

·调查研究·

舟山市博物馆文物库房空气中真菌多样性 及部分馆藏文物真菌污染情况

林吉恒¹, 乐艳², 黄朱梁¹, 孙瑛¹

1.舟山市食品药品检验检测研究院微生物检测室,浙江 舟山 316013;2.舟山市博物馆

摘要:目的 研究舟山市博物馆文物库房空气中的真菌多样性及部分馆藏文物的真菌污染情况。方法 于 2020 年初对博物馆 A1、A2 两个文物库房空气中真菌及 6 件有真菌病害的文物进行采样、培养、分离和鉴定,利用 MEGA5 软件构建系统发育树进行聚类分析。结果 从文物中分离出真菌 14 株,分别为 *Neanthostomella viticola*、鸡油曲霉、已拟盘多毛孢、辐毛鬼伞、粪壳菌、格孢腔菌、毕赤酵母、芦苇节菱孢、杂色曲霉变种、鸡油曲霉、杂色曲霉。从文物库房空气中分离出 14 株真菌,分别为 *Robbauera albescens*、芦苇节菱孢、齿梗孢属、铁艾酵母、菌核曲霉、杂色曲霉、曲霉属、桉树焦枯病菌、烟管菌。文物及库房空气中丰度最高的真菌均为曲霉属,达到 50%(7/14)。结论 本研究分离得到的真菌大多为可对文物产生危害的常见菌种,需采取高效快速的防治措施。

关键词:文物;库房;真菌;分离;鉴定

中图分类号:R122.2;R379 **文献标志码:**A

Fungal diversity in indoor air of storerooms and fungal contamination in some cultural relics of Zhoushan Museum

LIN Ji-heng*, LE Yan, HUANG Zhu-liang, SUN Ying

*Microbiological Testing Department, Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan, Zhejiang 316013, China

Abstract:Objective To study the fungal diversity and fungal contamination in conservation environment and some cultural relics of Zhoushan Museum. Methods We sampled, cultivated, isolated and identified fungi from some cultural relics and conservation environment A1, A2, using MEGA5 to assemble the phylogenetic tree of Pleurotus. Results Fourteen fungal strains were isolated from cultural relic surfaces of Zhoushan Museum, namely, *Neanthostomella viticola*, *Aspergillus cibarius*, *Pestalotiopsis cocculi*, *Coprinellus radians*, *Sordariomycetes* sp., *Pleosporeles* sp., *Meyerozyma guilliermondii*, *Arthrinium arundinis*, *Aspergillus subversicolor*, *Aspergillus cibarius*, *Aspergillus versicolor*. Fourteen fungal strains were isolated from the conservation environment, namely, *Robbauera albescens*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Scolecobasidium* sp., *Tilletiopsis albescens*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus* sp., *Calonectria pseudoreteauidii*, *Bjerkandera adusta*. *Aspergillus* sp. was the dominant fungi in cultural relics and indoor air of storerooms with abundance of 50%(7/14). Conclusion Most of these fungi can not only cause severe aesthetical damage to cultural relics, but also alter their material structures. Therefore, it is urgent that effective preventative and protective measures be taken.

Keywords: Cultural relics; Fungi; Isolation; Identification

舟山群岛四面环海,属亚热带海洋性季风气候,冬暖夏凉,温和湿润,光照充足,年平均气温约 16.7℃,年平均相对湿度为 79%,适宜各种生物群落的繁衍和生长,给微生物的生长提供了充足条件。舟山博物馆是舟山市唯一集收藏、保护、研究、展示和教育于一体的综合性博物馆,藏品总数 10010 件,按质地可分为书画、古籍、陶瓷、木器、金属、标本等 12 大类,其中书画、古籍、纺织品、竹木器和标本等有机质文物易遭受各种微生物的破坏。微生物在自然界中分布广泛,当条件适宜就会生长繁殖。传世至今的文物由于受自

