坏比真菌要小且破坏速度缓慢,^[2] 这有可能就是许多木材在地下埋藏了数千年却依然保存至今的原因。对木材造成破坏的细菌主要有好氧纤维素分解菌和厌氧纤维素分解菌, 虽然埋藏环境基本处于厌氧条件, 但在考古发掘过程中, 随着土层的变薄, 氧气会渐渐渗透到墓葬

收稿日期: 2004-05-15; 修回日期: 2004-09-10

作者简介: 张金萍(1966-), 女, 1988 年毕业于南昌航空工业学院化工系金属腐蚀与防护专业, 1990 年毕业于南京大学文献情报学系图书馆专业, 双学士, 现就职于南京博物院文物保护研究所, 副研究员, 江苏省南京市中山东路 321 号, 邮编: 210016 E-mail: huayi 9510@

中, 致使环境中的好氧菌复活。因此我们在分析检测时将样品分别放在了有氧和厌氧的条件下进行操作, 以求更好更全面地反映埋藏环境的真实情况。

3 纤维素分解菌优势菌的筛选和纯化

3.1 好氧纤维素分解菌优势菌的筛选和纯化

从好氧纤维素分解菌数量的测定用的 CMC 改良培养基平板上, 目测挑选优势菌落, 记录菌落特征, 平板划线纯化菌种后, 分别回接到 CMC 改良斜面培养基和牛肉膏-蛋白胨的斜面培养基, 在好氧条件下培养, 观察菌株的生长情况, 并保留菌种。结果如表 1:

表 1 好氧纤维素分解菌优势菌的筛选和纯化

Table 1 Purifying and filtration of the aerobic cellulose decomposing bacteria

菌株序号	CMC 改良培养基平板上菌落特征				菌落来源	CMC 改良琼脂	牛肉膏、蛋白胨、琼脂
	颜色	折光性	大小	其他			
H1-1	白色	半透明	较大	中间有突起	1(-2)	+	+
H1-2	白色	半透明	较大	/	1(-2)	+	+
H2-1	白色	半透明	较大	似 1-1	2(-2)	+	+
H3-1	粉红	半透明	大	/	3(-3)	±	+
H3-2	黄色	半透明	较小	/	3(-3)	+	+
H3-3	白色	半透明	较大	菌落不光滑	3(-3)	+	+
H4-1	白色	半透明	较大	/	4(-1)	+	+
H5-1	粉红	半透明	大	似 3-1	5(-4)	-	+
H5-2	白色	半透明	较大	似 1-1 菌落呈针尖状	5(-4)	+	+
H5-3	黄色	半透明	小	/	5(-4)	-	+
H5-4	粉红	半透明	大	/	5(-4)	-	+

注: 1) 分离土壤标本的平板上分布有不同的菌落, 目测观察比较典型和数量占优势的菌株, 然后挑入斜面。菌落特征是指分离的原始平板上菌落的形态和大小, 下文同。2) 菌落来源 1(-2) 表示来自 1 号标本、稀释度为 10^{-2} 的平板。其中 1~5 分别代表 M1 棺外土、M1 墓中土、M1 墓中木、M2 墓中土和 M2 墓中木。3) + 表示在斜面上生长良好; - 表示在斜面上不生长; ± 表示在斜面上有少量生长。

