

一幅油画藏品微生物病害的检测分析

唐欢¹ 范文奇¹ 王春¹ 徐研²

(1. 重庆市文化遗产保护科研基地, 重庆中国三峡博物馆馆藏文物有害生物控制研究中心, 重庆, 400015; 2. 中央美术学院美术馆, 北京, 100102)

摘要 本文对于一幅美术馆油画藏品的霉变进行了病害检测分析, 利用纯培养的方法从该油画藏品表面及背面分离得到10株霉菌, 通过培养特征、显微形态检测和rDNA转录间隔区序列ITS (internal transcribed spacer) 测序分析表明: 10株霉菌分属小穴壳菌属、芽枝霉属、毁丝霉属、枝顶孢属、节菱孢菌属、短梗霉属等。这些霉菌与常见传统书画表面污染霉菌存在较大的种属差异, 此外, 这幅油画的正面与背面的霉菌种类并不一致。

关键词 霉菌 油画 文物 rDNA-ITS 木腐菌

引言

长期以来, 我国文物保护修复者对于馆藏纸质书画的霉菌污染已相当重视, 但对于油画藏品的微生物病害调查及研究则开展极少。随着博物馆内油画藏品数量的逐年增加, 油画的保存和防霉处理也会逐渐成为不能忽视的问题, 而油画的微生物病害调查是油画防霉变处理的基础工作之一, 建立相应的菌种库可为除霉剂的筛选提供有针对性的靶标。基于此, 对一幅美术馆油画藏品的霉变部位进行了病害检测分析。

1 材料与方

1.1 样品采集

有霉变现象的油画由中央美术学院美术馆提供。该幅油画创作于1900年, 在入藏前受到过严重的水害, 油画正面及背面均可见大片水浸的痕迹, 并且随着水流痕迹形成十分明显的白色印渍。背面除画布上有大片水渍外, 边缘画框上也留有水痕(图1、图2), 部分采样位置如图3和图4所示。

利用一次性无菌拭子取样器单一方向轻拭疑似霉变处, 拭子头在沙氏葡萄糖琼脂平板上反复擦拭, 在平板表面标明采样编号、采样时间, 置于冰盒中, 迅速带回实验室进行分离培养。



图1 油画正面



图2 油画背面

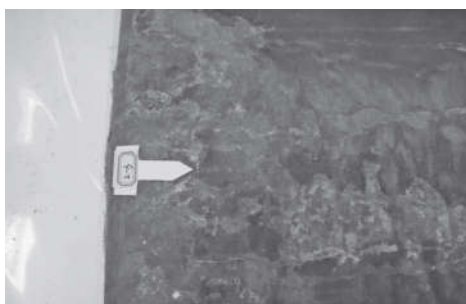


图3 采样位置(2-3)



图4 采样位置(2-4)

1.2 试剂及主要设备

霉菌分离、纯化用的沙氏葡萄糖琼脂平板购自重庆庞通医疗器械有限公司。真菌DNA提取试剂盒购自Omega公司(E. Z. N. A. Fungal DNA Kit), Taq DNA聚合酶、缓冲液体系、引物定制均由TAKARA公司提供。

真菌培养用人工气候箱为Binder公司KBF240(E5.2)型, PCR仪为Bio-Rad C1000型, 核酸定量仪为Nano-Drop 2000C型, 凝胶成像系统为Bio-Rad Gel Doc XR⁺, 测序仪为ABI公司Applied Biosystems 3730XL, 显微镜为尼康公司Ni-U型。

1.3 霉菌的分离、纯化

将采集后的样品于25℃, RH 70%倒置培养3天, 选择分离效果清晰、菌落形态和颜色多样的平板, 分别挑取菌落进行划线纯化。对得到的纯化霉菌, 使用瓷珠菌种保存管, 将其冻存于-20℃备用。

