

广西民族博物馆展柜空气中霉菌的分离及鉴定

田双娥

(广西民族博物馆, 广西南宁, 530028)

摘要 本文选取广西民族博物馆两个曾发现霉斑的展柜对空气中的霉菌进行分离纯化, 获得30株霉菌, 通过形态特征观察和rDNA转录间隔序列ITS (Internal Transcribed Spacer) 测序分析。结果表明, 展柜中的空气分离到的30株霉菌分属于青霉属 (*Penicillium*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、棒孢属 (*Corynespora*)、帚霉属 (*Scopulariopsis*)、弯孢属 (*Curvularia*)、木霉属 (*Trichoderma*)、链格孢属 (*Alternaria*)、镰孢菌属 (*Fusarium*)、壳针孢属 (*Septoria*)、茎点霉属 (*Phoma*)、赤霉属 (*Gibberella*)、白腐真菌 (*Phanerochaete*)、刺盘孢属 (*Colletotrichum*)、尾孢属 (*Cercospora*)、黑孢属 (*Nigrospora*)、附球霉属 (*Epicoccum*)、笄霉属 (*Choanephora*) 18个属。

关键词 展柜空气 霉菌 分离与鉴定

引言

广西民族博物馆春季潮湿, 展厅展柜中陈列的展品易滋生霉菌, 污染了展陈文物的表面以及展柜的玻璃, 严重影响了馆藏展品的展示。

霉菌是丝状真菌的俗称, 意即“会引起物品霉变的真菌”, 通常指菌丝体发达又不形成大型肉质子实体结构的真菌。霉菌常在营养基质上形成绒毛状、网状或絮状菌丝体。霉菌在自然界中的分布最广, 以孢子方式繁殖和传播, 孢子是空气中数量最多的气传生物学微粒^[1], 孢子抗干燥, 质量小, 随气流、物质运输到处传播。霉菌分解能力强, 能在各种环境中生活。霉菌是单细胞或多细胞生物, 不需要光源就能够存活。孢子在空气中广泛存在, 在足够潮湿和获取营养的情况下, 孢子会被激活, 霉菌则滋生起来。由于不同的真菌孢子含有不同的色素, 所以菌落可呈红、黄、绿、青绿、黑、白、灰等多种颜色。霉菌产生的色素覆盖在文物表面致使文物表面变色, 破坏原有的画面, 严重影响了展品的美观和展示。

为了提供更适宜的展柜微环境, 避免微生物病害影响展品的展示, 为后续的微生物病害防治提供靶标, 本文对春季污染坭兴陶的展柜空气霉菌进行了分离和鉴定, 以期后续文物的霉害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

展柜空气中霉菌的取样采用自然沉降法^[2]。共选取了两个展柜进行取样试验。培养皿做好标记后带回实验室培养。

1.2 实验试剂及设备

霉菌的分离、纯化用沙氏液体培养基和葡萄糖琼脂(PDA)固体培养基。真菌提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,DNA聚合酶购自Takara。

真菌培养用LRH-250HS型培养箱;PCR(聚合酶链式反应)仪为国产DTC-3G型,恒温振荡器为TS-100C型,凝胶成像系统为国产山富850型,离心机为TGL-16G型。

1.3 霉菌的分离、纯化

真菌分离纯化培养基为沙氏葡萄糖液体培养基(葡萄糖40g,蛋白胨10g,琼脂20g,溶于1000mL蒸馏水中,pH为 5.6 ± 0.2)和PDA固体培养基,分别灭菌后备用。

从展厅带回的平板置于28℃、70%RH的培养箱中培养5~6天。提取优势菌落进行多次划线,至少划线5次,得到纯菌落。

1.4 真菌DNA的提取

将平板上纯化的单菌落接种于液体培养基中,置于28℃摇床中180r/min培养。将过滤后的菌丝体烘干,使用液氮研磨后采用天根试剂盒提取霉菌DNA。将获得的DNA用1%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物与载体连接克隆,挑取阳性克隆子测序,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.5 真菌ITS基因片段的PCR扩增及测序