3.2 厌氧纤维素分解菌优势菌的筛选和纯化

从厌氧纤维素分解菌数量的测定用的 CMC 改良培养基平板上, 目测挑选优势菌落, 记录菌落特征, 平

板划线纯化菌种后, 分别回接到 CMC 改良斜面培养基和牛肉膏-蛋白胨的斜面培养基, 在好氧条件下培养, 观察菌株的生长情况, 并保留菌种。结果如表 2。

表 2 厌氧纤维素分解菌优势菌的筛选和纯化

Table 2 Purifying and filtration of the anaerobic cellulose decomposing bacteria

菌株序号	CMC 改良培养基平板上菌落特征				菌落来源	CMC 改良琼脂(好氧)	牛-蛋琼脂(好氧)
	颜色	折光性	大小	其他			
Y1-1	白色	不透明	大	中间有白点	1(-1)	-	-
Y1-2	白色	半透明	大	似 1-1	1(-1)	+	+
Y1-3	白色	半透明	较大	菌落不规则	1(-1)	-	+
Y1-4	白色	透明	较大	似 1-3	1(-1)	+	+
Y2-1	淡黄	透明	较大	不规则, 有褶皱	2(-1)	-	+
Y3-1	白色	半透明	大	边缘不光滑	3(-3)	-	+
Y3-2	白色	半透明	大	不规则	3(-3)	-	+
Y3-3	白色	半透明	较大	不规则, 铺开	3(-3)	-	+
Y5-1	白色	半透明	小	菌落呈针尖状	5(-4)	-	+
Y5-2	白色	半透明	较大	似 3-3	5(-4)	+	+

4 纤维素分解菌数量的测定

4.1 好氧纤维素分解菌数量的测定

4.1.1 羧甲基纤维素钠(CMC)培养基平板稀释法

CMC 培养基配方如下: CMC 20g, Na_2HPO_4 2.5g, KH_2PO_4 1.5g, 蛋白胨 2.5g, 酵母膏 0.5g, 蒸馏水 1000mL, 琼脂 20g, pH 7.0~7.2。

将配置好的培养基高温高压灭菌(121℃)20分

钟, 倒入无菌培养皿, 冷却后制成平板。

土样置于 4℃冰箱中保存。测定当天, 取 10g 土样加入 100mL 无菌水, 振荡 15min 制成土壤悬液。土壤悬液用无菌水系列稀释, 吸取 0.05mL 稀释液加入 CMC 培养基平板, 刮刀刮匀。将平板放置于 35℃保温箱内恒温培养 3 天, 取出记录平板上的菌落数。每一稀释度重复 4 次。测定结果见表 3。

表 3 好氧纤维素分解菌数量的测定

Table 3 Determine the quantity of the aerobic cellulose decomposing bacteria

标本号	干土%	各稀释度下实际菌落数				选用稀释度	纤维素分解菌数量(个/g干土)
		-1	-2	-3	-4		
M1 棺外土	65.79%	27, 20, 18	0, 2, 4	/	/	-1	6.50×10^3
M1 墓土	66.67%	34, 36, 45	8, 2, 4	/	/	-1	1.15×10^4
M1 墓中木	25.96%	多不可计	多不可计	284, 432, 410	/	-3	2.89×10^7
M 墓中土	66.67%	1, 2, 2	/	/	/	-1	5.0×10^2
M2 墓中木	20.10%	多不可计	多不可计	多不可计	53, 50, 40	-4	4.74×10^7

注: 1)/ 表示该稀释度没有菌落生长

2) 每一稀释度设置 4 次重复, 记数时选择菌落分布均匀、没有出现明显污染的 3 个平板, 因此取 3 次重复

4.1.2 羧甲基纤维素钠(CMC)改良培养基平板稀释法 由于上面的 CMC 培养基是一种半合成培养基, 其中含有蛋白胨和酵母膏, 可以作为碳源被微生物利用。因此将这种培养基改进为完全合成培养基, 以纤维素为唯一碳源。培养基配方如下: CMC 15g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, K_2HPO_4 1.0g, K_2SO_4 2.5g, Mg-

SO_4 0.3g, NaCl 0.2g, CaCl_2 0.2g, FeCl_3 0.01g, 阿农微量元素储备液 1mL, 蒸馏水 1000mL, 琼脂 20g, pH7.0~7.2。

将配置好的培养基高压灭菌(121℃)20分钟, 倒入无菌培养皿, 冷却后制成平板。测定方法同前, 35℃恒温培养 4 天。测定结果见表 4。

表 4 采用 CMC 改良培养基平板稀释法对好氧纤维素分解菌数量的测定

Table 4 Determine the quantity of the aerobic cellulose decomposing bacteria with CMC medium plate dilution method