身材质、保存环境等影响,极易受到微生物的侵蚀,导致文物腐朽分解甚至毁损,严重影响文物的整体价值。近年来,文博工作者对文物微生物病害进行了大量分析工作^[1]。文物库房作为文物的保存场所,其空气中微生物的污染状况直接影响文物质量,故对博物馆环境中微生物进行研究非常必要,目前很多博物馆已开展了此项工作^[2-4]。2020 年初,舟山博物馆文物库房内的部分文物有明显的菌斑出现,笔者针对这些菌斑及保存环境中的真菌进行采样、培养、分离与鉴定,以期今后的防治工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 1386A2 生物安全柜(赛默飞世尔科技有限公司),MLS-3780 高压蒸汽灭菌锅(三

基金项目:2021 年度舟山市科技计划项目(2021C31003)

作者简介:林吉恒(1986-),女,工程师,从事食品及药品等微生物检验检测研究。

洋工业株式会社),DM2500 研究级照相显微镜(德国徕卡仪器有限公司),KBF240 恒温恒湿培养箱(德国BINDER 公司),EHG-A 恒温摇床(江苏金坛市亿通电子有限公司),My Cyclor PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),Gel Doc XR 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,青岛海博高科园生物科技有限公司),沙氏葡萄糖液体培养基(SDB,青岛海博高科园生物科技有限公司),50 mol/L Tris-HCl (pH 8, 碧云天生物技术研究),10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA,pH 8,碧云天生物技术研究),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,麦克林生化科技有限公司),苯酚、氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司),RNaseA、Transtaq-TDNA 聚合酶、Trans 2K Plus DNA 标记、10×PCR 缓冲液、6×DNA Loading 缓冲液(大连宝生物工程公司),PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.2 馆藏文物样品中真菌的采集 2020 年初在舟山博物馆 A1、A2 库房内的部分囊匣(其内部保存的文物表面未出现霉斑)和文物上发现菌斑,故针对这 2 个库房内的菌斑进行采样分析,采样方式为用湿润的无菌棉签蘸取菌斑,再在 SDA 培养皿中划线培养。其中样品 a、b、c 分别取自 A1 库房,样品 d、e、f 分别取自 A2 库房。

1.3 馆藏文物保存环境空气中真菌的采集 采用自然沉降法^[9]采集 A1、A2 库房空气环境中的真菌,每个库房均设置 6 个 SDA 平皿,将培养皿暴露在空气中 10 min 后盖上皿盖,其中阴性对照不开盖。

1.4 真菌菌株的分离与纯化 将 1.2 和 1.3 节中取得的平皿于 28 ℃培养 5~7 d,逐日观察。挑取平板上所有单菌落,转移至另一 SDA 平板中进行分离纯化 2~3 次。纯化得到的菌株置于 4 ℃保存备用。

1.5 DNA 的提取 将纯化得到的真菌接种到 SDB 培养基中,28℃下 120 r/min 摇床培养 2 d,采用 CTAB 法^[6]提取 DNA。

1.6 ITS 序列的扩增 真核生物 ITS 序列(Internal Transcribed Spacer)具有广泛的序列多态性,即使是亲缘关系非常接近的两个物种在 ITS 序列上也会表现出差异,因此广泛应用于真核生物的鉴定^[7]。扩增真核生物 ITS 序列使用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')^[8]。

PCR 扩增反应体系:10×PCR 缓冲液 5 μl、2.5 mmol/L dNTP 混合物 4 μl、10 mmol/L ITS 12 μl、10 mmol/L ITS 42 μl、模板 DNA 2 μl、5 U/μl Transtaq-T DNA 聚合酶 0.5 μl、ddH₂O 34.5 μl,总体积 50 μl。PCR 扩增条件:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94℃ 45 s,退火 56 ℃ 45 s,延伸 72 ℃ 50 s,反应 35 个循环;延伸 72 ℃ 10 min。以高压灭菌的超纯水作为阴性对照。

1.7 PCR 产物测序及分析 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,将得到的 PCR 产物送上海生工生物工程股份有限公司进行测序,将测序结果提交到 GenBank,采用 NCBI Blast 功能(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对。之后利用 MEGA5 软件构建系统发育树,获得基于 ITS 序列的系统发育树系统发育方法对其进行物种鉴定,计算各真菌的相对丰度,并对结果进行分析。