真菌ITS基因片段扩增的引物序列^[3]为5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'和ITS45'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。

PCR循环参数:94℃ 5min—PCR 94℃ 30s—53℃ 30s—72℃ 45s—72℃ 5min,循环35次。PCR扩增体系见表1。

表1 PCR扩增体系

成分	体积/ μL	成分	体积/ μL
Premix PCR Taq酶	12.5	基因组	2
引物(ITS1、ITS4)	0.5	ddH ₂ O	9.5
总体积		25	

2 结果与讨论

2.1 分离纯化结果

通过分离纯化，从空气分离得到30株优势菌株。

2.2 形态观察

获得的菌株纯培养后观察，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。部分形态学观察结果见表2，部分菌株显微观察结果见图1，部分菌落平板图见图2。

表2 部分形态学观察结果

编号	培养96h后菌落形态特征描述
1	绿色菌落，放射状，边缘略整齐，直径0.9cm
2	黄绿色，菌落绒毛状，边缘整齐，直径1.1cm
3	背面黄色，正面白色，绒毛状，直径1.1cm
4	灰绿色，绒毛状菌丝，直径2.2cm
7	绿色，菌丝呈分枝状，放射状，菌落绒毛状，直径1.15cm
8	灰绿色孢子，直径1.2cm
9	菌丝发达，蔓延快，白色菌落，网状，直径4.4cm
10	灰绿色，孢子呈灰色，菌落突起，绒毛状，直径2.2cm
11	灰绿色孢子，直径1.1cm
13	灰绿色孢子，直径1.2cm
14	黑色孢子，丝状菌丝，直径2cm
15	菌丝发达，灰绿色，放射状，绒毛状菌丝，直径2.7cm
16	淡绿色，粉状孢子，直径1.2cm
17	青色孢子多、粉状，直径2cm

2.3 分子生物学鉴定结果

对展柜空气中分离纯化的菌株进行测序，测序获得500~600bp的ITS序列，把获得的序列在GenBank中进行BLAST比对（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>），所有序列对应Genbank中已知的参考序列的同源性 $\geq 98\%$ ，具体比对结果见表3。

表3 展柜空气中分离菌株同源性比对结果

编号	长度/bp	相似种	参考序列号	相似度/%
1	512	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain SR10-CJR4	KP900273	99
2	511	<i>Cladosporium</i> sp. CX-2011a	JN227055	99
3	534	<i>Alternaria longissima</i> isolate ZJ8	KJ572139	98
4	523	<i>Corynespora cassiicola</i> strain NEHU.ANSRJ.14	KF928292	99
5	529	<i>Fusarium</i> sp.02	AJ222809	99
6	535	<i>Septoriella oudemansii</i> strain CBS 138012	KR873250	99
7	528	<i>Cladosporium</i> sp. TA26-6	JF819132	99
8	520	<i>Phoma</i> sp. GAH7	FJ950743	99
9	518	<i>Gibberella moniliformis</i> strain P6-26	GU723435	99
10	538	<i>Corynespora cassiicola</i> isolate SCSB15	KF913519	99
11	592	<i>Penicillium oxalicum</i> strain BGPUP4	KP780809	99
12	595	<i>Scopulariopsis croci</i> genomic DNA, strain FMR 4004	LM652406	99
13	592	<i>Penicillium oxalicum</i> strain QRF392	KP278189	100
14	577	<i>Aspergillus</i> sp. 2011.9	KP668958	99
15	564	<i>Curvularia lunata</i> strain PSU-ES195	JN116704	100
16	592	<i>Penicillium</i> sp. BAB-5444	KT355727	99
17	596	<i>Aspergillus oryzae</i> isolate F5-03	JN561266	99
18	587	<i>Hypocrea lixii</i> strain Th 47	GU046487	100
19	593	<i>Penicillium</i> sp. BAB-1995	KM066554.1	99
20	553	<i>Fusarium equiseti</i>	FJ459976.1	100
21	643	<i>Phanerochaete sordida</i>	AB210078.1	98
22	644	<i>Trichoderma harzianum</i> strain MGQ2	KC342029.1	99
23	557	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KJ767066.1	100
24	585	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> strain CGM45	JX669445.1	99
25	543	<i>Cercospora lagenariae</i> strain IPBCC 13.1010	KC776155.1	99
26	594	<i>Penicillium</i> sp. 2 AE-2013 strain F4884	KF746134.1	99
27	563	<i>Nigrospora sphaerica</i> strain H2	KU878079.1	99
28	550	<i>Epicoccum nigrum</i> strain HBE	KU254609.1	100
29	640	<i>Choanephora infundibulifera</i>	KJ461159.1	99
30	579	<i>Aspergillus japonicus</i> strain VIT-SB1	KC128815.1	99

