

研究报告

三星堆象牙埋藏环境可培养厌氧微生物分离及多样性分析

何昌杰^{#1}, 秦向宁^{#1}, 王宁², 蒋璐蔓², 朱莉萍³, 肖麟², 何砚秋¹, 李思凡³, 邹立扣¹, 赵珂^{*1}

1 四川农业大学资源学院微生物学系, 四川 成都 611130

2 成都文物考古研究院, 四川 成都 610072

3 四川省文物考古研究院, 四川 成都 610041

何昌杰, 秦向宁, 王宁, 蒋璐蔓, 朱莉萍, 肖麟, 何砚秋, 李思凡, 邹立扣, 赵珂. 三星堆象牙埋藏环境可培养厌氧微生物分离及多样性分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2094-2109.

HE Changjie, QIN Xiangning, WANG Ning, JIANG Luman, ZHU Liping, XIAO Lin, HE Yanqiu, LI Sifan, ZOU Likou, ZHAO Ke. Isolation and diversity of culturable anaerobes from the ivory burial environment of Sanxingdui[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2094-2109.

摘要:【背景】埋藏环境与文物劣化有着密切的关系, 微生物被认为是导致文物劣化和消失的重要原因之一。埋藏环境下的三星堆象牙处于深埋、缺氧的条件, 但目前对该环境下的厌氧菌缺乏必要的了解。【目的】以三星堆象牙埋藏层土壤为研究对象, 探究埋藏环境可培养厌氧微生物多样性和影响微生物分布的因素, 为深入研究厌氧微生物产酸、产蛋白酶等功能及象牙劣化机理提供菌株资源和理论参考。【方法】利用厌氧工作站, 采用3种厌氧菌分离培养基分离三星堆象牙埋藏层土壤中的厌氧微生物, 分析不同培养基对厌氧菌的分离效果, 对分离菌株进行16S rRNA基因系统发育分析, 揭示三星堆不同象牙埋藏环境中可培养厌氧微生物的多样性, 并采用Mantel检验研究影响三星堆象牙埋藏环境可培养厌氧微生物分布的环境因子。【结果】从三星堆象牙埋藏层土壤中共分离获得61株厌氧菌, 16S rRNA基因测序分析结果显示分离菌株均属于发酵厌氧微生物, 分属于梭菌科(*Clostridiaceae*)与消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*)共2个科, 梭菌属(*Clostridium*)、土生孢杆菌属(*Terrisporobacter*)、哈撒韦氏菌属(*Hathewayia*)、*Haloimpatien*共4个属, *Clostridium cibarium*、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、大梭菌(*Clostridium magnum*)、硝醛酚梭菌(*Clostridium nitrophenolicum*)、*Clostridium kogasense*、肠梭菌(*Clostridium intestinale*)、生孢梭菌(*Clostridium*

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF0904000)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0904000).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zhaoke82@126.com

Received: 2023-12-19; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-04-24

sporogenes)、*Clostridium* sp. (A4d)、马永贝土生孢杆菌(*Terrisporobacter mayombeii*)、*Hathewayia massiliensis*、*Haloimpatiens massiliensis* 共 11 个种; 所采用的 3 种分离培养基中, 强化梭菌培养基分离获得的发酵厌氧菌数量和种类最多, 但其他 2 种培养基也表现出独特的分离效果; Mantel 检验结果表明, 可培养发酵厌氧菌种群分布特征与 Cu、Pb 的含量呈显著正相关。【结论】三星堆象牙埋藏环境可培养发酵厌氧微生物的分布存在一定差异, K8 象牙埋藏层土壤中可培养发酵厌氧菌丰富度与多样性均最高, 多种培养基综合利用有利于分离出更为丰富多样的微生物类群, Cu、Pb 与有机质含量是影响三星堆象牙埋藏层土壤可培养发酵厌氧菌种群分布的关键因素。

关键词: 三星堆遗址; 象牙; 埋藏环境; 发酵厌氧微生物

Isolation and diversity of culturable anaerobes from the ivory burial environment of Sanxingdui

HE Changjie^{#1}, QIN Xiangning^{#1}, WANG Ning², JIANG Luman², ZHU Liping³, XIAO Lin², HE Yanqiu¹, LI Sifan³, ZOU Likou¹, ZHAO Ke^{*1}

1 Department of Microbiology, College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Chengdu Institute of Cultural Relics and Archaeology, Chengdu 610072, Sichuan, China

3 Sichuan Provincial Cultural Relics and Archeology Research Institute, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: [Background] The deterioration of cultural relics in burial environments is closely associated with microorganisms that are recognized as one of the major contributors to the degradation and disappearance of cultural relics. The knowledge is limited regarding anaerobes in the anoxic conditions deep at the Sanxingdui site. **[Objective]** To investigate the culturable anaerobe diversity in the ivory burial layer of Sanxingdui, explore the factors influencing the distribution of culturable anaerobes, and provide strain resources and theoretical reference for further research on the organic acid and protease production of the anaerobes and the mechanism of ivory degradation. **[Methods]** Anaerobes were isolated from the ivory burial layer of Sanxingdui using an anaerobic workstation and three isolation media, and the effectiveness of different media for isolating anaerobes was analyzed. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences was performed to reveal the diversity of culturable anaerobes. Furthermore, the Mantel test was carried out to study the environmental factors influencing the distribution of culturable anaerobes. **[Results]** A total of 61 strains of anaerobes were isolated from the ivory burial layer of Sanxingdui. Based on the 16S rRNA gene sequences, the strains were assigned into *Clostridium*, *Terrisporobacter*, *Hathewayia*, and *Haloimpatiens* belonging to *Clostridiaceae* and *Peptostreptococcaceae*. Eleven species were identified: *Clostridium cibarium*, *C. beijerinckii*, *C. magnum*, *C. nitrophenolicum*, *C. kogasense*, *C. intestinale*, *C. sporogenes*, *Clostridium* sp. (A4d), *Terrisporobacter mayombeii*, *Hathewayia massiliensis*, and *Haloimpatiens massiliensis*. Among the three isolation media used, the reinforced *Clostridium* medium yielded the highest number and the most species of fermentative

anaerobes, and the other two media also showed unique isolation effects. Mantel test results indicated significant positive correlations between the distribution characteristics of culturable fermentative anaerobes and the content of Cu and Pb. **[Conclusion]** The culturable fermentative anaerobes present varied diversity in the ivory burial environment of Sanxingdui, with the highest richness and diversity in pit K8. Multiple isolation media facilitated the isolation of diverse microbial groups. Cu, Pb, and organic matter are the key factors influencing the distribution of culturable fermentative anaerobes in the ivory burial layer of Sanxingdui.

Keywords: Sanxingdui ruins; ivory; burial environment; fermentative anaerobes

三星堆遗址坐落于四川省广汉市,距今已有 3 000 余年历史,其作为古蜀王国的都城,为古蜀文化研究提供了重要的材料^[1]。从 1986 年到 2020 年,在三星堆遗址发现了 8 个大型埋藏坑,出土了大量青铜器、金器、玉器等珍贵文物,其中更是以首次出土大批量整根象牙而备受关注^[2]。2020 年 9 月三星堆遗址考古发掘再次启动,并于 2022 年 6 月发布三星堆遗址考古发掘阶段性成果:本次考古发掘共出土象牙 678 根,象牙雕刻残件 46 件^[3]。象牙是动物硬组织中一种特殊的生物材料,主要由无机矿物碳羟磷灰石和有机纤维蛋白组成^[4],与新鲜象牙相比三星堆出土象牙力学性能极差,这可能是由于三星堆象牙长期埋藏于地下,在地下水、可溶盐及微生物等各种不利因素的侵蚀下^[5],象牙中起主要黏结作用的有机组分被分解,碳羟磷灰石被腐蚀,导致象牙出现严重糟朽^[6]。

埋藏环境与文物劣化有着密切的关系,微生物被认为是导致文物劣化和消失的重要原因之一^[7]。厌氧菌是在缺氧环境中生活的微生物,在全球碳、氮和硫循环以及有机物降解过程中发挥着重要作用^[8],可通过多种代谢途径产生有机酸、甲烷、酶等多种代谢产物,并对蛋白质等有机物进行降解,从而对其所处环境产生影响^[9]。三星堆象牙出土前被埋藏在 1.30–2.20 m 深度的土壤中,为厌氧微生物的生长繁殖提供了有利条件^[10]。然而,当前对于

