

使敦煌壁画红色铅丹变色菌株生理特性的研究*

冯清平 杨玲 张晓君 马晓军

(兰州大学生物系 兰州 730000)

摘要 对一株分离自敦煌壁画的菌株进行了生理生化检测,结果表明,该菌符合黄杆菌属 (*Flavobacterium*), 不定种 (*Species Incertae Sedis*) 的特征。在加有铅丹 (Pb_3O_4) 的培养基上, 菌体呈棕黑色。通过鉴定, 认为该棕色为菌体将铅丹氧化成 PbO_2 的缘故。在 pH9.8、37℃、黑暗条件下氧化程度最高。纯氧及纯氮气条件下菌体氧化铅丹受抑制, 菌株氧化铅丹受质粒控制。菌体具主动吸收铅的能力, 电镜观察铅主要位于原生质体内, $5 \times 10^{-3} \text{ mol / ml NaN}_3$ 抑制菌体生长。

关键词 黄杆菌, 铅丹 (Pb_3O_4), 环境因子, 载体, 质粒

分类号 Q939.9

具有氧化金属特性的细菌目前愈来愈被人们重视, 它们是微生物学和生物化学研究的重要领域, 对环境污染的生物治理、微生物采矿和冶金等有重要意义。目前, 人们对细菌氧化金属的研究着重于 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^0 、 As^{3+} 等元素, 而对于细菌氧化铅的报道很少。我们从敦煌壁画上分离到一株能将桔红色铅丹氧化成棕黑色 PbO_2 的细菌。敦煌壁画是以铅丹为主要红色颜料的, 它的变色对壁画影响较大。有关科学家研究了光照、温度、湿度等对壁画颜料变色的化学、物理影响^[1,2]。对于细菌的影响无人研究。我们分离到的这株菌能够导致壁画红色区域大面积变黑, 因而研究其机理对生物保护壁画有重要意义。

1 材料和方法

1.1 菌种

分离自敦煌 205 号窟变色壁画表面。

1.2 培养基

牛肉膏液体改良培养基(%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.5, 核黄素 $5 \times 10^{-6} \text{ mol / ml}$, NaCl 0.5, $MgSO_4$ 0.02, pH8.2。

牛肉膏琼脂培养基(%): 牛肉膏 0.3, 蛋白胨 1.0, 葡萄糖 0.5, NaCl 0.5, 琼脂 1.5, pH8.2。

加铅琼脂培养基(%): 牛肉膏液体培养基中加 Pb_3O_4 0.2, $CaCO_3$ 0.2。

加铅液体培养基(%): 牛肉膏液体改良培养基中加 Pb_3O_4 0.2, $CaCO_3$ 0.2。

1.3 菌种形态及生理生化特性

用透射电镜观察菌体形态, 采用醋酸铀单染, 参照文献 [3], 其他理化特性参照文

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1998-01-22

献[4]。

1.4 G + C mol% 测定

用苯酚氯仿法提取 DNA, 紫外分光光度计测定 T_m 值, 得 G + C mol%^[5]。

1.5 菌体内有色物质鉴定

1.5.1 色素鉴定: 于牛肉膏液体培养基及加铅液体培养基上分别培养该菌株。参照文献[6]提取色素; 于 UV-VIS spectrophotometer 756mc 上, 300~540nm 扫描测光吸收。

1.5.2 铅化学形态的测定: 于加铅琼脂培养基上培养菌体, 收集后, 一部分用 WFX-16 型原子吸收仪测量菌体中铅体总含量; 另一部分用 0.6mol / L 盐酸 + 0.3% 双氧水提取二氧化铅及草酸铅^[7], 然后测原子吸收。

1.6 环境因子对菌株氧化铅丹的影响

1.6.1 pH、温度的影响: 在 pH 值分别为 7.8、8.6、9.4、9.8、10.2、10.8、12.0 的加铅琼脂培养基上培养菌体, 收集菌体, 测原子吸收。分别于 24℃、28℃、32℃、37℃ 培养, 然后收集菌体, 测原子吸收。

