

研究报告

太原北齐徐显秀墓壁画真菌群落组成与菌害成因

武发思^{1,3,4} 武光文² 刘岩² 田恬⁵ 张国彬^{1,3,4} 贺东鹏^{3,4} 徐瑞红^{3,4}
赵林毅^{1,3,4} 冯虎元⁵ 汪万福^{1,3,4,5*}

(1. 敦煌研究院保护研究所 甘肃 敦煌 736200)

(2. 太原北齐壁画博物馆 山西 太原 030000)

(3. 国家古代壁画与土遗址保护工程技术研究中心 甘肃 敦煌 736200)

(4. 古代壁画保护国家文物局重点科研基地 甘肃 敦煌 736200)

(5. 兰州大学生命科学学院 甘肃 兰州 730000)

摘要:【目的】确定壁画病害真菌群落组成,解析影响病菌发生的关键环境因子,为墓室壁画的科学保护提供依据。【方法】利用无菌解剖刀分别采集白色霉变与无明显霉变壁画样品;使用扫描电子显微镜(SEM)分析病害真菌微观形态特征;通过提取样品基因组总DNA、扩增真菌ITS区、构建克隆文库、测序和系统发生关系分析等技术研究壁画真菌群落组成与结构特点;结合温度与相对湿度监测,分析诱发壁画霉变的环境成因。【结果】霉变壁画表面有大量菌丝体,分生孢子大小为(1.5–2.0) μm × (1.0–1.5) μm 。霉变壁画克隆文库序列分别与NCBI数据库中白色侧齿霉菌属(*Engyodontium*)和支顶孢属(*Acremonium*)真菌具有较高的相似度,白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*)为优势病害菌(98.1%);无明显霉变壁画克隆文库序列分别与青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢属(*Alternaria*)、假丝酵母属(*Candida*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)和白色侧齿霉菌属真菌高度相似,无绒毛青霉菌(*Penicillium laeue*)为优势菌(77.4%);所有文库序列均属于子囊菌门(Ascomycota)。监测期墓道下部环境温度在–0.3–17.6 °C之间波动,相对湿度长期在80%–100%之间变化。【结论】霉变与无明显霉变壁画中真菌群落组成差异较大;白色侧齿霉菌是引起墓道壁画霉变的主要病害菌;墓道下部相对湿度常年较高是诱发壁画霉变的关键环境因子;有必要开展壁画菌害区域的抢救性防护,并实施一定的环境控制措施以保护该考古遗址古代壁画。

关键词: 墓室壁画, 霉变, 克隆文库, 群落结构, 环境监测

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31440031, 31260136, 31500430); Project of Shanxi Cultural Relics Bureau (No. 2014-kb-04); Project of Science and Technology for the Conservation of Cultural Relics, Gansu Cultural Relics Bureau (No. GWJ2014003)

***Corresponding author:** Tel: 86-937-8869043; Fax: 86-937-8869103; E-mail: wwanfu@hotmail.com

Received: June 25, 2015; **Accepted:** August 27, 2015; **Published online** (www.cnki.net): November 17, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31440031, 31260136, 31500430); 山西省文物局课题(No. 2014-kb-04); 甘肃省文物保护科学和技术研究课题(No. GWJ2014003)

***通讯作者:** Tel: 86-937-8869043; Fax: 86-937-8869103; E-mail: wwanfu@hotmail.com

收稿日期: 2015-06-25; **接受日期:** 2015-08-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-11-17

Fungal community composition on normal and moldy mural in Xu Xianxiu's tomb of Northern Qi Dynasty, Taiyuan

WU Fa-Si^{1,3,4} WU Guang-Wen² LIU Yan² TIAN Tian⁵ ZHANG Guo-Bin^{1,3,4}
HE Dong-Peng^{3,4} XU Rui-Hong^{3,4} ZHAO Lin-Yi^{1,3,4} FENG Hu-Yuan⁵
WANG Wan-Fu^{1,3,4,5*}

(1. The Conservation Institute of Dunhuang Academy, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(2. Mural Museum of the Northern Qi Dynasty in Taiyuan, Taiyuan, Shanxi 030000, China)

(3. National Research Center for Conservation of Ancient Wall Paintings and Earthen Sites, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(4. Key Scientific Research Base of Conservation for Ancient Mural, State Administration for Cultural Heritage, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(5. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: [Objective] We explored the fungal community composition on mural surface, to analyze the major environmental factors that induce the explosion of fungal disease, and to provide the basis for the scientific conservation of murals. **[Methods]** Mural samples with and without whitish moldy necrosis were carefully and separately collected by sterile scalpel. The Scan Electronic Microscope (SEM) was used to analyze microcosmic features of fungus that caused mural biodeterioration. By the extraction of total genomic DNA, the following steps should be the amplification of fungal ITS region, clone library construction, sequencing, and phylogenetic analysis, thereafter the fungal community composition and structure characteristics were clarified. Combined with temperature and relative humidity (RH) monitoring, the environmental factors related to fungal growth can be figure out. **[Results]** A large amount of mycelia existed on mildewed murals, the volume of conidia ranged among 1.5–2.0 μm multiplied by 1.0–1.5 μm . Most of clone library sequences in mildewed murals were much similar to genera *Engyodontium* and *Acremonium*, of these fungi *Engyodontium album* was a dominant fungus (98.1%); however, sequences from mural samples without mildew were more similar to genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Candida*, *Chaetomium* and *Engyodontium*, in which *Penicillium laeve* was a dominant species (77.4%). All sequences belonged to Ascomycota in our study. The temperature below the tomb tunnel varied from $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $17.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, and RH varied mostly from 80% to 100%. **[Conclusion]** The fungal community composition in the moldy murals was distinct different from murals without apparently moldy necrosis. *Engyodontium album* was the dominant disease fungus which caused mildew of murals. Perennial higher RH below the tomb tunnel must be the primary environmental factor that induced mildew. As a result, it is necessary to carry out some salvage protection and certain environmental control measures for conservation of ancient murals in this archaeological site.

