

## 敦煌莫高窟中细菌多样性的研究

张晔林<sup>1</sup> 唐德平<sup>1</sup> 张楠<sup>1</sup> 王婉如<sup>1</sup> 张东明<sup>1</sup> 武发思<sup>2</sup> 薛林贵<sup>1\*</sup>

(1. 兰州交通大学 化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070)

(2. 敦煌研究院保护所 甘肃 敦煌 736200)

**摘要:** 【目的】通过对敦煌莫高窟内细菌多样性及生理生化特征的分析, 为壁画微生物病害防治提供试验依据。【方法】采用纯培养与 16S rDNA 等技术对莫高窟 245#窟内空气样品、壁画样品进行分析, 并在培养基中添加壁画颜料测试其对细菌生长的影响。

【结果】分离出可培养细菌 76 株, 分属于 8 个属。其中空气中有 6 个属, 分别为 *Bacillus*、*Arthrobacter*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Enterobacter*、*Kocuria*, 优势菌为 *Bacillus*、*Arthrobacter*。壁画上有 *Bacillus*、*Arthrobacter*、*Paenibacillus*、*Erythrobacter* 4 个属, 优势菌为 *Bacillus*、*Arthrobacter*; 并发现 DHXJ05 (*Enterobacteriaceae*)、DHXJ08 (*Bacillaceae*)、DHXJ15 (*Erythrobacteraceae*)、DHXJ16 (*Bacillaceae*)和 DHXJ17 (*Bacillaceae*)能在含有铁红、铅丹、朱砂的环境中良好生长。【结论】为后期研究壁画颜料的变色机理及选择相应的细菌防治制剂提供了条件。

**关键词:** 敦煌壁画, 细菌多样性, 分离鉴定

## The bacterial diversity in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China

ZHANG Bing-Lin<sup>1</sup> TANG De-Ping<sup>1</sup> ZHANG Nan<sup>1</sup> WANG Wan-Ru<sup>1</sup>  
ZHANG Dong-Ming<sup>1</sup> WU Fa-Si<sup>2</sup> XUE Lin-Gui<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

(2. The Conservation Institute of Dunhuang Academy, Dunhuang, Gansu 736200, China)

基金项目: 古代壁画保护国家文物局重点科研基地资助; 甘肃省科技支撑计划项目(No. 090NKCA079); 国家自然科学基金项目(No. 30870384)

\*通讯作者: Tel: 86-931-4938619; 信箱: xuelg@mail.lzjtu.cn

收稿日期: 2011-11-10; 接受日期: 2012-01-29

**Abstract: [Objective]** Analyzing the bacterial diversity, physiological and biochemical characteristics in the mogao grottoes can provide an experimental basis for microbial disease prevention and treatment of Mogao murals. **[Methods]** Both the air and mural samples collected from Mogao Grottoes 245# are analyzed by means of pure culture techniques, and testing effect of mural paint on bacterial growth. **[Results]** 76 bacteria belonging to eight different genera are identified and characterized. Six genera are revived from the air, they are *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Kocuria*. Among them, *Bacillus* and *Arthrobacter* are dominant. Four genera are revived from the mural, they are *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Erythrobacter*, among them, *Bacillus* and *Arthrobacter* are dominant; and it is found that some bacteria, such as DHXJ05 (Enterobacteriaceae), DHXJ08 (Bacillaceae), DHXJ15 (Erythrobacteraceae), DHXJ16 (Bacillaceae) and DHXJ17 (Bacillaceae) can grow well in environment containing red ferric oxide, red lead, and cinnabar. **[Conclusion]** This experiment provide the conditions for discolorment mechanism and choosing corresponding bacterial preparation.

**Keywords:** Mogao Grottoes, Bacterial diversity, Isolation and identification

敦煌莫高窟位于甘肃省敦煌市东南 25 km 的鸣沙山下(94°47'E, 40°2'N)。它开凿于前秦建元二年(公元 366 年), 后经历代续建。现存有十六国后期到北魏、北周、隋、唐、五代、宋、西夏、元等朝代修建的 492 个石窟, 约 45 000 m<sup>2</sup> 的壁画, 2 000 多座彩塑。其规模宏大、内容丰富, 是我国珍贵的文化艺术宝库, 被誉为“墙壁上的博物馆”。

