

定陶汉墓出土汉砖表面及其储存环境真菌病害的分析与防治

王玲^{#2}, 王宇^{#1}, 杨昕雨¹, 王岑¹, 李程浩³, 崔圣宽³, 潘皎^{*1}

1 南开大学生命科学学院, 天津 300071

2 定陶王陵保护研究中心, 山东 菏泽 274100

3 山东省文物考古研究院, 山东 济南 250001

王玲, 王宇, 杨昕雨, 王岑, 李程浩, 崔圣宽, 潘皎. 定陶汉墓出土汉砖表面及其储存环境真菌病害的分析与防治[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2515-2526

Wang Ling, Wang Yu, Yang Xinyu, Wang Cen, Li Chenghao, Cui Shengkuan, Pan Jiao. Analysis and prevention of fungal deterioration on the surface and in the storage environment of bricks unearthed from the mausoleum of Dingtao King[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2515-2526

摘要:【背景】定陶王墓地 M2 汉墓出土了一批处于防护层的重要汉砖, 目前部分汉砖表面出现了真菌病害问题。【目的】根据现场文物保护状况, 选取了 5 块汉砖表面的微生物病害样本, 检测并分析了汉砖表面的真菌病害, 将分离得到的 7 株真菌进行抑菌试验。【方法】使用扫描电镜观察、高通量测序、纯培养和抑菌试验等方法对样本中的真菌进行分析。【结果】发现未经抑菌处理的汉砖表面真菌病害问题严重, 经 75%乙醇和 0.5%硝酸咪康唑处理过的汉砖表面真菌病害问题减弱。汉砖上的主要真菌不同, 汉砖 9 表面含量最多的真菌为 *Boeremia*, 汉砖 13 表面含量最多的为虫草科(*Cordycipitaceae*)。然而硝酸咪康唑和硼酸硼砂并无抑菌效果, 抑菌产品 K100 (2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮)具有较好的抑菌效果。【结论】本研究对分析和防治汉砖表面的真菌病害及对汉砖进行科技保护具有重要意义。

关键词: 定陶汉墓; 文物汉砖; 真菌病害; 抑菌试验

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(19JCZDJC33700)

#对本文贡献相同

Supported by: Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (19JCZDJC33700)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: panjiaonk@nankai.edu.cn

Received: 2021-12-09; Accepted: 2022-03-23; Published online: 2022-04-02

Analysis and prevention of fungal deterioration on the surface and in the storage environment of bricks unearthed from the mausoleum of Dingtao King

WANG Ling^{#2}, WANG Yu^{#1}, YANG Xinyu¹, WANG Cen¹, LI Chenghao³, CUI Shengkuan³, PAN Jiao^{*1}

1 School of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 Protection Research Center of the Mausoleum of the Dingtao King, Heze 274100, Shandong, China

3 Shandong Provincial Institute of Cultural Relics and Archaeology, Jinan 250001, Shandong, China

Abstract: [Background] Many protective bricks of the M2 mausoleum of Dingtao King have been unearthed, and some have suffered from fungal deterioration. [Objective] In this study, samples from the surfaces of five bricks were collected to examine and analyze the fungi in them. In the meanwhile, fungistatic experiment was carried out on the isolated seven fungi. [Methods] We use scanning electron microscopy, high-throughput sequencing, pure culture, and fungistatic experiment to examine and analyze the fungi in samples. [Results] The result suggested serious fungal deterioration on the surfaces of artifact bricks without fungicide treatment and alleviation of the deterioration on the surfaces after treatment with 75% ethanol and 0.5% miconazole nitrate. Fungal species were different depending on the bricks. To be specific, *Boeremia* was most abundant on brick 9 and *Cordycipitaceae* dominated brick 13. It was found that miconazole nitrate and the mixture of boracic acid and borax failed to inhibit the fungi, while the fungistatic product K100 (2-methyl-4-isothiazolin-3-one) was effective on them. [Conclusion] This study is of great significance for the analysis and control of fungi on the surfaces of bricks and for protection of bricks of artifacts.

Keywords: mausoleum of Dingtao King in Han Dynasty; bricks as cultural relics; fungal deterioration; fungistatic test

文物是人类在社会活动中遗留下来的具有重要历史、艺术、科学价值的遗物和遗迹,对研究人类文明和历史发展具有十分重要的意义。墓室砖作为常见的文物类型,通常埋藏在墓室的四壁及顶部,是记载和传承历史的重要载体。由于长期的地下水浸泡、出土后环境的变化和不适合的储存保护方法,导致部分定陶汉墓汉砖表面产生了裂纹,甚至有断裂和剥落的情况,砖石表面文字符号也出现了不同程度的损坏。同时,汉砖表面的微生物病害问题也不容忽视。微生物无处不在,由于其代谢能力强、生长繁殖旺盛,部分真菌已经在汉砖表面

大量生长,对汉砖的保护具有潜在的威胁。目前有文献报道,我国许多砖石文物和古建筑遗址都受到不良环境或者人为的破坏,其中生物病害也会给此类文物带来不同程度的破坏作用。例如:我国七大古城墙之一的寿县古城墙出现了砖体粉碎、表面剥落及表面盐分结晶等病害^[1];西安城墙的古砖在上百年的露天环境侵蚀下,表面形成了不同程度的腐蚀痕迹和风化产物^[2];平遥古城城墙的古砖已经出现了濒危程度的病害,病害类型以风化、水渍、盐害、人为破损面、人为补砌和裂隙等为主,出现了酥碱和砖体掏蚀等严重的风化病害^[3]。白禹等^[4]

