



## 研究报告

## 太原北齐徐显秀墓壁画可培养真菌多样性及危害防治

武发思<sup>Δ1,2,4,5</sup> 马文霞<sup>Δ1</sup> 贺东鹏<sup>2,4,5</sup> 田恬<sup>1</sup> 王江<sup>3</sup> 刘岩<sup>3</sup> 张琪<sup>1</sup> 武光文<sup>3</sup>  
汪万福<sup>1,2,4,5</sup> 冯虎元<sup>\*1,5</sup>

1 兰州大学生命科学学院 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 太原北齐壁画博物馆 山西 太原 030000

4 古代壁画保护国家文物局重点科研基地 甘肃 敦煌 736200

5 甘肃省敦煌文物保护研究中心 甘肃 敦煌 736200

**摘要:**【背景】原址保护的墓葬壁画普遍存在着有害微生物的威胁,对壁画菌害的长效防治是文物保护领域久未解决的难题。【目的】确定太原北齐徐显秀墓墓道霉变壁画上可培养真菌多样性,分离优势菌株,并筛选长效的生物杀灭剂,为墓葬壁画菌害的抢救性防治提供科学依据。【方法】利用无菌棉签采集壁画表面白色菌丝体样品,使用扫描电子显微镜分析病害菌微观形貌特征;通过培养、分离及纯化获得真菌菌株,运用形态学和分子技术鉴定种属;结合实验室抑菌圈测试和原位杀菌试验,分析不同生物杀灭剂的抑菌圈大小、杀菌后原位可培养微生物浓度以及 ATP 荧光值差异,以期找到长效的生物杀灭剂。【结果】霉变壁画表面有大量菌丝体并伴有分生孢子,白色菌丝体样品中可培养真菌属于子囊菌门(*Ascomycota*)的 6 个属,其中白色侧齿霉菌(*Parengyodontium album*)相对丰度最高(98.13%),为优势病害菌。经实验室和原位试验筛选评估,确定了双氯酚复配型杀灭剂(0.5%双氯酚+75%乙醇)对该病害真菌杀灭效果最好,在 7 年连续监测期内未出现病害菌的复发。【结论】白色侧齿霉菌是引起徐显秀墓墓道壁画霉变的主要可培养病害菌;双氯酚复配型杀菌剂用于该病害菌防治的时效性最长;建议后期结合抢救性防治、环境调节和跟踪监测,以达到墓葬壁画微生物危害的长效防控。

**关键词:** 墓葬壁画, 霉变, 真菌多样性, 生物杀灭剂, 抢救性保护

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (32060258, 32001125); National Key Research and Development Program of China (2019YFC1520700); Project of Gansu Cultural Relics Bureau (GWJ202011)

ΔThese authors contributed equally to this work

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

Received: 14-06-2020; Accepted: 04-01-2021; Published online: 25-03-2021

基金项目: 国家自然科学基金(32060258, 32001125); 国家重点研发计划(2019YFC1520700); 甘肃省文物局课题(GWJ202011)

Δ对本文贡献相同

\*通信作者: Tel: 0931-8912537; E-mail: fenghy@lzu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-14; 接受日期: 2021-01-04; 网络首发日期: 2021-03-25

# The diversity of cultivable fungi on corridor murals and controlling of microbial deterioration in Xu Xianxiu's tomb of Northern Qi dynasty, Taiyuan

WU Fasi<sup>Δ1,2,4,5</sup> MA Wenxia<sup>Δ1</sup> HE Dongpeng<sup>2,4,5</sup> TIAN Tian<sup>1</sup> WANG Jiang<sup>3</sup>  
LIU Yan<sup>3</sup> ZHANG Qi<sup>1</sup> WU Guangwen<sup>3</sup> WANG Wanfu<sup>1,2,4,5</sup> FENG Huyuan<sup>\*1,5</sup>

1 MOE Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, 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 Mural Museum of the Northern Qi Dynasty in Taiyuan, Taiyuan, Shanxi 030000, China

4 Key Scientific Research Base of Conservation for Ancient Wall Paintings, State Administration for Cultural Heritage, Dunhuang, Gansu 736200, China

5 Gansu Provincial Research Center for Conservation of Dunhuang Cultural Heritage, Dunhuang, Gansu 736200, China

**Abstract: [Background]** The tomb murals preserved at the original sites are generally threatened by the microbial disease, and the long-term controlling of these microorganisms is a long-standing problem in the field of cultural heritage conservation. **[Objective]** We aimed to explore the cultivable fungal diversity on moldy murals of the tomb corridor surfaces, to isolate the dominant fungal strains and screen the long-acting biocides, and provide a scientific support for the control of the mural's fungal disease of this tomb. **[Methods]** Mural samples with whitish moldy necrosis were carefully collected by sterile swabs. The surface morphology of samples was analyzed by scanning electron microscope (SEM). The culture-dependent method was employed to isolate fungal strains, and combine with molecular techniques for identification, the community composition of fungi was analyzed thereafter. Combined with the laboratory inhibition zone test and the *in-situ* biocides test, the size of the inhibition zone of different biocides, the *in-situ* cultivable microbial concentration after biocides application, and the ATP fluorescence values differences were analyzed in order to find a lasting efficacy of the biocides. **[Results]** There were a large amount of mycelia with conidia, the culturable fungi in the white mycelium samples affiliated to the six genera of *Ascomycota* phylum, the dominant cultivated fungus was *Parengyodontium album* (98.13%). After screening and evaluation in laboratory and *in-situ* tests, it is clear that the most effective biocide was dichlorophene compounds (0.5% dichlorophene with 75% ethanol), and no repeated outbreaks of microorganisms occurred during the 7-year consecutive monitoring period. **[Conclusion]** *P. album* was the dominant cultivable fungi that caused mural moldy at tomb corridor. Dichlorophene compound biocide used in the controlling test of Xu Xianxiu's tomb mural of Northern Qi dynasty has achieved the longest timeliness of maintenance; and it is recommended to combine the emergency protection, environmental regulation and follow-up monitoring in the future, as a result, to achieve long-term prevention and control of the microbial hazards to the tomb murals.