2 结 果

2.1 分离纯化与形态观察 通过 2~3 次平板分离划线,从不同的文物表面共分离得到真菌 14 株,从 A1、A2 库房空气中共分离得到真菌 14 株。部分真菌菌落形态见封三图 1。

2.2 分子生物学鉴定结果分析 对获得的 28 株真菌 ITS 序列在 GenBank 中进行同源性比对,结果见表 1、表 2。本次采样的 2 个库房中污染文物共培养分离出真菌 14 株(ZSY-F1~F14),其中 A1 库房的文物 a 上分离得到的真菌为 *Neanthostomella viticola*、鸡油曲霉,文物 b 上分离得到的真菌为已拟盘多毛孢、辐毛鬼伞、粪壳菌、格孢腔菌,文物 c 上分离得到的真菌为毕赤酵母、芦苇节菱孢;A2 库房的文物 d 上分离得到的真菌为杂色曲霉变种,文物 e 上分离得到的真菌为鸡油曲霉,文物 f 上分离得到的真菌为杂色曲霉。A1 库房环境空气中分离出 5 株真菌(ZSK-F1~F5),鉴定结果为 *Robbauera albescens*、芦苇节菱孢、铁艾酵母、齿梗孢属等;A2 库房环境空气中分离出 9 株真菌(ZSK-F6~F14),鉴定结果为曲霉属(包括菌核曲霉、杂色曲霉)、桉树焦枯病菌、烟管菌等。

表 1 部分馆藏文物中 14 株真菌 ITS 序列相似性分析

馆藏文物 样品	序号	相似种	相似度 (%)
a	ZSY-F1	<i>Neanthostomella viticola</i>	98
	ZSY-F2	<i>Aspergillus cibarius</i> (鸡油曲霉)	100
b	ZSY-F3	<i>Pestalotiopsis cocculi</i> (已拟盘多毛孢)	97
	ZSY-F4	<i>Coprinellus radians</i> (辐毛鬼伞)	99
	ZSY-F5	<i>Sordariomyces sp.</i> (粪壳菌)	99
	ZSY-F6	<i>Pleosporales sp.</i> (格孢腔菌)	99
c	ZSY-F7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (毕赤酵母)	98
	ZSY-F8	<i>Arthrimum arundinis</i> (芦苇节菱孢)	100
d	ZSY-F9	<i>Aspergillus subversicolor</i> (杂色曲霉变种)	100
e	ZSY-F10	<i>Aspergillus cibarius</i> (鸡油曲霉)	100
f	ZSY-F11	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	98
	ZSY-F12	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	100
	ZSY-F13	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	100
	ZSY-F14	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	100

