

研究报告

墓室酥碱砖壁画及其环境的真菌多样性分析

马文霞^{1Δ} 武发思^{1,2,3Δ} 田恬¹ 马燕天¹ 向婷¹ 刘贤德¹ 汪万福^{1,2,3} 冯虎元^{1*}

(1. 兰州大学细胞活动与逆境适应教育部重点实验室 甘肃 兰州 730000)

(2. 敦煌研究院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)

(3. 古代壁画保护国家文物局重点科研基地 甘肃 敦煌 736200)

摘要: 【背景】酥碱是威胁古代墓室砖壁画保存的主要病害之一,水分和盐分共同作用下壁画产生酥碱病害,而其中真菌类群、来源及耐盐性鲜有报道。【目的】比较敦煌汉墓、晋墓和嘉峪关五号墓内砖壁画酥碱样品及其赋存环境空气中可培养真菌的群落组成、多样性及耐盐性,为砖壁画的防护提供理论依据。【方法】运用扫描电镜观察酥碱样品微观形貌,并结合能谱、X射线衍射进行成分分析;对样品培养、分离、纯化获得真菌纯菌株,运用形态和分子生物学技术鉴定种属;利用梯度含盐培养基研究菌株的耐盐性。【结果】墓室酥碱样品及环境空气中青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)和枝孢属(*Cladosporium*)丰度较高,为优势属;其他菌属包括镰孢菌属(*Fusarium*)和毛壳菌属(*Chaetomium*)为稀有属。三座墓室砖壁画酥碱中均存在烟曲霉(*A. fumigatus*)、花斑曲霉(*A. versicolor*)以及黄灰青霉(*P. aurantiogriseum*);酥碱样品与墓室内外空气中分离获得的真菌类群间有一定相似性。多数菌株可在含15% NaCl的培养基上生长,一株产黄青霉(*P. chrysogenum*)甚至可在30%盐浓度条件下生长。【结论】青霉属和曲霉属为墓室共有优势菌,多数菌株有较强的耐盐性。

关键词: 地下墓葬, 砖壁画, 真菌, 多样性, 耐盐性

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31500430, 31560160); “Light of West China” Program of Talent Training and Introduction of Chinese Academy of Sciences (18JR3RA004); Science and Technology Plan of Gansu Province (1604WKCA003); Project of Gansu Cultural Relics Bureau (GWJ2014003)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-931-8912537; E-mail: fenghy@lzu.edu.cn

Received: November 18, 2017; Accepted: June 06, 2018; Published online (www.cnki.net): July 31, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31500430, 31560160); 中国科学院“西部之光”人才培养引进计划(18JR3RA004); 甘肃省科技计划项目(1604WKCA003); 甘肃省文物局课题(GWJ2014003)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 86-931-8912537; E-mail: fenghy@lzu.edu.cn

收稿日期: 2017-11-18; 接受日期: 2018-06-06; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-07-31

Fungal diversity of brick murals with salt efflorescence and their surroundings in different ancient tombs

MA Wen-Xia^{1Δ} WU Fa-Si^{1,2,3Δ} TIAN Tian¹ MA Yan-Tian¹ XIANG Ting¹ LIU Xian-De¹
WANG Wan-Fu^{1,2,3} FENG Hu-Yuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations of Ministry of Education, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

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

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

Abstract: [Background] Salt Efflorescence is one of the major diseases caused by combined action of humidity and salt which threatened the preservation of ancient wall paintings, but the fields like composition of fungi, its origin and salt tolerance have seldom been reported. [Objective] This study aimed at exploring the community difference of culturable fungi that isolated from brick murals with salt efflorescence disease and their surroundings in tombs, including Dunhuang Han dynasty tomb, Dunhuang Jin dynasty tomb, and Jiayuguan No. 5 tomb, meanwhile, it has purpose to explore the halotolerant ability of the isolated fungal strains in order to provide theoretical basis for better conservation of the brick-tomb wall paintings. [Methods] The surface morphology and crystal phase of samples were analyzed by scanning electron microscope combined with energy dispersive spectrometer (SEM-EDS) and X-ray diffraction (XRD). The culture-dependent method was employed to isolate fungal strains, and to combine with molecular techniques for identification, the community composition and structure characteristics of fungi were identified thereafter. Halotolerancy of all the isolated strains were determined by salt-gradient culture medium method. [Results] The dominant genera of the cultivated fungal genus were *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, and the other groups including *Fusarium* and *Chaetomium* were rarely isolated. All of the salt efflorescence samples have some common species, such as *A. versicolor*, *P. Aurantiogriseum* and *A. fumigatus*. The community compositions of fungi isolated from the efflorescence samples were similar with their surrounding airborne samples. Most of the isolated strains could grow on culture medium containing 15% sodium chloride, a strain of *P. chrysogenum* do have their growth even in the 30% salt concentration. [Conclusion] *Pencillium* and *Aspergillus* were dominated in different ancient tombs, most of the fungal strains most of the strains have relatively strong capacity of salt tolerance.

Keywords: Tomb, Brick paintings, Fungi, Diversity, Halotolerant

人类在长期的历史发展中遗留下了大量的文物，这些文物是历史考证和考古研究的重要资料，具有极其重要的研究价值^[1]。墓室砖壁画作为一种常见的文物类型，通常绘制在墓室的四壁、顶部和甬道，是记载和传承历史的重要载体^[2]。然而，这些墓室砖壁画目前面临着很多威胁，真菌等微生物可在各类材料表面生长或起降解作用，从而造成这些壁画的劣化^[3-4]。在世界各地的研究中，壁画微生物的分布均非常普遍，这些微生物的代谢活动可对

壁画美学和结构造成破坏^[4-5]。在包括法国拉斯科史前洞穴、西班牙阿尔塔米拉洞穴以及日本高松冢古坟等多处遗址地壁画表面均暴发过极其严重的真菌病害^[6-8]；国内包括敦煌莫高窟、太原北齐徐显秀墓和嘉峪关魏晋墓在内的壁画也同样发生过真菌病害问题^[9-11]，而针对这些病害的研究均是通过对比壁画真菌多样性分析和病害机理开展的。因此，真菌多样性分析可以为壁画病害的研究提供更加直观、全面的信息，并为墓室砖壁画防护提供理论依据^[12-13]。长

期以来,在针对壁画微生物种类鉴定研究中,分离培养技术的应用最为普遍,该方法的优势之一是可对所获菌株的生物学特性进行全面研究^[14-15]。

墓室砖壁画常见病害有色变、酥碱、起甲、颜料层脱落和生物侵蚀^[16-17]。其中酥碱病害素有“壁画癌症”之称,在水分作用下,潮湿环境造成壁画地仗中大量的氯化钠迁移和聚积,受温度、相对湿度的影响,盐分溶解-结晶的往复循环中其结晶导致材料结构松散形成酥碱^[18-19]。近年来,砖石质历史建筑病害盐霜(酥碱)内嗜盐微生物的数量、群落组成、渗透压适应能力及其生长活动对于材料的损害机制等方面逐渐引起微生物学家和文物保护工作者的关注^[20-22]。研究发现,酥碱中的大量盐分可对微生物多样性造成明显的影响,嗜盐性和耐盐性微生物更适应这种特殊环境^[22]。毋庸置疑,水分和盐分活动是导致壁画酥碱病害形成的主要环境因子,但在水分不断活动的过程中,酥碱壁画中微生物的“角色”和作用尚未被关注和解答。