标本号	干土比例/%	各稀释度下实际菌落数				选用稀释度	纤维素分解菌数量(个/g干土)
		-1	-2	-3	-4		
M1 棺外土	65.79	35, 76, 46	4, 10, 9	/	/	-1	1.59×10^4
M1 墓中土	66.67	多不可计	180, 146, 142	19, 10, 12	/	-2	4.68×10^5
M1 墓中木	25.96	多不可计	多不可计	246, 221, 215	59, 60, 50	-4	4.34×10^7
M2 墓中土	66.67	6, 10, 9	/	/	/	-1	2.50×10^3
M2 墓中木	20.10	多不可计	多不可计	多不可计	64, 76, 65	-4	6.80×10^7

4.2 厌氧纤维素分解菌数量的测定

厌氧条件下的 CMC 改良培养基平板稀释法: 土壤悬液用无菌水系列稀释, 吸取 0.05mL 稀释液加入 CMC 改良培养基的平板, 刮刀刮匀。将平板放置于密封干燥器中, 抽真空后冲入氮气, 反复进行 4 次

制造厌氧环境, 并采用美兰琼脂指示剂指示干燥器内厌氧状态, 35℃保温箱内恒温培养 15 天取出, 记录平板上的菌落数。每一稀释度重复 4 次, 记数时选择菌落分布均匀、没有出现明显污染的 3 个平板, 因此取 3 次重复。测定结果见表 5。

表 5 厌氧纤维素分解菌数量的测定

Table 5 Determine the quantity of the anaerobic cellulose decomposing bacteria

标本号	干土比例/%	各稀释度下实际菌落数				选用稀释度	纤维素分解菌数量(个/g干土)
		-1	-2	-3	-4		
M1 棺外土	65.79	10, 32, 21	/	/	/	-1	6.38×10^3
M1 墓中土	66.67	18, 10, 9	/	/	/	-1	3.70×10^3

(续表 5)

标本号	干土比例/%	各稀释度下实际菌落数				选用稀释度	纤维素分解菌数量(个/g 干土)
		-1	-2	-3	-4		
M1 墓中木	25.96	多不可计	多不可计	58.44.42	6.3.10	-3	3.69×10 ⁶
M2 墓中土	66.67	/	/	/	/	/	0
M2 墓中木	20.10	多不可计	多不可计	多不可计	32.28.20	-4	2.65×10 ⁷

5 鉴定结果

行活化, 选择了其中的 16 株进行鉴定, 鉴定结果见 6。

将挑出的优势菌株接入牛肉膏蛋白胨培养基进

表 6 细菌种类的鉴定

Table 6 Bacteria category of identify

序号	细菌斜面 24h	BUG 24h	革兰氏	细胞形态	鉴定结果	中文名称
H1-1	±	+	GN	短杆	Moraxella osloensis	奥斯陆莫拉菌
H1-2	+	+	GN	短杆	Pseudomonas syringae pv aptata	丁香假单胞菌适合致病变种
H3-1	+	+	GN	杆状	Aquaspirillum autotrophicum	自养水螺菌
H3-3	+	+	GN	球形	Enterobacter	肠杆菌属
H4-1	+	+	GP	杆状, 有芽孢	未鉴定出, 多于 25 个临界反应	
H5-1	±	-	GN	杆状	/	
H5-3	+	+	GN	短杆	Acidovorax konjaci	魔芋食酸菌
H5-4	+	+	GN	短杆	Comamonas testosteroni	过滤弧菌
Y1-2	+	+	GN	短杆	Pseudomonas	假单胞菌
Y1-3	+	+	GN	短杆	未鉴定出, 数据库中无	
Y1-4	-				/	
Y2-1	+	+	GN	球形	Enterobacter	肠杆菌属
Y3-1	+	+	GN	短杆	未鉴定出, 数据库中无	
Y3-2	±	+	GN	短杆	未鉴定出, 数据库中无	
Y3-3	+	+	GN	短杆	未鉴定出, 数据库中无	
Y5-1	-					