**Keywords:** tomb murals, mildew, fungal diversity, biocides, emergency protection

墓葬壁画分布广泛、类型多样, 具有极高的历史价值、艺术价值、科学价值及社会文化价值<sup>[1]</sup>。随着考古发掘出土, 墓葬壁画极易受到微生物活动的侵蚀, 在埃及图坦卡蒙墓、意大利罗马地下墓穴及伊特鲁里亚墓葬壁画表面均有微生

物病害问题<sup>[2-4]</sup>。真菌、细菌、藻类可在壁画表面滋生蔓延, 通过菌丝体穿透、产色素、产酸等生长代谢过程造成壁画美学价值降低及结构和组分改变<sup>[5-8]</sup>。有研究指出, 真菌是威胁古代壁画保存的主要微生物类型, 法国拉斯科洞穴史前岩画、

日本高松冢古坟壁画<sup>[9-11]</sup>和我国敦煌莫高窟及魏晋墓壁画<sup>[12-14]</sup>都曾遭受过真菌的危害,其中青霉属、曲霉属和枝孢属类群在壁画上普遍存在<sup>[15]</sup>。墓葬壁画真菌病害的防治当前仍是个国际难题,运用杀灭剂防控微生物病害的方法仍在不断探索中<sup>[16-17]</sup>。然而系统开展调查分析、掌握微生物群落组成及病害成因是进行防治前必须重点开展的工作<sup>[18-19]</sup>。在文化遗产保护领域,微生物病害治理方法主要包括机械清除、紫外线或 $\gamma$ 射线辐照、激光清洗以及最为常用的化学杀灭剂处理<sup>[20]</sup>。

北齐徐显秀墓位于山西省太原市迎泽区郝庄乡王家峰村东(112°36'42.2"E, 37°50'11.8"N),属北温带大陆性气候,年均气温 9.5 °C,年均降水量 456 mm,多集中于夏秋季。该墓葬于 2000 年 12 月被盗后,在 2002 年 10 月开展了抢救性发掘工作。墓志记载墓主人为北齐太尉,武安王徐显秀;建于武平二年(571 年),墓葬内保存有总面积 330 余 m<sup>2</sup> 的大型人物壁画,壁画内容连贯完整,墓道壁画为出行仪仗队,是目前所发现同时期墓葬中保存最为完好的大型壁画墓,不仅具有极高的美学价值,更为研究北齐历史文化提供了宝贵资料,获评“2002 年度全国十大考古新发现”。墓葬发掘出土后,受保存环境改变的影响,墓道壁画于 2013 年 8 月开始出现霉变病害,本课题组于 2015 年通过壁画样品的基因组总 DNA 提取、真菌 ITS 区域 PCR 扩增和克隆文库构建等分子生物学技术,确定了霉变样品和无明显霉变样品中优势病害菌分别为白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*)和无绒毛青霉菌(*Penicillium laeve*)<sup>[21]</sup>,并结合环境监测发现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。白色侧齿霉菌是文物保存环境中极为常见的病害真菌,但其命名经历了多次改变<sup>[22]</sup>,近年其拉丁名已由 *E. album* 修正为 *Parengyodontium album*<sup>[23]</sup>。尽管基于克隆文库构建的分子测序分析在 DNA 水平上快速获得了优势病害微生物群落的鉴定信息,但

对于墓葬壁画保护中霉变病害的治理而言,找到适宜的生物杀灭剂仍是开展抢救性保护工作的关键,而长效杀灭剂的筛选当前还需建立在其对于霉变壁画中可培养微生物的抑菌性实验、现场原位杀灭试验及杀灭剂长效性综合评估的基础上,因此获得病害菌株并开展科学评测对于墓葬壁画微生物病害的紧急防护仍具有非常重要的现实意义。

本文进一步分析了该墓葬菌害壁画上的可培养真菌群落组成并分离出优势病害菌,结合实验室抑菌性和文物保存现场原位试验效果评估,最终筛选出具有较好防治效果的针对性生物杀灭剂。研究结果将为墓葬壁画保护中的菌害治理提供重要的科技支撑,对同类环境下壁画微生物病害的抢救性防护也具有重要的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

利用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 浸湿的无菌棉签在墓道微生物病害处(图 1A)擦拭 5 cm×5 cm,以采集墓道壁画表面白色霉变物(图 1B),并置于无菌 Eppendorf 管中,放于冷藏箱加冰袋带回实验室,置于-20 °C 条件下保藏备用。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

PDA (Potato Dextrose Agar)、PDB (Potato Dextrose Broth)、察氏、孟加拉红、麦芽汁、R2A、牛肉膏(Beef Extract, BE)蛋白胨琼脂培养基, BD Difco 公司; DNA 提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; 核酸染料 GeneGreen、10×缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)、Taq 聚合酶、dNTPs, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖, Biowest 公司; 乙醇, 烟台市双双化工有限公司; 甲醛, 四川西陇化工有限公司; 戊二醛, 北京索莱宝科技有限公司; 霉敌、双氯酚, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 苯扎氯铵, Acros Organics 公司; 苯并咪唑, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。恒温培养箱, 上海一恒科

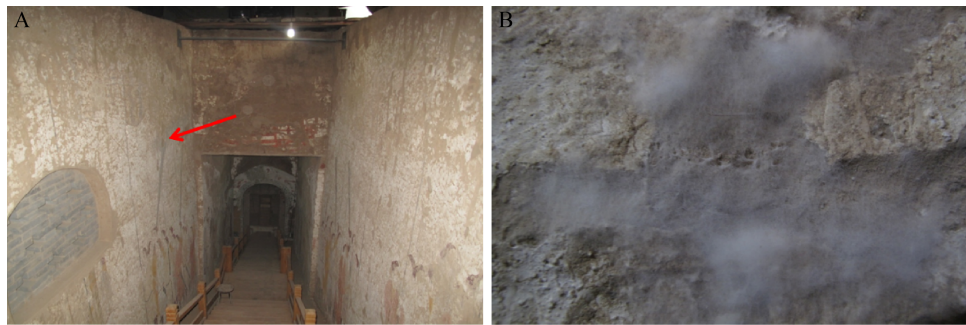


图1 徐显秀墓壁画采样区域

Figure 1 The sampling areas of mural in Xu Xianxiu's tomb

注: A: 箭头所示为墓道白色霉变区域; B: 壁画表面白色霉变

Note: A: The arrow pointed whitish moldy area; B: White moldy on the mural surface

学仪器有限公司; 离心机、PCR 仪, Eppendorf 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; ATP 荧光检测仪, Kikkoman 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 真菌培养与计数

将棉签样品放入 20 mL 磷酸缓冲液(Phosphatic Buffer Solution, PBS)中混匀, 取适量分别涂布于 PDA、察氏、孟加拉红和麦芽汁培养基上, 每组 3 个重复。将涂布平板置于培养箱中 25 °C 条件下培养 3–45 d, 按菌落生长情况进行克隆形成单位(Clone Forming Unit, CFU)计数, 根据公式计算出相应样品中真菌浓度。计算公式如下:

$$C = \frac{T \times D \times 20}{A \times B}$$

$C$  表示真菌浓度(CFU/cm<sup>2</sup>),  $T$  表示平板上有效菌落数(CFU),  $D$  表示稀释倍数(20 倍), 20 表示稀释样品的 PBS 用量(mL),  $A$  表示棉签采样面积(25 cm<sup>2</sup>),  $B$  表示涂布平板时的用量(mL)。