三星堆象牙微生物的研究主要集中在象牙出土后的好氧细菌与真菌等方面^[11],对埋藏环境下厌氧菌的相关研究尚未见报道。尽管目前高通量测序广泛应用于微生物群落结构分析,但可培养方法可以获得最能反映生态环境特征的微生物类群,并且这些纯培养菌株对于阐明微生物的功能是非常必要的^[12]。因此,本研究采用可培养技术对三星堆象牙埋藏环境的厌氧微生物进行分离纯化培养,分析不同埋藏环境厌氧微生物的群落组成及其与土壤理化的相关性,以了解三星堆象牙埋藏环境中厌氧微生物种类及分布特征,为后续探究厌氧微生物的功能,揭示埋藏条件下象牙劣化机理提供菌株资源和理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品

在象牙发掘过程中采用无菌土壤采样器分别从四川省广汉市三星堆遗址(30°59'N, 104°12'E)的 K3、K4、K7、K8 这 4 个埋藏坑中采集象牙埋藏层土壤,各埋藏坑采样深度分别为 1.9、1.3、1.7、1.6 m,采集样品置于无菌厌氧袋中,冰盒保存带回实验室后立即在厌氧工作站中进行后续实验。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

厌氧培养基、强化梭菌培养基(reinforced medium for clostridia, RCM)和硫乙醇酸盐培养基(thiolglycollate medium, TM),青岛海博生物

技术有限公司。土壤浸出培养基(soil leaching medium, SLM) (g/L): 葡萄糖 7.5, 酵母膏 3.0, MgSO_4 0.5, K_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.5, L-半胱氨酸 0.5, 琼脂 20.0, 蒸馏水 0.6 L, 三星堆土壤浸出汁 0.4 L, pH 7.0–7.2^[13]。

PCR 引物、核酸染料、琼脂糖和 PBS 缓冲液, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2×*Taq* PCR Mix, 天根生化科技(北京)有限公司。超景深显微镜, KEYENCE 公司; 扫描电子显微镜和电感耦合等离子体质谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 冷冻离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; pH 计, 上海雷磁仪器有限公司; 恒温金属浴, 杭州米欧仪器有限公司; 厌氧工作站, Shellab 公司。

1.3 土壤理化性质测定

采用烘干法测定土壤含水率, pH 值采用 pH 计测定, 土壤重金属 Cu、Pb 含量采用电感耦合等离子体质谱仪测定, 土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法测定^[14]。

1.4 厌氧菌的分离、纯化与保种

在厌氧工作站中称取 10 g 土壤样品加入盛有 90 mL 1×PBS 的无菌三角瓶中, 振荡均匀。将 1 mL 土壤悬浮液接种于 9 mL 厌氧培养基中, 37 °C 静置富集培养 2–3 d。对富集培养液进行梯度稀释, 分别吸取稀释液 100 μL 涂布到 RCM、TM 和 SLM 培养基中, 37 °C 恒温培养 3–5 d, 待菌落长出后, 挑取不同形态特征的单菌落进行分离纯化, 采用 20% 甘油冷冻法于 –80 °C 保存菌株。

1.5 形态观察

在超景深显微镜下观察菌株菌落形态、大小、颜色等特征; 挑取单菌落于 2% 戊二醛液体中固定 12 h, 进行乙醇脱水, 干燥喷金后在扫描电子显微镜下观察细菌的大小、形状等特征。

1.6 厌氧菌 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增及测序

参照 Idris 等^[15]提取分离菌株的 DNA, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3') 对菌株 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR Mix 12.5 μL , 上、下游引物(1 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板(50 ng/ μL) 1 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.7 系统发育树构建

测序结果上传至 EzBioCloud 标准菌株数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)进行序列比对, 找出与目标菌株相似性最高的 16S rRNA 基因序列^[16], 采用 MEGA X 通过近邻相接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 厌氧菌菌株序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库, 获得 GenBank 登录号(OR598766–OR598790)。

1.8 群落结构多样性分析与环境因子相关性分析

α 多样性也被称为生境内多样性, 可以反映微生物群落的丰富度和多样性。通过 PRIMER 7.0 软件计算不同埋藏坑中可培养厌氧菌的 Species richness、Pielou's evenness、Shannon 指数和 Simpson 指数, 分析比较厌氧菌丰富度及多样性^[17]。利用 R 语言 4.2.2 软件中的 dplyr、linkET 和 ggplot2 包进行环境因子相关性分析。

2 结果与分析

2.1 三星堆象牙埋藏层土壤理化性质测定

三星堆象牙埋藏层土壤 pH 值、含水率(moisture content, MC)、有机质(organic matter, OM)、

铅(lead, Pb)、铜(copper, Cu)含量测定结果表明:三星堆象牙埋藏层土壤的 pH 为 7.00–7.27, 呈现弱碱性或中性; MC 为 16.16%–30.07%, K7 坑 MC 显著高于 K3、K4、K8 坑; OM 含量为 2.61%–12.41%, K4 坑中 OM 含量显著高于 K3、K7、K8 坑, 其含量分别为 K3、K7、K8 坑的 4.8、2.5、2.3 倍; 三星堆象牙埋藏层土壤中 Cu 含量为 4 685.29–7 005.50 mg/kg 干土、Pb 含量为 465.46–948.01 mg/kg 干土, K8 坑中 Cu、Pb 含量最高, 其中 Cu 含量显著高于 K4 与 K7, 而 Pb 含量显著高于其他埋藏坑(表 1)。

2.2 三星堆象牙埋藏层土壤厌氧菌的分离纯化

RCM、TM、SLM 这 3 种分离培养基对三星堆象牙埋藏层中厌氧微生物的分离结果表明:不同培养基对同一样品中厌氧微生物的分离结果

存在差异(图 1), 同一培养基对不同样品分离获得的厌氧菌的数量和种类均存在明显差异(图 2), 如 RCM 从 K3、K4、K7、K8 象牙埋藏层土壤样品中分离获得的微生物的数量分别为 4.23×10^7 、 2.96×10^7 、 3.97×10^7 、 5.76×10^7 CFU/g 湿土。

三种分离培养基从 4 个埋藏坑的象牙埋藏层土壤样品中共分离获得 61 株菌, 其中 RCM 培养基分离获得 34 株菌、TM 培养基分离获得 12 株菌、SLM 培养基分离获得 15 株菌。此外, RCM 培养基在同一稀释度下分离获得厌氧菌的数量高于其他 2 种培养基, 表明 RCM 培养基具有更好的分离效果(表 2)。

2.3 三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌的形态观察

分离获得的厌氧菌在 RCM 培养基上反复划线获得纯菌株, 在厌氧工作站 37 °C 恒温培养

表 1 三星堆不同埋藏坑象牙埋藏层土壤理化性质

Table 1 Soil physico-chemistry of ivory burial layer in the different Sanxingdui burial pits

Sample	pH	MC (%)	OM (%)	Cu (mg/kg-dry soil)	Pb (mg/kg-dry soil)
K3	7.00±0.05c	17.86±1.19c	2.61±2.88c	5757.57±601.43ab	563.99±256.03b
K4	7.03±0.06c	22.08±1.34b	12.41±0.10a	4685.29±1001.86b	465.46±176.34b
K7	7.18±0.03b	30.07±1.07a	4.95±1.19b	5175.47±1199.95b	532.48±48.66b
K8	7.27±0.04a	16.16±2.01c	5.42±1.48b	7005.50±1177.75a	948.01±132.40a

结果为平均值±标准差($n=5$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

The results are average±standard deviation ($n=5$), different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

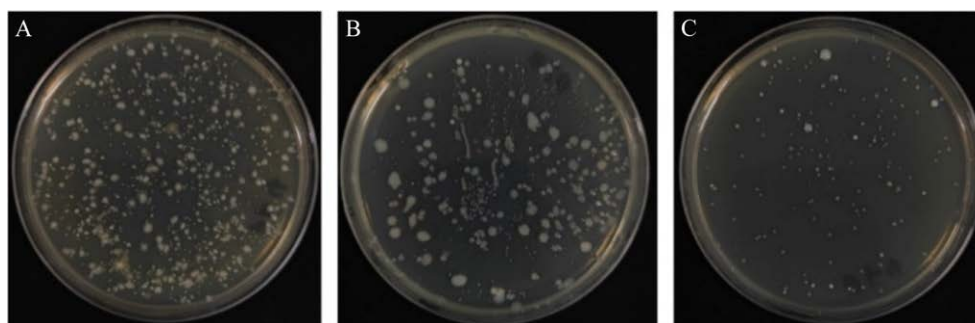


图 1 不同培养基对 K8 象牙埋藏层土壤厌氧微生物的分离情况 A: 强化梭菌培养基. B: 硫乙醇酸盐培养基. C: 土壤浸出培养基

Figure 1 Isolation of anaerobes from K8 ivory burial soil. A: Reinforced medium for clostridia. B: Thioglycollate medium. C: Soil leaching medium.

