傩戏展柜内霉变文物的菌株分离与鉴定*

Isolation, Identification of Moldy Cultural Relic Strains in the Nuo Opera Showcase

陈美均 马征 唐欢

Chen Meijun Ma Zheng Tang Huan

（“馆藏文物有害生物控制研究国家文物局重点科研基地”重庆中国三峡博物馆，重庆，400015）

（“Key Scientific Research Base of Pest and Mold Control of Heritage Collection”

Chongqing China Three Gorges Museum, Chongqing, 400015）

内容提要：馆藏有机质文物易受到环境中霉菌的污染与破坏，某博物馆在巡检过程发现傩戏展柜内出现部分文物霉变的现象，本研究对该批文物进行采样，分离鉴定获得23株霉菌；对该展柜进行空气微生物采样，获得7株霉菌。文物来源的23株菌株通过形态观察和分子生物学鉴定为9个属，主要以青霉属（*Penicillium*）、曲霉属（*Aspergillus*）、篮状菌属（*Talaromyces*）为主。展柜内空气微生物分离的7株菌株分属于曲霉属、青霉属、篮状菌属、烟管菌属（*Bjerkandera*）和色串孢属（*Torula*）5个属。本文明确了霉变文物的致病菌及文物保存环境中的污染菌，为文物霉害开展有针对性的防治工作提供基础依据。

关键词：空气微生物 展柜 霉菌 分子生物学 有机质文物

Abstract: The organic cultural relics in the collection are easily contaminated and destroyed by molds in the environment. During the inspection of the museum, some cultural relics were found moldy in Nuo opera showcase. In this study, 23 strains of mold were isolated and identified, and 7 strains of mold were obtained by air microorganism sampling. The 23 strains from cultural relics were identified as 9 genera by morphological observation and molecular biology, mainly *Penicillium*, *Aspergillus* and *Talaromyces*. The 7 strains isolated from air microorganism in the showcase are 5 genera, which belonged to *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Bjerkandera* and *Torula*. This paper has confirmed the pathogenic bacteria of moldy cultural relics and the pollution bacteria in the cultural relics preservation environment, which provides the basis for the targeted prevention and control of mildew in cultural relics.

Key Words: Air microorganism; showcase; mildew; molecular biology; organic cultural relics

* 本研究为国家重点研发计划“馆藏文物预防性保护风险防控关键技术研发示范（2020YFC1522500）”资助。

微生物病害是导致馆藏文物中纺织品、纸质、竹木漆器等有机质文物劣化和损毁的主要因素之一，有机质文物材料作为提供营养的培养基使微生物生长繁殖，进而破坏文物本体[1]。目前，馆藏文物有害微生物的来源主要有两个途径：一是文物本体所携带的污染，二是空气微生物的污染。空气中含有大量有生命的活体，如细菌、真菌和放线菌等，这些微生物浓度过高时，会造成博物馆内的环境污染，影响观众和工作人员的健康；同时空气中漂浮的微生物孢子可沉降在文物表面，当文物的材料基质与环境的温湿度、酸碱度等满足了沉积孢子生长条件，孢子就会萌发、生长、扩散，发达的菌丝体覆盖在文物表面，并向内部渗透吸收养分继而产生代谢物，这些代谢物不断侵入并腐蚀文物制品的内部结构，对文物造成不可逆转的损害[2]。因此，在了解文物表面有害微生物和其所处环境中空气微生物种属的基础上，分析二者之间的关联性，可为馆藏文物保存环境综合治理及文物霉变的预防治理提供科学依据和指导意义。