1.6.2 氧浓度的影响: 分别于正常氧浓度, 纯氧, 纯氮气条件下培养菌体, 100r / min, 30℃ 培养 3d。用生长于正常氧浓度下不含铅的培养基上的菌体作对照。收集菌体, 测原子吸收。

1.6.3 光照的影响: 于加铅琼脂培养基上涂布菌体, 同时以避光的作对照, 于 27°~30℃ 自然光下培养 7d。

1.7 铅载体的测定

用无离子水洗平皿、配制加铅琼脂培养基及 6×10^{-1} mg / ml 铬黑 T 溶液, 制成平板。涂布菌体, 以空白作对照, 30℃ 培养 7d。刮去菌体。

1.8 铅在菌体细胞的定位

如 1.3.1 法, 分别用透射电子显微镜观察生长于牛肉膏培养基及加铅琼脂培养基上的菌体。

1.9 菌体生长的抑制

配制含 NaN_3 的加铅琼脂培养基, 使终浓度为 10^{-5} mol / ml, 10^{-4} mol / ml, 10^{-3} mol / ml, 10^{-2} mol / ml。涂布菌体, 于 30℃ 培养 6d。

1.10 质粒的消除

配制含吡啶橙为 50、100、200、250、500、1000 (μg / ml) 的牛肉膏液体培养基, 接种菌, 30℃ 培养 5d。取菌悬液 0.4ml, 于加铅琼脂培养基上培养 7d。挑出丧失氧化特性的菌落, 接于加铅琼脂斜面。

2 结果和讨论

2.1 菌种鉴定

该菌株菌体为短杆状, 大小为 $1.0 \sim 1.6 \times 1.2 \sim 2.0 \mu\text{m}$, 周生鞭毛, 无芽孢, 有荚膜及贮藏颗粒, 细胞单个存在, 呈革兰氏阴性。G + C mol% 为 69.05, 具黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 不定种 (Species Incertae Sedis) 的特征。该菌株与属内两个相关种在色素、细胞大小及生化特性等方面均有差异 (表 1), 因而我们初步认为该菌株为一新种, 命名为敦煌黄杆菌

表1 敦煌黄杆菌和黄杆菌属内2个已知种的差别*

Table 1 Differences between strain *Flavobacterium dunhuangensis* sp. nov. and identified two species of the *Flavobacterium*

特征 Characteristics	菌种 Species	里加黄杆菌 <i>Flavobacterium riense</i>	贪食黄杆菌 <i>Flavobacterium devorans</i>	敦煌黄杆菌 <i>Flavobacterium dunhuangensis</i> sp. nov.
个体形态	革兰氏染色	G ⁺	G ⁻	G ⁻
	鞭毛	周生	周生	周生
	芽孢	0	0	-
	大小(μm)	0.8×1~2.5	0.5~1.0×1~2	1~1.6×1.2~2
	荚膜	+	0	+
菌落特征	形状	圆形	圆形	圆形
	表面	光滑	光滑	光滑
	边缘	全缘到波浪	全缘	全缘
	光学特征	0	不透明	半透明
	菌苔颜色	黄色, 橙色或褐色	浅黄色	黄色
液体培养	产生色素	可能非胡萝卜素	类胡萝卜素	类胡萝卜素
	菌膜	+	0	-
	混浊	+	+	-
	沉淀	+褐色	+白色	+黄色
	运动	+	+	+
生理特性	色素	y ⁰	y	y ⁰
	37℃生长	+	-	+
	耐盐	+	+	+(2%)
	需NaCl	-	-	-
	淀粉水解	0	-	+
	纤维素水解	0	-	+
	明胶水解	-	-	-
	酪蛋白水解	-	-	-
	葡萄糖产酸	+	+	+
	木糖产酸	0	0	+
	麦芽糖产酸	0	+	-
	甘露醇产酸	0	0	+
	果糖产酸	0	0	+
	乳糖产酸	0	-	+
	蔗糖产酸	0	+	-
甲基红实验	0	-	-	
伏普实验	0	+	-	
吲哚实验	-	-	-	
产H ₂ S实验	0	0	-	
凝酶	0	-	-	
过氧化氢酶	0	+	+	
硝酸还原	+	-	-	
石蕊牛奶	-	-	-	
G+Cmol %		69	69	69.05

*y=黄色; y⁰=黄色~橙色; 0=没有资料记载.