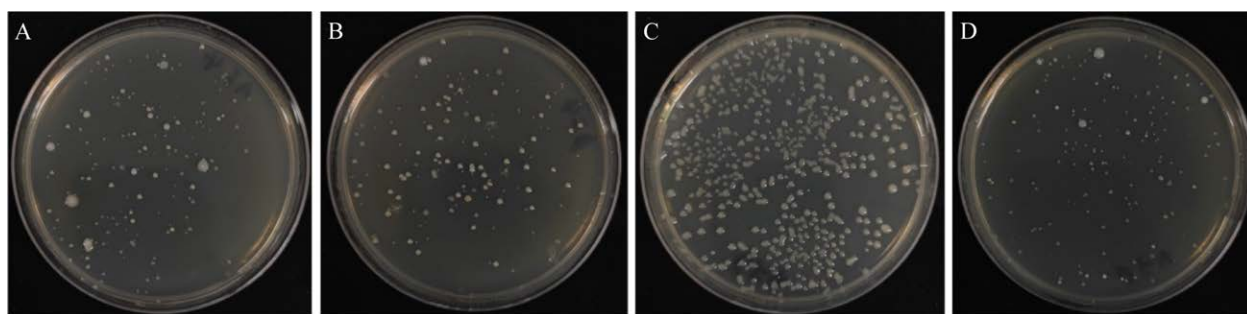


图2 土壤浸出培养基对不同埋藏坑厌氧微生物的分离情况 A: K3 象牙埋藏层土壤. B: K4 象牙埋藏层土壤. C: K7 象牙埋藏层土壤. D: K8 象牙埋藏层土壤

Figure 2 Isolation of anaerobes from different burial pits by SLM. A: K3 ivory burial soil. B: K4 ivory burial soil. C: K7 ivory burial soil. D: K8 ivory burial soil.

表2 不同培养基对厌氧菌的分离结果

Table 2 Isolation of anaerobes on different media

Source	Isolation medium	CFU ($\times 10^7$ CFU/g-moist soil)	Number of isolated anaerobic strains
K3	RCM	4.23	7
	TM	1.58	1
	SLM	1.65	4
K4	RCM	2.96	8
	TM	1.93	2
	SLM	1.47	4
K7	RCM	3.97	6
	TM	2.19	4
	SLM	3.53	1
K8	RCM	5.76	13
	TM	2.56	5
	SLM	1.58	6

3 d 后,采用超景深显微镜和扫描电子显微镜观察菌株的菌落形态和显微形态。如图3所示,这些厌氧菌的菌落均较小,但大小存在差异,菌落直径为 0.8–4.0 mm,菌落形状呈圆形或不规则状,表面湿润有光泽,部分菌落表面存在褶皱,边缘整齐或不整齐,颜色多为乳白色,少数为淡黄色。扫描电子显微镜结果表明,大多数菌体呈现出长杆状,少部分菌体呈短杆状,菌

体长度为 3–20 μm ,宽度为 0.3–0.8 μm (图3)。

2.4 三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌的鉴定及系统发育分析

分离菌株经 16S rRNA 基因测序,并在 EzBioCloud 上对测定序列进行比对分析,结果表明 61 株菌均属于发酵厌氧微生物,选取其中 25 株代表性发酵厌氧菌菌株,构建三星堆象牙埋藏层土壤发酵厌氧菌系统发育树,确定菌株系统发育地位(图4)。结果表明,25 株发酵厌氧菌分别与其亲缘关系最近的菌株相似性为 97.05%–99.75%,其中 5 株与其近缘种间的 16S rRNA 基因序列相似性较低。菌株 BFS2 与其相近模式种 *Clostridium magnum* 的 16S rRNA 基因相似性为 98.43%,菌株 DFT2 与 *Clostridium intestinale* 的相似性为 97.05%,菌株 BFS1、BFR1、CFR1 与 *Clostridium* sp. A4d 的相似性分别为 98.64%、98.48%、98.49%。25 株代表菌株分属于 2 个科(*Clostridiaceae* 和 *Peptostreptococcaceae*) 4 个属(*Clostridium*、*Terrisporobacter*、*Hathewayia* 和 *Haloimpatien*) 11 个种,其中 *Clostridiaceae* 共计 23 株菌分属于 3 个属 10 个种、*Peptostreptococcaceae* 共计 2 株菌分属于 1 个种(表3)。

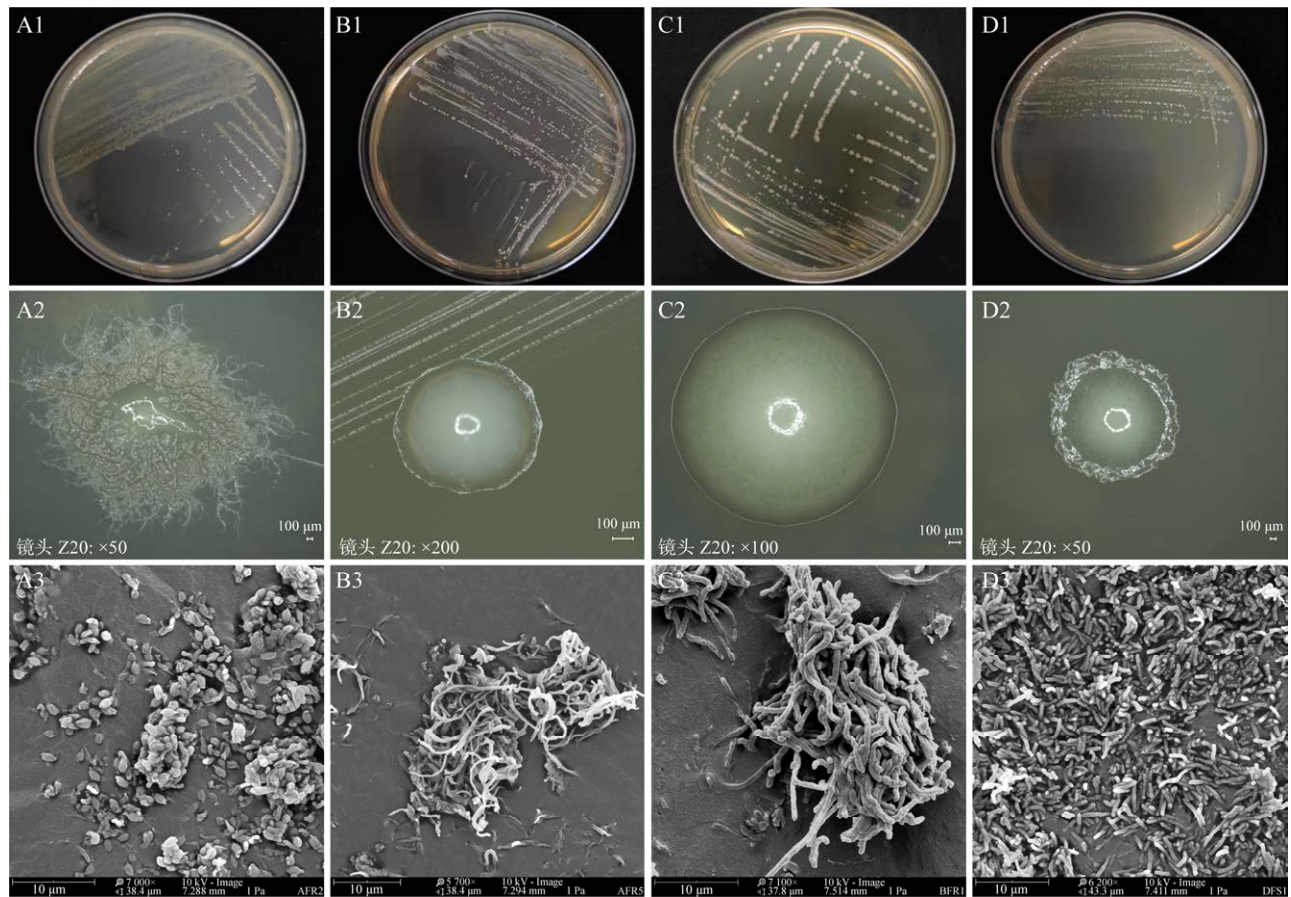


图 3 厌氧菌在超景深显微镜及扫描电子显微镜下的形态特征 A1–A3: 菌株 AFR2. B1–B3: 菌株 AFR5. C1–C3: 菌株 BFR1. D1–D3: 菌株 DFS1