注: BUG: 专用培养基 GN: 阴性, GP: 阳性

6 结论

从以上分析结果可以看出, 无论 M1 还是 M2 墓葬中木样的细菌数都远远大于土样中的细菌数, 说明木材是细菌很好的营养源。从鉴定结果可以看出泗阳汉墓中的细菌种类主要有奥斯陆莫拉菌、丁香假单胞菌、自养水螺菌、肠杆菌属、魔芋食酸菌、过滤弧菌、假单胞菌等。细胞的形态主要有短杆、球形、

杆状等。

参考文献:

[1] 于天仁. 土壤化学原理[M] . 北京: 科学出版社, 1987. 115.
YU Tian - ren. Principle of soil chemistry[M] . Beijing: Science Press. 1987. 115.
[2] 周慧明. 木材防腐[M] . 北京: 中国林业出版社, 1993. 54.
ZHOU Hui - ming. Wood antiseptef[M] . Beijing: China Forestry Press. 1993. 54.

Bacteria analysis and identification in certain burying circumstance of Han Dynasty tombs at Siyang county

ZHANG Jin - ping, XI San - cai, ZHOU Jian - lin

(Nanjing Museum, Nanjing 210016, China)

Abstract: The wooden relics are susceptible to bacteria unavoidably under certain burying circumstance, which highly af-

fect the chemical composition and ultrafinestructure of the wood. Sodium carboxymethyl cellulose was employed (CMC) to improve the culture medium plate method for purifying and filtration of the aerobic and anaerobic cellulose decomposing bacteria in the earth and wood samples in Han Dynasty tombs at Siyang county under burying circumstance; and employs CMC medium plate dilution method to determine the quantity of cellulose decomposing bacteria; and employs the beef extract - peptone medium method to activate the dominant bacterial strains, 16 among which were identified. The results indicate that the type of the bacteria is mainly *Moraxella osloensis*, *Pseudomonas*, *Aquaspirillum autotrophicum*, *Enterobacter*, *Acidovorax konjaci*, *Comamonas testosterone*, *Pseudomonas* in the Han Dynasty tombs at Siyang county. The shape of the cells is mainly in the form of short rod, sphere, rod etc. The research for the type, quantity and distribution and the like in the earth and wood samples in burying circumstance can reveal the damage mechanism of the wood, and offer a guide to the theory and practice of the culture relics protection in future.

Key words: Burying circumstance; Wooden relics; Aerobic cellulose decomposing bacteria; Anaerobic cellulose decomposing bacteria; Purifying and filtration; Bacteria identify; Bacteria modality

· 文 摘 ·

用分解纤维素的微真菌损害的纤维素经 γ 辐照和老化后的状况

能分解纤维素的微真菌孢子和分生孢子在环境中分布很广,一旦环境条件适合其生长,它们就会在图书馆和档案馆的图书和文献资料上生长,从而导致图书资料结构的损害。为了寻找一个有用的方法去保护和抑制由微真菌和细菌诱发的纸张的生物损害,测定了经真菌损害的纤维素(绘图纸)经不同 γ 射线剂量辐照和老化后的损害情况。

纤维素样品(绘图纸)被切成片($\Phi 6\text{cm}$),经用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线不同剂量(0, 3, 10, 及 100, 200kGy)辐照并人工老化(根据 ISO5630/3 辐照样品被保持在 65%RH 的大气中 12 和 24 天,温度 80 $^{\circ}\text{C}$)后,用黄霉素浸泡,经过滤后被培植在 Pototo dextrose Agar 培养基上,每 mL 注射 0.5mL 黄青霉素分生孢子水悬浮液,在 25 $^{\circ}\text{C}$,潮湿的大气中培养 10 - 15 天后,真菌的分生孢子被收集在水中。用 HPLC 测定麦角甾醇的量可直接评估黄青霉素的生物质量和纤维素受损状况,因为纤维素高分子是真菌生长的主要碳源。

结果表明,纤维素经高剂量 γ 射线辐照后,其结构发生变化,从而明显地影响真菌的生长;而低剂量($<10\text{kGy}$)辐照仅仅有所减轻或完全对真菌生长不起作用。实验还表明,黄青霉素对于老化和非老化的纤维素有相同的行为。

钱俊龙 摘编自《Restaurator》2003, 24: 145 - 151