Keywords: Tomb murals, Mildew, Clone library, Community structure, Environment monitoring

古代壁画是具有极高历史价值、艺术价值和科学价值的珍贵文化遗产，通常绘制并保存于石窟、寺观、殿堂(教堂)和墓室等建筑体内。受壁画附存环境中非生物因素、生物因素和人类活动的影响，古代壁画普遍存在裂隙、空鼓、色变、起甲、酥碱、烟熏和生物侵蚀等多种病害，严重威胁其长久保存和永续利用^[1]。在诸多病害中，壁画的生物退化和

生物降解问题一直以来都是文物保护工作者关注的焦点^[2-3]，包括法国拉斯科洞穴壁画^[4-5]、西班牙阿尔塔米拉洞穴壁画^[6-7]、埃及图坦卡蒙墓壁画^[8]、日本高松冢古坟壁画^[9]、意大利原罪地下墓室壁画^[10]以及我国敦煌莫高窟壁画^[11-12]等多处世界遗产地及古迹遗址地壁画都曾遭到或仍面临着包括细菌、真菌和藻类的侵蚀和破坏。近些年，随

着微生物分子生态学研究的发展,对于微生物侵蚀壁画机理的相关研究也在不断深入^[13]。

就不同环境下保存的壁画而言,墓室环境壁画所面临的微生物侵蚀与退化问题则更为严重和复杂^[14-15]。究其原因,土壤本身是微生物资源的储藏库,地下高湿度和低空气交换等环境特点也非常有利于墓室壁画中微生物的滋生和侵染。为了阻止或减缓病害微生物对珍贵壁画的进一步劣化,多种杀灭剂曾被广泛应用到壁画病害菌的防治中,然而防护现状却依然不容乐观^[16-17],这在很大程度上被归因于当前对于壁画病害微生物群落本底水平及其附存环境的调查和研究依然不够全面和细致^[18]。

自 20 世纪 90 年代开始,我国研究人员使用基于培养的手段对甘肃酒泉丁家闸十六国墓壁画和嘉峪关新城魏晋墓壁画^[19]、河南密县汉墓壁画^[20-21]、陕西长安唐墓壁画^[22]、西安曲江翠竹园西汉墓壁画^[23]等几处墓室壁画病害微生物进行了分离和鉴定;然而,利用分子生物学技术研究墓室壁画微生物的报道截至目前还较少,仅见对我国北方 5 世纪墓室壁画^[24]和嘉峪关魏晋墓壁画^[25-26]病害微生物群落组成和结构特征的检测分析。当前,文物保护领域已基本达成共识,即要建立针对壁画微生物病害的有效防护体系,对于壁画微生物群落特征的详尽分析是必不可少的,与依赖于培养的传统方法相比,构建克隆文库等现代分子生物学技术在壁画微生物生态学研究更具优势。

本研究以山西太原王家峰北齐徐显秀墓壁画为研究对象,利用分子生物学技术分析霉变壁画与无明显霉变壁画中真菌群落组成差异,明确壁画优势病害菌;并通过墓室环境监测分析,揭示影响壁画霉变的关键环境因子;相关研究结果将为墓室壁画微生物病害的监测和防治提供重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样点简介:北齐徐显秀墓位于太原市迎泽区郝庄镇王家峰村东“王墓坡”(112°36'42.2"E;

37°50'11.8"N),该地海拔 895 m,土质为湿陷性亚黏土,属暖温带大陆性气候,四季分明,雨热同季;历史最低温为-25.5℃,最高气温 39.4℃,年平均降水量为 420-457 mm,主要集中在 7-9 月。墓葬于 2000 年 12 月被发现,至 2002 年 10 月完成田野考古发掘工作。根据墓志记载,该墓葬为北齐太尉、武安王徐显秀之墓;因其中保存了同时期最完整的墓室彩绘壁画 330 余 m²,以及 500 余件精美器物,轰动了国内外文博界;壁画内容包括墓主人家居宴饮、仪仗出行队列及天象神兽等,其为北朝社会历史文化研究提供了难得的形象资料,对于美术考古也具有极高的价值。被国家文物局评为“2002 年度全国十大考古新发现”;2004 年被山西省人民政府公布为山西省第四批省级重点文物保护单位;2006 年被国务院公布为第六批全国重点文物保护单位。2011 年,“山西太原王家峰北齐徐显秀墓保护工程”项目开始实施,该考古遗址进入原址保护与展示利用的新阶段。