2020年末，某博物馆在例行文物巡检中发现，傩戏展柜内的部分面具和冠扎上出现明显的菌斑（图1）。该博物馆位于我国西南内陆地区，属亚热带湿润季风气候类型，素有“火炉”与“雾都”之称，夏季湿热、冬季凉爽，四季气候变化较大，日照不足，降水量较大，年均湿度70%—80%，高温高湿的气候环境，极容易发生反潮、微生物侵害等问题。傩戏是在民间祭祀仪式基础上，与当地的歌舞、戏剧相结合而形成的一种戏曲形式，其表演道具主要有面具和冠扎，面具木质，冠扎主要是棉麻等纺织品[3]，均为适合霉菌生长的有机质材料。为对该展柜内的文物及时实施保护处理，对展柜内环境进行了微生物净化。本文针对文物表面霉菌和该展柜的空气微生物进行了采样培养、分离与鉴定。

一、实验部分

（一）实验材料

供试培养基：沙保罗琼脂培养基（SDA），用以真菌的分离纯化。该培养基由重庆庞通医疗器械有限公司生产。

主要试剂：Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒、溶菌酶缓冲液、真菌通用引物ITS1（5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’）和ITS4（5’-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3’），上海生工生



图1 部分文物霉变病害特征

a. Nuo6，木质 b. Nuo7，木质 c. Nuo4，木质 d. Nuo5，木质 e. Nuo2，皮革 f. Nuo1，纺织品

物公司生产；Taq DNA聚合酶、Loading Buffer，TakaRa公司生产；乳酸酚棉蓝染色液，青岛高科技工业海博生物技术有限公司生产。

主要仪器：SW-CJ-IFD型超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司），KBF240型恒温恒湿箱（德国Binder），ZR2050型空气浮游菌采样器（青岛众瑞智能仪器有限公司），BK5000型生物显微镜（重庆奥特光学仪器有限公司），C1000型PCR扩增仪（美国Bio-Rad），Gel Doc 2000型凝胶成像仪（美国Bio-Rad）等。

（二）实验方法

1. 文物表面微生物的采集

傩戏表演用具展柜内的部分文物上出现成片霉斑，霉变病害特征见图1。针对文物上的霉斑进行采样分析，通过一次性无菌棉签单一方向蘸取菌斑，然后在SDA培养皿中划线，标明采样编号、采集时间，带回实验室分离培养。

2. 空气微生物的采集

使用ZR2050型空气浮游菌采样器，使用SDA培养皿进行采样，该取样器采样流量设置为10L/min，采样时长为5min（参照国标GB/T 18883—2002《室内空气质量标准》进行）。

3. 微生物的分离、纯化

将上述采集的样品SDA平板置于28℃，湿度80%培养箱中倒置培养72小时。观察菌落形态并对其编号，选择菌落形态、颜色不同的菌株，分别挑取单菌落进行划线培养，做好相应记录，分离纯化两三次。纯化得到的菌株置于–20℃保存备用。

4. 微生物的显微形态鉴定

观察菌株在SDA上的菌落形态，用解剖针从菌落的边缘挑取少量带有孢子的菌丝，放入载玻片上，用无菌水或乳酸酚棉蓝染色液作为镜检浮载液，参考病原真菌检测资料[4]，在光学显微镜下观察菌丝体、孢子的显微特征，并拍照记录。

5. 菌株的分子生物学鉴定

采用DNA抽提试剂盒提取真菌总DNA。真菌PCR的扩增采用ITS序列通用引物ITS1（5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’）和ITS4（5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’）。PCR扩增反应体系采用50 μL：10×PCR缓冲液5 μL、$MgCl_2$（25mM）5 μL，dNTP（2.5mM）4 μL、Taq酶（5U/μL）0.4 μL、上下游引物各1 μL、DNA模板2 μL、ddH_2O31.6 μL。PCR扩增程序为95℃预热3min，95℃变性60s，52℃退火30s，72℃延伸1min，进行35个循环，然后72℃终延伸10min。反应结束后，取PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测，然后送至上海生工生物公司进行纯化测序。

将测序所得的序列结果在NCBI中进行Blast比对，采用以下标准：s≥99%为同种，95%＜s＜99%为同属[5]，以此判断待测微生物的种属（s表示待测序列与数据库中序列的相似度）。