另外,墓室病害真菌的多样性也会受到其赋存环境的影响^[23],有研究表明,空气中真菌浓度与温度呈正相关,并且子囊菌(*Ascomycetes*)和担子菌(*Bssidiomycetes*)的孢子浓度会随着湿度的增加而增加^[24]。在不同的洞窟或洞穴中,由于文物所处环境不同,其内部微生物群落组成的差异也会较大^[25]。此外,由于大量游客参观而造成文物所处微环境发生改变,其内部空气微生物浓度及群落的变化也已引起了文物保护工作者的高度关注^[26]。

截至目前,国内对于墓室这种特殊环境中砖壁画真菌多样性的研究还较少^[10],对于酥碱砖壁画及其保存环境中真菌的调查还尚未开展。本研究利用传统培养结合扫描电子显微镜-能谱仪(*Scanning electron microscope combined with energy dispersive spectrometer*, SEM-EDS)和 X 射线衍射(*X-ray diffraction*, XRD)等方法对“世界最大的地下画廊”——佛爷沟西晋画像砖墓(西晋墓和汉墓)和嘉峪关魏晋壁画墓(五号墓)内酥碱砖壁画的真菌进行了检测,以期比较分析不同墓室赋存环境空气中真

菌群落组成的异同,以及不同墓室酥碱砖壁画真菌类群组成的异同,同时探究酥碱壁画环境中真菌菌株的耐盐特性,研究结果将为酥碱壁画中是否存在共有真菌类群的活动提供直接证据,促进墓室砖壁画的科学保护。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样点简介

敦煌西晋墓和敦煌汉墓均位于距离敦煌市约 6 km 的戈壁之中,东西比邻。嘉峪关魏晋五号墓原址位于甘肃省嘉峪关市新城乡,后整体搬迁至甘肃省博物馆进行异地复原保护。三座墓葬内均有题材丰富的砖壁画(图 1A-C),具有重要的考古价值。前期现状调查发现三座墓室砖壁画存在酥碱、颜料层脱落、霉变等病害,尤其是酥碱问题严重(图 1D-F),不利于保护^[27-28]。

1.1.2 样品采集

研究材料于 2014 年 10 月采集自敦煌西晋墓、敦煌汉墓以及甘肃省博物馆馆藏的嘉峪关五号墓。其中砖壁画酥碱样品采用无菌手术刀采集,分别在酥碱和无明显酥碱部位轻轻刮取表层粉末样品。为了保护壁画,采样过程必须避免伤及壁画颜料层。采集到的样品放入 2 mL 无菌 Eppendorf 管中,收集后带回实验室,部分样品用于 SEM-EDS 和 XRD 分析,部分用于培养纯化、菌株鉴定。空气样品采用国际通用 Buck Bio-Culture™ Sampler 采样器进行采集,分别使用马铃薯葡萄糖琼脂 PDA、孟加拉红、察氏、麦芽汁 4 种培养基平板取样;30 L/min 条件下采样 5 min 后带回实验室培养;每组样品 3 个重复,每次采样完成后用 75% 的酒精棉对采样器及采样工具进行消毒。使用温湿度监测仪记录采样月份平均温湿度。

1.1.3 培养基、主要试剂和仪器

马铃薯葡萄糖琼脂 PDA、马铃薯葡萄糖肉汤 PDB、孟加拉红、察氏和麦芽汁培养基, BD Difco 公司; DNA 提取试剂盒, Omega 公司; *Taq* 聚合酶和 dNTPs, 天根生化科技(北京)有限公司。恒温培



图 1 三座墓室砖壁画及其酥碱病害

Figure 1 Brick murals and salt efflorescence disease at three tombs

注：A、D 分别为嘉峪关五号墓完整砖壁画和酥碱病害砖壁画；B、E 分别为敦煌西晋墓完整砖壁画和酥碱病害砖壁画；C、F 分别为敦煌汉墓完整砖壁画和酥碱病害砖壁画。

Note: A and D are brick paintings intact and salt efflorescence damaged respectively in Jiayuguan No. 5 tomb; B and E are brick paintings intact and salt efflorescence damaged respectively in No. 5 tomb Dunhuang Jin tomb; C and F are brick paintings intact and salt efflorescence damaged respectively in Dunhuang Han tomb.

养箱，上海一恒科学仪器有限公司；PCR 仪，艾本德公司；琼脂糖凝胶电泳仪，北京六一生物科技有限公司；扫描电镜(SEM)，FEI 公司；能谱仪(EDS)，牛津仪器公司；X 射线衍射分析仪(XRD)，理学株式会社。

1.2 方法

1.2.1 扫描电镜-能谱(SEM-EDS)分析

用无菌手术刀将砖壁画样品切成 1 mm×5 mm×5 mm 小块，在无菌状态下干燥 2-3 h。使用导电胶将样品固定在样品台上，利用离子溅射

仪表面喷金 90 s 增强其导电率，SEM 结合 EDS 观察样品表面微观形态并分析其元素组成。

1.2.2 样品晶体类型 X 射线衍射(XRD)分析

使用玛瑙研钵手动研碎样品，制得平滑均匀 300 目左右的粉末样品。把研磨好的样品粉末均匀洒入样品框中并压平，进行 XRD 分析，结合 EDS 元素分析结果得出晶体类型。

1.2.3 菌种分离与计数

(1) 真菌培养：将 20 mg 酥碱砖壁画样品放入

50 mL 磷酸缓冲液中混匀, 之后均匀涂布于马铃薯葡萄糖琼脂 PDA、察氏、孟加拉红和麦芽汁培养基上, 每组样品 3 个重复。将空气样品平板和涂布平板均置于 25 °C 培养箱中培养 3–20 d 后进行下一步实验。

(2) 真菌的计数: 培养 20 d 后进行菌落 CFU 计数, 根据公式计算出相应样品中真菌的浓度。空气样品和砖壁画酥碱样品计算公式如下:

$$C = \frac{1000 \times T}{t \times F} \quad (1)$$

公式(1)中: C 表示空气中可培养真菌浓度(CFU/m³), T 表示平板上有效菌落数(CFU), t 表示采样时间(min), F 表示空气流量(L/min)。

$$C = \frac{T}{A \times B} \quad (2)$$

公式(2)中: C 表示壁画样品中可培养真菌浓度(CFU/g), T 表示平板上有效菌落数(CFU), A 表示样品稀释浓度(g/mL), B 表示涂布平板时的用量(mL)。

(3) 真菌基因组 DNA 提取和 ITS 区段的 PCR 扩增: 选用真菌培养最常用的马铃薯葡萄糖琼脂 PDA 培养基对不同形态的菌落进行分离纯化, 并用甘油冻存管保存菌种。取纯化后菌体约 0.5 g, 放入 1.5 mL 无菌离心管中, 液氮冷冻后研磨备用。选用 HP Fungal DNA Kit 提取上述菌体基因组 DNA。以纯化后的 DNA 为扩增模板, 使用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增 ITS 区段。PCR 反应体系(25 μL): 10×Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, *Taq* 聚合酶 1 U, dNTPs 0.2 mmol/L, 引物 0.2 mmol/L, DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件: 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% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小与特异性。

(4) 测序及序列提交: 将菌株的 PCR 产物送交上海美吉生物医药科技有限公司进行测序, 所测得的序列使用 CExpress 软件和 Sequin 软件编辑后全部提交至 GenBank 数据库, 获得登录号。

(5) 序列比对及系统发育树构建: 将所得序列

利用 BLAST 在 GenBank 中进行比对搜索, 得到相似性最高的参考序列, 通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