### 1.2.2 真菌形态观察和分子数据分析

(1) 扫描电镜观察。将棉签样品放入 20 mL PBS 中置于 25 °C、150 r/min 摇床富集培养 24 h, 9 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 取菌体于试管中。用 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 洗脱 3 次, 弃上清。加 1 mL 4% 戊二醛固定 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 加

PBS 洗涤 3 次, 洗完后 12 000 r/min 离心 10 min。分别用 30%、50%、70%、85%、90%、100%乙醇梯度脱水, 每次 10 min, 每步完成后 12 000 r/min 离心 10 min。滴加样品于细胞玻片上, 冷冻干燥后将玻片贴在导电胶上喷金 8 s 增加导电率, 用扫描电镜进行微观形貌观察。

(2) 显微镜观察。使用解剖针从单菌落平板中挑起菌丝, 用 50%乙醇浸润后使用蒸馏水冲洗。将冲洗好的菌丝放在滴加过乳酸石炭酸棉兰染色液(石炭酸 10 g, 甘油 20 mL, 棉兰 0.02 g, 蒸馏水 10 mL)的载玻片上, 用解剖针分散菌丝后盖上盖玻片, 用光学显微镜观察拍照。

(3) 真菌基因组 DNA 提取和 ITS 区段的 PCR 扩增。选用 PDA 培养基对不同形态的真菌菌落进行划线分离纯化。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 DNA 提取试剂盒提取上述菌体基因组 DNA。以纯化后的 DNA 为扩增模板, 使用真菌通用引物对 ITS1/ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 区段。PCR 反应体系(25 μL): 10×缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, Taq 聚合酶 1 U, dNTPs 0.2 mmol/L, 引物 0.2 mmol/L, DNA 模板 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 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完成测序, 所测序列使用 CExpress 软件(Informax, MD 公司) 拼接, 剔除重复序列后在线提交至 GenBank 数据库。

(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, 得到相似度最高的参考序列。通过 MEGA 4.0 软件对上述序列与参考序列构建系统发育树<sup>[24]</sup>。

(6) 群落组成分析。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, 完成群落组成分析。

1.2.3 抢救性防治

(1) 杀灭剂选择: 针对常见文物微生物杀灭剂及建议浓度(表 1)开展后续筛选实验。

(2) 实验室筛选。

将优势菌接入 PDB 培养基中, 25 °C、150 r/min 条件下培养 7 d 制成菌液, 取 200 μL 菌液涂布于 PDA 培养基平板上。选取 6 mm 的药敏纸片灭菌烘干, 分别浸泡于工作浓度的杀灭剂中 1 h, 之后均匀平铺 3 个纸片于单个平板上, 置于 25 °C 培养箱中恒温培养, 7 d 后测定抑菌圈大小。每组实验

重复 3 次, 根据抑菌圈大小筛选杀灭剂及最佳使用浓度。

(3) 原位筛选。2013 年 10 月, 选定墓道壁画病害区(图 2A), 将其划分为 8 个 10 cm×10 cm 的实验区域, 分别喷洒经实验室筛选确定了最佳抑菌浓度的 7 种杀灭剂(图 2B), 以相同量的无菌 ddH<sub>2</sub>O 作为对照, 每个处理分 3 次共喷洒 50 mL, 以确保杀灭剂可以均匀渗透到一定深度及防止喷洒时形成径流影响画面质量。为避免不同处理区域交接处抑菌剂相互影响, 在剪制的塑料方框内喷洒杀灭剂(图 2C)。

(4) 原位防治效果评估。CFU 计数评估: 分别于 2013 年 10 月(灭菌后 3 天)和 2017 年 10 月, 分 2 次用无菌解剖刀对杀灭实验区及未做处理的霉变对照区内壁画表层(1 mm 内, 含壁画地仗层土壤)采样, 置于磷酸缓冲液(PBS)中混匀后, 分别涂布于 R2A、PDA、BE 琼脂培养基上, 25 °C 培养箱中培养 3–7 d 后计算微生物浓度并进行 CFU 差异性 ANOVA 分析, 计算公式如下:

$$C = \frac{T}{A \times B}$$

其中  $C$  表示可培养真菌浓度(CFU/g),  $T$  表示平板上有效菌落数(CFU),  $A$  表示稀释浓度(g/mL),  $B$  表示涂布平板时的用量(mL)。

表 1 常见壁画微生物杀灭剂及建议浓度

Table 1 Normal biocides and recommend concentration

编号 No.	生物杀灭剂 Biocides	化学式 Chemical formula	CAS 号 CAS No.	浓度 Concentration (%)	配制方法 Preparation methods
1-YC	乙醇 Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	64-17-5	75.0	蒸馏水 Distilled water
2-JQ	甲醛 Formaldehyde (35%–38%)	CH <sub>2</sub> O	50-00-0	0.5	75.0%乙醇 75.0% ethanol
3-WE	戊二醛 Glutaraldehyde	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	111-30-8	2.0	蒸馏水(用 0.3% NaHCO <sub>3</sub> 调 pH 到 7.5–8.8) Distilled water (adjust the pH to 7.5–8.8 with 0.3 NaHCO <sub>3</sub> )
4-MD	霉敌 BIT	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NOS	2634-33-5	0.2	75.0%乙醇 75.0% ethanol
5-BC	苯扎氯铵 Benzalkonium chloride	C <sub>23</sub> H <sub>42</sub> ClN	68424-85-1	0.2	75.0%乙醇 75.0% ethanol
6-SL	双氯酚 Dichlorophene	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	97-23-4	0.5	75.0%乙醇 75.0% ethanol
7-BB	苯并咪唑 Benzimidazole	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	51-17-2	0.4	75.0%乙醇 75.0% ethanol

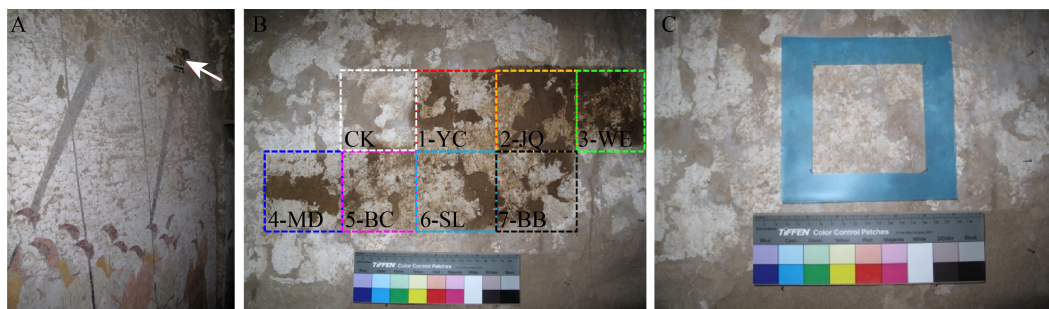


图2 墓葬墓道白色霉变病害处试验

Figure 2 The test on whitish moldy mural of tomb corridor

注: A: 试验区域; B: 7种杀灭剂试验范围; C: 杀灭剂喷洒方式

Note: A: The test area; B: The specific test area of the seven biocides; C: The spraying method of biocides