Figure 3 Morphological characteristics of culturable anaerobes under super depth-of-field microscope and scanning electron microscope. A1, A2 and A3: Strain AFR2. B1, B2 and B3: Strain AFR5. C1, C2 and C3: Strain BFR1. D1, D2 and D3: Strain DFS1.

2.5 三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌的组成

三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌分布结果显示(图 5), 4 个坑中分离到的厌氧菌种类存在明显差异, K8 象牙埋藏层土壤中厌氧菌类群相较于 K3、K4、K7 坑土壤厌氧菌类群要更为丰富多样。除 *Clostridium* sp. A4d 在所有样品中均有分布外, 其余菌属分布均存在差异, 其中 *Clostridium sporogenes* 只在 K3 样品中分离获得, *Clostridium magnum* 只在 K4 样品中分离获得,

Hathewayia massiliensis 只在 K7 样品中分离获得, 而 *Clostridium nitrophenolicum*、*Haloimpatiens massiliensis*、*Clostridium kogasense*、*Clostridium intestinale* 仅在 K8 样品中分离获得。

2.6 培养基对厌氧菌分离的影响

本研究从 RCM 培养基分离到 34 株厌氧菌, 共 7 种厌氧菌种; TM 培养基分离到 12 株厌氧菌, 共 4 种厌氧菌种; SLM 培养基分离到 15 株厌氧菌, 共 4 种厌氧菌种(图 6)。3 种培养基都分离到了 *Clostridium* sp. A4d, 而 *Clostridium*

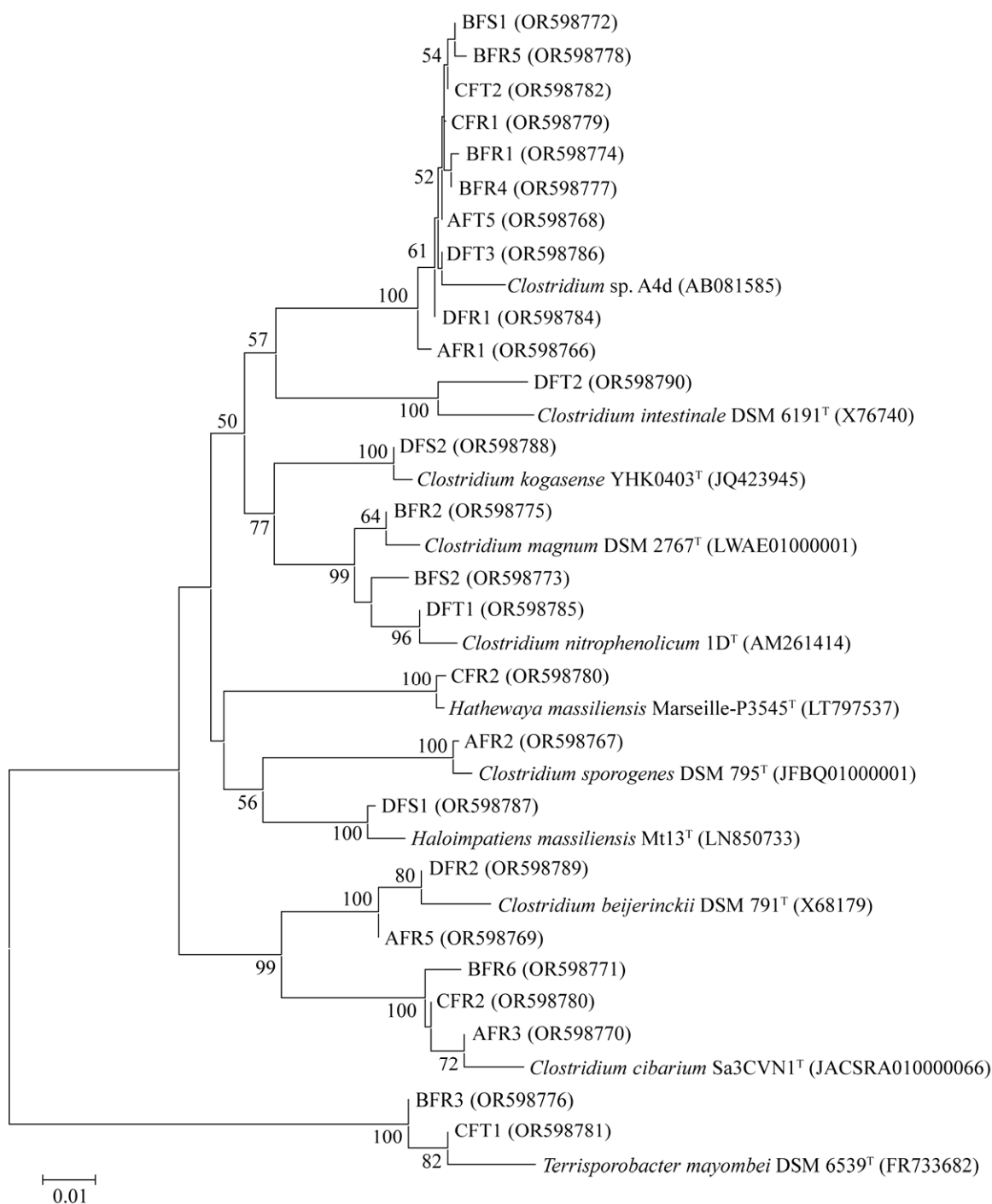


图4 基于三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌 16S rRNA 基因构建的系统发育树 括号中序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字代表 bootstrap 值；标尺表示每个核苷酸序列位置中碱基替换数

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of culturable anaerobes from ivory burial soil of Sanxingdui. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; values at the branching points represent bootstrap value; scale bar indicates the estimated number of base changes per nucleotide sequence position.

表 3 基于 16S rRNA 基因三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌种类鉴定

Table 3 Identification of culturable anaerobic species based on 16S rRNA gene sequences from ivory burial soil of Sanxingdui

Source	Strain No.	Family	Closed match in EzBioCloud	Hit strain name	Similarity (%)
K3	AFR1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.66
K3	AFR2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> (JFBQ01000001)	DSM 795 ^T	99.54
K3	AFR3	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium cibarium</i> (JACSRA010000066)	Sa3CVN1 ^T	99.74
K3	AFR5	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i> (X68179)	DSM 791 ^T	99.08
K3	AFT5	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.87
K4	BFS1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.64
K4	BFS2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium magnum</i> (LWAE01000001)	DSM 2767 ^T	98.43
K4	BFR1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.48
K4	BFR2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium magnum</i> (LWAE01000001)	DSM 2767 ^T	99.41
K4	BFR3	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Terrisporobacter mayombe</i> (FR733682)	DSM 6539 ^T	99.47
K4	BFR4	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.86
K4	BFR5	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.66
K4	BFR6	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium cibarium</i> (JACSRA010000066)	Sa3CVN1 ^T	99.59
K7	CFR1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.49
K7	CFR2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Hathewayia massiliensis</i> (LT797537)	Marseille-P3545 ^T	99.66
K7	CFR3	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium cibarium</i> (JACSRA010000066)	Sa3CVN1 ^T	99.59
K7	CFT1	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Terrisporobacter mayombe</i> (FR733682)	DSM 6539 ^T	99.52
K7	CFT2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.86
K8	DFS1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Haloimpatiens massiliensis</i> (LN850733)	Mt13 ^T	99.12
K8	DFS2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium kogasense</i> (JQ423945)	YHK0403 ^T	99.66
K8	DFR1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.94
K8	DFR2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i> (X68179)	DSM 791 ^T	99.60
K8	DFT1	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium nitrophenolicum</i> (AM261414)	1D ^T	99.75
K8	DFT2	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium intestinale</i> (X76740)	DSM 6191 ^T	97.05
K8	DFT3	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i> sp. (AB081585)	A4d	98.94