表 2 馆藏文物保存环境空气中 14 株真菌 ITS 序列相似性分析

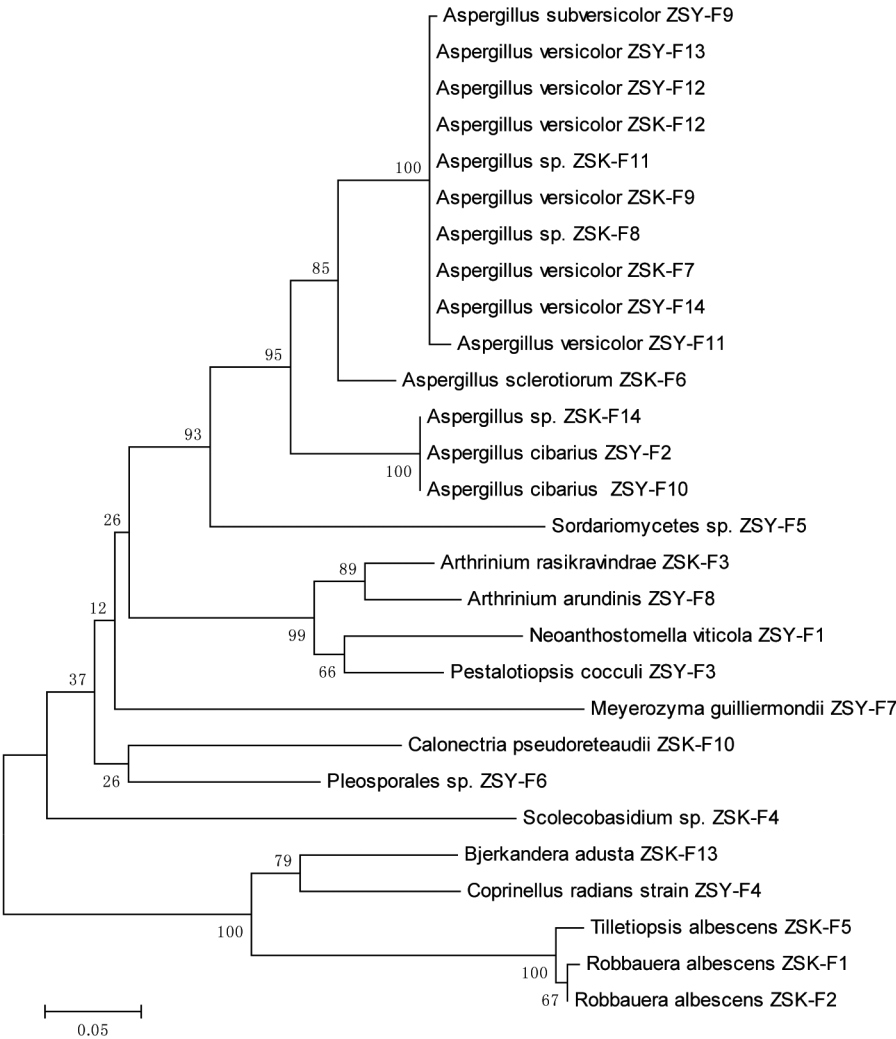
序号	相似种	相似度(%)
ZSK-F1	<i>Robbauera albescens</i>	96
ZSK-F2	<i>Robbauera albescens</i>	98
ZSK-F3	<i>Arthrinium rasikravindrae</i> (芦竹节菱孢)	100
ZSK-F4	<i>Scolecobasidium</i> sp.(齿梗孢)	99
ZSK-F5	<i>Tilletiopsis albescens</i> (铁艾酵母)	98
ZSK-F6	<i>Aspergillus sclerotiorum</i> (菌核曲霉)	100
ZSK-F7	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	99
ZSK-F8	<i>Aspergillus</i> sp.(曲霉属)	100
ZSK-F9	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	99
ZSK-F10	<i>Calonectria pseudoreteauidii</i> (桉树焦枯病菌)	99
ZSK-F11	<i>Aspergillus</i> sp.(曲霉属)	100
ZSK-F12	<i>Aspergillus versicolor</i> (杂色曲霉)	100
ZSK-F13	<i>Bjerkandera adusta</i> (烟管菌)	100
ZSK-F14	<i>Aspergillus</i> sp.(曲霉属)	99

2.3 库房空气中真菌多样性及部分馆藏文物真菌聚类分析结果 将分离得到 28 株真菌使用软件 MEGA5 进行菌群聚类分析, 真菌间的聚类进化关系

见图 2。从馆藏文物样品中分离得到的 14 株真菌中, 不同样品的受污染真菌既有关联性又保持相对独立性, 特别是曲霉属广泛存在, 而其他真菌则保持着所依附样品的独立性。结合保存环境中的真菌可知, 曲霉属在样品及空气环境中均保持着相对最高丰度, 且亲缘关系非常接近(如 ZSY-F9、11、12、13、14 与 ZSK-F7、8、9、11、12 之间, ZSY-F2、F10 与 ZSK-F14 之间)。此外, ZSK-F3 与 ZSY-F8 之间、ZSK-F13 与 ZSY-F4 之间也有很近的亲缘关系。如样品 a 的污染菌 ZSY-F2 与样品 e 的污染菌 ZSY-F10、A2 的空气污染菌 ZSK-F14 有高度的同源性, 但样品 a、e 分别位于 A1、A2 库房, 样品 b 的污染菌 ZSY-F4 与 A2 的空气污染菌 ZSK-F13 又有一定的同源性。