ATP 荧光检测评估: 于 2017 年 10 月, 使用 ATP 荧光检测仪同步评估了样品中的活菌水平。使用配套检测笔中的无菌棉棒浸润于无菌去离子水中, 用棉棒蘸取固定质量的已采集表层 1 mm 内壁画及地仗层土壤粉末样品, 随后将棉棒插入检测笔中, 按仪器操作说明读取 ATP 荧光值并记录 3 组数据。

#### 1.2.4 数据统计与分析

实验所获的可培养真菌浓度平均值和标准误差的统计分析采用 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 2017 计算分析, 绘图使用 Origin 8.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 原位样品扫描电镜分析

扫描电镜分析显示墓道西壁白色霉变样品中存在大量菌丝体, 不同形态的菌丝体缠绕聚集在一起(图 3A), 其中一种伴有分生孢子(长约 2.0–3.0  $\mu\text{m}$ , 宽约 1.5–2.0  $\mu\text{m}$ )的菌丝体数量明显占据优势(图 3B)。

### 2.2 墓道壁画可培养真菌浓度、多样性及优势菌分析

#### 2.2.1 可培养真菌主要类群

墓道病害区可培养真菌浓度经计算约  $4\,880\,000 \pm 160\,000\text{ CFU/m}^2$ 。共分离得到可培养真菌 17 株, 选择代表性单菌株序列(登录号:

MT598824–MT598832)及与 NCBI 数据库中相似程度最高的参照序列, 比对构建可培养真菌系统发育树。从图 4 可以看出, 真菌隶属于子囊菌门 (*Ascomycota*) 的 6 个属。其中菌株 T11 为白色侧齿霉菌 (*P. album*), 相对丰度最高(98.13%), 是导致墓道西壁出现白色霉变的优势菌; 其他可培养真

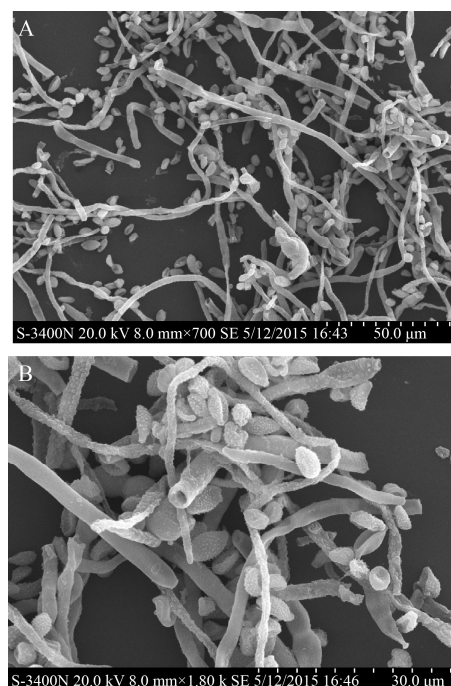


图3 扫描电镜分析

Figure 3 The SEM analysis

注: A: 低倍数下霉变菌体形态; B: 优势菌微观形貌

Note: A: Moldy sample at low magnification; B: Micro-morphology of dominant fungi

菌还包括轮状镰刀霉(*Fusarium verticillioides*)、粒状青霉(*Penicillium granulatum*)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)等,但相对丰度远低于白色侧齿霉菌(图 5)。

2.2.2 墓道可培养优势真菌形态

优势菌落白色侧齿霉菌(*P. album*)菌落形态如

图 6A 所示,通过观察单菌落表面白色绒毛状菌丝,与墓道白色霉变菌体相似。通过棉兰对菌丝体染色可观察到优势病害真菌的菌丝细长并伴有分生孢子(图 6B),该结果与电镜下原位样品形态相似(图 3),证明了墓道西壁白色霉变为白色侧齿霉菌所致。

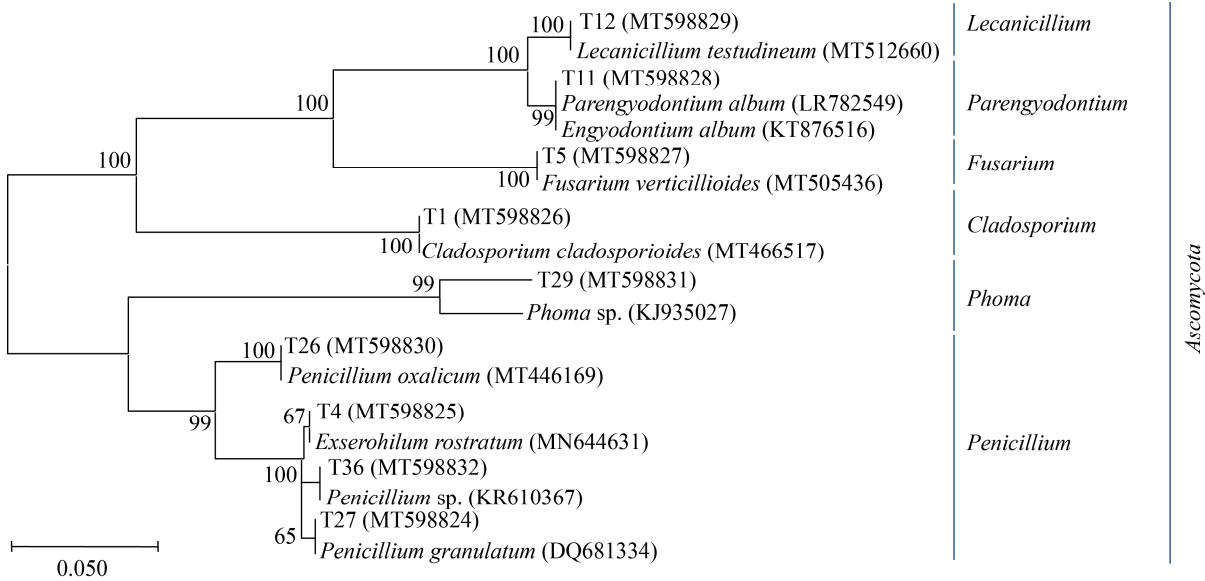


图 4 墓道白色霉变病害样品中分离真菌系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of fungi isolated from whitish moldy mural of tomb corridor