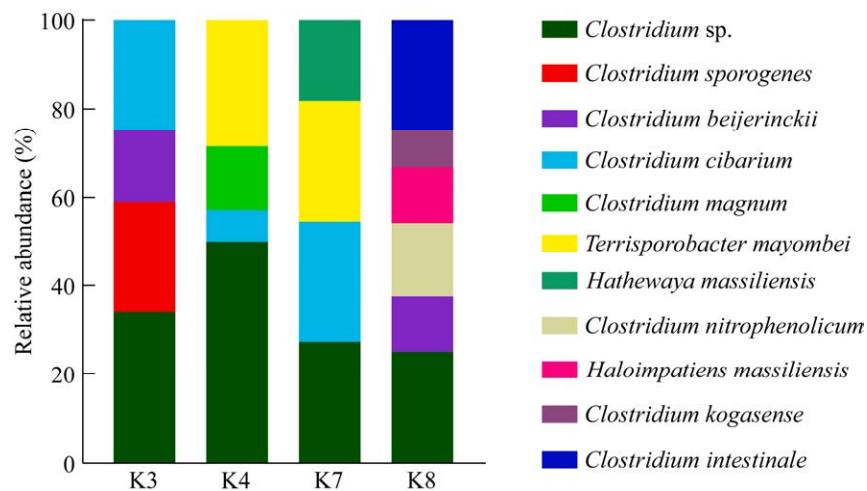


图 5 可培养厌氧菌在三星堆不同象牙埋藏层土壤中的分布

Figure 5 The distribution of culturable anaerobes isolated in ivory burial soil of Sanxingdui.

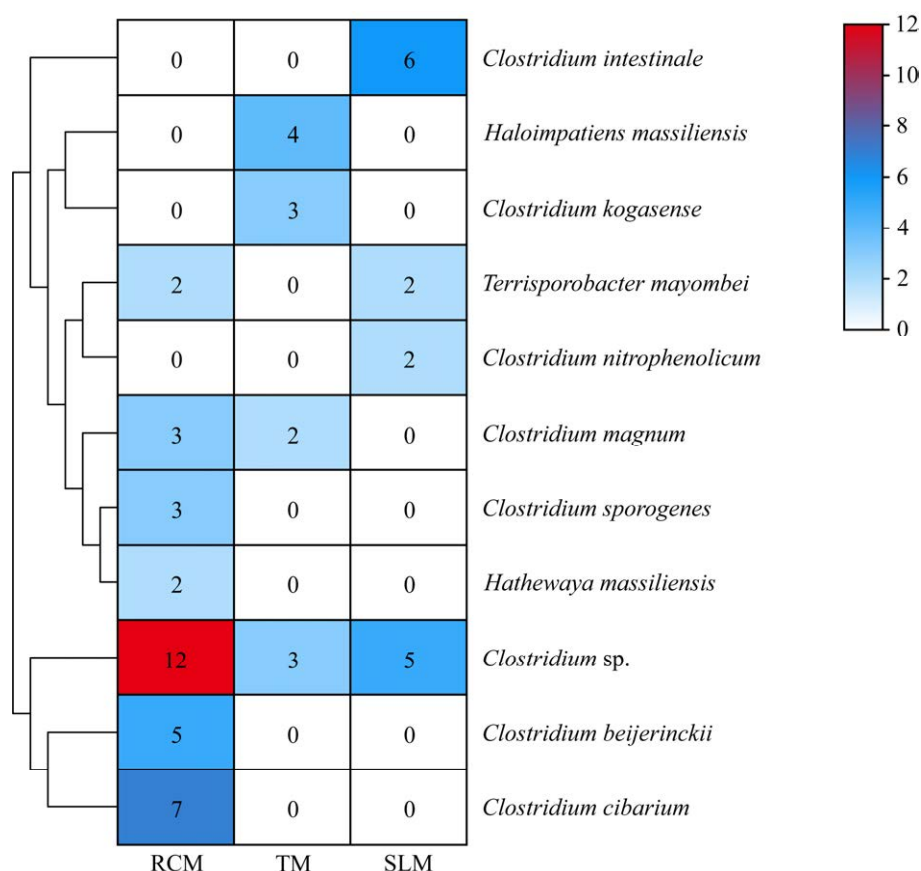


图 6 不同培养基分离厌氧菌的情况

Figure 6 Isolation of anaerobes on different media.

sporogenes、*Clostridium beijerinckii*、*Clostridium cibarium* 和 *Hathewayia massiliensis* 仅在 RCM 培养基中分离获得，*Haloimpatiens massiliensis* 和 *Clostridium kogasense* 仅在 TM 培养基中分离获得，*Clostridium nitrophenolicum* 和 *Clostridium intestinale* 仅在 SLM 培养基中分离获得。以上结果表明，3 种培养基中 RCM 培养基能够分离到种类更丰富、数量更多的厌氧菌，分离效果最佳。虽然 TM 培养基和 SLM 培养基分离的厌氧菌数量和种类相对较少，但本研究中某些厌氧菌分别仅从这 2 种培养基中分离获得，说明 2 种培养基对某些厌氧菌的分离依然存在特异性，多种培养基的综合利用有利于分离出更为丰富多样的微生物类群。

2.7 三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌多样性分析

α 多样性分析中 Species richness 与 Pielou's evenness 分别用于衡量物种的丰富度与分布均匀程度；Shannon 与 Simpson 指数用于衡量物种的多样性。三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌群多样性分析结果表明，4 个埋藏坑土壤中厌氧菌多样性指数均存在差异，K8 坑土壤中 Species richness、Shannon 与 Simpson 指数最高，表明 K8 坑土壤厌氧菌群丰富度与群落多样性最高；K4 坑土壤厌氧菌多样性指数均低于其他 3 个埋藏坑，表明 K4 坑象牙埋藏层土壤环境中厌氧菌群丰富度、分布均匀性与群落多样性均低于其他埋藏坑土壤环境(表 4)。

表 4 三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌多样性指数

Table 4 The diversity indices of culturable anaerobes in ivory burial soil of Sanxingdui

Sample	Species richness	Pielou's evenness	Shannon index	Simpson index
K3	1.207	0.980	1.358	0.803
K4	1.137	0.845	1.171	0.692
K7	1.251	0.990	1.373	0.818
K8	1.573	0.959	1.719	0.844

2.8 土壤环境因子与可培养厌氧菌种群分布的相关性

将三星堆象牙埋藏层土壤可培养厌氧菌群与土壤理化因子进行相关性分析, Mantel 检验结果表明 4 个埋藏坑土壤 pH 及 Cu、Pb 含量相互之间呈正相关关系。可培养厌氧菌种群分布特征与其土壤样品的 MC、pH、Cu 与 Pb 含量呈正相关, 而和 OM 含量呈负相关, 其中与 Cu、Pb 含量呈显著正相关(图 7A)。相关性热图分析结果显示, 不同理化因子对菌株存在不同程度影响, 其中 *Clostridium cibarium*、*Clostridium magnum*、*Terrisporobacter mayombe*、*Hatheway* *massiliensis* 与 MC 呈正相关, 与 Cu、Pb 含量呈负相关; *Clostridium beijerinckii*、*Haloimpatiens massiliensis*、*Clostridium kogasense*、*Clostridium nitrophenolicum*、*Clostridium intestinale* 与 pH、Cu、Pb 含量呈正相关, 与 MC、OM 含量呈负相关(图 7B)。