二、实验结果

（一）文物表面微生物的分离与鉴定

1. 文物表面微生物采集及分离纯化结果

通过分离培养，从木质、纺织品和皮革等8件文物表面分离纯化到23株真菌，具体的采样位置和分离情况见表1。其中有2个菌株（菌株1、2）从纺织品部位采集，4个菌株（菌株3—6）从皮革部位采集，17个菌株（菌株7—23）从木质部位采集得到。菌株在培养基上两三次划线纯化培养后，菌落特征各不相同。

2. 文物表面微生物显微形态鉴定结果

通过菌落形态观察发现这23株菌株的生长情况有较大差异，分属多种类别。所有菌株进行光学镜检，部分显微图片如图2所示。观察可知，a分生孢子顶端膨大，呈烧瓶状，上半部分或三分之二处产生孢子，为典型的曲霉属特征；b分生孢子梗光滑，帚状枝，由三四个轮生略散开的梗基构成，分属于青霉属；c分生孢子梗虽然也为扫帚状，但其为对称双轮生，且瓶梗为披针形，疑为篮状菌属；d只见

表1 文物表面微生物的采样和分离情况

文物编号	材质	分离菌株编号	分离菌株数量（株）
Nuo1	纺织品	1、2	2
Nuo2	皮革	3、4、5、6	4
Nuo3	木质	7、8	2
Nuo4	木质	9、10	2
Nuo5	木质	11、12、13	3
Nuo6	木质	14、15、16、17	4
Nuo7	木质	18、19、20、21	4
Nuo8	木质	22、23	2
总株数			23

大量菌丝；e分生孢子梗棕色，光滑，有隔膜，两三个分枝，具针状顶端，分生孢子从分生孢子梗的分枝侧向着生；f菌丝光滑具隔膜，橄榄褐色至褐色，分生孢子梗分化明显，顶端细胞膨大，合轴式延伸，疑似枝孢霉属；g菌丝呈褐色，分生孢子梗直立，无分枝；h显微镜下呈深棕至黑色，球形、近球形或卵圆形，不分隔，外有浓密的棕色附属丝，附属丝呈棕色，弯曲，疑为毛壳菌；i菌丝褐色，光滑，具有众多的圆柱状小齿，分生孢子产生于小齿上，椭圆形，无色。根据光学显微观察，可初步鉴定为青霉属、曲霉属、篮状菌属、枝孢属、毛壳菌等常见真菌。

3. 文物表面微生物分子生物学鉴定结果

对23株真菌的ITS序列与Genbank数据库中已知的序列进行同源性对比，依据比对结果，得到文物表面微生物的属种范围如表2。研究结果表明，鉴定出的真菌涵盖了9个属，主要有青霉属（*Penicillium*）、曲霉属（*Aspergillus*）、篮状菌属（*Talaromyces*）3个属，分别占分离总数的30.43%、26.09%、17.39%。其中青霉属的菌株以鲜红青霉（*P. chermesinum*）和咖啡青霉（*P. coffeae*）为主，曲霉属的菌株主要以杂色曲霉（*A. versicolor*）为主。其余属的菌株各有1株，包括了枝孢属（*Cladosporium*）、毛壳菌属（*Chaetomium*）、烟管菌属（*Bjerkandera*）、暗萨拉霉属（*Phaeoisaria*）、双聚散霉属（*Dicyma*）、*Toxicocladosporium*共6个属。