1.1.2 样品采集:2013 年 8 月,在徐显秀墓壁画病害现状调查时,项目组首次发现墓道西壁壁画表面(图 1A)出现疑似白色絮状霉变污染物(图 1B),面积约 2 m²,霉变区无绘画内容。同年 10 月,项目组利用无菌解剖刀分别采集了白色霉变与无明显霉变区域壁画样品,并置于无菌 Eppendorf 管中,带回实验室后其中一部分样品用于扫描电子显微镜分析,另一部分样品用于基因组总 DNA 提取。

1.2 方法

1.2.1 样品 SEM 分析:分别取少量霉变与无明显霉变壁画样品,固定于导电胶带上,在真空环境下(<5 Pa)喷金 90 s (I=40 mA),完成制样后使用扫描电子显微镜(JSM-6610LV, JEOL. Ltd.)分析供试样品中病害菌体的微观形态特征。

1.2.2 样品总 DNA 提取:称取霉变与无明显霉变壁画样品各 25 mg,使用 PowerSoilTM (MOBIO Laboratories, Solanabeach, CA, USA) DNA 提取试剂盒,结合 FastPrep[®]-24 样品处理系统(MP,



图 1 墓道西壁主要霉变区域(A, 箭头所示虚线框内)及壁画表面白色霉变物(B)

Figure 1 The main moldy area (A, in the arrow pointed dashed box) and white mould on the mural surface of west wall in tomb tunnel (B)

USA), 根据操作说明分别完成样品基因组总 DNA 提取, 分装后置于 -70°C 保存备用。

1.2.3 目标片段扩增: 合成真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 完成真菌 rRNA 基因内转录间隔区(ITS)的扩增。反应体系 (25 μL)包括: 10 \times 缓冲液 2.5 μL , 2.5 U/ μL 的 *Taq* 聚合酶(Tiagen Co., Beijing, China) 0.2 μL , dNTPs 终浓度 0.2 mmol/L, MgCl_2 终浓度 2.5 mmol/L, 引物终浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 2.0 μL (约含 5 ng DNA)。扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 10 min。用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小与特异性。

1.2.4 克隆文库的构建: 取 3 μL 经琼脂糖 DNA 纯

化试剂盒(Tiagen)纯化后扩增产物, 与 pGEM-T 载体(Promega)于 4°C 过夜连接, 连接产物克隆至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中(Tiagen)。根据蓝白斑筛选实验[(LB 培养基中(g/L): 胰蛋白胍 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10; Amp 浓度为 100 mg/L, X-Gal 为 20 g/L, IPTG 为 200 g/L]构建真菌 ITS 序列克隆文库。

1.2.5 测序与嵌合体检测: 分别挑取150–200个白斑, 利用通用引物T7/SP6扩增验证阳性克隆子中插入片段的大小。验证无误后的克隆斑挑至装有液体 LB培养基的离心管中(含Amp 100 mg/L), 37°C 、150 r/min 培养过夜后送交测序公司完成测序(ShangHai Majorbio Bio-technology Co., Ltd.)。得到有效序列全部提交至NCBI数据库GenBank中。

1.2.6 序列比对及系统发生树构建: 所得序列在 GenBank数据库中进行比对, 获得其最相似的参考序列。通过 MEGA 6.06 软件中的邻接法(Neighbor-Joining method)分析构建克隆文库所得典型序列与其相似序列间系统发生树。

1.2.7 群落结构分析: 统计系统发生树中相同种属相关序列总量, 计算其在克隆文库中所占百分比, 完成群落组成与结构分析。

1.2.8 遗址环境监测: 为配合徐显秀墓保护工程, 项目组已于 2011 年在遗址地不同位置安装了美国 Onset HOBO 数据记录仪, 用于监测温度和湿度的变化, 记录仪数据采集频次为每半小时一次。本研究选择了临近采样位置的墓道下甬道入口处环境数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 样品扫描电镜分析

通过对墓道西壁白色霉变样品与无明显霉变样品的扫描电镜分析(图 2), 确定了霉变壁画样品中存在大量菌丝体, 菌丝体分枝形成分生孢子梗, 分生孢子呈倒洋梨形, 长约 1.5–2.0 μm , 宽约 1.0–1.5 μm 。无明显霉变样品中菌丝体结构不可见, 具有微生物特征的结构体也很少, 多数为壁画地仗