(6) 群落结构分析: 统计在系统发育树中相同种属序列的数量, 计算其所占百分比, 完成三座墓室酥碱砖壁画真菌类群分析。

1.2.4 菌株耐盐性研究

选取不同类型样品中丰度高于 5% 的 15 株真菌菌株, 定量接入到 NaCl 浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%、30% (质量体积比) 的马铃薯葡萄糖肉汤 PDB 培养基中, 25 °C、150 r/min 培养 10 d, 滤出菌体置于 65 °C 烘干至恒重后称量菌体重量, 以菌株生长情况评价其耐盐性。

1.3 数据统计与分析

实验所获得的可培养真菌浓度(CFU/m³)平均值和标准误的统计分析采用 SPSS 16.0 完成, 可培养真菌在属和种水平上的相对丰度使用 Excel 2016 计算分析, 真菌群落组成图表用 Origin 8.0 绘制。

2 结果与分析

2.1 砖壁画样品的扫描电镜-能谱(SEM-EDS)分析

电镜观察结果(图 2)显示, 无酥碱部位样品中有大量结晶状物质(图 2A–C); 酥碱样品内有较多菌丝状物质, 其中在魏晋五号墓酥碱中成团出现(图 2D), 在敦煌汉墓酥碱中发现长约 10.0 μm、宽约 0.2 μm 的单独菌丝状物质, 且表面有绒状突起(图 2E), 敦煌西晋墓酥碱样品中也有成团菌丝状物质, 并有毛刺状的形态(图 2F)。SEM-EDS 分析同时确定了有菌丝与无菌丝部位基质成分的元素组成相差较大。汉墓酥碱样品中菌丝状物质(图 2G)含量最多的元素为 C 和 O 元素, 而无明显菌丝状物质部位(图 2H)的 C 元素含量很低, O 和 Ca 元素含量高。西晋墓酥碱样品(图 2F)中菌丝状物质(图 2I)部分所含 C 元素高, 而在非菌丝状物质部位(图 2J)并未检测到 C 元素。这说明视野中可见的菌丝状物质确为有机生命体, 即为菌丝体, 这一结果证明了壁画酥碱样品内确有微生物存在。

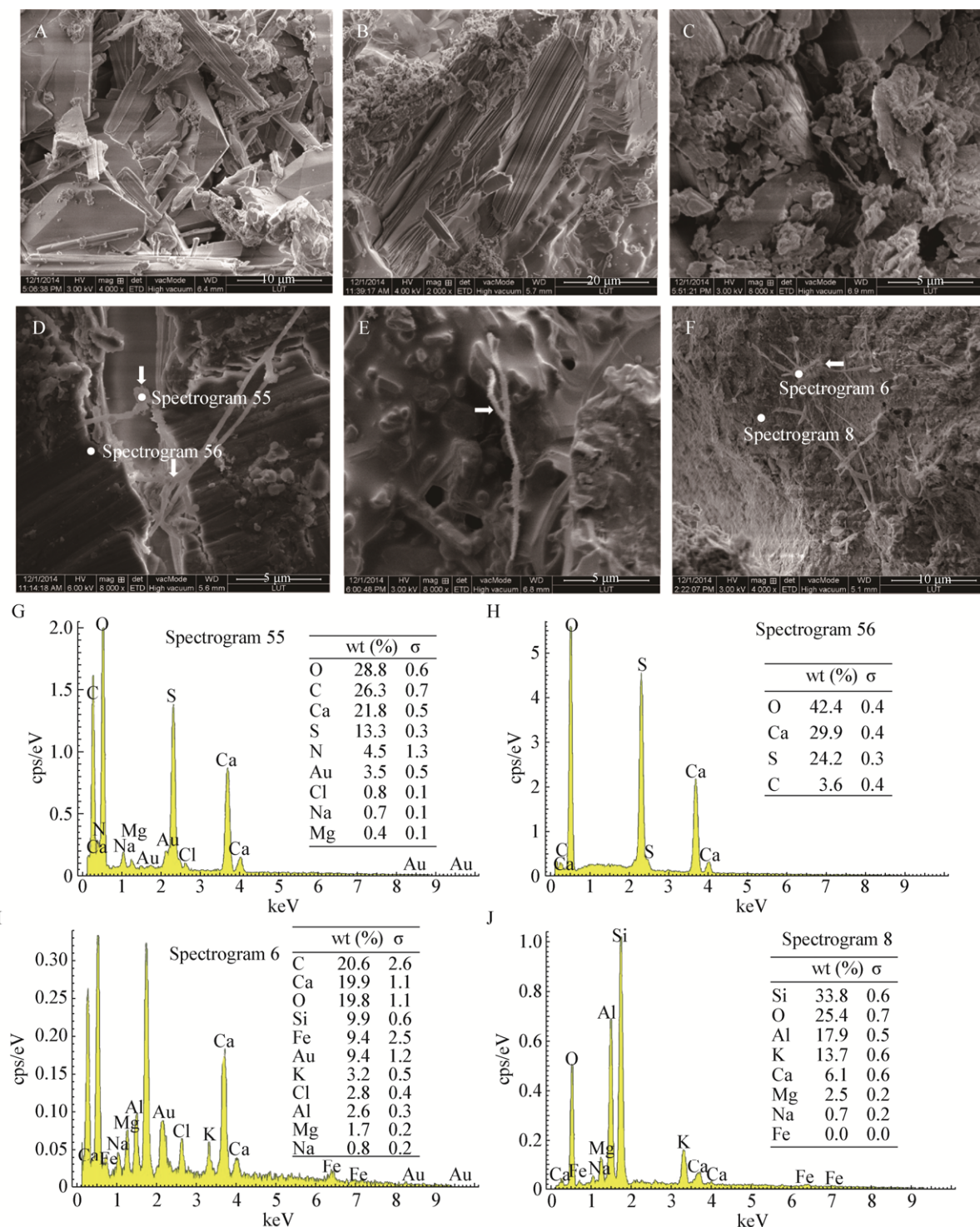


图2 不同类型样品 SEM-EDS 分析图

Figure 2 The SEM and EDS analysis of different samples

注：A、B、C 分别为五号墓、汉墓、西晋墓没有酥碱病害的正常壁画样品；D、E、F 分别为五号墓、汉墓、西晋墓酥碱样品；G、H 分别为 D 图中所示菌丝及非菌丝部位元素组成；I、J 分别为 F 图中所示菌丝及非菌丝部位元素组成。

Note: A, B and C were normal mural samples without salt efflorescence disease in No. 5 tomb, Han tomb and Jin tomb; D, E and F were salt efflorescence in No. 5 tomb, Han tomb and Jin tomb; G and H were EDS analysis of hypha and non-hyphal part pointed in figure 2D; I and J were EDS analysis of hypha and non-hyphal part pointed in figure 2F.