注: 邻接系统发育树是基于所获菌株的 rDNA 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; 本研究获得的菌株以大写字母 T 和数字命名, 所获相应序列在括号内, 它们在基因库的序列号为 MT598824–MT598832

Note: Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial rDNA ITS gene sequences of all identified fungi and referenced sequences; Numbers above branches denote bootstrap values from 1 000 replicates; Strains obtained in present study were named with capital letter T and numbers, and corresponding sequences are shown in brackets, they are labeled with the GenBank database accession number (MT598824–MT598832)

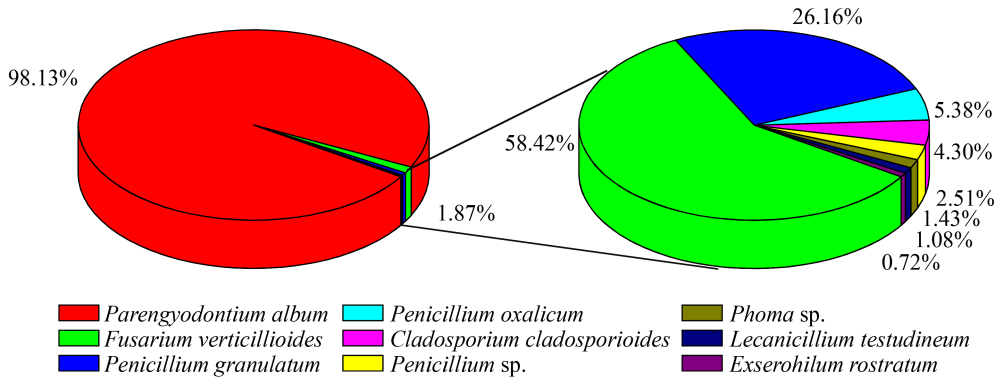


图 5 墓道白色霉变壁画上可培养真菌群落组成

Figure 5 Fungal community composition and their abundance on whitish moldy mural of tomb corridor

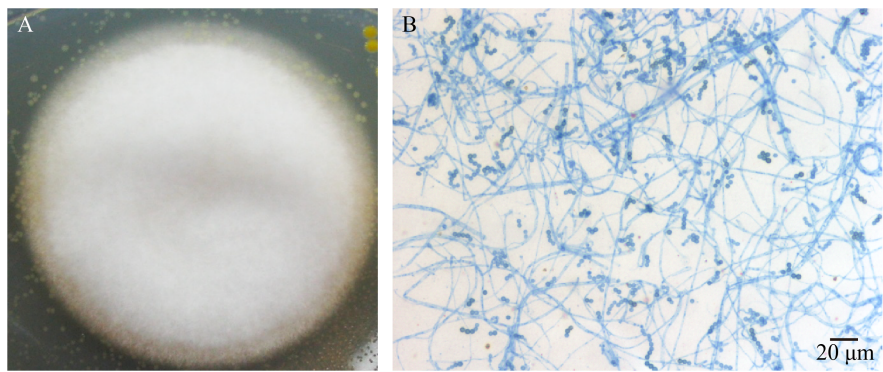


图 6 优势病害菌单菌落形态  
**Figure 6 The single fungal colony morphology of dominant disease fungi**  
注: A: 宏观形态; B: 微观形态  
Note: A: Macro morphology; B: Micro morphology

2.3 杀灭剂效果评估

2.3.1 实验室抑菌性

接菌于固体培养基培养一周后, 通过测量抑菌圈大小(表 2)可知, 双氯酚复配型杀菌效果最好, 戊二醛次之, 甲醛、苯扎氯铵和苯并咪唑均对优势病害菌抑菌效果不明显。

表 2 微生物复配杀灭剂处理后平板抑菌圈大小  
**Table 2 The inhibition zone after microbial compound biocides dealed treatment**

生物杀灭剂编号 Biocide No.	抑菌圈大小 Size of inhibition zone (cm)
1-YC	9.00±0.33ab
2-JQ	7.11±0.20b
3-WE	10.72±0.22ab
4-MD	8.44±0.29b
5-BC	6.88±0.20b
6-SL	16.55±0.63a
7-BB	7.44±0.42b
空白对照 Blank control	0.00

注: 同列数据后有相同字母者表示差异不显著( $P>0.05$ ); 1-YC、2-JQ、3-WE、4-MD、5-BC、6-SL、7-BB 分别表示乙醇、甲醛、戊二醛、霉敌、苯扎氯铵、双氯酚和苯并咪唑  
Note: Those with the same letter after the same column of data indicate that the difference is insignificant ( $P>0.05$ ); 1-YC, 2-JQ, 3-WE, 4-MD, 5-BC, 6-SL, 7-BB represent ethanol, formaldehyde, glutaraldehyde, BIT, benzalkonium chloride, dichlorophene and benzimidazole respectively

2.3.2 现场原位杀菌效果评估

通过比较各类杀灭剂处理区域可培养微生物浓度(表 3), 可确定杀灭剂的时效性差异。2017 年与 2013 年相比, 在发生霉变部位的对照区域, 使用 PDA 培养基中可培养微生物(真菌)浓度有明显下降, R2A 和 BE 培养基中可培养微生物浓度均没有明显变化。对比 R2A 平板上可培养微生物浓度, 除乙醇/水(溶质/溶剂)复配型处理区域浓度减小外, 其他区域均有一定增加, 其中戊二醛/水复配型处理和苯扎氯铵/乙醇处理升高幅度最大, 霉敌/乙醇复配型和双氯酚/乙醇复配型增长幅度均相对较小。对比 PDA 平板上可培养微生物浓度, 乙醇/水复配型处理区域有所下降, 双氯酚/乙醇复配型、霉敌/乙醇复配型处理区域与 2013 年相同, 其他杀灭剂处理区域均有不同程度增加。对比使用 BE 培养基可培养微生物浓度, 7 个区域均有所增加。戊二醛/水复配型处理区域增长幅度最小, 霉敌/乙醇复配型处理区域次之。综合 3 类培养基上 2013 年与 2017 年数据, 双氯酚/乙醇复配型、霉敌/乙醇复配型抑菌剂对病害菌杀灭的中长期效果最好。

通过在 2017 年采集并检测墓道霉变位置不同杀灭剂处理样品中的微生物 ATP 荧光, 可知经杀灭剂处理 4 年后, 与霉变对照区域相比, 其他处理区域微生物活性均有明显降低。其中双氯酚/乙醇复配型的荧光值最低, 其抑菌时效最长, 苯扎