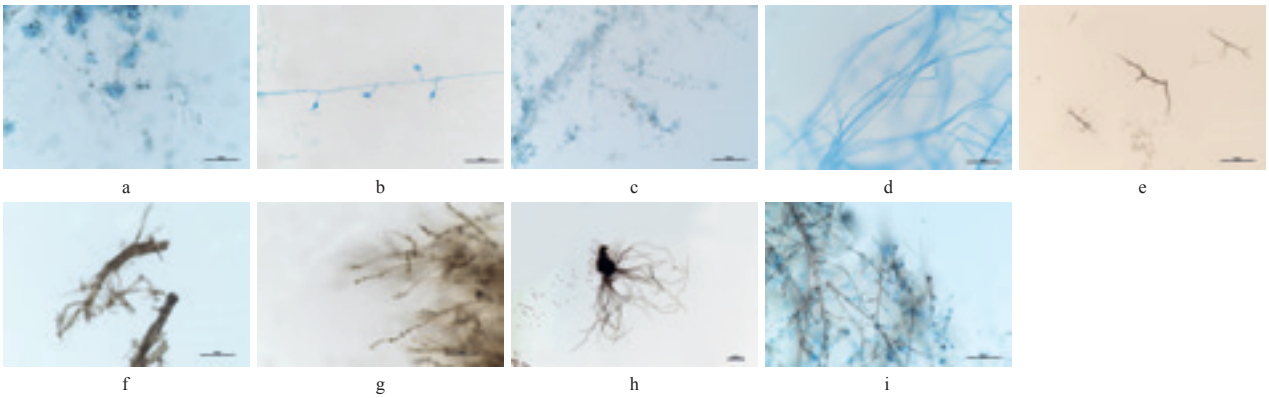

图2 部分文物表面微生物菌株的显微观察

a. 菌株16 b. 菌株12 c. 菌株6 d. 菌株5 e. 菌株9 f. 菌株11 g. 菌株19 h. 菌株20 i. 菌株23

表2 文物表面微生物的分子生物学鉴定结果

编号	种属	同源菌株	序列编号	相似性/%
1	杂色曲霉	*Aspergillus versicolor*	MT102847	100
2	咖啡青霉	*Penicillium coffeae*	NR121312	99
3	鲜红青霉	*Penicillium chermesinum*	MK450679	100
4	鲜红青霉	*Penicillium chermesinum*	MN220649	100
5	烟管菌	*Bjerkandera adusta*	MT077148	100
6	红色篮状菌	*Talaromyces ruber*	MH595798	100
7	红色篮状菌	*Talaromyces ruber*	MH866048	100
8	局限曲霉	*Aspergillus restrictus*	MH855380	100
9	青褐双聚散霉	*Dicyma olivacea*	KF893287	100
10	黑曲霉	*Aspergillus niger*	MT152319	100
11	枝孢属	*Cladosporium* sp.	MK640598	100
12	鲜红青霉	*Penicillium chermesinum*	MH861332	100
13	红色篮状菌	*Talaromyces ruber*	MH860705	100
14	红色篮状菌	*Talaromyces ruber*	JX965239	100
15	鲜红青霉	*Penicillium chermesinum*	KJ767051	100
16	杂色曲霉	*Aspergillus versicolor*	MN782425	100
17	米曲霉	*Aspergillus oryzae*	MT230540	100
18	橘青霉	*Penicillium citrinum*	MT186193	100
19	*Toxicocladosporium*①	*Toxicocladosporium irritans*	MH857749	100
20	反卷毛壳	*Chaetomium convolutum*	MN341315	100
21	咖啡青霉	*Penicillium coffeae*	MK087643	99
22	杂色曲霉	*Aspergillus versicolor*	MT028083	100
23	暗萨拉霉属	*Phaeoisaria aquatica*	NR160592	97

（二）空气微生物的分离与鉴定

1. 空气微生物分离纯化结果

通过两三次的平板划线分离，从傩戏展柜的空气中共分离得到7株真菌。菌株在SDA上纯培养后，发现不同的菌株在培养基上呈现不同的菌落颜色和形态特征。G1霉菌菌落，毛绒状，呈黄绿色，有白色菌丝深入基质中；G2菌丝生长致密绒状，呈艾绿色，边缘白色；G3菌落，毛绒状，青灰色；G4菌落白色，初期菌落较薄，菌丝向上生长，刮取时，容易成片刮下；G5菌落质地为丝绒状，菌落初为浅黄橘青色，后期逐渐变褐；G6菌落初为白色，渐渐变成红色，边缘白色，菌丝不蓬松；G7菌落毛绒且致密，初期为白色，随着菌株生长，逐渐变为黄色、浅灰色。7株菌株培养72小时的平板菌落图片见图3。

