

# 纸质文物有害微生物监测方法研究

张 诺<sup>1, 2</sup> 郑冬青<sup>1, 2</sup>

[ 1. 纸质文物保护国家文物局重点科研基地（南京博物院），江苏南京，210016；2. 近现代纸质文献脱酸保护技术文化和旅游部重点实验室（南京博物院），江苏南京，210016 ]

**摘要** 为维护纸质文物的安全并保障保管人员的身体健康，本文通过文献调研和实验研究，从统计调查、样品采集及分子生物学鉴定三个方面系统地总结了纸质文物有害微生物监测的研究方法。本文还结合微生物防治的现状进行讨论，并提出建立长期的监测机制，发现潜在的微生物病源，为纸质文物的预防性保护提供科学依据。

**关键词** 纸质文物 微生物 监测

## 引 言

自古代纸张被发明制作以来，社会不断进步、变迁，纸张作为一种可长久保存的载体，详细记载了古代文明，对现代人类具有十分宝贵的研究意义<sup>[1]</sup>。当前，许多纸质文物都是采用纸质材料为载体进行保存的。纸质材质本身组成成分为保存纸质文物提出了较高的要求。年代久远的纸质文物容易遭受各种污渍的侵袭。其中，微生物是影响其保存与展示的重要因素之一，它可以以纸张为营养物质直接破坏材料，也可以生成代谢物直接污染载体。因此，当保管环境过于阴暗潮湿时，纸质文物更容易受到来自微生物的侵袭，最常见的就是在载体表面形成各种污斑<sup>[2]</sup>。同时，微生物代谢产生的各种代谢产物中包括各种有机酸，黏附上之后，就会使纸质文物一直处于一种低酸度的环境，并能在较短时间内大大降低纸张的牢固性能。据研究，纸张上霉菌病害种类可多达266种（105属）<sup>[3]</sup>。在常见的微生物中，霉菌以青霉、曲霉等分布广泛的菌属<sup>[4]</sup>为主；而细菌主要是球菌属和杆菌属<sup>[5]</sup>。受历史、经济条件及管理水平等多种因素的影响，我国各个地区在对纸质文物保护方面都存在着一定的差异。经济条件基础较好的地区，保管文物的物质条件较好，发生霉变现象可能性比经济条件差的地区也少。因此，研究纸质文物有害微生物的监测方法，及时掌握危害程度，对于及时采取防治措施、维护文物的安全并保障保管人员的身体健康，都有很重要的意义。

## 1 监测方法

### 1.1 统计调查

人类在科学研究中常与数据打交道，需要对特定的研究对象进行测量、记录并分析所得到的数

据。测量全部的对象既不现实也不可能，我们只能从全部研究对象中抽出一部分个体，通过对这一部分个体的研究来推断整体的情况，统计学研究的核心就是如何通过这一部分个体推断全体<sup>[6]</sup>。

抽样调查则为这一方法的基础，是指从调查对象的总体中抽取一定数量的样本，进而通过对样本的研究推断总体的方法。总体就是我们研究的全部对象；样本则为总体的一部分，样本内包含的个体数目为样本含量。在实际工作中，由于受时间、人力等资源的限制，往往不可能对总体中的每一个个体进行现状调查。因此，科学运用抽样调查法，不仅可以最大限度获得可信的样本信息，还节约了研究成本。通过对抽样调查获得的样本数据进行分析和统计推断，阐明总体的特征，这些可为科学防治纸质文物上有害微生物提供相应的依据。

抽样得到的样本应该是一个总体的缩影，应遵循随机原则。我国疆域辽阔，南北跨不同气候带，东西则从湿润到干燥，形成了全国气候复杂多样的特点。从总体中抽样的方法很多，各地区可结合当地的气候特点并根据抽样的组织形式选择适宜的方法。随机抽样法是指随机地抽取调查样本，可分为简单随机抽样法和分层随机抽样法。简单随机抽样法适用于样本数目较少、个体差异较小的总体；分层随机抽样法适用于总体情况复杂、样本个体差异较大的总体，需要先将总体分组再对各组进行简单随机抽样；除此之外，抽样的方法还有系统抽样法和典型抽样法<sup>[7]</sup>。这些抽样的方法可以单独使用，也可以联合使用。在对微生物污染程度进行调查时，记录的内容应包括当地的气候特点、库房的保管情况、被危害纸张年代和质地、采用何种方法防霉等，这些调查结果要能够反映有害微生物发生与危害情况。