以平遥古城古砖为研究对象, 借鉴石质文物病害的分类体系, 对古砖文物的病害进行分类分级, 生物病害被列入一级病害类别中。在生物病害中, 微生物是破坏砖石文物和建筑遗址的重要因素之一。重庆南宋衙署遗址高台建筑基址主要受到了放线菌、霉菌等微生物的侵害, 病害面积大且可在砖体表面看到剥落与孔洞, 严重影响了遗址的艺术价值^[5]。甘肃省会宁县丁沟康湾墓画像砖也受到了产黄青霉的侵害, 微生物降解和分泌色素产生的霉斑严重影响了壁画的艺术效果^[6]。在吉林省集安市高句丽将军坟、陕西省宝鸡市麟游慈善寺、重庆大足石刻、澳门郑家大屋等露天砖石文物均受到了青霉菌、酵母菌等微生物的侵害^[7]。

位于山东省菏泽市定陶区马集镇大李家村西北约 2 000 m 处的定陶王墓地(王陵) M2 汉墓, 是目前我国已经发掘的“黄肠题凑”墓葬当中规模最大、保存最好、规格最高的一座^[8]。2010 年 10 月, 考古人员对该墓地进行了抢救性发掘和墓室内的初步清理。2013 年 4 月, 定陶圣陵湖汉墓考古项目入选“2012 年度全国十大考古新发现”, 定陶王墓地(王陵)于同年 5 月成为第七批全国重点文物保护单位^[9]。M2 汉墓顶部及四周均用汉砖垒砌作为防护砖层^[10]。作为珍贵的实物资料, 定陶汉墓出土的汉砖上均带有朱书、墨书、符号和戳印等, 这对进一步了解该墓的历史背景、西汉时期的史料与书法艺术的发展具有重要的意义^[11]。目前考古人员已经将 M2 汉墓顶部的砖拆卸分离, 并在库房中进行存放保护、拓印、补形和归样, 再进行进一步的研究。储存砖的库房东西长约 34 m, 南北长约 21 m; 库房平均温度为 25 °C, 变化范围在 17.3–31.3 °C 之间, 库房平均湿度为 72%, 变化范围在 34.4%–91.0%之间。砖均用方形的白色塑料盆盛放, 大部分排列存放在铁架上, 部分

堆放在库房开阔处。另有少数立放在库房外的研究室处进行保护和拓印处理, 工作人员已对部分砖进行补形(石灰、石膏、碳黑以一定比例调和制成补形剂)。此前保护人员曾用 75%乙醇、0.5%硝酸咪康唑溶液和 5%硼酸硼砂溶液等分别对库房储存砖的表面进行擦拭处理, 但汉砖表面的真菌病害仍然比较明显, 需要引起足够重视。

本文主要研究分析汉砖表面及其储存环境空气中的真菌菌群组成, 检测早期保护中心所使用的抑菌材料的抑菌效果, 并筛选出具有更好抑菌效果的抑菌剂, 为汉砖的保护提供解决方案。项目组前往定陶汉墓砖存放的库房进行了砖表面微生物菌斑采样和储存环境的空气采样, 并对库房中砖的储存环境的温度、湿度及通风情况进行了调查。针对采集的微生物样品, 研究内容主要分为两个部分: (1) 通过对采集样品进行扫描电镜观察、高通量测序分析、真菌分离纯化培养和分子鉴定, 基本掌握砖表面主要真菌菌群组成; (2) 在实验室的条件下检验库房前期使用的抑菌剂(硼酸硼砂和硝酸咪康唑)的抑菌效果, 并筛选更加有效和环保的抑菌剂, 以期对汉砖表面的病害真菌进行有效防治。

1 材料与方法

1.1 取样

1.1.1 文物本体取样

采样点为定陶汉墓的文字汉砖储存区, 位于山东省菏泽市定陶区。为了从定陶汉墓汉砖样品及场地中分离出主要病害真菌, 制备马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基进行真菌的分离培养。取样分三步进行: 首先, 用双面碳导电胶在汉砖表面黏贴真菌菌害进行扫描电镜观察; 然后, 将同一位置的微生物样本接种到 PDA 培

培养基中用于真菌的分离和培养。最后,在同一位置将足够多的样本用无菌手术刀刮到无菌 EP 管中,用于总 DNA 提取和生物多样性分析。共采集了 5 个样本(表 1 和图 1)。

1.1.2 空气取样

项目组在存放汉砖的库房的东、西、南、北 4 个点采集了仓库中的空气样本,对空气中的真菌菌群组成进行了分析。采用空气采样器,采样流速为 100 L/min,工作时间为 2 min。使用 PDA 培养基进行真菌采集、分离和鉴定。

1.2 主要试剂和仪器

DNeasy PowerSoil Kit, Qiagen 公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences 公司; NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit、T5 Direct PCR Kit, QsingKe 公司; TransTaq-TDNA 聚合酶、Euxyl[®]系列产品 K100, Lanxess 公司。

扫描电镜, HITACHI 公司; Quantus[™] Fluorometer, Promega 公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 空气采样器, 青岛众瑞智能仪器股份有限公司。

1.3 扫描电镜观察

使用碳导电胶黏取汉砖表面的菌斑样品,在玻璃干燥器中干燥,24 mA 电流喷金 300 s,利用扫描电镜观察。

1.4 高通量测序及分析

使用 DNeasy PowerSoil Kit 提取汉砖表面微生物样本的总 DNA,送至美吉生物公司测序。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量,用 NanoDrop 2000 测定 DNA 浓度和纯度;利用引物 SSU0817F (5'-TTAGCATGGAATAAT RRAATAGGA-3')和 1196R (5'-TCTGGACCTG GTGAGTTTCC-3')对 18S rRNA 基因 V5-V7 区

表 1 取样信息

Table 1 Sampling information

Sample No.	Sample characteristics
Z9	Dense white round small fungi plaques
Z10	The surface of bricks treated with 75% ethanol
Z11	Surface of bricks treated with 5% miconazole nitrate
Z12	Black fungi plaques
Z13	Bricks with text had small, dense, white, round fungi plaques