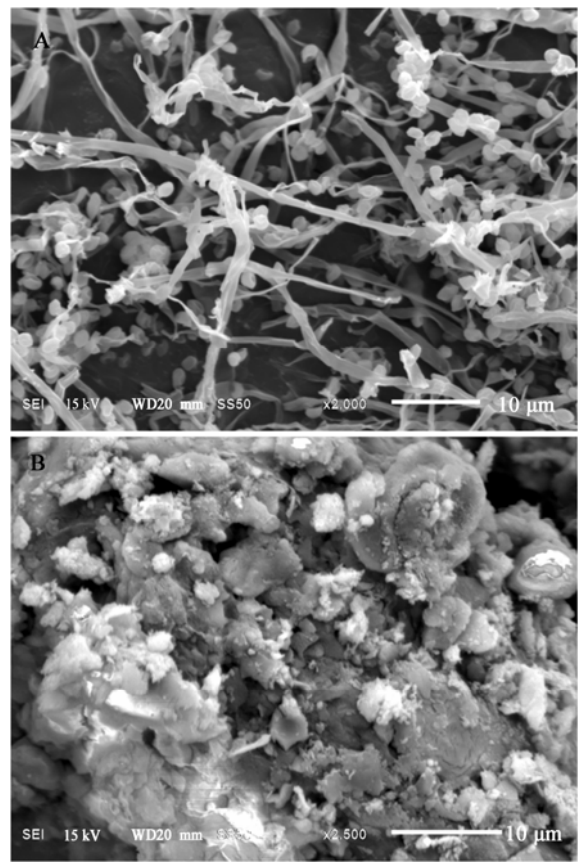


图 2 墓道西壁白色霉变壁画(A)与无明显霉变壁画样品(B)扫描电镜图
Figure 2 SEM images of mural samples with the white mildew (A) and without obvious mildew (B) on the west wall of tomb tunnel

层中土壤颗粒物。

2.2 阳性克隆的筛选

提取样品基因组总 DNA，基于通用引物 ITS1/ITS4 扩增真菌 ITS 区，扩增产物经割胶纯化后，构建克隆文库。利用蓝白斑筛选实验及二次扩增验证，霉变壁画克隆文库得到片段大小(600 bp 左右)合适的阳性克隆斑 129 个，无明显霉变壁画获得阳性克隆斑 135 个，摇培菌液全部送至测序公司完成了插入片段序列测定。

2.3 测序及序列比对

经测序后霉变壁画克隆文库共得到片段大小合适的序列 103 条(提交至 NCBI 数据库序列号为 KP063332–KP063434)，无明显霉变壁画克隆文库共得到序列 106 条(序列号为 KP063435–KP063540)；通过 BLAST 比对，确定了本研究中典型序列与 NCBI 数据库中相似度最高序列的科属、种和分离源等信息(表 1)。结果显示，白色霉变壁画克隆文库序列主要与白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*)和支顶孢菌(*Acremonium* sp.)具有较高的相似度，二者分别属于虫草菌科(Cordycipitaceae)和肉座菌科(Hypocreaceae)；对比相似序列的分离源信息发现，这些序列主要分离自潮湿墙壁和海洋藻类等样品中。无明显霉变壁画克

表 1 壁画病害真菌 ITS 区克隆文库典型序列比对分析 Table 1 BLAST and analysis of ITS region clone library sequences on fungal disease murals					
Typical clones (accession No.)	Family	Species	Source	Identity (%)	Accession No.
xh1 (KP063332)	Cordycipitaceae	<i>Engyodontium album</i>	Wall	99	KC311469
xh55 (KP063386)	Hypocreaceae	<i>Acremonium</i> sp.	Marine macroalgae	99	HQ914906
xnh40 (KP063474)	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium globosum</i>	Plant	97	JX981455
xnh78 (KP063512)	Aspergillaceae	<i>Aspergillus versicolor</i>	Old peat	99	AJ937754
xnh61 (KP063495)	Aspergillaceae	<i>Aspergillus penicillioides</i>	Sea sand	99	HQ914939
xnh1 (KP063435)	Aspergillaceae	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Rhizosphere	99	GU566212
xnh19 (KP063453)	Cordycipitaceae	<i>Engyodontium album</i>	Wall	99	KC311469
xnh55 (KP063489)	Aspergillaceae	<i>Penicillium laeue</i>	Genomic DNA	96	KF667369
xnh39 (KP063473)	Debaryomycetaceae	<i>Candida parapsilosis</i>	Feed	99	GQ395610
xnh43 (KP063477)	Pleosporineae	<i>Alternaria chlamydosporigena</i>	Genomic DNA	99	KC466540

隆文库序列主要与无绒毛青霉菌 (*Penicillium laeve*)、帚状曲霉菌 (*Acremonium* sp.) 等具有较高的相似度, 分别隶属于曲霉科 (*Aspergillus*)、毛壳菌科 (*Chaetomiaceae*) 和虫草菌科等 5 个科, 曲霉科占据优势, 相似序列主要分离自海砂、墙壁和根际土等样品中。

2.4 系统发生树构建

选择两个文库中典型序列及与之相似程度最高的 NCBI 数据库中参照序列, 构建徐显秀墓霉变

壁画与无明显霉变壁画样品中真菌 ITS 区克隆文库中典型序列及其相似序列间分类学系统发生树, 从图 3 可以看出, 所有序列均属于子囊菌门 (*Ascomycota*)。

2.5 群落组成与结构特征比较

霉变及无明显霉变样品克隆文库中真菌主要属及其所占百分比见图 4。霉变壁画克隆文库序列包括 2 个属, 分别为白色侧齿霉属 (*Engyodontium*) 和支顶孢属 (*Acremonium*), 其中白色侧齿霉属为优势