2.2 砖壁画酥碱样品晶体类型分析

SEM 分析发现, 汉墓酥碱样品中(图 3A)有大量长条柱状晶体结构。EDS 能谱分析显示(图 3B)其主要元素为 Cl (55.3%)和 Na (38.5%), 结合 XRD 确定其为 NaCl 晶体(图 3C)。说明酥碱样品内属于一个高盐环境, 由此推测酥碱样品中分离的真菌菌株应具有一定的耐盐性。

2.3 砖壁画内真菌物种多样性分析

2.3.1 可培养真菌菌株菌落形态

部分菌落纯化培养后的形态如图 4 所示。通过形态观察, 根据菌落形状、颜色、表面有无褶皱、有无分泌物、有无明显的毛状或絮状的气生菌丝、菌落是否有同心环纹等特征将菌株大致做初步归类并计数。

2.3.2 三座墓室可培养真菌浓度

魏晋五号墓、汉墓和西晋墓内空气中真菌浓度分别为 686.67 ± 9.76 、 35.56 ± 1.96 和 18.75 ± 0.38 CFU/m³。甘肃省博物馆外和敦煌戈壁滩空气中真菌浓度分别为 420.00 ± 6.53 CFU/m³ 和 19.59 ± 0.34 CFU/m³。馆藏五号墓酥碱样品中真菌浓度为 $16\,262.98 \pm 3\,552.74$ CFU/g, 汉墓和西晋墓酥碱中真菌浓度分别为 $1\,671.01 \pm 150.64$ CFU/g 和 675.00 ± 98.83 CFU/g。

2.3.3 三座墓室内主要真菌类群

提取真菌菌株基因组 DNA 扩增其 ITS 区段, 将扩增产物纯化后进行测序, 在线完成嵌合体检测后提交至 NCBI 数据库(序列号 KY944985–KY945044),

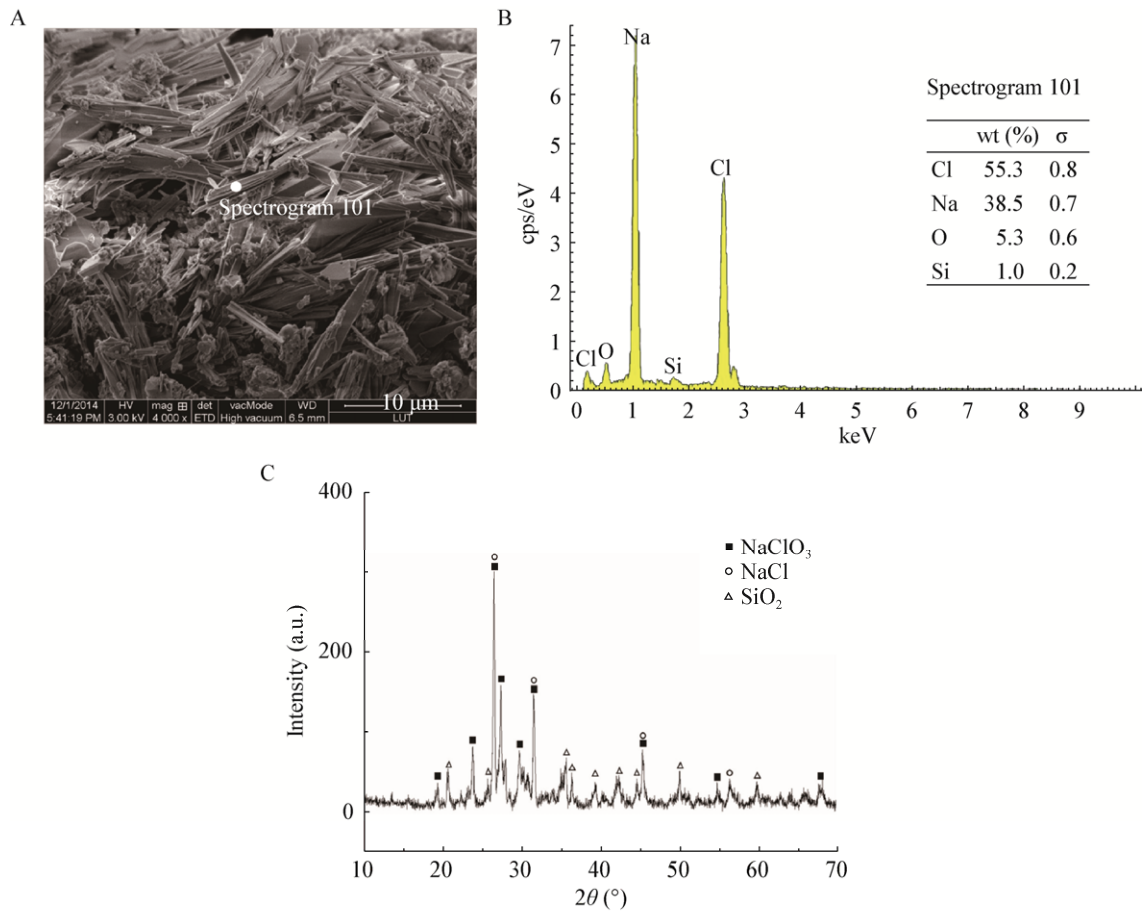


图 3 敦煌汉墓砖壁画酥碱样品形貌及成分分析图

Figure 3 Morphology and composition of Han tomb's salt efflorescence mural samples in Dunhuang

注: A、B、C 分别代表样品 SEM 图、EDS 图及 XRD 分析图。

Note: A, B and C represent SEM image, EDS analysis image, and XRD analysis image respectively.

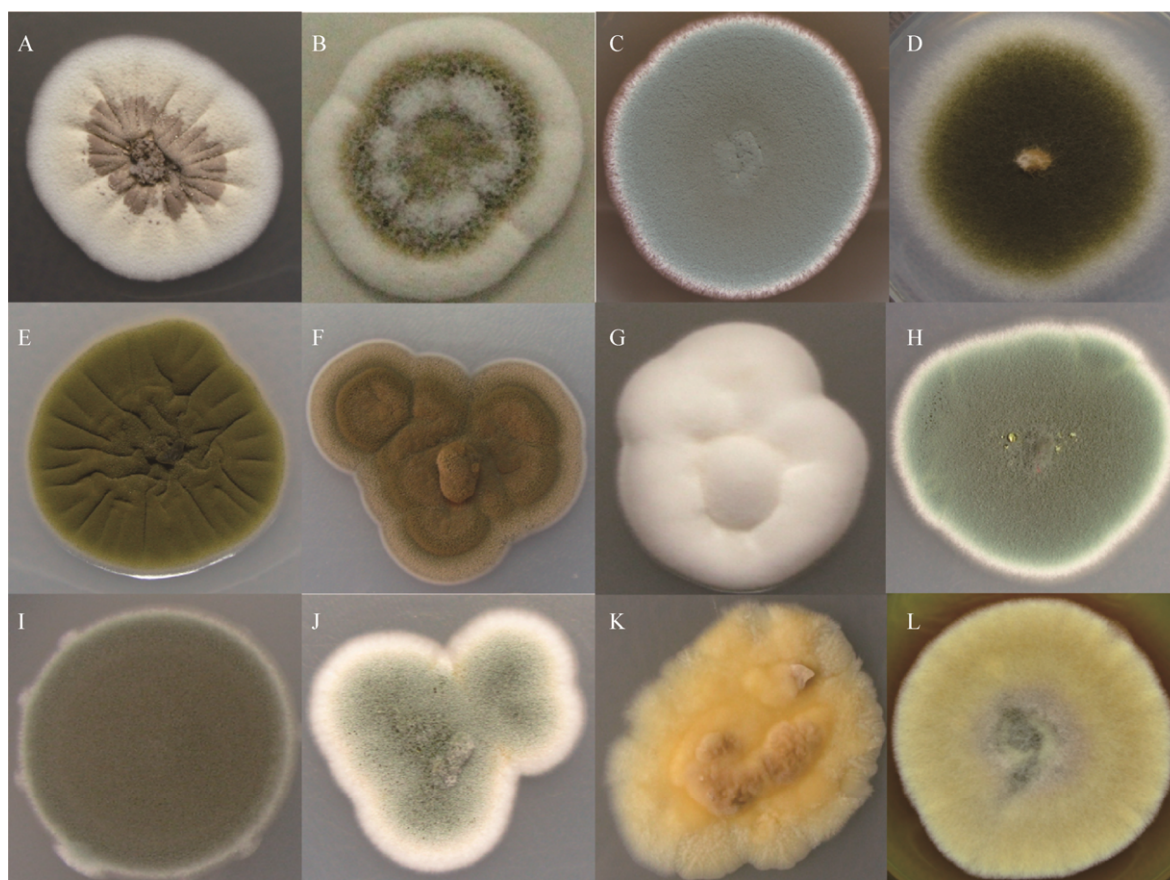


图4 真菌单菌落形态

Figure 4 The single fungal colony morphology

注: A: 顶孢霉菌; B: 黄曲霉; C: 黄灰青霉; D: 构巢曲霉; E: 芽枝状枝孢霉; F: 球孢枝孢; G: 共附生白色侧齿霉菌; H: 产黄青霉; I: 奥尔森青霉; J: 波兰青霉; K: 多产酵母; L: 膨胀匐柄霉。