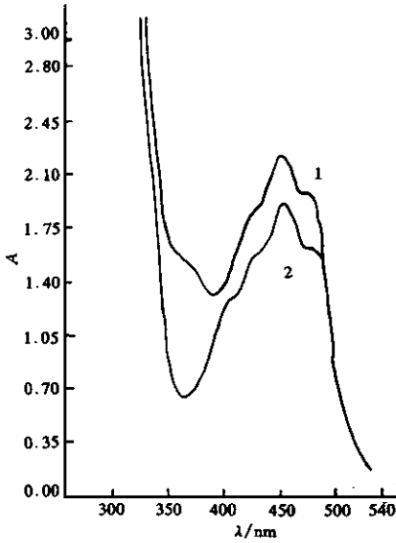


图1 色素吸收光谱

1. 棕黑色菌体色素吸收曲线; 2. 黄色菌体色素吸收曲线.

Fig. 1 The absorption spectrogram of pigments

1. Cells grown in medium with Pb_3O_4 added; 2. Cells grown in medium without Pb_3O_4 added.

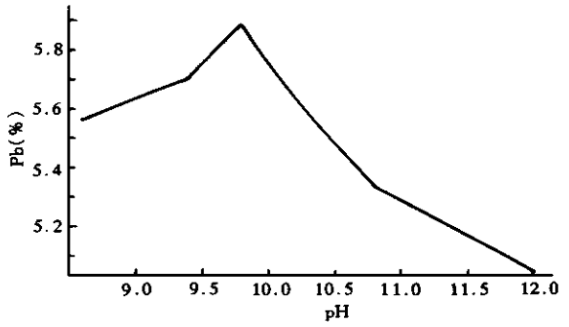


图2 铅原子吸收pH曲线

Fig. 2 The pH curve of Pb absorption

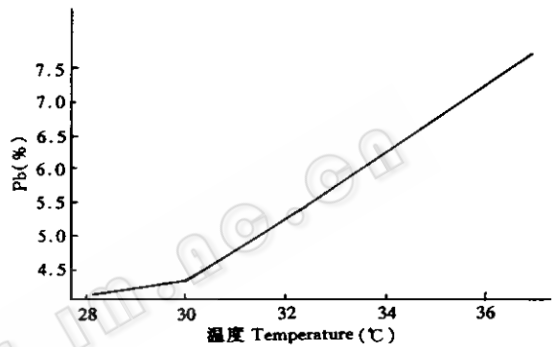


图3 铅原子吸收温度曲线

Fig. 3 The temperature curve of Pb absorption

(*Flavobacterium dunhuangensis* sp. nov.).

2.2 菌体细胞内有色物质鉴定

按上述方法提取色素,两者都表现标准类胡萝卜素具有的吸收曲线(图1)。

菌体内铅总含量为4.03%,二氧化铅及草酸铅含量为2.78%,占铅总含量的69.2%。由此可见,菌体细胞所产生的棕黑色不是菌体色素变化造成的,而是菌体将 Pb_3O_4 氧化的棕黑色 PbO_2 所致。

2.3 环境因子的影响

铅原子吸收pH曲线,温度曲线分别见图2,3。实验结果可知,该菌株在

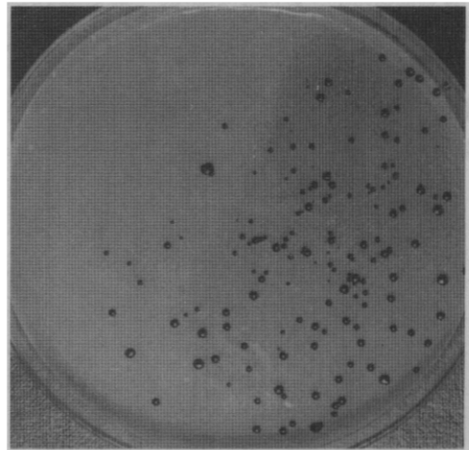


图4 光照对菌体氧化铅丹的影响

图示左半部分为光照条件,右半部分为黑暗条件下菌体及培养基的变化。

Fig. 4 The influence of lights on red lead's oxidization by the strain The change of medium and bacterial biomass: left under lights right under dark.