2. 空气微生物显微形态鉴定结果

对这7株菌株进行光学显微观察，结果如图4。G1-a、G5-a顶端产生烧瓶形或近球形顶囊，表面有许多小梗，小梗上着生成串的球

① *Toxicocladosporium*属暂无对应中文名。



图3 空气微生物菌株在SDA上的培养形态（培养72h）

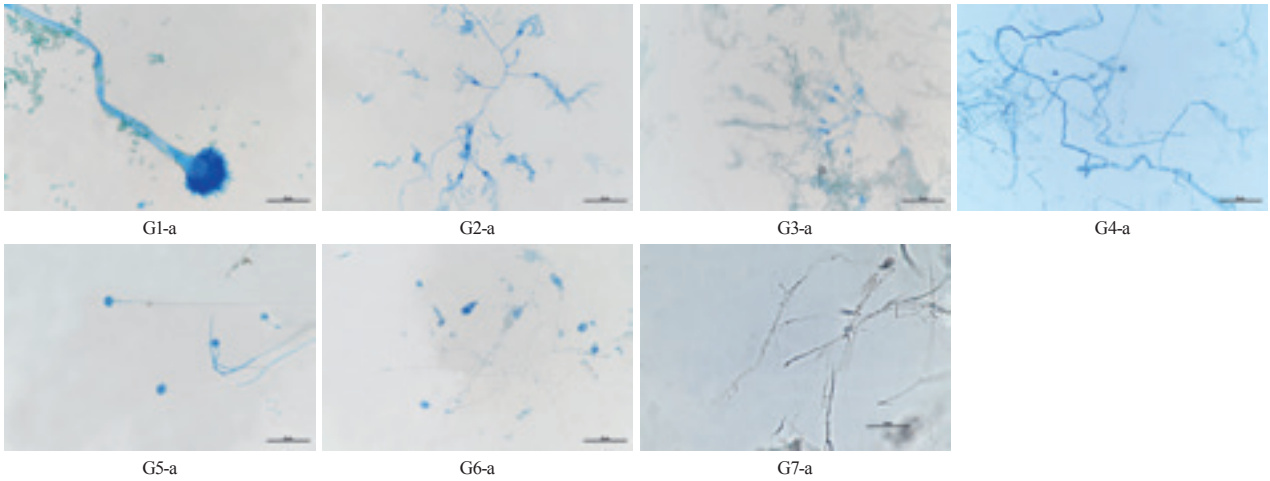

图4 空气微生物菌株的显微观察

形分生孢子，是典型的曲霉属特征；G2-a和G3-a分生孢子结构大量产生，帚状结构明显，为青霉属；G4-a与图2中的d结构相同；G6-a与图2中的c结构类似，虽可见明显扫帚状，但瓶梗为披针形，推测为篮状菌属；G7-a表生菌丝较为纤细，极淡褐色，具疣突，分枝，具隔膜。根据光镜结果，可初步鉴定空气微生物中主要有青霉属、曲霉属和篮状菌属。

3. 空气微生物分子生物学鉴定结果

把菌株测序获得的序列在Genbank中进行Blast比对，所有序列对应Genbank中已知的参考序列的同源性＞99%，具体比对结果见表3。7株菌株分属于曲霉属（*Aspergillus*）、青霉属（*Penicillium*）、烟管菌属（*Bjerkandera*）、篮状菌属（*Talaromyces*）和色串孢属（*Torula*），共5个属。

表3 空气微生物的分子生物学鉴定结果

编号	种属	同源菌株	序列编号	相似性/%
1	米曲霉	*Aspergillus oryzae*	MT230540	100
2	橘青霉	*Penicillium citrinum*	MT279452	100
3	鲜红青霉	*Penicillium chermesinum*	MK450679	100
4	烟管菌	*Bjerkandera adusta*	MK788323	99
5	溜曲霉	*Aspergillus tamarii*	MN339986	100
6	红色篮状菌	*Talaromyces ruber*	JX315667	99
7	昏暗色串孢	*Torula caligans*	JQ246356	100