Note: A: *Acremonium hansfordii*; B: *Aspergillus flavus*; C: *Penicillium aurantiogriseum*; D: *Aspergillus nidulans*; E: *Cladosporium cladosporioides*; F: *Cladosporium sphaerospermum*; G: *Engyodontium album*; H: *Penicillium chrysogenum*; I: *Penicillium olsonii*; J: *Penicillium polonicum*; K: *Pseudozyma prolifica*; L: *Stemphylium vesicarium*.

之后选择经 BLAST 比对后的代表性序列与 NCBI 数据库中相似程度最高的序列比对分析,并构建系统发育树。由图 5 可以看出,三座墓室分离得到的可培养真菌分属于子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)中 12 个属。

2.3.4 三座墓室酥碱砖壁画及其保存环境空气中真菌类群

经鉴定本次分离纯化所得的 106 株真菌隶属于真菌的 35 个种(图 6)。其中汉墓酥碱样品中分离得到 12 种,奥桑青霉菌(*Penicillium olsonii*)相对丰度最高(42.08%);汉墓空气样品中分离得到 7 种,

其中产黄青霉菌(*P. chrysogenum*)和极细枝孢霉(*Cladosporium tenuissimum*)丰度较高,均为 26.30%。西晋墓酥碱样品中分离得到 11 种,其中多产酵母菌(*Pseudozyma prolifica*)相对丰度高达 29.08%;西晋墓内空气中可培养真菌种类较少,此次采样仅分离得到 2 种。位于敦煌的两座墓室地理位置比邻,两座墓葬外空气样品分离得到 3 种真菌,其中瓜枝孢霉(*C. cucumerinum*)相对丰度最高,为 66.67%。魏晋五号墓酥碱样品中分离得到 13 种真菌,其中花斑曲霉(*Aspergillus versicolor*)相对丰度为 27.21%;墓室内空气样品中分离得到真菌 12 种,产黄青霉

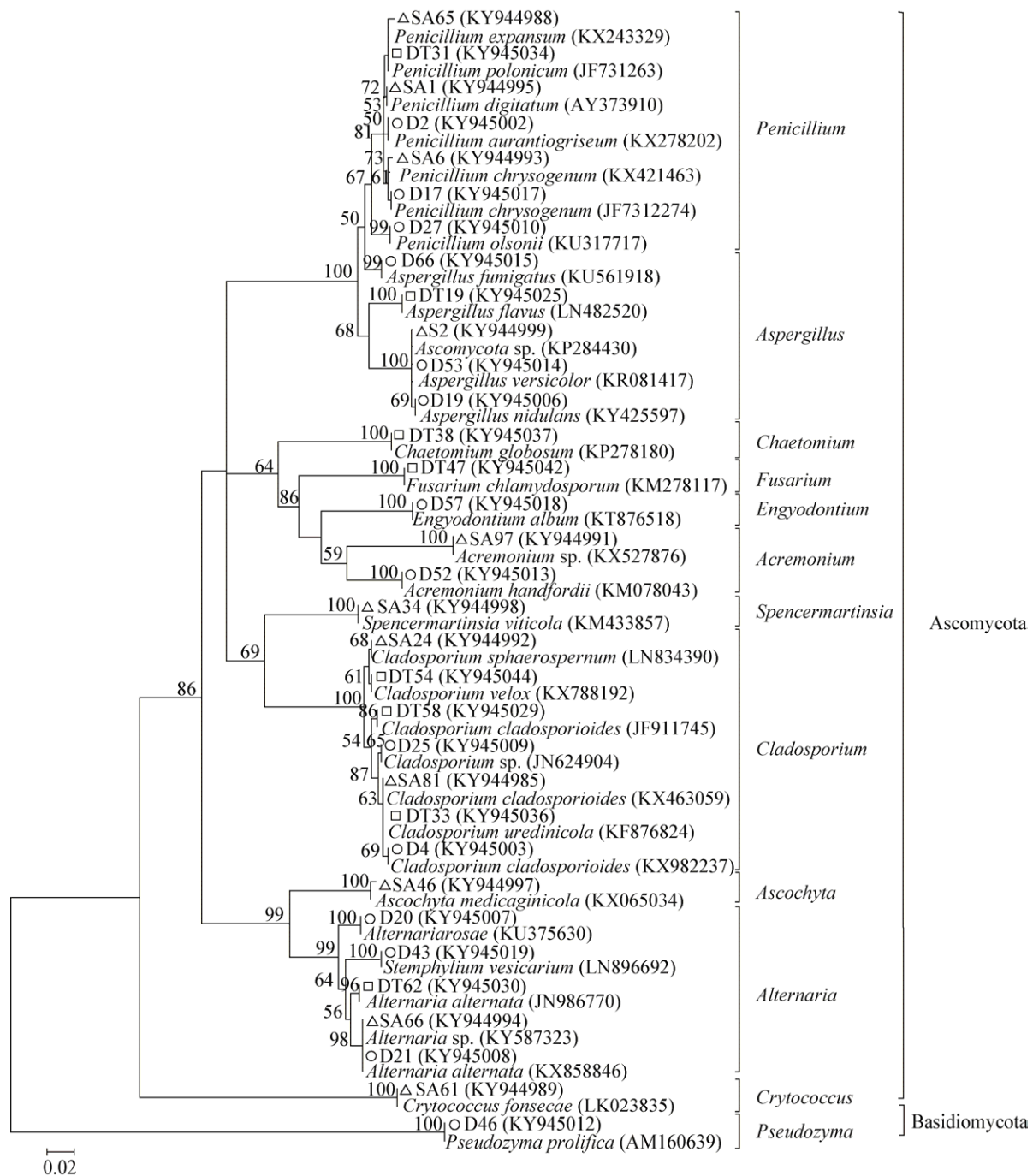


图5 砖壁画内分离真菌系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of fungi isolated from brick murals

注: Δ 代表菌株来源于五号墓样品; \square 代表菌株来源于西晋墓样品; \circ 代表菌株来源于汉墓样品. 邻接系统发育树是基于所获菌株的 ITS 序列及其相似的已鉴定参考序列构建. 分支上的数字代表 1 000 次重复后自展值; 本研究所获序列在 GenBank 的序列号为 KY944985–KY945044.

Note: Δ represent fungal strains isolated from No. 5 tomb; \square represent strains isolated from Xijin tomb; \circ represent strains isolated from Han tomb; Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial ITS gene sequences of all identified fungi and referenced sequences; Numbers above branches denote bootstrap values from 1 000 replicates; Sequences obtained in the present study are labeled with the GenBank database accession number (KY944985–KY945044).