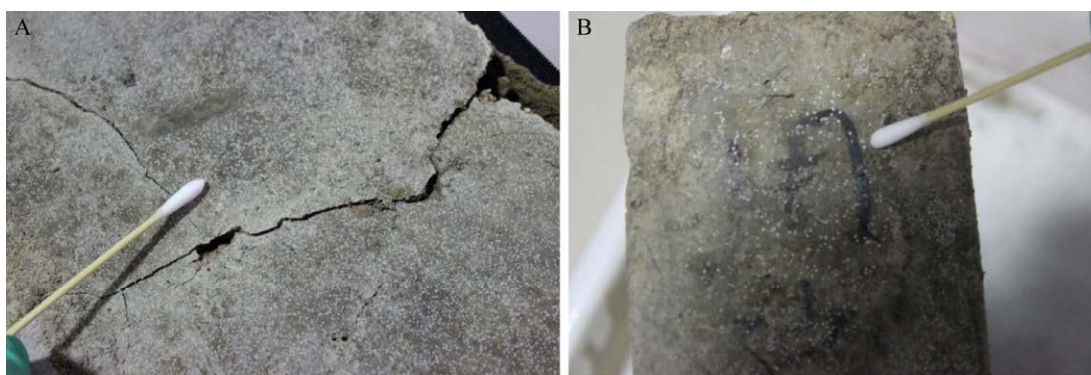


图 1 取样照片

Figure 1 Sampling photos. A: Z9; B: Z13.

进行 PCR 扩增。采用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行胶回收纯化, 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 Quantus™ Fluorometer 对回收产物进行检测、定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库, 用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行测序。使用 Fastp 软件对原始测序序列进行质控, Flash 软件进行拼接。利用 UPARSE 软件, 根据 97%的相似度阈值对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体。基于 Silva 18S rRNA 基因数据库(V138), 利用 RDP classifier 对 OTU 代表序列进行物种分类学注释, 设置置信度阈值为 0.7, 得到物种分类学注释结果。基于物种分类学注释结果, 利用 R 语言工具作图。基于物种分类学注释结果, 利用 Mothur 软件计算 α 多样性。原始测序数据在 NCBI Sequence Read Archive (SRA) 下载, 登录号为 PRJNA815459。

1.5 优势真菌的分离与鉴定

采用 PDA 培养基分离培养真菌。首先, 根据形态差异对库房空气样品中的真菌进行分类和计数。分离纯化形态差异显著的真菌并获得纯种, 通过 T5 Direct PCR Kit 提取菌株 DNA, 利用 ITS1/ITS4 引物扩增 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 真菌基因序列, 采用 TransTaq-TDNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): PCR 缓冲液(10 \times) 2.5 μ L, dNTP 混合物 2 μ L, 引物 ITS1 和 ITS4 (10 mmol/L)各 1 μ L, DNA 模板 3 μ L, TransTaq-TDNA 聚合酶 0.5 μ L, ddH₂O 15 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min 30 s; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 把纯化的 PCR 产物送金唯智生物科技有限公司进行测序, 利用 NCBI 在 BLAST 程序和 GenBank 数据库中进行序列同源性分析。真菌鉴定后, 用 ddH₂O 收集真菌的菌丝和孢子,

并将 1 mL 收集物保存在 500 μ L 的 60%甘油中, 在 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 小室培养

在平皿皿底铺一张略小于皿底的圆滤纸片, 放一 U 形玻璃棒, 在其上放置一个洁净载玻片, 盖上皿盖, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 30 min。取已灭菌的 PDA 培养基 6 mL 注入另一无菌平皿中, 使之凝固成 1 mm 薄层, 在超净工作台中用无菌刀切成 1 cm² 的琼脂块, 移至上述培养室中的载玻片上(每片放两块, 两端各放一块); 将孢子接种于琼脂块的边缘, 用镊子将无菌盖玻片覆盖在琼脂块上。在平皿的滤纸上加 3 mL 无菌的 50%甘油(用于保持平皿内的湿度)盖上皿盖, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d。从培养箱中取出载玻片在显微镜下观察并记录菌丝及孢子的形态特征。

1.7 滤纸片法抑菌试验

本实验采用的抑菌剂为 Euxyl[®] 系列产品 K100、硼酸硼砂(硼酸和硼砂 1:1 混合)和硝酸咪康唑。其中 K100 主要成分为 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(C₄H₅NOS), CAS 号为 2682-20-4; 硼酸分子式为 BH₃O₃, CAS 号为 10043-35-3; 硼砂分子式为 B₄H₂₀Na₂O₁₇, CAS 号为 1303-96-4; 硝酸咪康唑分子式为 C₁₈H₁₅C₁₄N₃O₄, CAS 号为 75319-48-1。实验菌株为在汉砖表面分离得到的真菌。首先利用棉签在 PDA 培养基划线培养菌株, 将滤纸片(直径 7 cm)放置在培养基的 4 个位置, 每个滤纸片加入 15 μ L 抑菌剂和阴性对照 ddH₂O, 然后放置在 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养。培养至第 3 天观察抑菌结果, 每个实验 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 扫描电子显微镜观察结果