三、讨论

从傩戏展柜内霉变的文物表面及展柜内的空气微生物调查情况来看，两种来源的菌株鉴定结果存在一定的关联性。

从文物表面分离的23株菌株，霉菌种属多样化，分别是曲霉属的杂色曲霉、局限曲霉、黑曲霉、米曲霉，青霉属的咖啡青霉、鲜红青霉、橘青霉，篮状菌属的红色篮状菌，烟管菌属的烟管菌，毛壳菌属的反卷毛壳，双聚散霉属的青褐双聚散霉，暗萨拉霉属，枝孢属和*Toxicocladosporium irritans*，共9个属14种菌。分析表明，曲霉属占总株数的26.09%，青霉属占总株数的30.43%，二者总占比56.52%，是文物采样样品分离霉菌的优势菌。而空气微生物采样结果中，筛选出7株优势真菌，结合形态学和分子生物学鉴定结果，发现这7株真菌分属于5个属7种不同的菌，曲霉属和青霉属为空气中的主要优势，占总分离株数的57.14%，菌株分别是曲霉属的米曲霉、溜曲霉，青霉属的橘青霉、鲜红青霉，篮状菌属的红色篮状菌，烟管菌属的烟管菌，色串孢属的昏暗色串孢。与文物表面分离的微生物结果相比，曲霉和青霉均为主要优势菌，这两类菌数量大、种类多、分布广，最易在空气中存在和文物上生长，这些结果均与前人研究结果基本一致[6, 7]。此外，从空气微生物分离到的7种优势真菌有5种都出现在文物表面。其中，文物表面分离的霉菌中鲜红青霉有4株，红色篮状菌有4株，杂色曲霉有3株，这三种菌占文物分离总株数的47.83%，且鲜红青霉和红色篮状菌都在空气中出现，可见该展柜环境下这两种微生物的污染情况较严重。此前鲜红青霉在霉变文物的分离鉴定研究中未见报道，本文是首次报道该菌引起文物霉变，目前对于该菌的生理生化和培养特性研究较少。本研究从展柜空气中、傩戏文物的皮革和木质部位均分离到该菌，尚不清楚是空气中鲜红青霉的孢子沉降到文物表面造成了文物霉变，还是文物自身所带的污染菌对展柜环境造成了污染，但由文物材质的有机成分分析可知，傩戏文物皮革中的蛋白和木质中的纤维素为其提供了适宜生长所需的营养物质，使其大量繁殖并对文物和环境造成了严重污染，相关的具体机制还需要在后续的研究中进一步揭示。

本研究从文物表面和空气微生物分离的菌株除常见的青霉属、曲霉属之外，篮状菌属居次。在李其久[8]的研究中从晚清书画裱件菌斑分离到一株霉菌，为篮状菌属。申艾君[9]也从馆藏竹木漆类的文物霉变斑点采样分离到篮状菌属。研究报道已知篮状菌广泛分布在空气、土壤和植物中，是一类适应性极强的腐生真菌，不仅能够产生高效率的木质纤维素酶，还能产生各种颜色鲜艳的色素[10]；而高活性木质纤维素酶和色素都极易腐朽文物、造成色素沉着等不可逆破坏。此外，从文物表面分离到的反卷毛壳、青褐双聚散霉、暗萨拉霉属菌株、枝孢属菌株和*Toxicocladosporium irritans*，这些菌株在空气中未分离到，可能是文物本体所带的污染菌。对于*Toxicocladosporium irritans*菌株，在前人Hamada和Abe[11]的研究中，从家用空调系内的鼓风机中，发现大量生长了*Toxicocladosporium*属和枝孢属等暗色真菌；而Kazuhiro和Hisayuki[12]也从家用空调的送风空气中分离到*Toxicocladosporium irritans*，且推测该菌广泛分布于环境中。对馆藏文物微生物病害研究中，田双娥[13]报道指出在广西民族博物馆的空气微生物中，占优势的主要是青霉属，枝孢属和曲霉属次之。张艳红[1]等从藏式皮箱上分离得到枝孢属和大量的毛壳菌属。已知毛壳菌属大量存在于自然界中各种含纤维素的基物上，是造成含纤维素材料生物降解的主要病害真菌之一[14]。这些研究也说明了本文所分离鉴定的大部分菌株在环境和馆藏文物上都曾出现过，即馆藏环境微生物常见菌株。在2009年许俊杰[15]首次报道了中国新记录属双聚散霉属（*Dicyma Boulanger*）和新记录中青褐双聚散霉（*D. Olivacea*），该菌株来自山东省沂源县沂山土壤，目前国内外对其研究鲜有报道；本研究从木质傩戏面具分离到的青褐双聚散霉菌株是该菌株第一次在文物上被发现。