3 讨论与结论

微生物是导致文物劣化的重要因素之一, 但目前对于三星堆象牙埋藏环境中的厌氧菌缺乏一定的了解。厌氧微生物是世界上最为丰富的微生物之一^[18], 对有机物的分解起到了重要作用, 新鲜象牙中氨基酸含量约为 35%, 而三星堆出土象牙中氨基酸含量仅约 1%^[19], 厌氧微

生物是否会导致象牙有机成分的降解还尚不清楚。通过可培养方法直接获取菌株有助于全面了解厌氧菌的功能, 拓展对厌氧微生物的认知, 为研究象牙微生物劣化机理提供菌株资源。

专性厌氧菌对氧气极为敏感, 培养的条件也十分苛刻, 因此对于厌氧微生物的分离培养也相对困难, 其中培养条件和培养基成分是影响厌氧微生物生长的重要因素^[20]。在培养专性厌氧菌时, 最核心的是控制厌氧条件, 采用厌氧工作站进行分离培养是目前公认效果较好的厌氧微生物培养方法^[21-22]。此外, 专性的厌氧菌生长还需要一个较低的氧化还原电位, 向培养基中添加还原剂有助于降低培养基的氧化还原电位, L-半胱氨酸是厌氧培养基中最常用的还原剂之一, 能更好地满足厌氧菌的生长要求^[23]。某些厌氧微生物的生长还需要微量营养物质, 但鉴定环境样品中特定微生物生长的关键营养物质相对困难, 因此可以将原样品的无菌浸出液添加到培养基中, 以提高厌氧菌的培养成功率^[24]。丁雪松^[13]采用窖泥浸出培养基模拟原始的窖泥环境进行厌氧菌的分离, 成功分离到不同种类的厌氧菌; 韩颖^[25]将厌氧培养基中无菌水替换成窖泥和酒醅混合离心后的营养液, 最终分离获得了乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)与 *Clostridium* 厌氧菌; 蒲秀鑫等^[26]基于高通量测序结果, 根据基因序列在 Known Media Database (KOMODO)数据库中进行培养基的预测, 实现了厌氧菌的定向分离。本研究采用 RCM、TM、SLM 这 3 种培养基对厌氧微生物进行分离, 其中 RCM 培养基营养最丰富, 主要针对梭菌属的培养, 在本研究中分离效果最佳; TM 培养基中硫乙醇酸盐能够更好地维持培养基中氧化还原电势, 适用于多种厌氧微生物, 但对某些梭状芽孢杆菌的孢子有一定的抑制作用^[27], 导致对 *Clostridium* 分离效果较差, 但其成功分

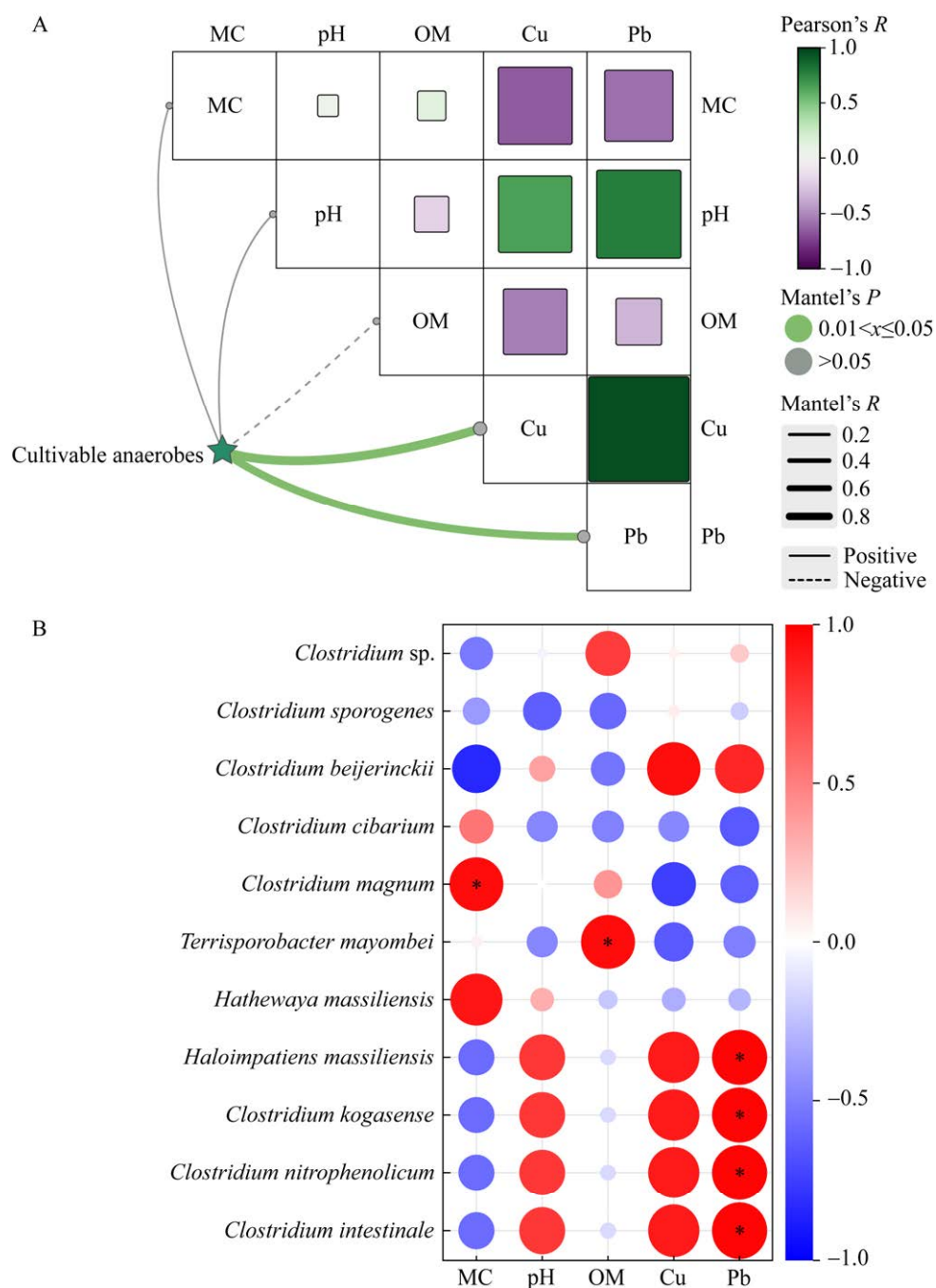


图 7 土壤环境因子与可培养厌氧菌种群分布的相关性 A: Mantel 检验, 矩形为环境因子的相关性热图, 连线为环境因子和可培养厌氧菌种群相关性. B: 相关性热图, 颜色表示相关性, 圆圈大小表示 R 值, 圆圈内的*为显著性(*: $P < 0.05$)

Figure 7 The correlation between environmental factors and population distribution of cultivable anaerobes. A: Mantel test, the rectangle represents a correlation heatmap of environmental factors, with lines connecting environmental factors to the correlation with cultivable anaerobic bacterial populations. B: Relevance heatmap, colors indicate correlation, circle size represents the R -value, and * inside the circles denote significance (*: $P < 0.05$).