pH9.8, 37 °C 时铅原子吸收量最高, 氧化铅丹能力最强。在光照条件下菌体生长缓慢, 培养基中铅丹褪色变白, 该成分为铅白。黑暗条件下, 该菌株生长较好, 并将铅丹氧化成棕黑色的 PbO_2 (图 4)。

敦煌壁画位于洞窟内, 洞窟开挖较深, 光线很暗, 土质碱性, 壁画以铅丹为主要红色颜料。这些都为敦煌黄杆菌提供了较好的生长及氧化铅丹的环境。

氧浓度对菌株氧化铅丹的影响见表 2。在纯氧及纯氮气条件下, 菌体生长受抑制, 菌

表2 氧浓度对菌体氧化铅丹的影响

Table 2 The influence of oxygen consistency on red lead's oxidation by the strain

培养条件 Culture condition	正常氧浓度 Normal O ₂ concentration	O ₂	N ₂	CK
样品重量 (g) Weight of sample	0.1112	0.0571	0.0665	0.1524
铅重量 (mg) Pb weight	4.08	2.6	3.08	0.05
铅含量 (%) Pb consistency	4.03	4.55	4.63	0.05
菌体颜色 Colonies' color	棕黑	淡黄	淡黄	黄色

体铅吸收与正常氧浓度下基本相似, 但菌体不呈棕黑色。说明在纯氧、纯氮条件下菌体能够吸附 Pb_3O_4 。Botcin^[8] 曾经指出黄杆菌能够用胞外络合的方式絮凝不溶于水的金属颗粒。该菌株具荚膜, 在纯氧及纯氮条件下生长受抑制, 但并不丧失吸收铅的能力。我们认

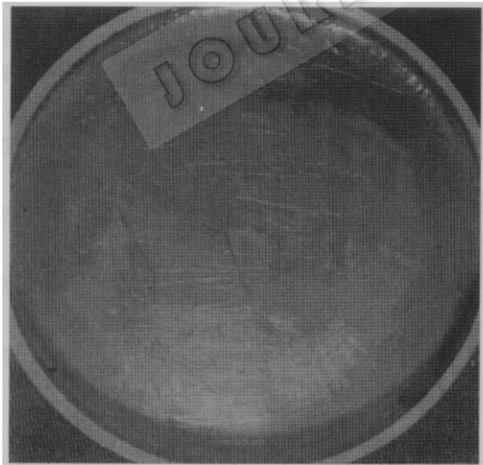


图5 铅载体的测试

图示刮去菌体的培养基的变化: 长有菌体的部位褪色, 无菌的部位为蓝黑色。

Fig. 5 The test of lead carrying agent

The medium grown the strain fade, other medium shows blue and purple.

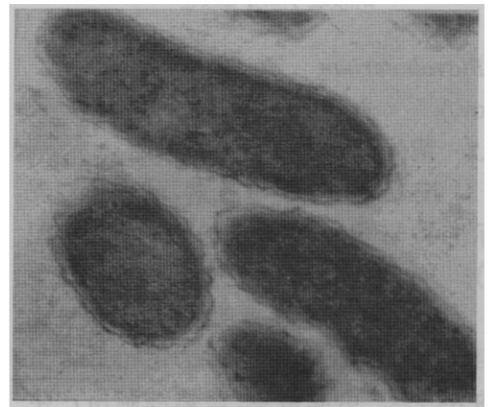


图6 在牛肉膏培养基上的菌体形态 (TEM 50 000 ×)

菌体呈杆状。

Fig. 6 The morphology of strain on beef extract medium (CK)

Cells show short rod-shaped.