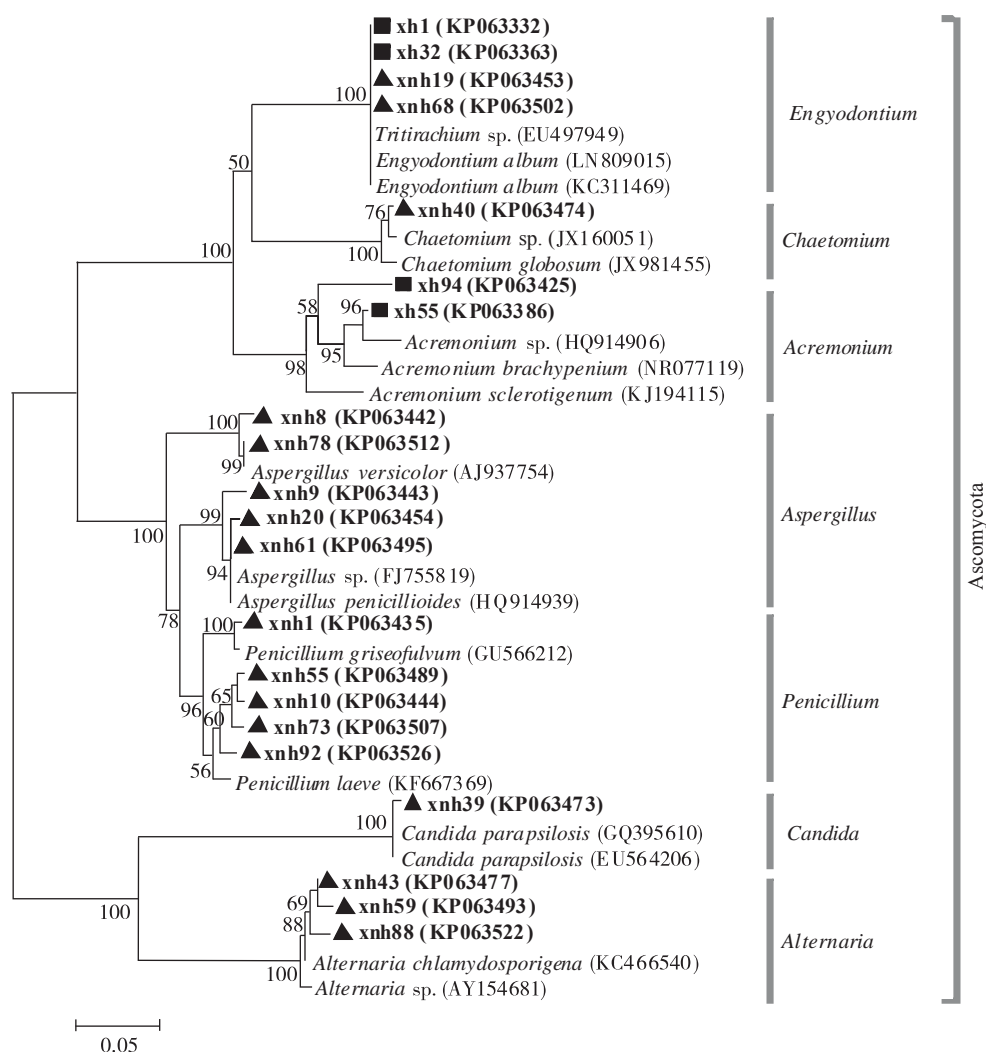


图 3 壁画真菌克隆文库系统发生树

Figure 3 Phylogenetic tree of mural fungus clone library

注: ■xh: 霉变壁画文库序列; ▲xnh: 无明显霉变壁画文库序列。

Note: ■xh: Sequences from moldy murals clone library; ▲xnh: Sequences from non-moldy murals clone library.

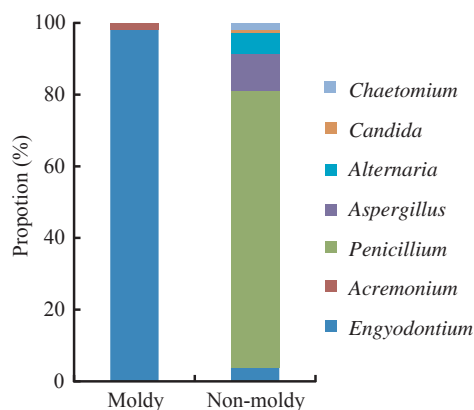


图4 墓道西壁壁画真菌群落组成及种属所占百分比
Figure 4 Proportions of genera detected among the fungal community on the west wall of tomb tunnel

属, 占文库中序列总数的 98.1%; 无明显霉变壁画样品克隆文库序列包括 6 个属: 青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、链格孢属 (*Alternaria*)、假丝酵母属 (*Candida*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*) 和白色侧齿霉属, 其中青霉属为优势属, 占文库中序列总数的 77.4%。由此可见, 霉变壁画及无明显霉变壁画中真菌群落组成具有较大差异, 优势类群各不相同。