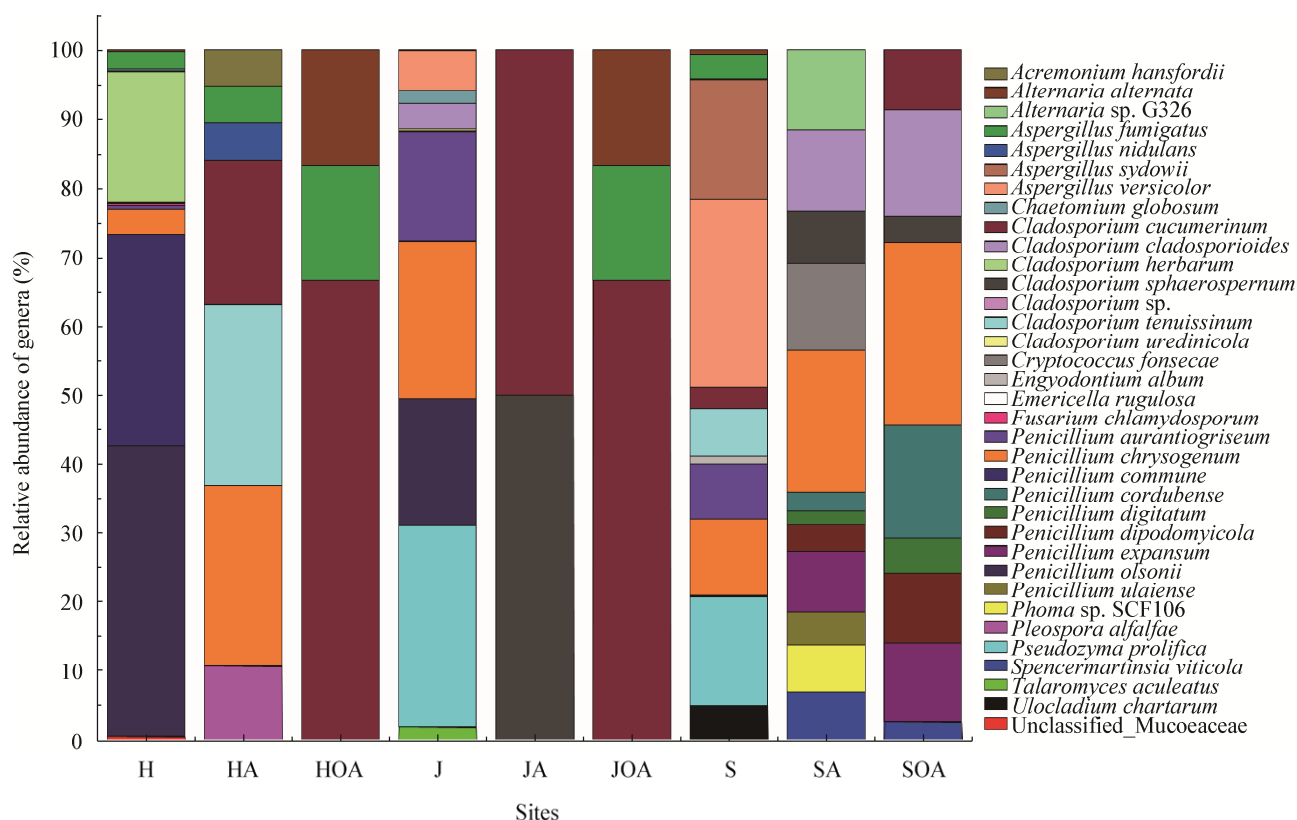


图6 三座墓室内酥碱病害及内外环境空气中真菌群落组成百分比

Figure 6 Fungal community composition and their abundance among the salt efflorescence and airborne samples inside and outside the three tombs

注: H、HA、HOA 分别代表汉墓酥碱壁画样品和墓室内及外环境空气样品; J、JA、JOA 分别代表西晋墓酥碱壁画样品和墓室内及外空气样品; S、SA、SOA 分别代表五号墓酥碱壁画和墓室内、外空气样品。

Note: H, HA and HOA represents the salt efflorescence mural samples, airborne samples inside and outside Han tomb chamber respectively; J, JA and JOA represents the efflorescence mural samples, airborne samples inside and outside Xijin tomb chamber respectively; S, SA and SOA represents the salt efflorescence mural samples, airborne samples inside and outside No. 5 tomb chamber respectively.

占 20.39%; 外环境空气中分离到 9 种真菌, 产黄青霉占 26.59%。对比汉墓、西晋墓及五号墓酥碱样品中真菌可知, 花斑曲霉菌、黄灰青霉(*P. aurantiogriseum*)和烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)为共有类群。

2.4 可培养真菌耐盐性研究

丰度高于 5% 的 15 株真菌, 大多数在 NaCl 浓度为 5%、10% 条件下生长状况良好(表 1)。随着 NaCl 浓度升高, 菌株的生长增殖受到影响, 但多数菌株在 15% 的浓度下仍可生长, 而顶孢霉菌(*Acremonium hansfordii*)在此浓度下不再生长, 说明其耐盐性较差。在 NaCl 浓度为 20% 的情况下, 仍有一半以上

的菌株可生长, 但是真菌生物量有明显下降, 说明生长趋势相比低浓度时降低。当 NaCl 浓度为 25% 时, 分离自西晋墓酥碱样品中的构巢曲霉(*A. nidulans*)、产黄青霉、变色曲霉(*A. versicolor*), 分离自汉墓样品中的团青霉(*P. commune*)、蜡叶芽枝孢霉(*C. herbarum*), 以及分离自五号墓的互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)仍有继续生长的能力, 说明这些菌株均具有较强的耐盐性。当 NaCl 浓度上升至 30% 时, 仅有产黄青霉可生长, 该浓度的 NaCl 溶液已基本达到饱和状态(30 °C 时 NaCl 的饱和浓度为 36%), 说明分离自酥碱壁画中的产黄青霉菌株有极强的耐盐性。

表 1 可培养真菌在不同盐环境下的生长趋势
Table 1 The growth trend of cultivable fungi in the different salt environment

菌株 Strains	盐浓度梯度 Salinity gradient (%)							
	0	5	10	15	20	25	30	35
<i>Acremonium hansfordii</i>	***	*	*	—	—	—	—	—
<i>Alternaria alternata</i>	*****	*****	***	**	**	*	—	—
<i>Aspergillus fumigatus</i>	****	***	**	*	—	—	—	—
<i>A. nidulans</i>	****	*****	*****	***	**	*	—	—
<i>A. sydowii</i>	***	**	**	*	—	—	—	—
<i>Aspergillus versicolor</i>	****	***	**	***	**	*	—	—
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	****	*****	*****	**	*	—	—	—
<i>C. herbarum</i>	*****	*****	***	**	*	*	—	—
<i>C. sphaerospermum</i>	****	*****	***	**	*	—	—	—
<i>C. tenuissimum</i>	****	***	**	**	*	—	—	—
<i>Engyodontium album</i>	****	**	**	*	—	—	—	—
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	****	*****	***	***	*	—	—	—
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	****	***	***	**	*	—	—	—
<i>P. chrysogenum</i>	*****	*****	*****	***	**	*	*	—
<i>P. commune</i>	****	*****	***	***	**	*	—	—

注: *: 可培养真菌干重范围; *m*: 干重; —: 无明显的菌体($m<50\text{ mg}$). *: $50\text{ mg}\leq m<100\text{ mg}$; **: $100\text{ mg}\leq m<200\text{ mg}$; ***: $200\text{ mg}\leq m<300\text{ mg}$; ****: $300\text{ mg}\leq m<400\text{ mg}$; *****: $m\geq 500\text{ mg}$.
Note: *: The range of cultivable fungal dry weight; *m*: Dry weight; —: Without obvious mycelium ($m<50\text{ mg}$). *: $50\text{ mg}\leq m<100\text{ mg}$; **: $100\text{ mg}\leq m<200\text{ mg}$; ***: $200\text{ mg}\leq m<300\text{ mg}$; ****: $300\text{ mg}\leq m<400\text{ mg}$; *****: $m\geq 500\text{ mg}$.