分别在 5 块汉砖的表面用碳导电胶黏取样本, 通过扫描电子显微镜观察汉砖表面的微生物状况, 如图 2 所示, 结果显示汉砖 9、12、

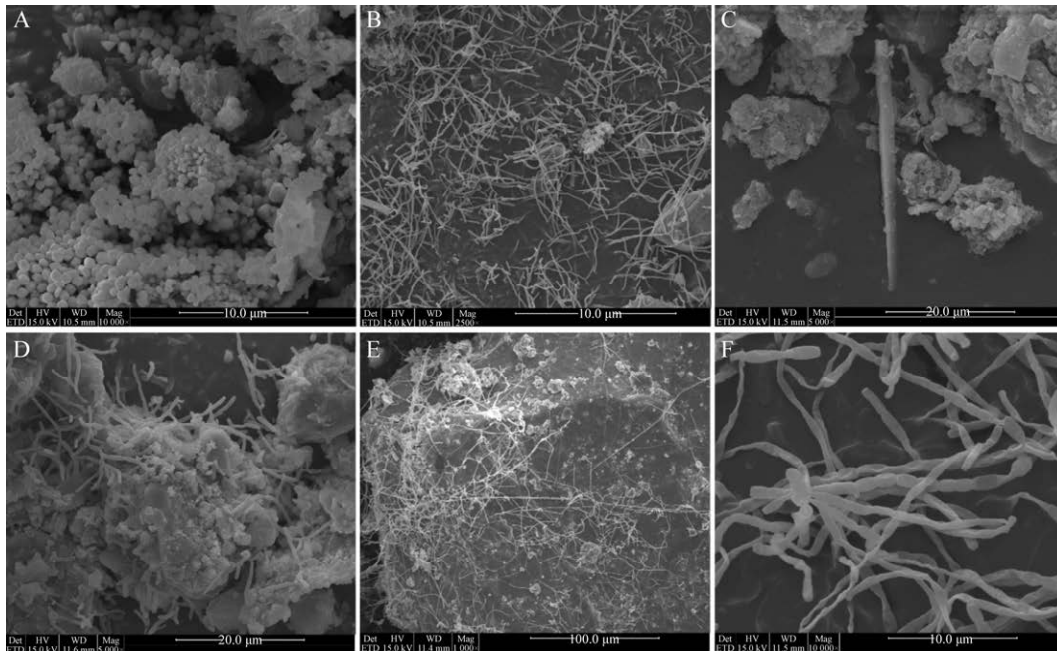


图 2 汉砖表面微生物样本扫描电镜结果

Figure 2 SEM results of microbial samples on the surface of cultural relic bricks. A, B: Z9; C: Z10; D: Z11; E: Z12; F: Z13.

13 表面有微生物存在,可以观察到菌丝和孢子;汉砖 11 表面仅有极少量的菌丝;汉砖 10 表面未观察到菌丝或孢子,其表面经过 75%的乙醇处理;汉砖 11 表面经过 5‰的硝酸咪康唑处理,实验室抑菌试验证明 5‰的硝酸咪康唑并不能有效地抑制病害真菌,因此汉砖表面依然会有微生物生长。汉砖 9、12、13 的表面未经过任何处理,因此真菌生长非常旺盛,严重影响了汉砖的外观。扫描电子显微镜下还可以看到真菌的菌丝生长到汉砖的内部,这可能会造成汉砖表面材料的剥离脱落,对汉砖造成严重的破坏作用。

2.2 微生物群落组成

选取了汉砖 9 和汉砖 13 表面的微生物样本进行高通量测序,测序结果如图 3 所示,可以看到两块汉砖表面的微生物存在着明显的差异,汉砖 9 占比最高的为 *Boeremia*, 达到了 44.23%; 其次分别为离蠕孢属(*Bipolaris*) (占比

为 24.23%)、枝孢属(*Cladosporium*) (占比为 22.25%)、缨霉属(*Thysanophora*) (占比为 3.86%)。然而汉砖 13 含量最高的则为虫草科(*Cordycipitaceae*)的一类,占比达到了 62.32%; 其次为肉座菌科(*Hypocreales*)的一类,占比为 10.05%; 另外,*Boeremia* 的占比为 7.68%, 缨霉属占比为 3.44%, 枝孢属占比为 2.94%, 镰刀菌属(*Fusarium*)占比为 2.52%, 离蠕孢属占比为 1.87%。

通过计算汉砖表面微生物的多样性指数,可以看到汉砖 9 的 Chao1、ACE、Sobs 指数均比汉砖 13 高, Simpson 指数比汉砖 13 低,这些结果均表明汉砖 9 的群落丰富度更高一些(表 2)。

2.3 纯培养结果

采用无菌棉签在每一块汉砖表面的菌斑处蘸取并分别涂布在 PDA 培养基上, 28 °C 培养 5 d 后获得纯培养物,通过形态学观察和分子鉴定确定了这些真菌的分类(表 3)。在汉砖 9 表

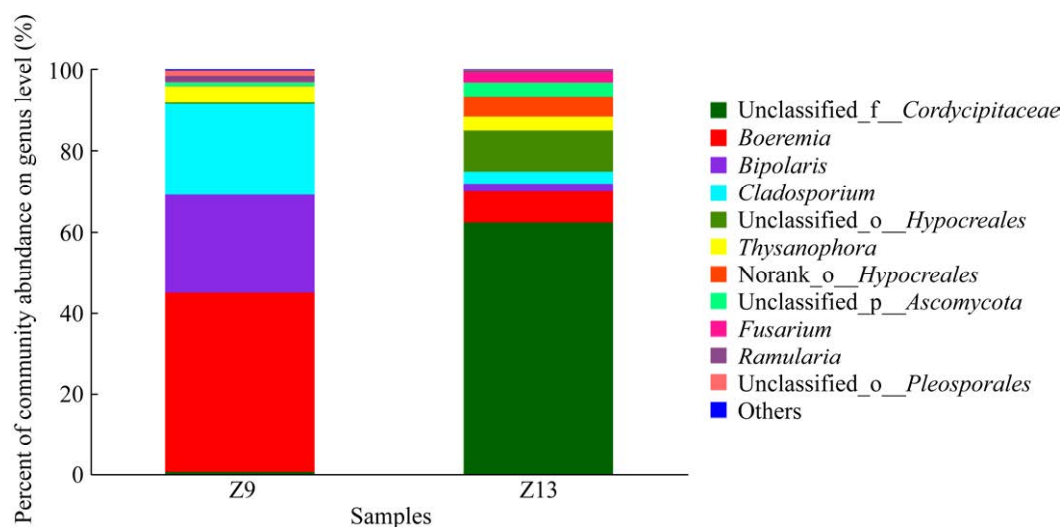


图3 汉砖表面微生物群落组成比较

Figure 3 Comparison of microbial community composition on the surface of cultural relic bricks.