2.6 环境温度与相对湿度变化

本研究对 2012 年 8 月至 2013 年 8 月墓道下部环境温度和相对湿度进行了连续监测(图 5), 分析发

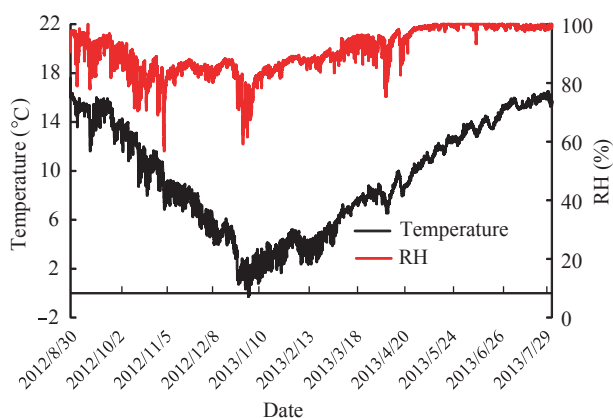


图5 墓道下部温度与相对湿度变化
Figure 5 Variations of temperature and relative humidity at the lower position of tomb tunnel

现, 墓道下部监测位置温度具有明显的季节性变化特征, 最低温出现在 1 月, 为 -0.3°C ; 最高温出现在 8 月, 为 17.6°C ; 相对湿度长期维持在 80% 以上, 5–8 月甚至经常性地达到 100%。由此可见, 监测点周围局部微环境具有常年阴凉潮湿的特点。

3 结论与讨论

墓室壁画的霉变问题较为普遍, 显微镜技术以其直观形象的特点在病害菌的初步判定中被广泛采用。本研究通过扫描电镜分析发现, 霉变壁画表面形成了大量菌丝体, 分生孢子的形态大小及着生方式也较为清晰, 这为主要病害菌的分子鉴定结果提供了重要的形态学鉴定佐证。无明显霉变壁画样品的电镜图中无菌丝体结构, 土壤颗粒物中仅有少量具微生物结构特征的球形菌体, 说明这些壁画尚未遭受到病害菌, 尤其是可形成菌丝体真菌的严重侵蚀和破坏。

克隆文库测序比对、系统发生关系和群落分析进一步揭示了霉变与无明显霉变壁画中真菌群落组成和结构特征的差异。霉变壁画文库中序列主要与 NCBI 数据库中白色侧齿霉属和支顶孢属序列相似, 优势病害菌为白色侧齿霉菌 (98.1%), 其与分离自墙壁样品的数据库序列更为相似; 与之不同, 法国拉斯科洞穴史前壁画的优势病害真菌主要为腐皮镰孢霉菌 (*Fusarium solani*)^[4-5]。白色侧齿霉菌曾被归类到白僵菌属 (*Beauveria alba*), 这类真菌广泛存在于土壤、植物残体和室内空气中, 为条件致病性真菌, 也偏好生活在古代壁画或建筑墙面上, 如俄罗斯波洛夫斯科 Pafnutiyev 修道院壁画表面, 白色侧齿霉菌占到分离所获微生物的 90%^[27]; 在捷克斯洛伐克 17 世纪历史建筑体潮湿墙壁上, 也有白色侧齿霉菌活动^[28]; 它也是德国多数壁画上的广谱性病害真菌, 被作为壁画受微生物侵蚀程度的判断指标之一; 对我国嘉峪关魏晋七号墓壁画真菌分析发现, 侧齿霉属占克隆文库序列总数的 23%^[26]。由此可见, 白色侧齿霉菌在壁画的微生物腐蚀过程中可能发挥着至关重要的作用, 其优势程度可作为壁

画受真菌侵蚀等级量化判定的重要指示子。

无明显霉变壁画文库中序列主要与数据库中青霉属、曲霉属、链格孢属、假丝酵母属、毛壳菌属和白色侧齿霉属的序列相似,优势真菌为无绒毛青霉菌(77.4%),它们与分离自海砂、墙壁和根际土的数据库序列更为相似。青霉属和曲霉属真菌在壁画上广泛存在,无论是基于传统分离培养的手段^[11],还是现代分子技术都验证了它们对于壁画表面微生态环境的适应性^[25]。在日本高松冢古坟与Kitora 古坟壁画病害微生物研究中,青霉属、曲霉属、假丝酵母属和支顶孢属均有出现,其中青霉属菌株(*Penicillium paneum*)被认为是引起古坟壁画污染的主要病害菌^[9]。焦磷酸测序技术分析表明,青霉属在埃及图坦卡蒙墓壁画真菌群落组成中占据优势,结合气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)对比分析发现,壁画表面棕色斑点内检测到的苹果酸主要由青霉菌产生^[8]。事实上,青霉属、曲霉属和链格孢属真菌也是我国石窟寺壁画和墓室壁画样品中最常被分离和鉴定的优势病害菌属^[11,20,23]。早有研究指出,在含有羟乙基纤维素的壁画上,如果缺少曲霉属、链格孢属和枝孢属(*Cladosporium*)等真菌产生的纤维素水解酶,诸如出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)等真菌就无法侵染壁画^[29],微生物间相互作用有利于提高其逆境适应能力。因此,尽管本研究中优势菌为青霉菌的壁画样品目前并没有肉眼可见的明显霉变,但是青霉和曲霉等常见真菌作为壁画表面最为普遍的条件致病菌,已成为徐显秀墓壁画潜在的微生物污染源。相比而言,霉变壁画克隆文库中真菌类型少,无明显霉变壁画中真菌多样性较高。这可能与文库构建中霉变壁画样品的PCR 偏好型扩增有一定关系,有研究指出PCR 扩增技术本身存在偏好型,不同引物对于DNA 模板的结合能存在差异^[30],一些优势菌在PCR 扩增中也可能被过量放大,从而影响到后续微生物群落结构的分析。