3 讨论与结论

近年来,微生物对墓室壁画的侵蚀问题一直受到文物保护工作者的高度关注,对于初步判断微生物病害的形态特征通常使用显微观察技术。本研究通过扫描电镜分析发现,酥碱病害样品中有大量菌丝体,无明显病害壁画样品中未发现明显菌丝体结构,这说明墓室砖壁画受到了微生物的侵蚀和破坏,酥碱的形成可能也有真菌参与。扫描电镜结合EDS分析,菌丝体处C元素含量明显高于无菌丝处,说明菌丝体确为有机物,这为酥碱砖壁画真菌的分子鉴定提供了佐证。通过对样品的晶体成分分析发现,壁画中有大量的NaCl晶体,说明酥碱中的真菌处于高盐环境中,因而对于该类环境中真菌菌株的耐盐性分析十分必要。

长期以来,对于文化遗产病害真菌菌株的分离通常使用不同培养基联合培养的方法^[29],本研究选用4种偏好性不同的培养基以得到较为丰富的真菌

类群。基于传统培养手段,青霉属和曲霉属真菌在壁画上广泛存在^[14]。通过培养鉴定,青霉属、曲霉属、枝孢属在3个不同地理位点砖壁画墓室的空气中、砖壁画酥碱样品中均有发现且丰度较高,是较为明显的优势菌属;镰孢菌属(*Fusarium*)、毛壳菌属(*Chaetomium*)和枝孢属(*Cladosporium*)等也有出现。在关于日本高松冢古坟与龟虎古坟壁画病害真菌研究中,青霉属是引起古坟壁画污染的主要病害菌^[8]。对比汉墓、西晋墓及五号墓酥碱样品中真菌类群,我们推测在地下环境中的相似砖壁画病害由共同的核心真菌参与作用。酥碱病害的发生和加重可能与这些共有的真菌(花斑曲霉菌、黄灰曲霉以及烟曲霉菌)有一定关系。

真菌的基本特质之一是营养繁殖,靠孢子进行生殖。对真菌而言,相对湿度、温度和风况等都会对孢子释放产生影响^[30]。根据样地温度、相对湿度监测数据(西晋墓采样月平均温度为 $10.79\pm 1.27\text{ }^{\circ}\text{C}$,

平均相对湿度为 $42.03 \pm 1.13\%$; 汉墓采样月平均温度为 $10.08 \pm 1.64\text{ }^{\circ}\text{C}$, 平均相对湿度为 $47.97 \pm 2.15\%$; 五号墓采样月平均温度为 $17.32 \pm 1.33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 平均相对湿度为 $72.84 \pm 1.49\%$) 分析, 西晋墓和汉墓温湿度相近, 而位于兰州市的五号墓温湿度均明显高于位于敦煌市的两座墓室。已有研究指出, 五号墓前室西壁存在地下渗水现象, 墓室内相对湿度大于 70% 的时间占全年的一半以上, 高湿度环境为病害真菌体活动提供了必要的条件^[31]。综合三座墓室内可培养真菌浓度来看, 五号墓墓室内空气样品与酥碱砖壁画样品真菌浓度和多样性均显著高于西晋墓和汉墓, 并且真菌类群分布均匀; 这可能是由于五号墓搬迁所处的甘肃省博物馆位于兰州市内, 城市空气污染相对严重, 墓室所处的环境湿度较高, 而这种高湿度的保存环境更有利于真菌的增殖和累积^[32]。三座墓葬的环境空气与墓室砖壁画酥碱中均分别存在相同的可培养真菌类群, 这与墓葬内外空气交换、空气微生物沉降在壁画表面滋生相关^[33]。空气真菌受外环境的影响较大, 通过对空气真菌的监测可确定气溶胶中的污染源, 对于墓葬壁画保护有重要的作用^[34]。

在砖壁画内水分运移过程中有充足的水分, 渗水过程中携带支撑体或土体内有机质, 可为真菌生长提供营养源^[22]。三座墓室内的酥碱病害处均发现花斑曲霉菌、黄灰青霉和烟曲霉, 它们可能与砖壁画酥碱病害的发生和加剧有一定关联。曲霉与青霉都是气生菌丝, 菌丝体极易伸进壁画内部, 促进壁画结构性损伤。另外, 黄灰青霉有纤维溶解酶, 这种酶会降解壁画地仗层内的纤维类成分, 降低其强度, 加剧酥碱病害。

石质文物分析发现, 酥碱由于其特殊的构造特点经常作为耐盐菌良好的生长场所^[35], 而文物表面的生物化学腐蚀通常是由于微生物在文物基质中的代谢活动直接造成的^[36]。古遗址建筑在富盐环境中会筛选出具有耐盐嗜盐能力的菌株, 这些菌株在其生长过程中常产生蔷薇色、紫色甚至黑色的色素^[37], 必然会对壁画的美学价值造成危害。由于

壁画酥碱不断发生, 壁画内真菌群落为了适应高盐环境也可能随之发生变化。本研究发现部分酥碱样品中存在 NaCl 结晶, 多数丰度较高的菌株在高盐浓度培养基中也能较好生长。研究表明, 大多数曲霉属和青霉属真菌有较强的耐盐性^[38], 它们在本次分离菌株中占绝对优势并具有较强的耐盐性, 曲霉属中丰度最高的花斑曲霉在盐浓度 25% 时还可生长, 青霉属中丰度最高的产黄青霉甚至在盐浓度为 30% 时仍可生长。酥碱中高盐环境对适应其微生境的真菌可能会具有一定的选择作用, 这些耐盐的青霉属和曲霉属菌株随着生长将逐渐产生色素、有机酸等代谢产物, 进而对壁画产生不可逆转的退化作用。针对本研究中三座墓室内酥碱砖壁画样品中真菌类群及特性的研究, 在今后保护壁画墓的建议如下: (1) 在酥碱壁画保护修复过程中, 有针对性地选择适宜杀灭剂对共有、高丰度耐盐性强的真菌进行杀灭; (2) 长期监测墓室内外环境特征; (3) 对嘉峪关五号墓进行防水、排湿干燥和定期通风处理, 以降低真菌侵蚀的风险。

致谢: 感谢敦煌市文物局、敦煌汉墓和西晋墓管理人员, 以及甘肃省博物馆工作人员在微生物病害调查和样品采集时给予的帮助。

REFERENCES

- [1] Pruvost M, Bellone R, Benecke N, et al. Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(46): 18626-18630
- [2] Zhang XS. Exploration on the protection of the brick fresco color of the Wei Jin ancient tombs[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2003, 15(3): 44-46 (in Chinese)
张兴盛. 关于魏晋墓砖壁画色彩保护的探索[J]. *文物保护与考古科学*, 2003, 15(3): 44-46
- [3] Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills?[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(22): 9637-9646
- [4] Ciferri O. Microbial degradation of paintings[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 879-885
- [5] De la Rosa JM, Martin-Sanchez PM, Sanchez-Cortes S, et al. Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13441
- [6] Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al. The microbiology of