为该菌对铅丹的氧化作用是从荚膜等多糖结构物理性絮凝开始的。

2.4 铅载体的测定

按上述方法测定该菌株是否具备主动吸收铅丹的能力。选择单色指示剂铬黑 T, 在 pH8.2 时, 它与铅结合呈现蓝紫色。在加有铬黑 T 的加铅琼脂培养基上, 菌体呈棕黑色。去掉菌体, 看到蓝紫色的培养基褪色。结果 (图 5) 说明菌体与铬黑 T 竞争吸收铅。证明敦煌黄杆菌在以荚膜等胞外物质物理性絮凝铅丹后, 有主动吸收铅丹的过程。

2.5 铅在菌体内的定位

用透射电镜观察, 结果见 6, 7。

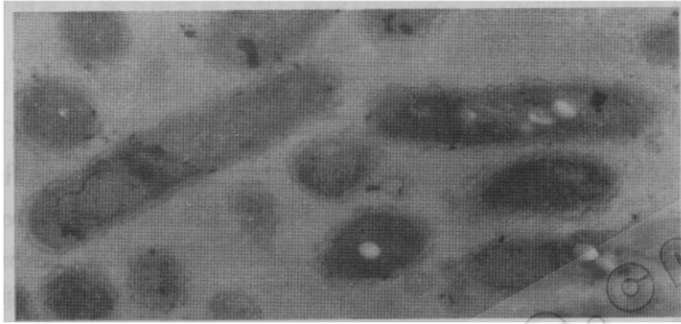


图 7 菌体在加铅培养基上的形态 (TEM 33 000 ×)
可见颗粒位于原生质体内。

Fig. 7 The morphology of strain on medium added in Pb_3O_4
There are Pb in protoplasts.

2.6 菌体的生长抑制

菌体在含 10^{-5} mol / ml NaN_3 的加铅培养基上呈棕黑色, 在 10^{-4} mol / ml NaN_3 存在的情况下生长不良, 呈淡黄色。在 10^{-3} mol / ml NaN_3 条件下菌体不生长。

依据所得结果, 我们认为该菌能以胞外多糖物质吸附铅粒, 而后在能量代谢的参与下将其通过膜上载体送到胞内。同时 NaN_3 的抑菌作用提示我们用其喷洒壁画表面, 有可能避免该菌损伤壁画。

2.7 质粒的消除

用 $250\mu\text{g} / \text{ml}$ 吡啶橙处理后的菌体丧失氧化铅丹的能力, 在加铅琼脂培养基上呈淡黄色。转接于加铅斜面上仍呈淡黄色, 说明控制菌体氧化铅丹的基因位于质粒上。

参 考 文 献

- [1] 盛芬玲, 李最雄, 樊再轩. 温度是铅丹变色的主要原因. 见: 敦煌研究院主编. 敦煌研究文集(上). 兰州: 甘肃民族出版社, 1993. 258~279.
- [2] 李最雄, 樊再轩, 盛芬玲. 铅丹、朱砂和土红变色的新进展. 见: 敦煌研究院主编. 敦煌研究文集(上). 兰州: 甘肃民族出版社, 1993. 309~336.
- [3] 郑国辑, 谷祝平主编. 生物显微技术(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1993. 295~296.
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [5] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定方法. 上海: 上海科技出版社, 1990. 58~59; 85~92.

- [6] 楼建龙,王月芳,王殿升等. 微生物学报, 1995, 35(5): 358~363.
[7] 许嘉琳, 鲍子平, 杨居荣等. 应用生态学报, 1991, 21(3): 244~248.
[8] Ghose W C. *Annual Review of Microbiology*, 1984, 38: 516~549.

STUDY OF THE PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF A STRAIN WHICH CAN CHANGE THE COLOR OF RED LEAD ON DUNHUANG MURAL

Feng Qingping Yang Ling Zhang Xiaojun Ma Xiaojun

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract A strain which was isolated from Dunhuang Mural was investigated. It belongs to *Flavobacterium*. In media added in Pb_3O_4 , colonies show brown and black. After identified pigments, it showed that the brown was caused by the oxidation of Pb_3O_4 into PbO_2 by the strain. The optimal oxidative condition is at pH9.8, 37°C and dark environment. The genes for oxidation is on plasmid and the oxidation was inhibited under pure O_2 and N_2 conditions, too 5×10^{-3} mol/ml NaN_3 is enough. The strain was able to absorb lead initiative. The transmission electron microscope showed that lead locate in protoplasts.

Key words *Flavobacterium*, Red lead (Pb_3O_4), Environmental factor, Carrying agent, Plasmid