事实上,真菌的生长也需要适宜的环境条件,

其中温度和相对湿度起到关键作用。霉菌生长的温度范围很广,霉菌繁殖最佳生长温度为25–30 °C,相对湿度达到75%以上即可生长增殖,RH 在95%以上生长更为旺盛。本研究中,墓道下部监测位置温度在–0.3–17.6 °C 之间波动,相对湿度长期在80%–100%之间,7–9 月温度和相对湿度均处于霉菌生长的最佳范围。因该遗址外搭设有临时性彩钢保护棚,其在维持墓室温度、湿度稳定方面起到了重要作用,抑制了墓室环境温度和相对湿度的剧烈波动,并在一定程度上减缓了壁画酥碱、起甲等病害的发生和发展;然而,因墓室为地下式建筑结构,彩钢棚封闭过严又不利于墓室内外的空气交换,形成的高湿度微生境将为壁画微生物的生长和增殖提供有利的环境条件。白色侧齿霉菌是两个文库中的共有真菌类群,其可能来源于空气转运过程中真菌分生孢子在壁画表面的沉降^[31],但也不能排除是墓道壁画内原有土著白色侧齿霉菌在适宜温湿度条件下暴发所致。

针对徐显秀墓当前的微生物病害特点,建议如下:(1) 有必要依据主要病害菌类型,筛选适宜的生物杀灭剂,并开展墓道壁画菌害区域的抢救性防护工作;(2) 对于墓葬遗址保护棚内的环境控制也是主动干预防护中可行的措施,保持壁画附存环境的相对稳定,减少遗址环境空气的人为扰动,以及在天气晴好时适当地自然通风透气均能有效降低壁画微生物病害的发生;(3) 有必要开展壁画本体及其附存环境的长期监测,以期实现墓葬遗址的预防性保护。

致谢:感谢太原北齐壁画博物馆与敦煌研究院文物保护技术服务中心相关工作人员给予本研究的帮助。

参 考 文 献

- [1] Wang XD, Su BM, Chen GQ, et al. The Normative Research for Ancient Wall Paintings Conservation in China[M]. Beijing: Science Press, 2013 (in Chinese)
王旭东, 苏伯民, 陈港泉, 等. 中国古代壁画保护规范研究[M]. 北京: 科学出版社, 2013
- [2] Ciferri O. Microbial degradation of paintings[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 879-885