结合培养性状,由表3可知空气中分离获得的真菌分属于青霉属(*Penicillium*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、棒孢属(*Corynespora*)、帚霉属(*Scopulariopsis*)、弯孢属(*Curvularia*)、木霉属(*Trichoderma*)、链格孢属(*Alternaria*)、镰孢菌属(*Fusarium*)、壳针孢属(*Septoria*)、茎点霉属(*Phoma*)、赤霉属(*Gibberella*)、白腐真菌(*Phanerochaete*)、刺盘孢属(*Colletotrichum*)、尾孢属(*Cercospora*)、黑孢属(*Nigrospora*)、附球霉属(*Epicoccum*)、笄霉属(*Choanephora*) 18个属。其中,最多的是青霉

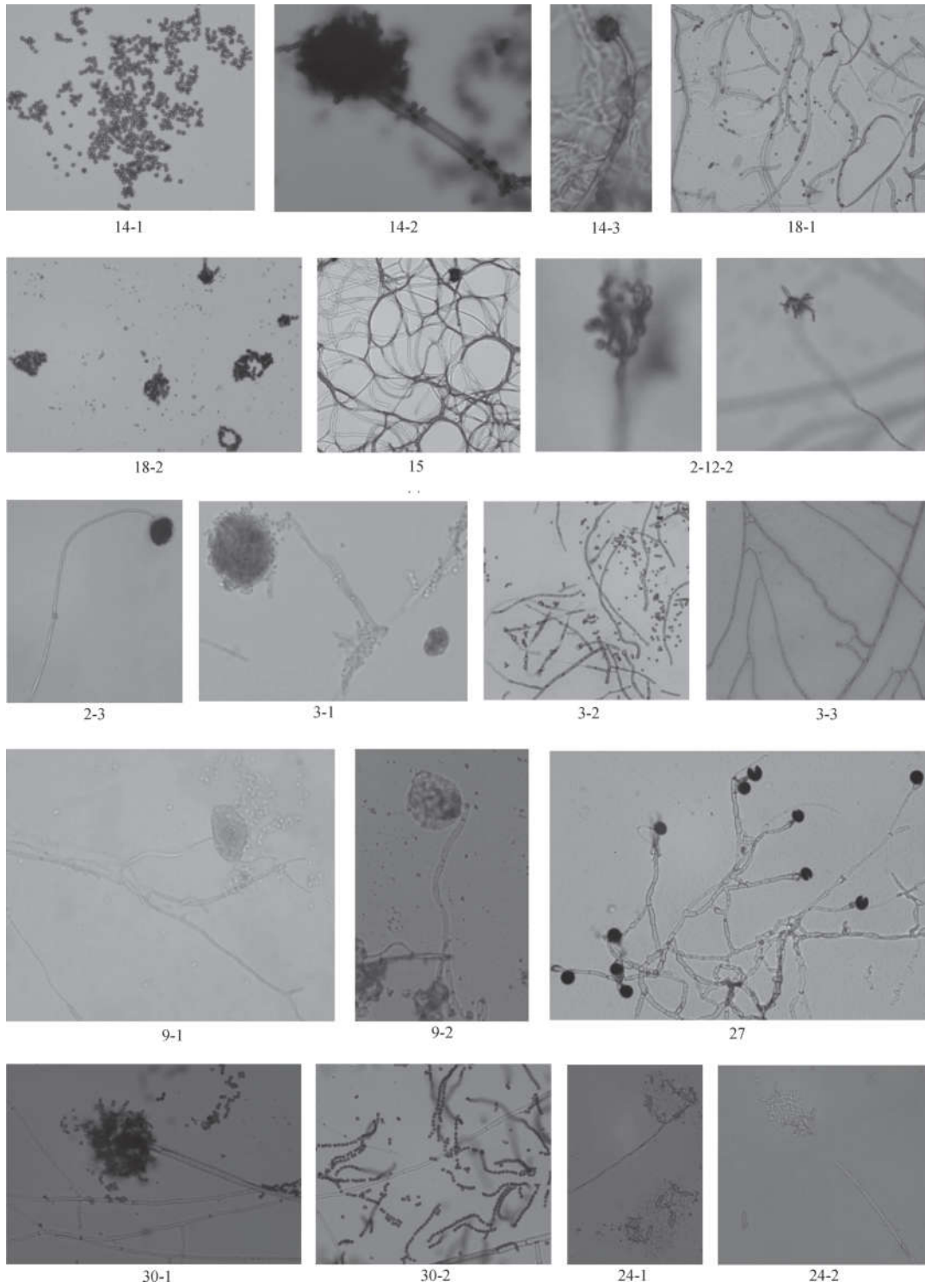


图1 部分菌株显微观察图

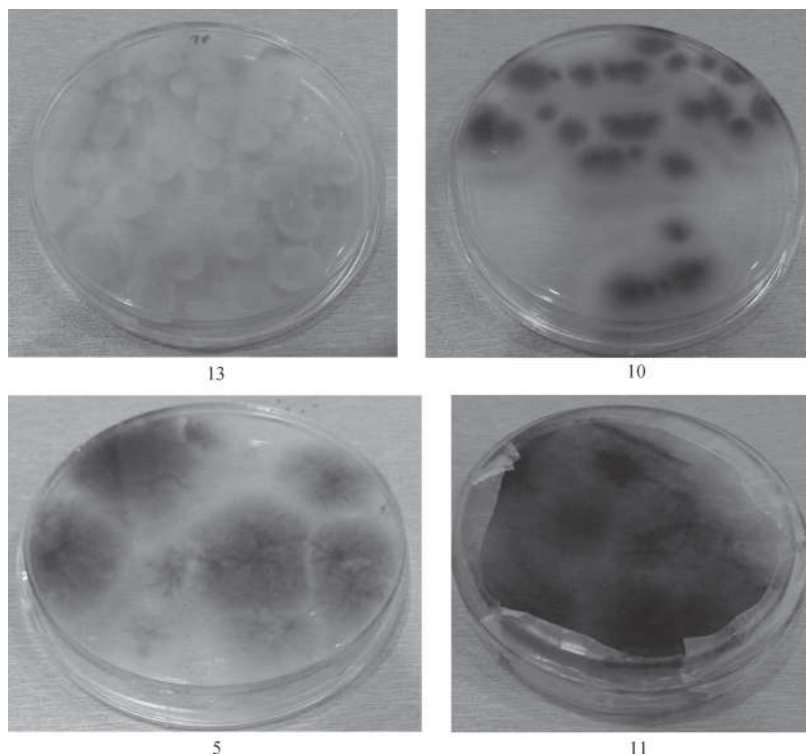


图2 部分菌落平板图

属, 枝孢霉属和曲霉属次之。青霉来源极为广泛, 可生长在任何含有有机物的基质上; 青霉属和枝孢霉属都是敦煌壁画颜料分离得到且在敦煌壁画颜料变色过程中起到了一定的作用^[4, 5], 枝孢霉和黑曲霉分泌的可溶性色素和代谢产物草酸等能造成颜料色度的改变^[6]; 曲霉分解淀粉和蛋白质。此外, 木霉具有较强分解纤维素的能力, 也可产生如柠檬酸、葡萄糖酸等有机酸。