3 讨论

3.1 真菌污染的多样性分析 6 种馆藏文物样品中共分离得到真菌 14 株, 分别为 *Neoanthostomella viticola*、鸡油曲霉、已拟盘多毛孢属、辐毛鬼伞、粪壳菌、格孢腔菌、毕赤酵母、芦苇节菱孢、杂色曲霉变种、



注:分支点上的数字表示基于邻接法 1000 次重复取样数据集的 Bootstrap 支持率;比例尺表示 100 个核苷酸中有 5 个被替代。

图 2 部分馆藏文物及其保存环境空气中分离得到的 28 株真菌基于 ITS 序列的系统发育树

鸡油曲霉、杂色曲霉;其中相对丰度最高的为曲霉属,其丰度为 50%(7/14),其次为 *Neoanthostomella viticola*、已拟盘多毛孢属、辐毛鬼伞、粪壳菌、格孢腔菌、毕赤酵母、芦苇节菱孢,其相对丰度均为 7%(1/14)。博物馆馆藏文物保存环境空气共分离得到真菌 14 株,分别为 *Robbauera albescens*、芦苇节菱孢、齿梗孢属、铁艾酵母、菌核曲霉、杂色曲霉、曲霉属、桉树焦枯病菌、烟管菌;其中相对丰度最高的为曲霉属,其丰度为 50%(7/14),其次为 *Robbauera albescens*,其丰度为 14%(2/14),丰度最低的是芦苇节菱孢、齿梗孢属、铁艾酵母、桉树焦枯病菌、烟管菌,其相对丰度分别为 7%(1/14)。

本研究显示,无论是博物馆馆藏环境空气还是馆藏文物样品中分离得到的真菌,优势菌均为曲霉属。曲霉属广泛分布在谷物、空气、土壤和各种有机质物品中,主要以枯死植物、动物的排泄物及动物尸体为营养源,为寄生于土壤的腐生菌,约占空气中真菌的 12%,不仅在其他博物馆环境中常有检出^[9-11],作为典型的危害文物的霉菌,其在各类文物中也常有检出^[12-14]。尤其是对有机质地的文物危害更明显,除了在有机质文物如纸质文物上留下色斑外,更为严重的是可以分解纸质文物的构成材料纤维素。因此,其可对纸质文物造成不可逆转的具有破坏性的霉斑,在修复过程中建议彻底去除。杂色曲霉菌作为曲霉菌属的一种,是湿热的沿海地区和内陆常见的室内外致敏真菌^[15],对人体带来的潜在危害也不容忽视。节菱孢属^[16]、齿梗孢属^[17]、桉树焦枯病菌、烟管菌等均为常见的植物病害菌,这与文物本身材质属性有一定关系。

3.2 馆藏环境真菌污染防治的重要意义 真菌污染的预防和治理是一项相当棘手的工作,真菌特别是霉菌在常温下能存活很长时间,当环境相对湿度高于 70%时,即便是低温状态,霉菌也相当容易孳生。而霉菌孢子作为霉菌的一种生殖方式,其生产与相对湿度、空气流动及温度等因素息息相关,在温暖、潮湿的适宜条件下 24~30 h 即可产生孢子。且孢子对外界环境理化因素的抵抗力很强,不易被消灭。早在 1996 年,我国卫生标准就规定:博物馆的温度标准值为 18~28℃,相对湿度标准值为 45%~65%^[18]。该标准较多考虑了公众卫生、舒适程度,而较少考虑文物本身,因此陈元生等^[19]在 2002 年便提出了制定我国博物馆文物保存环境质量和质量分级的设想和建议,其建议文物保存环境为温度 19~24℃、相对湿度 35%~65%,其中纸张、金属保存相对湿度建议控制在 40%~50%,