- [3] Zucconi L, Gagliardi M, Isola D, et al. Biodeterioration agents dwelling in or on the wall paintings of the Holy Saviour's Cave (Vallerano, Italy)[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 70: 40-46
- [4] Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al. The microbiology of Lascaux Cave[J]. Microbiology, 2010, 156(3): 644-652
- [5] Ma X, Mao L, Ma YT, et al. A review on microbial community ecology in prehistoric Lascaux Cave paintings[J]. Dunhuang Research, 2010(6): 115-120 (in Chinese)
马旭, 毛琳, 马燕天, 等. 拉斯科洞穴史前壁画微生物生态学进展[J]. 敦煌研究, 2010(6): 115-120
- [6] Portillo MC, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(3): 681-691
- [7] Ma YT, Wu FS, Ma X, et al. A review on a microbial community in prehistoric Altamira Cave paintings[J]. Dunhuang Research, 2011(6): 115-120 (in Chinese)
马燕天, 武发思, 马旭, 等. 史前洞窟阿尔塔米拉(Altamira Cave)壁画微生物群落研究进展[J]. 敦煌研究, 2011(6): 115-120
- [8] Vasanthakumar A, DeAraujo A, Mazurek J, et al. Microbiological survey for analysis of the brown spots on the walls of the tomb of King Tutankhamun[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 79(4): 56-63
- [9] An KD, Kiyuna T, Kigawa R, et al. The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 96(4): 579-592
- [10] Imperi F, Caneva G, Cancellieri L, et al. The bacterial aetiology of rosy discoloration of ancient wall paintings[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(11): 2894-2902
- [11] Feng QP, Ma XJ, Zhang XJ, et al. Studies on microbial factor on color change of Dunhuang mural I. Classification of microbes on color changed mural and property of some typical species[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1998, 38(1): 52-56 (in Chinese)
冯清平, 马晓军, 张晓君, 等. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究 I. 色变壁画的微生物类群及优势菌的检测[J]. 微生物学报, 1998, 38(1): 52-56
- [12] Wu FS, Wang WF, Ma YT, et al. Community structures of bacterial colonies on wall paintings in Cave 98 at Mogao Grottoes, Dunhuang[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1599-1608 (in Chinese)
武发思, 汪万福, 马燕天, 等. 敦煌莫高窟第98窟壁画表面菌斑的群落结构分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1599-1608
- [13] Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Porca E, et al. The biogeochemical role of *Actinobacteria* in Altamira Cave, Spain[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 81(1): 281-290
- [14] Heyrman J, Swings J. 16S rDNA sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb (Necropolis of carmona, Seville, Spain)[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2001, 24(3): 417-422
- [15] Diaz-Herraz M, Jurado V, Cuezva S, et al. Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order *Rhizobiales*[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 3610
- [16] Bastian F, Alabouvette C, Jurado V, et al. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave[J]. Naturwissenschaften, 2009, 96(7): 863-868
- [17] Martin-Sanchez PM, Nováková A, Bastian F, et al. Use of Biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux Cave in France[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(7): 3762-3770
- [18] Drahl C. For cave's art, an uncertain future[J]. Chemical & Engineering News, 2011, 89(43): 38-40
- [19] Zheng GY, Ma QL. Microorganisms identification and bacterial study on wall paintings of humid subterranean tombs at Jiuquan and Jiayuguan in Gansu province[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 1996, 8(1): 43-50 (in Chinese)
郑国钰, 马清林. 甘肃酒泉、嘉峪关壁画霉菌菌分离鉴定与防治研究[J]. 文物保护与考古科学, 1996, 8(1): 43-50
- [20] Chen HG, Jia XC. The isolation and identification of mould from mildewed murals of tomb of Han in Mixian[J]. Dunhuang Research, 1996(3): 145-148 (in Chinese)
陈红歌, 贾新成. 密县汉墓霉变壁画霉菌的分离鉴定[J]. 敦煌研究, 1996(3): 145-148
- [21] Zhang H, Jing Y, Chao K, et al. The separation and identification of moulds in tomb frescos[J]. Journal of Gansu Sciences, 1998, 10(2): 60-64 (in Chinese)
张慧, 敬言, 晁开, 等. 墓葬壁画霉菌的分离与鉴定[J]. 甘肃科学学报, 1998, 10(2): 60-64
- [22] Guo AL, Shan W, Yang WZ. Identification of microbial population on the excavated fresco from Nanliwang village Chang An county Shaanxi Province[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 1997, 9(1): 39-43 (in Chinese)
郭爱莲, 单晔, 杨文宗. 陕西长安南礼王村出土壁画的微生物类群鉴定[J]. 文物保护与考古科学, 1997, 9(1): 39-43
- [23] Zhao FY, Yan SM, Li H. Research into the moulds that have appeared on the Western Han mural in Cuizhuyuan, Qujiang, Xi'an[J]. Wenbo, 2010(5): 82-84 (in Chinese)
赵凤燕, 严淑梅, 李华. 西安曲江翠竹园西汉壁画霉菌菌分析研究[J]. 文博, 2010(5): 82-84
- [24] Ge QY, Li ZM, Sun YZ, et al. Application of molecular biological techniques in identifying pathogenic microbes on mural paintings[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 2012, 24(2): 14-21 (in Chinese)
葛琴雅, 李哲敏, 孙延忠, 等. 壁画菌害主要种群之分子生物学技术检测[J]. 文物保护与考古科学, 2012, 24(2): 14-21
- [25] Wu FS, Wang WF, He DP, et al. Molecular techniques used to analyze the bacterial groups on mural paintings in Wei and Jin Dynasty tombs, Jiayuguan[J]. Dunhuang Research, 2011(6): 51-58 (in Chinese)
武发思, 汪万福, 贺东鹏, 等. 嘉峪关魏晋墓腐蚀壁画细菌类群的分子生物学检测[J]. 敦煌研究, 2011(6): 51-58
- [26] Wu FS, Wang WF, He DP, et al. The fungal community composition on mural paintings in tomb of Wei and Jin Dynasty, Jiayuguan[J]. Dunhuang Research, 2013(1): 60-66 (in Chinese)
武发思, 汪万福, 贺东鹏, 等. 嘉峪关魏晋墓腐蚀壁画真菌群落组成分析[J]. 敦煌研究, 2013(1): 60-66
- [27] Karpovich-Tate N, Rebrikova NL. Microbial communities on damaged frescoes and building materials in the Cathedral of the nativity of the virgin in the Pafnutii-Borovskii monastery, Russia[J]. International Biodeterioration, 1991, 27(3): 281-296
- [28] Šimonovičová A, Gódyová M, Kunert J. *Engyodontium album*, a new species of microscopic fungi for Slovakia and its keratinolytic activity[J]. Biologia, Bratislava, 2004, 59(1): 17-18
- [29] Winters H, Isquith IR, Goll M. A study of the ecological succession in biodeterioration of a vinyl acrylic paint film[J]. Developments in Industrial Microbiology, 1976, 17: 167-171
- [30] Polz MF, Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3724-3730
- [31] Nugari MP, Realini M, Roccardi A. Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores[J]. Aerobiologia, 1993, 9(2/3): 131-139