空气中悬浮着霉菌的孢子, 孢子具有小、轻、干、多的特点, 还具有休眠期长和有较强的抗逆性的特点。空气中含有霉菌生长所需的营养物质吸附于纺织品和坭兴陶表面, 春季南方气候温暖潮湿, 为吸附于展品表面孢子的发芽及霉菌的生长繁殖提供了条件。

霉菌危害的对象主要是有机质文物, 如丝织品、纸张、漆木器和皮革等; 无机质文物如石刻、陶器等。霉菌会给提供养分的藏品带来永久性损害, 会使木质和织物出现污点, 结构强度降低, 更加容易渗水, 破碎; 引起纸张纤维素、淀粉及动物胶丢失, 对纸质文物造成严重破坏等; 霉菌的代谢产物有机酸会腐蚀无机物材料, 如金属、石质藏品等; 霉菌同样也会代谢出可溶解或者不可溶解的色素物质, 代谢产物随着时间的推移发生颜色改变; 用于消化有机物质的酶, 损害有机质文物。因此鉴定损害馆藏文物的霉菌, 研发防霉剂, 综合防治文物霉菌的损害是文物保护工作的重要工作内容^[7-10]。

对文物生物病害的防治核心是通过温湿度控制、通风和环境整洁来达到控制生物病害的生长, 而对于环境友好型杀菌剂、文物友好型防霉剂的研发是文物保护者在文保工作中的研究方向之一。国内重庆中国三峡博物馆、上海博物馆、南京博物院、浙江博物馆、首都博物馆等多家单位开展了

天然植物成分运用于文物防霉的相关研究和探讨。

结 语

鉴于空气中存在大量霉菌孢子,为了展品的安全,应对保存环境的温度和湿度进行控制,减少有害霉菌的生长繁殖,并有针对性地选择和使用防霉剂。本文通过形态学观察和真菌ITS区rRNA基因序列进行测序及比对,获得的结论如下:从展厅选取的两个展柜空气中获得的霉菌种属多样化,分属于18个真菌属,其中青霉菌最多,枝孢霉属和曲霉属次之。

参 考 文 献

- [1] Lacey J. Allergy and Allergic Disease. London: Black Science, 1997: 858-883.
- [2] 国家文物局. 馆藏文物保存环境质量检测技术规范. 北京: 文物出版社, 2009: 30-31.
- [3] White T J, Bruns T D, Lee S B, Taylor J W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990: 315-322.
- [4] 冯清平, 张晓君, 马晓军, 杨玲. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究. III. 枝孢属在石窟壁画铅丹变色中的作用. 微生物学报, 1998, (5): 365-370.
- [5] 张晓君, 冯清平, 杨玲. 枝孢霉在敦煌壁画颜料变色过程中的作用. 应用与环境生物学报, 1998, (3): 277-280.
- [6] 杨玲, 冯清平, 张晓君, 马晓军. 一株使敦煌壁画红色颜料变色菌株氧化铅丹特性的研究. 兰州大学学报(自然科学版), 1999, 35(1): 145-148.
- [7] 唐欢, 周丽坤, 范文奇, 王春. 7种植物精油对青霉抑菌活性的初步研究//中国文物保护技术协会第八次学术年会论文集. 北京: 科学出版社, 2015: 327-331.
- [8] 王克华, 周新光, 吴来明, 谢燕. 三种植物成分防霉活性及其对纸张、颜料影响的实验研究. 文物保护与考古科学, 2012, 24(3): 67-71.
- [9] 周新光, 吴来明, 王克华, 谢燕. 植物中药成分应用于文物虫害病害防治中的适用性探讨. 文物保护与考古科学, 2012, 24: 20-24.
- [10] 郑冬青, 张金萍, 王鹤云, 何子晨, 云悦, 鲁钢. 几种常用馆藏文物防霉剂的抑菌效果比较研究. 文物保护与考古科学, 2014, 26(1): 42-45.