表 3 2013 年与 2017 年杀灭剂试验区域可培养微生物浓度

Table 3 Comparison of the concentration of cultivable fungi in the biocides treated experimental areas

编号 No.	R2A 培养基 R2A agar (CFU/g)		PDA 培养基 Potato-dextrose agar (CFU/g)		BE 培养基 BE agar (CFU/g)	
	2013	2017	2013	2017	2013	2017
对照 Control	2 700 000±250 000	6 800 000±2 100 000	83 000 000±6 400 000	1 300 000±330 000	1 500 000±29 000	1 700 000±170 000
1-YC	18 767±726a	7 283±1 157ab	1 117±268a	50±0b	483±60a	5 650±1 543ab
2-JQ	2 033±406b	9 217±404a	0±0 c	6 683±3 592a	0±0c	9 017±1 364a
3-WE	0±0c	4 917±2 323b	33±10bc	1 367±309b	183±60b	2 233±925b
4-MD	50±29c	3 117±742b	17±7bc	17±9b	0±0c	2 067±758b
5-BC	0±0c	6 083±1 270ab	117±17bc	2 317±617ab	50±50c	5 583±2 235ab
6-SL	33±17c	2 583±661b	0±0c	0±0b	17 ±9c	4 267±2 210b
7-BB	133±60c	5 500±257b	333±93b	2 733±2 683ab	0±0c	2 683±142b

注：1-YC、2-JQ、3-WE、4-MD、5-BC、6-SL、7-BB 分别表示乙醇、甲醛、戊二醛、霉敌、苯扎氯铵、双氯酚和苯并咪唑复配型杀灭剂实验区域；同列数据后有相同字母者表示差异不显著( $P>0.05$ )

Note: 1-YC, 2-JQ, 3-WE, 4-MD, 5-BC, 6-SL, 7-BB represent ethanol, formaldehyde, glutaraldehyde, BIT, benzalkonium chloride, dichlorophene and benzene compound biocides, respectively. Those with the same letter after the data in the same column indicate that the difference is insignificant ( $P>0.05$ )

氯铵/乙醇复配型和乙醇/水复配型处理次之(图 7)。截至 2020 年 12 月，在连续 7 年的监测期内，双氯酚/乙醇复配型处理区域没有出现肉眼可见的微生物病害复发迹象。

3 讨论与结论

长期以来，如何快速鉴定墓葬壁画微生物种类及其优势种群，并筛选针对性强、环保性好、持续性久的杀灭剂和杀灭方法，是墓葬壁画菌害治理保护中的关键需求之一<sup>[19]</sup>。本研究选择了 PDA、察氏、孟加拉红及麦芽汁 4 种培养基，通过培养和菌株分子鉴定，确定了优势病害真菌为白色侧齿霉菌(*P. album*, 98.13%)，此结果与之前本课题组利用直接提取霉变壁画样品总 DNA、构建克隆文库及测序分析获得的结果基本一致<sup>[21]</sup>，差异之处在于，利用克隆文库获得霉变壁画中的序列信息还包括支顶孢属(*Acremonium*)，但在本研究中未培养获得该属菌株，这与传统培养方法本身的局限性有关；另外通过不同类型的培养基，也可获得更多菌株，如本次研究中培养获得的轮状镰刀霉，在之前的克隆文库测序分析中并未检测到，克隆文库测序技术也会受到蓝白斑筛

选中克隆子数量的限制，数量过少可导致物种多样性覆盖度降低。基于培养和非培养技术的结合对解析壁画病害微生物多样性具有重要意义，菌株分离培养方法在后期优势病害菌株生理生化特性研究、生物杀灭剂筛选及文物保护修复等方面

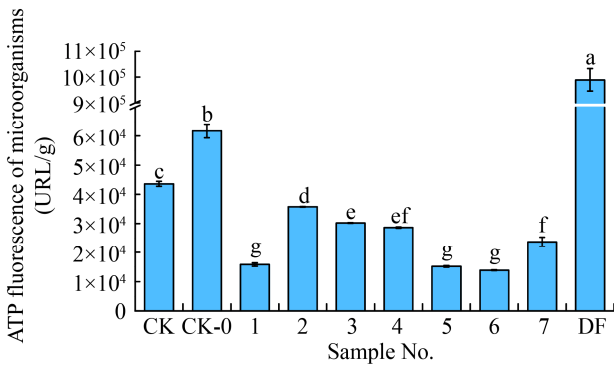


图 7 杀灭剂筛选试验区域微生物 ATP 荧光检测  
Figure 7 Comparison of the ATP fluorescence in the biocides test area

注：CK：无菌水处理；CK-0：无肉眼可见菌丝体空白对照；1、2、3、4、5、6、7 分别表示乙醇、甲醛、戊二醛、霉敌、苯扎氯铵、双氯酚和苯并咪唑；DF：未经杀灭处理残留菌丝  
Note: CK: Sterile water treatment; CK-0: Blank control of no mycelia visible to the naked eye; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 represent ethanol, formaldehyde, glutaraldehyde, BIT, benzalkonium chloride, dichlorophene and benzimidazole; DF: Residual hypha

具有不可替代的作用, 本研究可视为上一研究的补充延续以及对于墓葬壁画菌害治理的实践指导。白色侧齿霉菌是一种常见的文物致病菌<sup>[22]</sup>, 曾在世界多处壁画上发现<sup>[25-27]</sup>, 在俄罗斯波洛夫斯科修道院壁画表面上的分离丰度高达 90%<sup>[26]</sup>。其优势程度可判断壁画受真菌侵蚀的等级<sup>[21]</sup>, 而如何针对性地治理该病害菌是本研究关注的重点之一。

对多数微生物而言, 生物杀灭剂都具有较好的消除和抑制能力<sup>[28]</sup>, 如季铵盐类化合物、苯酚、甲醛和乙醇都有一定的杀菌能力<sup>[20,29]</sup>。张昱林<sup>[30]</sup>通过实验室壁画模拟试块分析了生物杀灭剂对霉菌生长的影响, 确定氯化汞和三丁基氧化锡具有抑菌效果; 日本高松冢古坟壁画微生物防治研究表明, 乙醇和异丙醇均有助于抑制壁画真菌滋生<sup>[11]</sup>。然而在杀灭剂应用过程中, 耐药性真菌的出现和演替菌群的再次暴发会成为新的难题, 通常采用多种杀灭剂同时或轮流使用以避免这一问题<sup>[31-32]</sup>。盲目使用多种杀灭剂可能加速抗性菌株的产生, 如法国拉斯科洞穴史前岩画微生物病害防治过程中, 2001 年暴发腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)病害后, 连续 3 年使用苯扎氯铵杀菌, 导致壁画表面碳源增多, 诱发形成了新的黑色斑点; 直至 2007 年, 壁画出现由拉斯科赭霉菌(*Ochroconis lascauxensis*)导致的大面积黑色菌斑; 2008 年选择季铵盐类复配型杀灭剂(10%-25%的苯扎氯铵、10%-25%的米他氯铵、2.5%的 N-辛基异噻唑啉酮和 3%异噻唑啉酮衍生物溶液)对微生物病害区进行杀灭; 2009 年优势菌群已改变为小疱毛壳科(*Herpotrichiellaceae*)的黑色酵母。杀灭剂应用后微生物群落的演替和抗性菌株的形成使拉斯科壁画作为病害防治的失败案例成为文物保护领域深刻教训<sup>[16,33]</sup>。