面分离到了一株链格孢菌(*Alternaria* sp.), 汉砖 10 表面分离到了一株曲霉(*Aspergillus* sp.), 汉砖 11 表面分离到了一株产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和一株黑曲霉(*Aspergillus niger*), 汉砖 12 表面分离到了一株聚多曲霉(*Aspergillus*

sydowii)和一株链格孢霉(*Alternaria alternata*), 汉砖 13 表面分离到了一株镰刀菌(*Fusarium* sp.). 我们记录了它们的单菌落状态, 并通过小室培养和显微镜观察菌丝和孢子情况(图 4 和图 5)。

表2 汉砖表面真菌多样性指数表

Table 2 Table of fungal diversity indices of cultural relic bricks

Sample	Sobs	Simpson	ACE	Chao1	Coverage
Z9	26	0.305	809	26.960	37 26.5 0.999 963
Z13	24	0.404	558	25.236	67 25.0 0.999 965

表3 汉砖表面分离的菌株分子鉴定结果

Table 3 Molecular identification of strains isolated from surface of bricks

Source	Molecular identification results	GenBank accession No.
Surface of Z9	<i>Alternaria</i> sp.	OM967352
Surface of Z10	<i>Aspergillus</i> sp.	OM967351
Surface of Z11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	OM967253
Surface of Z11	<i>Aspergillus niger</i>	OM967255
Surface of Z12	<i>Aspergillus sydowii</i>	OM967256
Surface of Z12	<i>Alternaria alternata</i>	OM967257
Surface of Z13	<i>Fusarium</i> sp.	OM967258

2.4 空气微生物组成及比例

空气样本取样时的温度为 25 °C、湿度为 84.7%。将东南西北 4 个位点空气样本得到的所有真菌分离纯化、计数并鉴定种属, 采用 4 组数据的平均数值, 得到空气中真菌的种群比例。空气中含量最多的为灵芝属(*Ganoderma*), 占比为 55%; 其次为米枝孢菌(*Cladosporium oryzae*), 占比为 14%; 细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)和白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)分别占 8%和 7%; 黑曲霉占 5%; 其余还有枝状枝孢菌(*Cladosporium cladosporioides*)、草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、产黄青霉和粗毛栓菌(*Trametes hirsuta*)。

2.5 抑菌试验结果

采用滤纸片法抑菌试验验证了定陶汉墓目前使用的抑菌剂 0.5%硝酸咪康唑和 5%硼酸硼砂的抑菌效果, 并检测了抑菌剂 0.5% Euxyl®

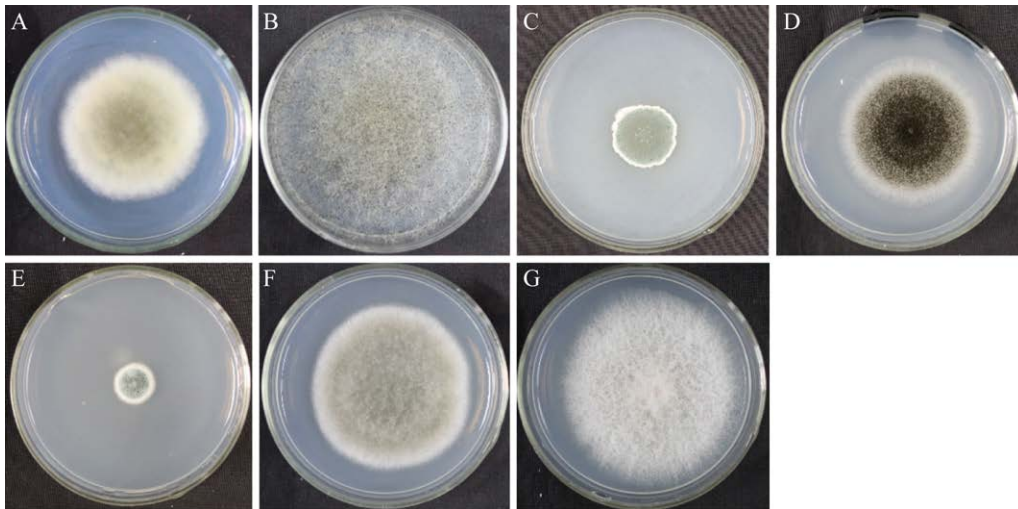


图4 汉砖表面分离菌株的单菌落照片

Figure 4 Single colony morphology of fungi isolated from surface of bricks (28 °C, 4 days). A: *Aspergillus niger*; B: *Aspergillus* sp.; C: *Aspergillus sydowii*; D: *Alternaria* sp.; E: *Alternaria alternata*; F: *Penicillium chrysogenum*; G: *Fusarium* sp..