1.4 霉菌的形态观察

1.4.1 菌落形态观察

在沙氏葡萄糖琼脂平板上划线培养的霉菌, 于25℃、RH 70%倒置培养, 观察菌落的生长速

度、外观形态、湿润程度、颜色变化等情况。

1.4.2 菌落显微形态观察

在载玻片上滴加乳酸酚棉兰染液，用解剖针从菌落的边缘挑取少量带有孢子的菌丝浸入染液，加盖玻片，用光学显微镜观察菌丝和孢子形态，并显微照相保存。

1.5 霉菌基因组DNA的提取

根据真菌DNA提取试剂盒提供的提取说明进行。

1.6 真菌ITS基因片段的PCR扩增及测序^[1]

真菌ITS基因片段扩增的引物序列为ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 和 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')，扩增序列为内转录间隔区1和2，PCR片段长度大小为600bp左右。

PCR反应体系为25 μ L，其中模板DNA量为50ng，10 \times PCR buffer (with Mg²⁺) 2.5 μ L，dNTP (各2.5mmol/L) 用量为 μ L，ExTaq 0.2 μ L，引物ITS1、ITS4 (10mmol/L) 各0.5 μ L，添加无菌双蒸水至终体积25 μ L。PCR循环条件为94 $^{\circ}$ C 预变性4min；94 $^{\circ}$ C 45s，55 $^{\circ}$ C 45s，72 $^{\circ}$ C 1min，30个循环；最后72 $^{\circ}$ C 延伸10min。PCR扩增完毕，产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。经切割胶回收后，PCR产物送生工公司进行测序。

1.7 序列比对

测序返回的序列，其同源性通过互联网与Genbank进行比对，网址为www.ncbi.nlm.nih.com。

2 结果与讨论

2.1 分离纯化











通过分离纯化，从该幅油画正面及背面获得10株霉菌。

2.2 形态观察











10株霉菌经多次纯化培养后，菌落呈现不同颜色、不同形态特征。如菌株2和菌株3，菌落颜色为橄榄褐色，表面不平滑，堆积呈现疣状突起，菌落背面在沙氏培养基呈现黑褐色，在显微镜下观察发现，分生孢子梗未见分枝，有隔膜，(28~150) μ m \times (2.5~4.2) μ m，分生孢子呈椭圆形，有隔胞，(9~10) μ m \times (3~4) μ m。又如，来自同一采样位置的菌株5、菌株6、菌株7，在培养基上的菌落形态与镜下形态十分一致，菌落为白色，培养3天后呈现绒毛状，中心厚，外层菌丝较中心轻薄，在沙氏培养基背面菌落中心呈现黄褐色，周边呈乳白色。镜下观察，培养3天后涂片多次均未找到分生孢子，分生孢子梗直立或弯曲，透明，光滑，有明显分隔，宽(4.5~6.4) μ m。菌

株8 在沙氏培养基上表现为黄绿色，很平展，表面黏稠感强。显微观察见大量长椭圆形分生孢子， $(2.0 \sim 4.1) \mu\text{m} \times (4.9 \sim 13.8) \mu\text{m}$ （培养形态与镜下显微形态见表1）。

表1 霉菌形态观察结果

编号	位置	纯化培养后形态	显微形态 ($\times 40$)
1	2-2		
2	2-2		
3	2-3		
4	2-3		
5	2-3		

续表

编号	位置	纯化培养后形态	显微形态 (×40)
6	2-3		
7	2-3		
8	2-4		
9	2-4		
10	2-4		

2.3 分子生物学鉴定结果

将分离获得的10株真菌的ITS序列上传至Genbank, 与Genbank 数据库中已知的ITS序列进行同源性比对, 结果表明, 提交的10个序列与数据库中参照序列的同源性大于或等于98% (表2), 其中聚生小球壳菌2株 (编号1、编号3), 芽枝霉属2株 (编号2、编号4), 毁丝霉属3株 (编号5、编号6、编号7), 出芽短梗霉属1株 (编号8), 尖孢枝孢属霉菌1株 (编号9), 甘蔗节菱孢属1株 (编号10)。