当前杀灭剂筛选工作多数还局限在实验室条件下, 少有研究开展现场试验和长效性跟踪评估, 因此结合实验室和文物保存现场开展科学系统的试验和评估就显得尤为重要。本研究在综合

考虑了供试杀灭剂在文物保护领域的使用频度、环境友好性及可操作性等因素的基础上, 选择了几种常见杀灭剂开展评估, 经实验室筛选确定双氯酚/乙醇复配型杀灭剂对于当前的优势病害菌防治效果最好。事实上, 由于微生物群落组成相对复杂, 原位试验中杀灭剂的抑菌效率降低和其快速失活都会导致现场试验的失败<sup>[31,34]</sup>。为了验证和评估杀灭剂的原位使用效果, 本研究首次对比了使用 3 d 后和 4 年后不同杀灭剂处理区域可培养微生物浓度的变化, 最终确定双氯酚/乙醇复配型、霉敌/乙醇复配型杀灭剂对优势病害菌治理效果较好。经过长达 7 年的监测, 双氯酚/乙醇复配型处理区域没有出现菌害的复发。R2A 和 BE 培养基中可培养微生物浓度升高的现象, 可归因于其中部分可培养细菌数量上升, 由于所选杀菌剂主要针对病害真菌, 其对于细菌的杀灭效力一般, 这一结果启示我们在以后的徐显秀墓壁画病害微生物防治工程实践中, 还需综合考虑霉变微生物的群落特性, 适当辅以针对细菌的杀灭剂, 以确保广谱杀灭及抑菌效力的长久性。同时, 针对不同遗址的壁画微生物病害问题, 应确保研究先行, 在科学数据的指导下制定针对性的保护方案。

ATP 生物发光法近年已成为快速评估抑菌剂对文物表面病害菌抑菌效果的方法之一<sup>[35]</sup>, 但该方法只能定量分析活菌数量。本研究以 ATP 荧光检测仪作为辅助评价手段对杀灭剂处理区域微生物活性进行了检测, 结果显示双氯酚/乙醇复配型处理后微生物荧光量显著降低, 反映出其对活菌杀灭能力最强且时效性最长。墓葬遗址一般处于地下环境, 土壤渗水、高相对湿度及低空气交换等特征是导致墓葬壁画更易被微生物侵蚀的主要环境成因<sup>[36-37]</sup>, 因此墓葬壁画的原址保护当前仍具有很大挑战, 基于生物杀灭剂的方法还需不断探索改进<sup>[16]</sup>。考虑到环境污染和抗性菌问题, 在菌害壁画抢救性防护后, 同步进行壁画保存环境调控已成为开展



文物预防性保护的主要趋势<sup>[17,20]</sup>。

Li 等研究表明,湿度、光照、所处高度和温度是影响墓葬真菌群落的主要因素<sup>[38]</sup>,搭建保护棚能有效抑制墓室表面的结露现象,减轻微生物病害问题<sup>[39]</sup>。徐显秀墓近年已开展的保护工程成效明显,如遗址外搭建的保护棚避免了温度和相对湿度的剧烈波动。但双层保护棚降低了墓葬内、外空气交换,墓葬内部分位置相对湿度长期在80%–100%之间,导致白色侧齿霉菌生长暴发<sup>[21]</sup>。因此在墓葬壁画保护中还需不断总结经验,并从整个生态环境平衡的角度综合考虑防控措施。

徐显秀墓壁画的研究近年趋向深入,一方面从壁画赋存环境、颜料组成方面进行了深入分析<sup>[40–41]</sup>,另一方面从微生物群落特征和菌株生理代谢角度探究其危害壁画机制<sup>[21,42–43]</sup>。管理方也通过增设换气装置,确保了在晴好天气时墓室内、外空气流通,以避免墓葬内环境长时间维持高湿度,防止病害菌再度暴发。抢救性防治、环境调节及长期跟踪监测研究相结合的措施将是墓葬等潮湿环境中壁画病害菌防控取得长效性的关键。

致谢:感谢太原北齐壁画博物馆李铁、温少杰等在微生物病害调查和采样时给予帮助。

## REFERENCES

- [1] Wang XY. Comparison and significance of murals in tombs around the world[J]. National Arts, 2019(6): 93-102 (in Chinese)  
汪小洋. 世界墓室壁画的比较与意义[J]. 民族艺术, 2019(6): 93-102
- [2] Sanchez-Moral S, Luque L, Cuezva S, Soler V, Benavente D, Laiz L, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. Deterioration of building materials in Roman catacombs: the influence of visitors[J]. Science of the Total Environment, 2005, 349(1/3): 260-276
- [3] Vasanthakumar A, DeAraujo A, Mazurek J, Schilling M, Mitchell R. Microbiological survey for analysis of the brown spots on the walls of the tomb of King Tutankhamun[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 79: 56-63
- [4] Diaz-Herraz M, Jurado V, Cuezva S, Laiz L, Pallecchi P, Tiano P, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. The actinobacterial colonization of Etruscan paintings[J]. Scientific Reports, 2014, 3: 1440
- [5] Capodicasa S, Fedi S, Porcelli AM, Zannoni D. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(8): 727-733
- [6] Mazzoni M, Alisi C, Tasso F, Cecchini A, Marconi P, Sprocati AR. Laponite *micro*-packs for the selective cleaning of multiple coherent deposits on wall painting: the case study of *Casina Farnese* on the Palatine Hill (Rome-Italy)[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 94: 1-11
- [7] Leplat J, Francois A, Bousta F. White fungal covering on the wall paintings of the Saint-Savin-sur-Gartempe Abbey church crypt: a case study[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 122: 29-37
- [8] Cennamo P, Montuori N, Trojsi G, Fatigati G, Moretti A. Biofilms in churches built in grottoes[J]. Science of the Total Environment, 2016, 543: 727-738
- [9] Bastian F, Jurado V, Nováková A, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. The microbiology of Lascaux Cave[J]. Microbiology, 2010, 156(3): 644-652
- [10] An KD, Kiyuna T, Kigawa R, Sano C, Miura S, Sugiyama J. 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
- [11] Wu FS, Zhu FQ, Wang WF, Duan YL, Tian T, Feng HY. Review of microbial deterioration and control of Takamatsuzuka Tumulus, Japan[J]. Sciences of Conservation and Archaeology, 2019, 31(3): 26-35 (in Chinese)  
武发思, 朱非清, 汪万福, 段育龙, 田恬, 冯虎元. 日本高松冢古坟微生物病害及其防治研究概述[J]. 文物保护与考古科学, 2019, 31(3): 26-35
- [12] Ma YT, Zhang H, Du Y, Tian T, Xiang T, Liu XD, Wu FS, An LZ, Wang WF, Gu JD, et al. The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 7752
- [13] Ma WX, Wu FS, Tian T, Ma YT, Xiang T, Liu XD, Wang WF, Feng HY. Fungal diversity of brick murals with salt efflorescence and their surroundings in different ancient tombs[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2091-2104 (in Chinese)  
马文霞, 武发思, 田恬, 马燕天, 向婷, 刘贤德, 汪万福, 冯虎元. 墓室酥碱砖壁画及其环境的真菌多样性分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2091-2104
- [14] Ma WX, Wu FS, Tian T, He DP, Zhang Q, Gu JD, Duan YL, Ma DX, Wang WF, Feng HY. Fungal diversity and its contribution to the biodeterioration of mural paintings in two 1700-year-old tombs of China[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2020, 152: 104972