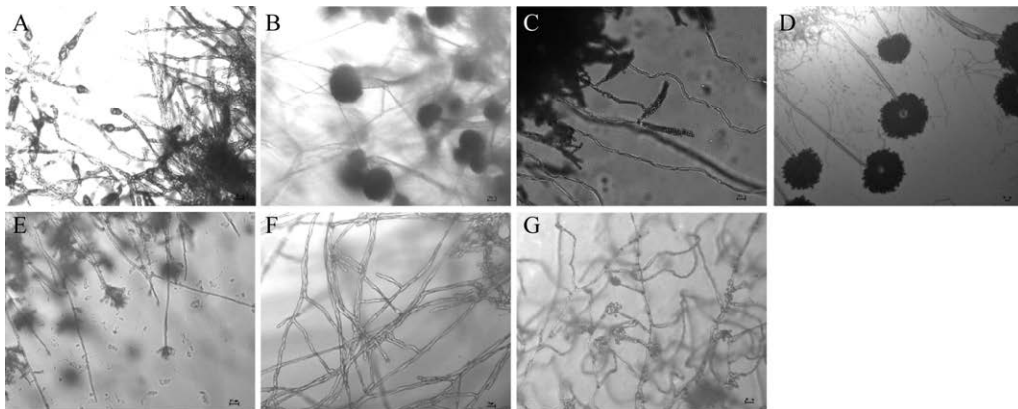


图5 汉砖表面分离菌株的显微照片

Figure 5 Micromorphology of fungi isolated from surface of bricks. A: *Aspergillus niger*; B: *Aspergillus* sp.; C: *Aspergillus sydowii*; D: *Alternaria* sp.; E: *Alternaria alternata*; F: *Penicillium chrysogenum*; G: *Fusarium* sp..

K100 的抑菌效果, 抑菌结果表明, 0.5%硝酸咪康唑和 5%硼酸硼砂对汉砖上分离的真菌无抑菌效果, 0.5% Euxyl® K100 对这 7 种真菌均具有很好的抑制效果(图 6)。

3 讨论

微生物病害问题是文化遗产保护中的一个

重要问题。在室内环境中, 真菌能够在相对较低的含水量条件下生长。此外, 当温度和湿度条件适宜时, 真菌孢子具有长期存活和生长的能力^[12]。目前汉砖所存放的库房平均温度为 25 °C, 变化范围在 17.3–31.3 °C 之间; 库房平均湿度为 72%, 变化范围在 34.4%–91.0%之间。这样的温湿度条件有利于真菌的生长。真菌可

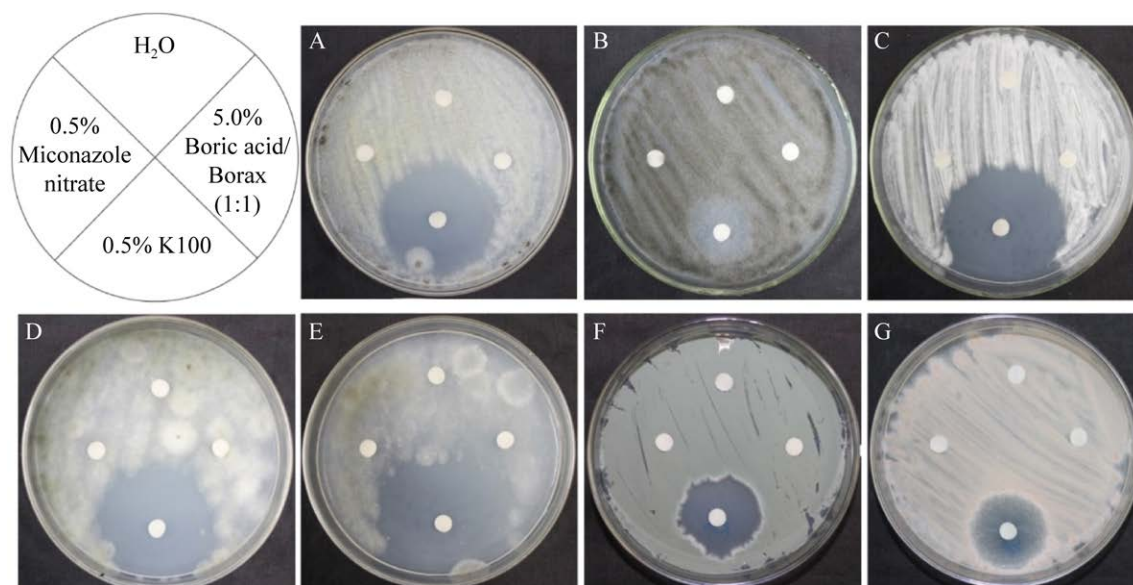


图 6 不同抑菌剂对汉砖表面真菌的抑制效果

Figure 6 Inhibitory effect of different bacteriostatic agents against fungi on the surface of bricks. A: *Aspergillus niger*; B: *Aspergillus* sp.; C: *Aspergillus sydowii*; D: *Alternaria* sp.; E: *Alternaria alternata*; F: *Penicillium chrysogenum*; G: *Fusarium* sp..

以通过分泌胞外酶来促进不同种类底物的降解,因此它们可以生长在各种材质的文物上^[13],例如古籍字画、木制沉船、石质建筑等。很多研究表明文物可以为微生物的定殖和生长提供理想的环境^[14]。本研究发现汉砖的表面也定殖了真菌,这些真菌不仅在汉砖表面形成菌斑而影响汉砖的外观,还有研究证明真菌可以分泌有机酸和氧化矿物中的阳离子,它们能够通过菌丝生长和生物腐蚀活动对石质文物内部产生影响,造成文物的破裂和剥落^[15-16]。马文霞等也发现墓室砖壁画受到了微生物的侵蚀和破坏^[17]。有研究表明真菌还会产生色素使文物表面变色,Vasanthakumar等在图坦卡门国王陵墓中发现了由微生物所产生的褐色斑点^[18]。此外,微生物还会分解保护文物所用的一些聚合物^[16];Sun等研究发现微生物会促进文物保护材料环氧树脂的降解^[19]。

本研究通过高通量测序检测到汉砖表面存在多种真菌,其中很多真菌被报道与文物病害相关。马文霞等发现青霉属、曲霉属、枝孢属等真菌在敦煌西晋墓、敦煌汉墓及甘肃省博物馆馆藏的嘉峪关五号墓这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存在且丰度较高,是较为明显的优势菌属,这一研究结果^[17]与本文类似。还有文献报道离蠕孢属会产生丰富的菌丝体^[20],菌丝体多不仅会在文物表面形成菌斑影响文物的外观,同时菌丝体还可能通过一系列生长机械力使一些汉砖的物理特性发生改变^[21]。枝孢菌属在文物表面和空气中均存在。据文献报道,枝孢菌属物种是室外和室内空气中最丰富的真菌之一,而且空气中发现的枝状枝孢菌是已有文献报道的安大略和亚特兰大房屋中最主要的真菌和室外空气中最丰富的真菌^[22-23]。2008-2009年在敦煌莫高窟