上述温、湿度相比 1996 年的卫生标准要求更高。活性或处于休眠状态的霉菌孢子无处不在,所以应从预防角度来进行环境控制,通过控制存储环境的温、湿度、保持存储区良好的空气流通、做好日常维护等方式,使孢子处于永久的休眠状态,而达到预防发霉的目的。今后需继续加强库房温、湿度、污染气体和真菌等环境因素的长期监测,结合对发霉有机质文物材料成分分析与污染真菌的鉴定,为真菌防治工作提供科学依据。

参考文献

- [1] 李其久,陈娟,熊丽星,等.古籍《中庸大学》污染霉菌的鉴定及其纸质样品霉斑的祛除[J].辽宁大学学报(自然科学版),2019,46(4):294-299.
- [2] 雷琼,肖璇,马立安,等.荆州博物馆文物展陈环境中真菌数量及其群落特征[J].文物保护与考古科学,2019,31(2):68-76.
- [3] 唐欢,范文奇,王春,等.重庆中国三峡博物馆小环境空气微生物种属与数量的动态研究[J].文物保护与考古科学,2017,29(1):35-43.
- [4] Lech T, Ziembinska-Buczynska A. Evaluation of a modified sampling method for molecular analysis of air microflora [J]. Genet Mol Res, 2015, 14: 3200-3208.
- [5] 秦文韬,荣成博,宋爽,等.杏鲍菇栽培工厂空气微生物群落研究[J].生物技术,2020,30(6):579-583.
- [6] 张俊华,马玥,杨明秀,等.高效、快速提取高质量稻曲病菌基因组 DNA 方法[J].东北农业大学学报,2020,51(3):1-7.
- [7] 朱链,侯怡铃,白鑫,等.基于 ITS 序列对几株野生大型真菌的鉴定[J].西华师范大学学报(自然科学版):1-6. [2022-06-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1699.N.20211201.0840.002.html>.
- [8] 武发思,马文霞,贺东鹏,等.太原北齐徐秀墓壁画可培养真菌多样性及危害防治[J].微生物学通报,2021,48(8):2548-2560.
- [9] 田双娥.三种植物精油对博物馆空气霉菌的抑菌活性研究[J].文物保护与考古科学,2021,33(4):33-43.
- [10] 雷琼,肖璇,马立安,等.荆州博物馆文物展陈环境中真菌数量及其群落特征[J].文物保护与考古科学,2019,31(2):68-76.
- [11] 唐欢,江洁,范文奇,等.博物馆文物库房空气微生物污染情况调查[J].职业与健康,2015,31(15):2088-2092.
- [12] 张艳红,刘自军,刘根亮,等.天津博物馆文物库房部分文物与囊匣中霉菌的分离与鉴定[J].文物保护与考古科学,2019,31(2):61-67.
- [13] 闫丽,洪巍,吕晓芳.馆藏书画与丝织文物上霉菌的分离与分子鉴定研究[J].文物鉴定与鉴赏,2021,12(10):60-65.
- [14] 唐欢,王春,范文奇,等.馆藏纸质书画文物上霉菌的分离与鉴定[J].文物保护与考古科学,2015,27(2):40-46.
- [15] 董丹,关统伟,车振明.杂色曲霉最适生长条件及抗药性实验研究[J].中国酿造,2015,34(4):51-54.
- [16] 杨金燕,姜于兰,杨亚曦,等.中国新纪录种马来西来节菱孢的形态特征及其分子系统学分析[J].贵州农业科学,2015,43(9):98-99.
- [17] 姜于兰,王德凤.齿梗孢属真菌中产纤维素酶菌株的筛选[J].山地农业生物学报,2015,34(6):85-88.
- [18] GB 9669—1996. 图书馆、博物馆、美术馆、展览馆卫生标准[S]. 北京:1996.
- [19] 陈元生,解玉林.博物馆文物保存环境空气质量标准研究[J].文物保护与考古科学,2002,14(1):152-191.

收稿日期:2022-01-06 责任编辑:黄丽媛