- [15] Guglielminetti M, De Giuli Morghen C, Radaelli A, Bistoni F, Carruba G, Spera G, Caretta G. Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescos of the monastery of St Damian in Assisi[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1994, 33(3): 269-283
- [16] Bastian F, Alabouvette C, Jurado V, Saiz-Jimenez C. 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, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 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] Alonso L, Pommier T, Kaufmann B, Dubost A, Chapulliot D, Doré J, Douady CJ, Moëne-Loccoz Y. Anthropization level of Lascaux Cave microbiome shown by regional-scale comparisons of pristine and anthropized caves[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(14): 3383-3394
- [19] Sterflinger K. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2010, 24(1/2): 47-55
- [20] Kakakhel MA, Wu FS, Gu JD, Feng HY, Shah K, Wang WF. Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: a review[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 143: 104721
- [21] Wu FS, Wu GW, Liu Y, Tian T, Zhang GB, He DP, Xu RH, Zhao LY, Feng HY, Wang WF. 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, 田恬, 张国彬, 贺东鹏, 徐瑞红, 赵林毅, 冯虎元, 汪万福. 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
- [22] Leplat J, François A, Boust F. *Parengyodontium album*, a frequently reported fungal species in the cultural heritage environment[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2020, 34(3): 126-135
- [23] Tsang CC, Chan JFW, Pong WM, Chen JHK, Ngan AHY, Cheung M, Lai CKC, Tsang DNC, Lau SKP, Woo PCY. Cutaneous hyalohyphomycosis due to *Parengyodontium album* gen. et comb. nov.[J]. *Medical Mycology*, 2016, 54(7): 699-713
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599
- [25] Wu FS, Wang WF, He DP, Chen GQ, Ma YT, Zhang GB, Zhang XD, Feng HY. 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, 陈港泉, 马燕天, 张国彬, 张晓东, 冯虎元. 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
- [26] 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
- [27] 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
- [28] Griffin PS, Indictor N, Koestler RJ. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment[J]. *International Biodeterioration*, 1991, 28(1/4): 187-207
- [29] Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems[J]. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2005, 1(4): 307-320
- [30] Zhang BL. Research on the preventive control of mould disease in Dunhuang murals[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiaotong University, 2012 (in Chinese)  
张曷林. 敦煌壁画霉菌病害的防治研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2012
- [31] Langsrud S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp.[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 95(4): 874-882
- [32] Cortesia C, Lopez GJ, De Waard JH, Takiff HE. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(12): 2574-2581
- [33] Bastian F, Alabouvette C. Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: the case of Lascaux Cave[J]. *International Journal of Speleology*, 2009, 38(1): 55-60
- [34] McBain AJ, Ledder RG, Moore LE, Catrenich CE, Gilbert P. Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3449-3456
- [35] Ge QY, Pan XX, Li Q, Pan J, Guo H. Application of ATP-bioluminescence method for the evaluation of biocides used for cultural heritage conservation[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2014, 26(4): 39-46 (in Chinese)  
葛琴雅, 潘晓轩, 李强, 潘皎, 郭宏. ATP生物发光法在文物抑菌剂效力检测中的应用[J]. *文物保护与考古科学*, 2014, 26(4): 39-46

- [36] 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 and Applied Microbiology*, 2001, 24(3): 417-422
- [37] Diaz-Herrera M, Jurado V, Cuezva S, Laiz L, Pallecchi P, Tiano P, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order *Rhizobiales*[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3610
- [38] Li YH, Huang Z, Petropoulos E, Ma Y, Shen Y. Humidity governs the wall-inhabiting fungal community composition in a 1600-year tomb of Emperor Yang[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8421
- [39] Li YH, Feng YM, Kong ZY, Hokoi S. Optimization and assessment of the protective shed of the Eastern Wu Tomb[J]. *Energies*, 2020, 13(7): 1652
- [40] Wen SJ. A brief analysis of the environmental control in Xuxianxiu tomb in North Qi, Taiyuan[J]. *National Geographic*, 2015(9): 232-233 (in Chinese)  
温少杰. 浅谈太原北齐徐显秀墓的环境控制问题[J]. *华夏地理*, 2015(9): 232-233
- [41] Yun YL, Wang J. Scientific analysis of the mural pigments from Xu Xianxiu's tomb of the Northern Qi dynasty[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2020, 32(4): 16-25 (in Chinese)  
员雅丽, 王江. 北齐徐显秀墓壁画颜料的科学分析[J]. *文物保护与考古科学*, 2020, 32(4): 16-25
- [42] Tian T. Bacterial diversity in air and mural paintings and mechanistic of *Naumannella cuiyingiana* response to lead pigments from the Xu Xianxiu's Catacomb[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou University, 2018 (in Chinese)  
田恬. 北齐徐显秀墓葬空气和壁画表面细菌多样性及萃英诺曼菌遇铅色变机制研究[D]. 兰州: 兰州大学博士学位论文, 2018
- [43] Tian T, Wu FS, Ma YT, Xiang T, Ma WX, Hu WG, Wu GW, An LZ, Wang WF, Feng HY. Description of *Naumannella cuiyingiana* sp. nov., isolated from a ca. 1500-year-old mural painting, and emended description of the genus *Naumannella*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(8): 2609-2614