环境空气检测中^[24-25], 2019年在中国国家海洋博物馆中保存的唐代独木舟周围环境检测中^[26], 2019年和2020年在南海I号沉船储存环境空气检测中^[27]也都发现了枝孢菌属。枝孢菌能够降解纤维素, 会对木制和纸质文物造成极大的破坏^[28]。高通量测序分析发现镰刀菌在汉砖13上所占的比例较多, 并且在PDA平板上培养出的主要真菌均为镰刀菌, 说明镰刀菌是汉砖13表面主要的一种病害菌。南海I号主要的病害真菌也是镰刀菌^[24], 通过ITS序列比对发现这2株镰刀菌的相似性为84.29%。课题组还分离到了2株链格孢霉, 链格孢霉不仅是一种植物病原菌, 还会引起人类疾病^[29-30]。敦煌莫高窟^[25-26]和国家图书馆古籍书库^[31]的空气中检测出这类真菌。同时还分离出一些曲霉, 曲霉属是地球上最丰富、分布最广的生物之一, 可以产生大量的分生孢子来广泛传播^[32]。此外, 曲霉具有多种酶的产生能力, 可以在任何底物上定殖。因此, 其存在会对任何类型的艺术品构成潜在威胁^[33]。

通过扫描电镜观察发现经过处理的汉砖表面几乎不存在微生物, 而未处理过的汉砖表面长满了微生物, 甚至有些微生物的菌丝穿入到汉砖里对汉砖造成危害。在文物保护领域, 物理清洗是应用较为普遍的方法, 因为该方法冲击力小, 适合脆弱文物的保护, 不会造成文物表面材质的脱落, 对于清洗文物表面的灰尘和生物污染物等具有一定的效果^[34]。根据本研究结果, 建议考虑使用环保、有效的抑菌剂抑制汉砖表面的大面积真菌病害的生长, 并且同时考虑通过控制环境中的温度和湿度来抑制真菌的生长。目前库房是相对封闭的环境, 室内可通过配置温湿度控制仪来控制室内温、湿度在较低的水平从而有效抑制真菌的生长。

致谢: 感谢山东省菏泽市定陶区定陶王陵保护研究中心和山东省文物考古研究院的相关工作人员在课题研究过程中提供的帮助。

REFERENCES

- [1] 周双林, 高海彦, 王嘉堃. 寿县城墙砖的病害与其特性关系的初步分析[J]. 中国城墙, 2018: 186-196
Zhou SL, Gao HY, Wang JK. Preliminary analysis on the relationship between diseases and characteristics of Shouxian city wall brick[J]. Chinese city wall, 2018: 186-196 (in Chinese)
- [2] 张悦, 金普军, 王肃, 杨小刚. 西安城墙古砖表面风化病害及腐蚀机理研究[J]. 文博, 2019(4): 106-112
Zhang Y, Jin PJ, Wang Su, Yang XG. Studies on the mechanisms of the surface weathering disease and erosion of the bricks of the Xi'an City wall[J]. Relics and Museology, 2019(4): 106-112 (in Chinese)
- [3] 任志伟, 任建光, 胡翠凤. 世界文化遗产地平遥古城城砖病害调查研究[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 2021, 37(2): 115-120
Ren ZW, Ren JG, Hu CF. Investigation and research on brick diseases of Pingyao ancient city, world cultural heritage site[J]. Journal of Shanxi Datong University: Natural Science Edition, 2021, 37(2): 115-120 (in Chinese)
- [4] 白禹, 张中俭, 刘鹏辉, 冯智深. 古城墙古砖的病害分类[J]. 山西建筑, 2020, 46(1): 30-32
Bai Y, Zhang ZJ, Liu PH, Feng ZS. Disease classification of the ancient brick in ancient city wall[J]. Shanxi Architecture, 2020, 46(1): 30-32 (in Chinese)
- [5] 余腾飞. 重庆南宋衙署遗址高台建筑基址生物病害的防治[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2016
Yu TF. The prevention and control of biological diseases in Southern Song dynasty office ruin high building[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2016 (in Chinese)
- [6] 张艳杰, 陈庚龄, 俄军, 马文霞, 张东生, 季新燕, 刘芳. 甘肃会宁丁沟康湾墓画像砖真菌鉴定与组成分析[J]. 丝绸之路, 2016(10): 75-76
Zhang YJ, Chen GL, E J, Ma WX, Zhang DS, Ji XY, Liu F. Identification and composition analysis of fungi in portrait bricks of dinggou Kangwan tomb in Huining, Gansu province[J]. The Silk Road, 2016(10): 75-76 (in Chinese)
- [7] 冯楠, 王蕙贞, 严淑梅, 周铁, 朱泓. 四处砖石类文物的杀菌与封护[J]. 考古与文物, 2011(3): 108-109
Feng N, Wang HZ, Yan SM, Zhou T, Zhu H. Research