离出了 *Haloimpatiens* 细菌; SLM 培养基主要用来模拟三星堆象牙埋藏层土壤的营养成分,最终从 SLM 培养基中成功分离到 4 株不同的厌氧菌,其中 *Clostridium nitrophenolicum* 和 *Clostridium intestinale* 仅从 SLM 培养基中分离获得,有效提高了厌氧菌的分离效率。虽然,RCM 培养基分离到的厌氧菌种类及数量均最多,但 SLM 培养基与 TM 培养基也分离出了不同种类的厌氧菌,说明培养基中的营养成分对可培养厌氧菌的分离存在重要影响,单一培养基不利于多种可培养微生物的分离,为提高分离菌株的多样性,应采用多种培养基综合互补,以得到更为丰富的微生物类群。

本研究对三星堆 K3、K4、K7 和 K8 坑象牙埋藏层土壤中分离的厌氧菌进行了 16S rRNA 基因系统发育分析,98.65% 的 16S rRNA 基因序列相似性可以作为区分两个物种的阈值^[28]。分离菌株中有 5 株与其近缘种间的 16S rRNA 基因序列相似性均低于 98.65%,可能是潜在的厌氧菌新种,需要进一步分类学实验确定其准确分类地位。61 株发酵厌氧菌分属于 *Clostridium*、*Haloimpatiens*、*Terrisporobacter*、*Hatheway* 这 4 个属,其中 *Clostridium* 为优势菌属,在所有样品中均有发现且种类最多。许育民等^[29]对窖泥样品中的可培养发酵厌氧菌进行分离,同样分离获得了 *Clostridium*、*Terrisporobacter* 的厌氧微生物,除此之外还分离到了副梭菌属(*Paraclostridium*)、鼠伴菌属(*Muricomes*)、产己酸杆菌属(*Caproiciproducens*)等属的厌氧菌,但未分离获得 *Haloimpatiens*、*Hatheway* 微生物。三星堆象牙埋藏环境可培养厌氧微生物类群同其他环境存在一定的差异。研究表明 *Clostridium*、*Haloimpatiens* 和 *Terrisporobacter* 都能发酵产生有机酸等物质^[30-32],可能对象牙成分中的碳羟磷灰石造成酸腐蚀,导致其结构疏松易碎。

Pinzari 等^[33]发现微生物产生的有机酸草酸在象牙上能形成草酸钙结晶,从而破坏象牙原本的结构。*Clostridium* 同时还可以进行氨基酸发酵,通过斯提柯兰氏反应(Stickland reaction)在氨基酸之间的偶联氧化-还原反应中获得能量^[34],该反应可以将蛋白中的氨基酸同时作为碳源、氮源,而 *Terrisporobacter* 同样能降解氨基酸^[32],两者都能导致蛋白结构的破坏,象牙中蛋白结构遭到破坏后,其弹性与韧性也将随之降低。此外,Kim 等^[35]发现 *Hatheway* 在降解蛋白质过程中起到关键作用,是明胶降解过程中的优势菌群,在蛋白质和碳水化合物之间其以蛋白质作为首选底物。由于象牙中主要成分为碳羟磷灰石和有机纤维蛋白,所以这些发酵厌氧微生物对象牙可能存在潜在的破坏作用。

三星堆 4 个埋藏坑中不仅出土了象牙,同时也出土了大量的青铜器,青铜中的金属离子可能会随着土壤中的各种物理化学反应溶出迁移至土壤中。已有研究证实三星堆出土青铜主要为铜铅锡合金^[36],本研究测试结果也表明象牙埋藏层土壤的 Cu、Pb 含量远超《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准》(Cu 100 mg/kg, Pb 120 mg/kg)的筛选值^[37],相关研究表明重金属的胁迫可以促进某些微生物的生长和产酸^[38],进而可能对象牙产生潜在的危害。目前,*Clostridium*、*Terrisporobacter*、*Hatheway*、*Haloimpatien* 与重金属的相关研究较少,但从本研究中分离的大量发酵厌氧菌的分布特征均与 Cu、Pb 含量呈正相关,其中 *Haloimpatiens massiliensis*、*Clostridium kogasense*、*Clostridium nitrophenolicum*、*Clostridium intestinale* 与 Pb 含量呈显著正相关,表明长时间的埋藏过程可能提高了其对 Cu、Pb 的适应性,揭示了环境因子不仅会重塑微生物的群落结构,还可能促使微生物对环境的适应性增强^[39]。此外,pH、OM 含量同样影响三星堆象牙埋藏

环境可培养发酵厌氧菌的种群分布,除 K3 坑为中性土壤外,其余都为弱碱性土壤,而中性或碱性土壤更有利于微生物的繁殖生长,pH 还可以影响土壤中重金属的溶解度与价态,改变微生物细胞的表面活性,抑制或促进微生物的繁殖和生长,进而影响微生物种群的分布特征^[40]。由于 K4 埋藏坑象牙在埋藏前被大面积焚烧,灰烬遍布整个坑内^[1],象牙碳化严重,导致其埋藏层土壤中 OM 含量显著高于其他埋藏坑,高含量的 OM 能够改良土壤结构,促进团粒状结构的形成,从而增加土壤的疏松性与通气性^[41],这可能是导致 K4 象牙埋藏层可培养发酵厌氧菌群落丰富度与多样性均低于其他埋藏环境的原因之一。

本研究结果表明采用多种培养基综合互补可以为研究象牙劣化机理提供更多的菌株资源,同时也能更加全面地解析三星堆象牙埋藏环境中厌氧微生物的多样性。在长时间的埋藏过程中,象牙中无机及有机成分易受到埋藏环境理化性质与微生物的影响,其中微生物产酸可能导致其表面的腐蚀,损害外观和结构,而微生物降解蛋白质等功能可能导致象牙韧性降低和质地变化。因此,今后将进一步通过不同培养条件分离更多类型的厌氧微生物,并基于全基因组学以及产物检测分析等手段对可培养厌氧菌的产酸、产蛋白酶等相关功能进行研究,为进一步探究三星堆出土象牙的微生物劣化机理提供菌株资源和理论基础。

REFERENCES

- [1] 于孟洲,李潇檬.也谈三星堆遗址的“祭祀遗存”[J].四川文物,2022(6): 98-110.
YU MZ, LI XM. Discussing the “sacrificial remains” of the Sanxingdui site[J]. Sichuan Cultural Relics, 2022(6): 98-110 (in Chinese).
- [2] 汪灵. 中国的古象牙文物及其保护意义[J]. 中国文物科学研究, 2007(2): 58-61, 85.
WANG L. Chinese ancient ivory cultural relics and their protection significance[J]. China Cultural Heritage Scientific Research, 2007(2): 58-61, 85 (in Chinese).
- [3] 徐秀丽. 6 座祭祀坑出土文物近 13 000 件祭祀坑埋藏年代确定[N]. 中国文物报, 2022-06-17(1).
XU XL. Excavation from six sacrificial pits yielded nearly 13,000 cultural relics, and the burial period of the sacrificial pits has been determined[N]. Chinese Cultural Relics Newspaper, 2022-06-17 (in Chinese).
- [4] SIMPSON P. Studies on the degradation of horn, antler and ivory at archaeological sites[D]. Portsmouth: University of Portsmouth, 2011.
- [5] 郭宏. 文物保存环境概论[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
GUO H. Introduction to the Conservation Environment of Cultural Relics[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [6] 旦辉,汪灵,王冲,常嗣和,樊华. 成都金沙出土古象牙文物的微生物特征及其防治方法探讨[J]. 考古与文物, 2009(5): 100-102.
DAN H, WANG L, WANG C, CAHNG SH, FANG H. Microbial characteristics and prevention methods of ancient ivory artifacts unearthed in Jinsha, Chengdu[J]. Archaeology and Cultural Relics, 2009(5): 100-102 (in Chinese).
- [7] XU J, WEI Y, JIA H, XIAO L, GONG D. A new perspective on studying burial environment before archaeological excavation: analyzing bacterial community distribution by high-throughput sequencing[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 41691.
- [8] KOKKO ME, MÄKINEN AE, PUHAKKA JA. Anaerobes in bioelectrochemical systems[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2016, 156: 263-292.
- [9] SONG K, YEERKEN S, LI L, SUN J, WANG Q. Improving post-anaerobic digestion of full-scale anaerobic digestate using free ammonia treatment[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(7): 7171-7176.
- [10] 谢振斌,唐飞,王冲,刘建成,李军,肖庆,冉宏林,孙群,邓宏. 基于环境监测的三星堆遗址祭祀坑考古现场预防性保护[J]. 文物保护与考古科学, 2023, 35(3): 71-79.
XIE ZB, TANG F, WANG C, LIU JC, LI J, XIAO Q, RAN HL, SUN Q, DENG H. Preventive conservation of the sacrificial pit at Sanxingdui site based on environmental monitoring[J]. Journal of Cultural Heritage and Archaeology Science, 2023, 35(3): 71-79 (in Chinese).