- Lascaux Cave[J]. Microbiology, 2010, 156(3): 644-652
- [7] Saiz-Jimenez C, Cuezva S, Jurado V, et al. Paleolithic art in peril: policy and science collide at Altamira Cave[J]. Science, 2011, 334(6052): 42-43
- [8] 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
- [9] Ma YT, Zhang H, Du Y, et al. The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 7752
- [10] 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
- [11] Wu FS, Wu GW, Liu Y, et al. Fungal community composition on normal and moldy mural in Xu Xianxiu's tomb of Northern Qi Dynasty, Taiyuan[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 479-487 (in Chinese)
武发思, 武光文, 刘岩, 等. 太原北齐徐显秀墓壁画真菌群落组成与菌害成因[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 479-487
- [12] Feng QP, Zhang XJ, Ma QL, et al. Studies on microbiological factor in colour change of Mogao Graffito's mural--II. Effect of microorganism on the pigment of imitative mural[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1998, 38(2): 131-136 (in Chinese)
冯清平, 张晓军, 马清林, 等. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究—II. 微生物对模拟石窟壁画颜料的影响[J]. 微生物学报, 1998, 38(2): 131-136
- [13] Sterflinger K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage[J]. Fungal Biology Reviews, 2010, 24(1/2): 47-55
- [14] 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
- [15] Garg KL, Jain KK, Mishra AK. Role of fungi in the deterioration of wall paintings[J]. Science of the Total Environment, 1995, 167(1/3): 255-271
- [16] Li ZX. The ancient ruins protection of the Silk Road[J]. China Cultural Heritage, 2004(3): 118-122 (in Chinese)
李最雄. 丝绸之路古遗址保护[J]. 中国文化遗产, 2004(3): 118-122
- [17] Zhang XJ, Feng QP, Yang L, et al. Effect of *Cladosporium* sp. on the changing course of red lead used for the Dunhuang mural[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 1998, 4(3): 277-280 (in Chinese)
张晓君, 冯清平, 杨玲, 等. 枝孢霉在敦煌壁画颜料变色过程中的作用[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4(3): 277-280
- [18] Guo H, Li ZX, Song DK, et al. Resarchon efflorescence of wall paintings in the Mogao Grottoes of Dunhuang[J]. Dunhuang Research, 1998(3): 153-163 (in Chinese)
郭宏, 李最雄, 宋大康, 等. 敦煌莫高窟壁画酥碱病害机理研究之一[J]. 敦煌研究, 1998(3): 153-163
- [19] Jin ZL, Chen GQ, Xia Y, et al. Comparative study of salt damage caused by sulfates and chlorides to mural paintings-evidence of superpenetration, migration and crystallization destruction resulting from sodium sulfate[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 2015, 27(1): 29-38 (in Chinese)
靳治良, 陈港泉, 夏寅, 等. 硫酸盐与氯化物对壁画的破坏性对比研究——硫酸钠超强的穿透、迁移及结晶破坏力证据[J]. 文物保护与考古科学, 2015, 27(1): 29-38
- [20] Adamiak J, Otlewska A, Gutarowska B. Halophilic microbial communities in deteriorated buildings[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2015, 31(10): 1489-1499
- [21] Adamiak J, Otlewska A, Gutarowska B, et al. Halophilic microorganisms in deteriorated historic buildings: insights into their characteristics[J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(2): 335-341
- [22] Lepinay C, Mihajlovski A, Seyer D, et al. Biofilm communities survey at the areas of salt crystallization on the walls of a decorated shelter listed at UNESCO World cultural Heritage[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 122: 116-127
- [23] Jurado V, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(4): 325-330
- [24] Stennett PJ, Beggs PJ. *Alternaria* spores in the atmosphere of Sydney, Australia, and relationships with meteorological factors[J]. International Journal of Biometeorology, 2004, 49(2): 98-105
- [25] Rintala H, Pitkäranta M, Toivola M, et al. Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 56
- [26] Sanchez-Moral S, Luque L, Cuezva S, et al. Deterioration of building materials in Roman catacombs: the influence of visitors[J]. Science of the Total Environment, 2005, 349(1/3): 260-276
- [27] Lu D. The study on Dunhuang Jin brick-tomb painting[J]. Identification and Appreciation to Cultural Relics, 2016(12): 34-41 (in Chinese)
卢冬. 敦煌晋墓画像砖研究[J]. 文物鉴定与鉴赏, 2016(12): 34-41
- [28] Xue JY. Removing and half underground of mural painting tomb No. 5 of Wei and Jin dynasty at Jiayuguan pass[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 1997(1): 33-38 (in Chinese)
薛俊彦. 嘉峪关魏晋壁画墓五号墓的搬迁与半地下复原研究[J]. 文物保护与考古科学, 1997(1): 33-38
- [29] Jurado V, Miller AZ, Alias-Villegas C, et al. *Rubrobacter braccarensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rubrobacter* isolated from a biodeteriorated monument[J]. Systematic & Applied Microbiology, 2012, 35(5): 306-309
- [30] Simeray J, Chaumont JP, Léger D. Seasonal variations in the airborne fungal spore population of the east of France (Franche-Comté). Comparison between urban and rural environment during

- two years[J]. *Aerobiologia*, 1993, 9(2/3): 201-206
- [31] Wu YQ, Zhang JQ, E J. The environmental analysis of mural painting tomb of Wei and Jin dynasty at Gansu Museum[J]. *The Silk Road*, 2012(10): 23-25 (in Chinese)
- 吴依茜, 张健全, 俄军. 甘肃省博物馆馆藏嘉峪关新城魏晋壁画墓环境分析研究[J]. *丝绸之路*, 2012(10): 23-25
- [32] Liu WB, Liu YY, Liao J, et al. Study on relationship between temperature humidity and fungal contamination in air conditioning system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 22(3): 22-25 (in Chinese)
- 刘文碧, 刘迎云, 廖颀, 等. 空调系统中温湿度与真菌污染关系的研究[J]. *环境科技*, 2009, 22(3): 22-25
- [33] Montacutelli R, Maggi O, Tarsitani G, et al. Aerobiological monitoring of the “Sistine Chapel”: airborne bacteria and microfungi trends[J]. *Aerobiologia*, 2000, 16(3/4): 441-448
- [34] Jones AM, Harrison RM. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 326(1/3): 151-180
- [35] Ettenauer J, Sterflinger K, Piñar G. Cultivation and molecular monitoring of halophilic microorganisms inhabiting an extreme environment presented by a salt-attacked monument[J]. *International Journal of Astrobiology*, 2010, 9(1): 59-72
- [36] Gorbushina AA. Life on the rocks[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(7): 1613-1631
- [37] Ettenauer JD, Jurado V, Piñar G, et al. Halophilic microorganisms are responsible for the rosy discolouration of saline environments in three historical buildings with mural paintings[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103844
- [38] Frisvad JC. Halotolerant and halophilic fungi and their extrolite production[A]//Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A. *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*[M]. Dordrecht: Springer, 2005: 425-439

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(1) 建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得;(2) 建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以避免长句,以求简单清晰;(3) 建议使用过去时态,要求语法正确,句子通顺;(4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致,但可比中文摘要更详尽,写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。(5) 摘要中不要使用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA, ATP等;(6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词:应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如“基因”、“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.2199)