## 1.2 样品采集

### 1.2.1 空气样品<sup>[8]</sup>

空气中微生物总数是指每立方米空气中微生物的总数，单位cfu/m<sup>3</sup>。测量空气中微生物总数有两种方法：沉降法和撞击法。空气中细菌总数的检测参照《医院消毒卫生标准》（GB 15982—2012），附录A（规范性附录）“采样及检查方法”，选择六级撞击式空气采样器为采样工具，选择具有代表性的位置为采样点，采用琼脂培养平板，将采样器置于0.8~1.5m高度进行采样，结果的评价参照《图书馆、博物馆、美术馆、展览馆卫生标准》（GB 9669—1996）进行比较，撞击法菌落数≤2500cfu/m<sup>3</sup>。空气中霉菌总数的检测参照《馆藏文物保存环境质量检测技术规范》（WW/T 0016—2008），附录E（规范性附录）“馆藏文物保存环境中霉菌总数的测定方法”，结果的评价参照《图书馆、博物馆、美术馆、展览馆卫生标准》（GB 9669—1996）进行比较，沉降菌落≤30个/皿。

### 1.2.2 本体样品

用湿润的无菌棉签在有污斑的位置轻柔旋转摩擦，随即将棉签涂抹至适宜微生物生长的无菌LB平板、PDA平板上进行培养。将LB平板恒温37℃培养，其间陆续在平板的棉签涂抹位置发现细菌菌落，随后采用平板划线法对细菌进行分离纯化（非棉签涂抹处生长的细菌视为操作污染，不列入后续研究）。将PDA平板恒温28℃培养，其间陆续在平板的棉签涂抹位置发现霉菌菌落，随后采用点培养法对霉菌进行分离纯化（非棉签涂抹处生长的霉菌视为操作污染，不列入后续研究）。后续参考相关专业资料进行分析，鉴定微生物种属。

### 1.3 分子生物学鉴定

在微生物病害研究上,早期主要通过微生物的纯培养并依据微生物的形态及生理生化特征对其进行鉴定。受培养条件的限制,微生物在常规条件下都是不可培养或者难培养的,而且纯培养得到的菌株并不一定为危害纸质文物的优势菌株<sup>[9]</sup>。随着分子生物学技术的发展,基于16S rDNA/18S rDNA的分子鉴定、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、原位荧光杂交(FISH)、高通量测序等技术被应用于微生物的相关研究,这些分子生物学技术已在一定的范围内得到应用。

作为分子生物学和信息技术的结合体,生物信息学在微生物群落组分分析研究方面也发挥了重要的作用。目前,与生物相关的数据资源有NCBI、EMBL等,将核酸序列上传到数据库就可以进行序列比对,并通过聚类分析、构建分子系统发育树可最终确定种属。同时,为了全面反映微生物群落的特征,Chao1指数和ACE指数可表达群落的丰富度;Shannon指数和Simpson指数可表达群落的丰富度和均匀度,此种分析方法适用于微生物免培养的高通量测序技术<sup>[10]</sup>。

## 2 研究案例

贵州省气候湿润、潮湿,绝大部分馆藏纸质文物受到微生物病害的侵染。本文以两家市级博物馆为调研对象,采用无损采样方法对随机抽取纸质文物的表面微生物进行采集、分离、纯化,并结合分子生物学技术对其类别进行鉴定分析,同时通过高通量测序来检验结果的可信度。

本研究案例所选取的纸质文物(1~9)为同一馆藏文物,纸质文物(10~19)为另一博物馆馆藏。文物为近现代、清朝和民国时期的作品,样本纸张含水率较高,pH偏酸性。实验中共分离得到33株细菌和42株真菌,通过鉴定实际得到16种细菌和8种真菌。细菌分属于9个属:假单胞菌属、动性球菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、伯克氏菌属、考克氏菌属、咸海鲜球菌属、葡萄球菌属和肠杆菌属。真菌分属于3个属:双聚散霉属、青霉属和曲霉属。分离鉴定得到的结果见表1,其中青霉属出现的频率为32%,双聚散霉属和曲霉属出现的频率各为26%,芽孢杆菌属出现的频率为21%,故可推测芽孢杆菌属、曲霉属、青霉属和双聚散霉属为优势菌属。

表1 微生物鉴定结果

微生物	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.7	No.11	No.13	No.14	No.15	No.17	No.18	No.19
假单胞菌属	○								○				
动性球菌属	○												
芽孢杆菌属		○					○				○	○	
类芽孢杆菌属						○							
伯克氏菌属			○	○									
考克氏菌属			○	○									
咸海鲜球菌属									○				
葡萄球菌属									○				○
肠杆菌属									○				
双聚散霉属	○		○	○	○		○						
青霉属	○	○				○	○	○	○				
曲霉属	○		○	○	○					○			

注:○表示此项检测出。

同时，也对一块残破碎片进行了高通量测序。测序结果如图1所示，细菌菌属主要是糖多孢菌属（17%）、乳球菌属（6%）、盐单胞菌属（2%）和芽孢杆菌属（1%），真菌菌属主要是曲霉属（73%）、青霉属（20%）和双聚散霉属（5%）。