- on the biological control and conservation of stone relics in four circumstances[J]. *Archaeology and Cultural Relics*, 2011(3): 108-109 (in Chinese)
- [8] 马清林, 许言, 乔云飞, 詹长法, 沈大娟, 张秋艳, 刘忠平, 王乐乐, 成倩, 葛琴雅. “山东定陶王墓地(王陵) M2 汉墓保护工程”设计研究[J]. *中国文物科学研究*, 2014(4): 90-95
Ma QL, Xu Y, Qiao YF, Zhan CF, Shen DW, Zhang QY, Liu ZP, Wang LL, Cheng Q, Ge QY. Conservation project of the Dingtao King' mausoleum dated at the West Han dynasty, Shandong province, China: Organization and design[J]. *China Cultural Heritage Scientific Research*, 2014(4): 90-95 (in Chinese)
- [9] 刘自军. 饱水木质文物的微生物病害研究: 以南海I号沉船和定陶 M2 黄肠题凑汉墓为例[D]. 天津: 南开大学硕士学位论文, 2018
Liu ZJ. Studies on microbial contaminations of waterlogged wooden relics—taking the Nanhai No. 1 shipwreck and Dingtao M2 Huangchang ticou tomb as examples[D]. Tianjin: Master's Thesis of Nankai University, 2018 (in Chinese)
- [10] 吕书庆. 古代砖文概述[J]. *中国书法*, 2004(2): 52-60, 97
Lü SQ. An overview of ancient brick inscriptions[J]. *Chinese Calligraphy*, 2004(2): 52-60, 97 (in Chinese)
- [11] 盘霄远. 山东定陶灵圣湖汉墓墓主身份研究[J]. *赤峰学院学报(汉文哲学社会科学版)*, 2014, 35(2): 22-24
Pan XY. Study on the identity of the owner of the Han tomb in Linghu, Dingtao, Shandong[J]. *Journal of Chifeng University: Philosophy and Social Science Chinese Edition*, 2014, 35(2): 22-24 (in Chinese)
- [12] Vukojević J, Grbić MJ. Moulds on paintings in Serbian fine art museums[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4(13): 1453-1456
- [13] Sterflinger K, Piñar G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art: tilting at windmills?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(22): 9637-9646
- [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] De La Torre MA, Gomez-Alarcon G, Melgarejo P, Saiz-Jimenez C. Fungi in weathered sandstone from Salamanca cathedral, Spain[J]. *Science of the Total Environment*, 1991, 107: 159-168
- [16] Warscheid T, Braams J. Biodeterioration of stone: a review[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46(4): 343-368
- [17] 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
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)
- [18] 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
- [19] Sun ML, Zhang FY, Huang XD, Han YQ, Jiang N, Cui B, Guo QL, Kong MY, Song L, Pan J. Analysis of microbial community in the archaeological Ruins of Liangzhu city and study on protective materials[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 684
- [20] Cipollone J, Mourellos C, Sisterna M. First report of *Bipolaris zeicola* on barley worldwide[J]. *Crop Protection*, 2020, 135: 105188
- [21] 张国勇, 张欣, 王欢. 浅析石质文物微生物病害的清洗[J]. *邢台学院学报*, 2013, 28(1): 20-24
Zhang GY, Zhang X, Wang H. Analysis of microbial diseases in stone cultural relics cleaning[J]. *Journal of Xingtai University*, 2013, 28(1): 20-24 (in Chinese)
- [22] Fradkin A, Tobin RS, Tarlo SM, Tucic-Porretta M, Malloch D. Species identification of airborne molds and its significance for the detection of indoor pollution[J]. *JAPCA*, 1987, 37(1): 51-53
- [23] Horner WE, Worthan AG, Morey PR. Air- and dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6394-6400
- [24] Wang WF, Ma YT, Ma X, Wu FS, Ma XJ, An LZ, Feng HY. Seasonal variations of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(4): 309-315
- [25] Wang WF, Ma X, Ma YT, Mao L, Wu FS, Ma XJ, An LZ, Feng HY. Seasonal dynamics of airborne fungi in different caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(6): 461-466
- [26] Zhang FY, Li L, Sun ML, Hu CT, Zhang ZG, Liu ZJ, Shao HF, Xi GL, Pan J. Fungal community analyses of a pirogue from the Tang dynasty in the national maritime

- museum of China[J]. Applied Sciences, 2019, 9(19): 4129
- [27] Han YQ, Huang XD, Wang Y, Du J, Ma KX, Chen Y, Li NS, Zhang ZG, Pan J. Fungal community and biodeterioration analysis of hull wood and its storage environment of the Nanhai No. 1 shipwreck[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 11: 609475
- [28] 曾思泉, 凌娟, 林丽云, Manzoor Ahmad, 张燕英, 张颖, 董俊德. 1 株红树林来源枝孢属真菌的分离鉴定及纤维素酶性质分析[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(2): 37-42
- Zeng SQ, Ling J, Lin LY, Ahmad M, Zhang YY, Zhang Y, Dong JD. Isolation and identification of a *Gladaaporism* fungus from mangrove and its cellulase enzyme properties[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(2): 37-42 (in Chinese)
- [29] Abdul Wadud M, Das S, Atiqur Rahman Khokon M. Prevalence of the *Alternaria* blight of cumin (*Cuminum cyminum* L.) in Bangladesh: morphology, phylogeny and pathogenic variation of *Alternaria* spp.[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(10): 5865-5874
- [30] Didehdar M, Khoshbayan A, Vesal S, Darban-Sarokhalil D, Razavi S, Chegini Z, Shariati A. An overview of possible pathogenesis mechanisms of *Alternaria alternata* in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 155: 104905
- [31] 任珊珊. 古籍书库空气真菌种属调查[J]. 甘肃科技, 2020, 36(7): 81-82, 80
- Ren SS. A survey of air fungi species in ancient books[J]. Gansu Science and Technology, 2020, 36(7): 81-82, 80 (in Chinese)
- [32] Pangallo D, Kraková L, Chovanová K, Simonovicová A, De Leo F, Urzi C. Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(5): 2015-2027
- [33] Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*[J]. Studies in Mycology, 2014, 78: 141-173
- [34] Campagna BA, Kumar R, Kumar AV. Biodeterioration of stone in tropical environments: an overview[J]. APT Bulletin, 2000, 31(4): 57