- [11] 何砚秋, 蒋璐蔓, 陈俊橙, 王宁, 肖麟, 王冲, 李思凡, 曲靖文, 程乾, 石雪雪, 谭玉兰, 曹雪笛, 张紫薇, 邹立扣, 赵珂. 三星堆出土古象牙表面病害微生物分离鉴定及抑菌剂效果评价[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(3): 543-552.
- HE YQ, JTANG LM, CHEN JC, WANG N, XIAO L, WANG C, LI SF, QU JW, CHEN Q, SHI XX, TAN YL, CAO XD, ZHANG ZW, ZOU LK, ZHAO K. Isolation and identification the microbe diseases breeding on the surface of ancient ivory unearthed from Sanxingdui ruins and evaluation of antimicrobial effect of bacteriostatic agent[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2022, 28(3): 543-552 (in Chinese).
- [12] XIAN WD, HU CJ, LI WJ. Methods for isolation and cultivation of thermophiles in hot springs[J]. Bio-101, 2021: e2003741.
- [13] 丁雪松. 传统白酒窖泥中厌氧菌的分离鉴定及功能菌的筛选[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学硕士学位论文, 2012.
- DING XS. Isolation, identification, and screening of anaerobic bacteria in traditional baijiu cellar sediment, as well as selection of functional bacteria[D]. Harbin: Master's Thesis of Heilongjiang University, 2012 (in Chinese).
- [14] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO SD. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [15] IDRIS B, GOODWIN W. Comparison of chelex[®]-100 with two solid phase DNA extraction techniques[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2015, 5: e274-e275.
- [16] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing ezbiocloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [17] 刘国红, 刘波, 王阶平, 朱育菁, 陈峥, 车建美, 陈倩倩. 基于可培养方法分析云南腾冲小空山火山谷芽胞杆菌分布特征[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1063-1075.
- LIU GH, LIU B, WANG JP, ZHU YJ, CHEN Z, CHE JM, CHEN QQ. Distribution characteristics of *Bacillus*-like species of Xiaokong Mountain volcanic valley in Tengchong County, Yunnan Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(6): 1063-1075 (in Chinese).
- [18] 承磊, 马诗淳, 巫可佳, 张辉, 邓宇. 厌氧微生物培养分离: 过去、现在和未来[J]. 微生物学报, 2021, 61(4): 946-968.
- CHENG L, MA SC, WU KJ, ZHANG H, DENG Y. Cultivation and isolation of anaerobes: past, present and future[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(4): 946-968 (in Chinese).
- [19] 樊华. 金沙与三星堆出土象牙结构和组分研究[D]. 成都: 成都理工大学硕士学位论文, 2006.
- FAN H. Analysis of structure and composition of ivory unearthed from Jinsha and Sanxingdui[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu University of Technology, 2006 (in Chinese).
- [20] BICLOT A, HUYS GR, BACIGALUPE R, D'HOE K, VANDEPUTTE D, FALONY G, TITO RY, RAES J. Effect of cryopreservation medium conditions on growth and isolation of gut anaerobes from human faecal samples[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 80.
- [21] XUE Y, SHEN R, LI Y, SUN Z, SUN X, LI F, LI X, CHENG Y, ZHU W. Anaerobic fungi isolated from bactrian camel rumen contents have strong lignocellulosic bioconversion potential[J]. Front Microbiol, 2022, 13: 888964.
- [22] HERRMANN AJ, GEHRINGER MM. A low-cost automatized anaerobic chamber for long-term growth experiments and sample handling[J]. HardwareX, 2021, 10: e00237.
- [23] SCOLA BL, KHELAIFIA S, LAGIER JC, RAOULT D. Aerobic culture of anaerobic bacteria using antioxidants: a preliminary report[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, 33(10): 1781-1783.
- [24] RAJNI HK, GASHAW M, BO M. Anaerobes in Biotechnology[M]. Berlin: Springer, 2016.
- [25] 韩颖. 古井窖泥菌群中厌氧菌的纯化培养与分子鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2017.
- HAN Y. Purification and molecular identification of anaerobic bacteria in Gujing Tribute pit mud[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese).
- [26] 蒲秀鑫, 柴丽娟, 徐鹏翔, 张晓娟, 陆震鸣, 王松涛, 沈才洪, 史劲松, 许正宏. 泸型酒窖泥中梭菌的分离及代谢产物分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2427-2436.
- PU XX, CHAI LJ, XU PX, ZHANG XJ, LU ZM, WANG ST, SHEN CH, SHI JS, XU ZH. Isolation and metabolic characters of *Clostridium* strains from pit mud of Luzhou-flavor baijiu[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(12): 2427-2436 (in Chinese).

- [27] MOSSEL DAA, BEERENS H. Studies on the inhibitory properties of sodium thioglycollate on the germination of wet spores of clostridia[J]. Journal of Hygiene, 1968, 66(2): 269-272.
- [28] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(2): 346-351.
- [29] 许育民, 冯大鸿, 李秋雨, 余苗, 王洪, 沈祥坤, 田瑞杰, 胡晓龙. 窖泥源可培养厌氧菌株挥发性代谢产物解析[J]. 轻工学报, 2021, 36(6): 21-29.
- XU YM, FENG DH, LI QY, YU M, WANG H, SHEN XK, TIAN RJ, HU XL. Analysis of volatile metabolites of cultivated anaerobic strains in pit mud[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(6): 21-29 (in Chinese).
- [30] ÁN XELA F, NALAKATH AH, VEIGA MC, CHRISTIAN K. Efficient butanol-ethanol (B-E) production from carbon monoxide fermentation by *Clostridium carboxidivorans*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(7): 3361-3370.
- [31] WU D, ZHANG NF, SUN C, ZHANG WW, HAN SB, PAN J, WU M, DILBAR T, ZHU XF. *Haloimpatiens lingqiaonensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from paper-mill wastewater[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016, 66(2): 628-632.
- [32] 刘晓. 不同青贮料对育肥猪生长性能和肉质及肠道微生物区系的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2019.
- LIU X, Effects of different fermented feeds on growth performance and meat quality and intestinal microorganism[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [33] PINZARI F, TATE J, BICCHIERI M, RHEE YJ, GADD GM. Biodegradation of ivory (natural apatite): possible involvement of fungal activity in biodeterioration of the lewis chessmen[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(4): 1050-1062.
- [34] POEHLEIN A, RIEGEL K, KÖNIG SM, LEIMBACH A, DANIEL R, PETER D. Genome sequence of *Clostridium sporogenes* DSM 795^T, an amino acid-degrading, nontoxic surrogate of neurotoxin-producing *Clostridium botulinum*[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10(1): 40.
- [35] KIM SI, KIM E, AGHASA A, HWANG S. Shift in bacterial diversity in acidogenesis of gelatin and gluten seeded with various anaerobic digester inocula-science[J]. Bioresource Technology, 2020, 306: 123158.
- [36] 马江波, 金正耀, 田建花, 陈德安. 三星堆铜器的合金成分和金相研究[J]. 四川文物, 2012(2): 90-96, 100.
- MA JB, JIN ZY, TIAN JH, CHEN DA. The alloy composition and metallographic study of bronze artifacts from Sanxingdui[J]. Sichuan Cultural Relics, 2012(2): 90-96, 100 (in Chinese).
- [37] 生态环境部, 国家市场监督管理总局. 土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准: GB 15618—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [38] JANG HC, VALIX M. Overcoming the bacteriostatic effects of heavy metals on *Acidithiobacillus thiooxidans* for direct bioleaching of saprolitic Ni laterite ores[J]. Hydrometallurgy, 2017, 168: 21-25.
- [39] KANG J, YIN Z, PEI F, YE Z, SUN Y, SONG G, GE J. Driving factors of nitrogen conversion during chicken manure aerobic composting under penicillin g residue: quorum sensing and its signaling molecules[J]. Bioresource Technology, 2022, 345: 126469.
- [40] ZHANG J, WANG L, YANG J, LIU H, DAI JL. Health risk to residents and stimulation to inherent bacteria of various heavy metals in soil[J]. Science of The Total Environment, 2015, 508: 29-36.
- [41] SONG F, LIU K, LOU Y, KUZYAKOV Y, WANG Y. Divergent responses of aggregate stability to long-term mineral and organic amendments between upland and paddy soils[J]. Journal of Soils and Sediments, 2022, 22(12): 2969-2981.