表2 真菌序列同源性比对结果

编号	长度/bp	同源菌株	相似性/%
1	527	<i>Dothiorella gregaria</i> strain PZ-ZG-2-1 (聚生小球壳菌)	100
2	523	<i>Cladosporium</i> sp. 1 SDM-2014 (芽枝霉属)	99
3	516	<i>Dothiorella gregaria</i> strain PZ-ZG-2-1-2 (聚生小球壳菌)	100
4	523	<i>Cladosporium</i> sp. 1 SDM-2014 (芽枝霉属)	100
5	539	<i>Myceliophthora verrucosa</i> strain MHJ3 (毁丝霉属)	98
6	538	<i>Myceliophthora verrucosa</i> strain MHJ3 (毁丝霉属)	98
7	539	<i>Myceliophthora verrucosa</i> strain MHJ3 (毁丝霉属)	98
8	560	<i>Aureobasidium pullulans</i> strain RChB006 (出芽短梗霉)	99
9	528	<i>Cladosporium oxysporum</i> isolate MS3 (尖孢枝孢)	99
10	583	<i>Arthrinium saccharicola</i> culture-collection CPC:18977 (甘蔗节菱孢)	100

3 讨 论

目前, 国内博物馆开展纸质书画表面污染霉菌的研究报道逐步增多, 首都博物馆、南京博物院以及重庆中国三峡博物馆等都开展过相关研究。从鉴定结果可以发现, 纸质文物霉变的主要污染菌是曲霉属, 如烟曲霉、棒曲霉、黑曲霉、杂色曲霉等, 其次是青霉属, 有报道的为草酸青霉、产黄青霉、宛氏拟青霉等, 也有少量其他种属的丝状真菌, 如根霉、木霉^[1-3]。从本研究的比对结果可以明显发现, 这幅油画作品正面及背面分离得到的污染菌与常见纸质书画文物表面来源的常见霉菌种类存在明显不同, 10株霉菌中没有出现纸质文物表面最常见的曲霉和青霉, 而以芽枝霉、毁丝霉、枝顶孢霉以及节菱孢菌属为主。

常见的油画支撑物有画布或木板, 自支撑 (support) 向上, 分别是基底层、颜料层和光油层。而一般的书画文物则是纸本或绢本。因材料的不同, 霉菌可生长利用的营养成分就存在差异, 进而可能造成表面污染菌有所差异。一些毁丝霉属的霉菌具备极强的纤维素降解能力^[4], 枝孢霉也可以代谢产生高活性的纤维素酶^[5], 而分离自油画背面靠近木质画框处的节菱孢菌是造成竹材霉变致霉性较强的种属^[6]。因此, 我们的结果提示, 这些霉菌的污染对于该油画的保存极为不利, 可能进一步造成画面的腐朽、破损以及油画画框的深度霉腐, 需要尽快对其进行消杀处理。

结 语

本研究分离得到的污染霉菌种类包括小穴壳菌属、芽枝霉属、毁丝霉属、枝顶孢属、节菱孢菌属、短梗霉属。这些种类的霉菌与常见纸质书画文物表面来源的常见霉菌种类存在明显不同，具有较强的纤维降解能力。

参 考 文 献

- [1] 唐欢, 王春, 范文奇, 周理坤, 马冠华. 馆藏纸质书画文物上霉菌的分离与鉴定. 文物保护与考古科学, 2015, 27 (2) : 40-46.
- [2] 闫丽, 高雅, 贾汀. 古代书画文物上污染霉菌的分离与鉴定研究. 中国文物科学研究, 2011, 1: 78-82.
- [3] 张慧, 张金萍, 朱庆贵. 古旧纸本字画孳生霉斑的鉴定. 文物保护与考古科学, 2016, 28 (1) : 108-111.
- [4] 詹发强, 崔卫东, 周亚飞, 王炜. 降解棉秸秆耐热菌株的鉴定及降解条件优化. 微生物学通报, 2012, 39 (1) : 44-54.
- [5] 甄静, 王继雯, 谢宝恩, 李冠杰, 刘莹莹, 周伏忠, 陈圆参. 一株纤维素降解真菌的筛选、鉴定及酶学性质分析. 微生物学通报, 2011, 38 (5) : 709-714.
- [6] 付惠, 陈玉惠, 王文久, 杨宇明, 辉朝茂. 云南五种用材竹的致霉菌及其致霉特性研究. 竹子研究会刊, 1999, 18 (1) : 16-22.