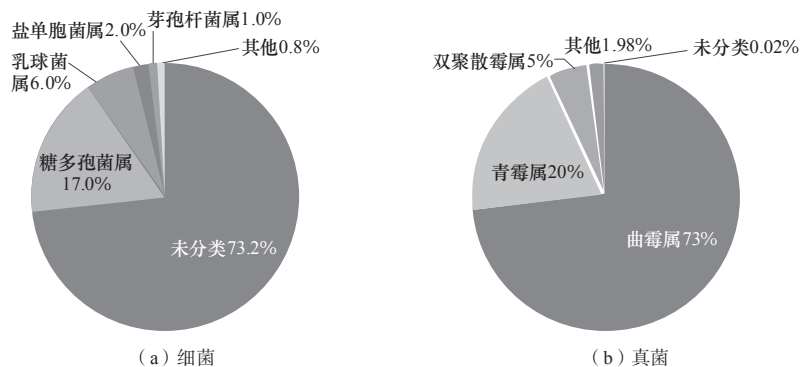


图1 高通量测序结果

### 3 讨 论

微生物病害在纸质文物中较为常见。微生物具有分布广、对环境适应能力强、代谢转换能力强、繁殖速度快等特点。微生物防治一直是文物保护的难点之一。开展纸质文物有害微生物监测，其目的是了解有害微生物的危害情况，研究制定防治措施，以及时控制微生物的蔓延。

近几十年来，国内外的专业人员对纸质文物上的微生物做了大量的科学研究，虽然大多数研究针对的是真菌，事实上细菌对纤维素的降解、纸张的酸化等现象的产生都起到一定的作用，两者应该是一种协同共生的关系。例如，细菌中的芽孢杆菌等在代谢中易产生甲酸、乙酸、丙酮酸<sup>[11]</sup>；细菌中的放线菌类群有降解木质素的能力；黑曲霉等真菌产生的纤维素酶可以水解纤维素的 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键<sup>[12]</sup>。这些微生物在载体材料上群居杂生，势必共同影响着纸张纤维的老化降解。

随着分子生物学技术的发展，微生物高通量测序可一次性从样品中获得数万条基因序列；变性梯度凝胶电泳技术可以研究微生物结构的时间空间变化，对长期监测工作十分必要；宏基因组技术解释了微生物在颜料上生长的原因。同时，随着预防性保护理念的日益深入，监测文物保存环境中空气微生物组成、控制环境中的微生物污染已成为近年来预防性保护研究的一个新方向，国内部分博物馆、图书馆和国外一些专业机构均开展了这方面的研究<sup>[13]</sup>。这些全新的视角促进了微生物防治和保护工作的推进。

本文从统计学和生物学的视角介绍了目前纸质文物有害微生物监测的方法。事实上，文物所处的环境不可能做到无菌，微生物防治工作的重点是“防”，如果防的工作做好了，“治”就不显得格格外重要。通过对微生物污染监测，评价微生物污染的状况，从控制保存环境的温湿度条件、控制孢子源头和使用相应的防霉剂等方面抑制微生物生长。此外，保管人员普遍欠缺微生物常识，这也间接造成了病害的传播。所以，建立微生物综合防治体系，就需要从诊病、治病、防病三个方面形成规范的长效管理制度，从而为科学有效解决微生物病害提供保障。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 杨春燕. 浅谈纸质文物的保护 [J]. 学理论, 2010, (10): 146-147.
- [ 2 ] 李伟. 纸质档案霉菌防治方法研究 [J]. 档案学研究, 2017, (1): 61-65.
- [ 3 ] Kowalik R, Sadurska I. Microflora of papyrus from samples of Cairo museums [J]. Studies in Conservation, 1973, 18 (1): 1-24.
- [ 4 ] 中国纺织品鉴定保护中心. 纺织品鉴定保护概论 [M]. 北京: 文物出版社, 2002: 154-157.
- [ 5 ] Li Y. Taking about the comparison of mildewproof effect of commonly used book antiseptics [J]. Sci-Tech Information Development and Economy, 2009, 19 (24): 98-99.
- [ 6 ] 杜荣骞. 生物统计学 [M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 1-2.
- [ 7 ] 陶琴. 档案有害生物监测技术 [J]. 中国档案, 2014, (7): 64-66.
- [ 8 ] 陶琴. 霉菌对档案的危害及其防治技术研究进展 [J]. 档案学通讯, 2013, (6): 90-93.
- [ 9 ] 王亚丽. 微生物分子生态技术在文物保护中应用的进展 [J]. 文物保护与考古科学, 2012, 24 (2): 108-111.
- [ 10 ] 周言君, 钟江. 古籍纸张表面微生物群落组成的初步研究 [J]. 复旦学报 (自然科学版), 2016, 55 (6): 707-714.
- [ 11 ] Pinzari F, Zotti M, Mico A D, et al. Biodegradation of inorganic components in paper documents: formation of calcium oxalate crystals as a consequence of *Aspergillus terreus* Thom growth [J]. Int-Biodeter Biodeg, 2010, 64 (6): 499-505.
- [ 12 ] 姚娜, 闫丽, 周文华, 等. 早期霉变纸币霉菌分离与鉴定研究 [J]. 中国纸币, 2015, (6): 44-48.
- [ 13 ] 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.