四、总结

本文分别分离培养了文物表面微生物及文物对应保存环境中的空气微生物，通过对所得菌株进行形态学和分子生物学鉴定，明确了文物表面霉菌和空气中真菌的种类，通过对其相关性的分析，判断文物霉变的病因和环境污染情况。

文物表面霉菌和空气中的真菌种类存在相关性。实施文物保存环境的空气微生物净化，可有效阻断空气中孢子的传播蔓延，降低文物表面微生物污染源的数量，维持馆藏环境中生物因素的“稳定、洁净”。本研究结果为对馆藏环境实施空气微生物净化提供了理论支撑；同时，获得可培养的、来源明确的污染菌株，可为后续研发文物保存环境中的空气微生物净化剂和文物防霉剂提供靶标菌株。因此，本研究为馆藏环境控制和文物生物病害控制提供了更有针对性的筛选工具。

参考文献

[1] 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.

[2] 周宏湘. 纤维用防菌防霉剂的进展[J]. 现代纺织技术, 1994, 2(1): 40−46.

[3] 戴红霞, 陈忠猛. 傩戏研究现状[J]. 新疆艺术(汉文), 2020(3): 104−109.

[4] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[5] LANDEWEERT R, LEEFLANG P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 327−333.

[6] 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.

[7] 田金英, 王春蕾. 北京故宫文物霉菌调查研究[J]. 北方文物, 2002(3): 100−107.

[8] 李其久, 段大程, 刘辰澍, 等. 晚清书画裱件一株霉菌的鉴定及培养条件优化[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2018, 45(1): 59−63.

[9] 申艾君, 王明道, 刘康, 等. 馆藏竹木漆器类文物污染霉菌类群的鉴定与分析[J]. 河南科学, 2011, 29(8): 923−926.

[10] 孙剑秋, 阮永明, 金世宇, 等. 篮状菌属的重要性及其分类学研究概况[J]. 菌物研究, 2021, 19(2): 83−93.

[11] HAMADA N, ABE N. Contamination of air conditioners by thermophilic fungi[J]. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, 2016, 44: 395−402.

[12] KAZUHIRO H, HISAYUKI O, YUKI S, et al. Isolation of Simplicillium sympodiophorum and Toxicocladosporium irritans from the Blowout Air of Household Air Conditioners[J]. Biocontrol Science, 2021, 26(2): 105−111.

[13] 田双娥. 广西民族博物馆展柜空气中霉菌的分离及鉴定[C]//中国文物保护技术协会, 重庆市文化遗产研究院. 中国文物保护技术协会第九次学术年会论文集. 北京: 科学出版社, 2018.

[14] LJALJEVIC M, STUPAR M, VUKOJEVIC J, et al. Molds in museum environments: biodeterioration of art photographs and wooden sculptures[J]. Archives of Biological Sciences, 2013, 65(3): 955−962.

[15] 许俊杰. 中国一新记录属—双聚散霉属[J]. 菌物研究, 2009, 7(2): 66−67.