石窟壁画由于其存在于特殊的环境, 不能像纸质、瓷器等文物进行保护, 因而保护难度较大。微生物是石窟壁画损坏中不可忽视的一个因素。国内外研究学者从石窟壁画表面分离出多种微生物: 在嘉峪关魏晋墓中, 发现了霉菌 4 个属, 优势菌为 *Penicillium* 和 *Alternaria*<sup>[1]</sup>; 密县汉墓中鉴定出霉菌 3 个属, 主要为 *Penicillium* 和 *Paecilomyces*<sup>[2]</sup>; 陕西长安唐墓中, 鉴定出霉菌 8 个属主要为 *Mucor* 和 *Penicillium*, 细菌 7 个属主要为 *Micrococcus* 和 *Bacillus*<sup>[3]</sup>; 澳大利亚 Catherine Chapel 中鉴定出 *Kocuria*、*Arthrobacter*、*Paenibacillus* 等<sup>[4]</sup>。微生物的种类因地域、洞窟条件、窟内位置甚至时间而有所不同。一方面, 微生物生长代谢对壁画颜色的褪变, 壁画表层的风

化、粉化起着一定的作用。冯清平等研究证实, 枝孢霉、黑曲霉生长代谢过程中可以利用壁画颜料中的骨胶, 从而降低颜料颗粒之间的固结力和颜料在壁画上的附着力, 使壁画粉化<sup>[5-6]</sup>; 其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<sup>[7]</sup>。另一方面, 随着环境的改变, 包括洞窟所在地区的自然环境和洞窟内部小环境的不同, 壁画的微生物病害变得复杂多样。Lascaux cave 就是由于游客的大量涌入, 改变了窟内条件, 在 1963 年爆发了严重的 *Bracteaecoccus* 病害; 在 2007 年出现能利用杀菌剂及其降解产物大量生长的 *Scolecobasidium tshawytschae*<sup>[8-9]</sup>。因此, 壁画中微生物的防治是一个长期、谨慎的工作。敦煌莫高窟由于游客的大量增加, 开放洞窟内的微生物种类明显比封闭窟丰富<sup>[10]</sup>; 其窟内温度湿度也显著上升<sup>[11]</sup>, 更有利于微生物的生长, 因此也存在着同样的危机。

本研究通过对敦煌莫高窟细菌多样性的分析, 得到了窟内细菌分布及种属多样性结果, 并通过颜料对细菌生长的影响试验, 筛选出 5 株可能对壁画产生损害作用的菌株, 需要对其进行重

点防治。研究结果为后期研究壁画颜料的变色机理及选择相应的细菌防治制剂提供了条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 样品的采集:** 于 2010 年 10 月 22 日在敦煌莫高窟 245#窟采集空气样 8 个、壁画样品 10 个。空气样采用常规沉降法, 将无菌 NA 培养基平板分别放在洞窟入口通道、洞窟中央、西北、西南以及佛龛的四角, 待沉降 1 h 后, 密封带回供试验用。壁画样品使用两种方法采集。一法为使用灭菌棉签轻轻涂擦壁画表面, 然后将其放入灭菌的生理盐水, 此方法采集 6 个样品; 另一方法为用灭菌刀片轻轻刮取壁画上的霉点和褪色、变色部位颜料少许, 然后放入 50 mL 无菌离心管, 此方法采集 4 个样品, 如图 1 所示。将样品放入低温保温箱中带回。

**1.1.2 培养基:** 分离细菌使用了 3 种培养基。

(1) NA (g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.0–7.2; (2) TSA (g/L): 大豆蛋白胨 5.0, 胰蛋白胨 15.0, NaCl 5.0, pH 7.2; (3) R2A (g/L): 酵母粉 0.50, 胰蛋白胨 0.25, 蛋白胨 0.75, 葡萄糖 0.50, 淀粉 0.50, 磷酸氢二钾 0.30, 硫酸镁 0.024, 丙酮酸钠 0.30, 琼脂 15.00, pH 7.2。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细菌的分离与纯化:** 将采集空气样品的培养皿放入恒温培养箱 25 °C 培养 36 h, 之后将长出的细菌菌落挑出, 在 NA 平板上用划线法纯化。

用棉签采集的生理盐水样品: 用移液枪吸取样品滴加在 NA、TSA 和 R2A 培养基上, 每个培养皿加 400 μL 样品。然后在恒温培养箱 25 °C 培养 36 h, 之后将长出的细菌菌落挑出, 在 NA 平板上用划线法纯化。

采集的壁画表面固体样品处理方法为, 将样品用灭菌生理盐水溶解, 配成 1 g/mL 的溶液, 然后梯度稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 。用移液枪吸取样品滴加在 NA、TSA 和 R2A 培养基上, 每个培养皿加 400 μL。每个浓度每种培养基做 2 个。然后在恒温培养箱 25 °C 培养 36 h, 之后将长出的细菌菌落挑出, 在 NA 平板上用划线法纯化。

**1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取:** 细菌基因组 DNA 的提取方法参见文献[12]。

**1.2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增:** 根据细菌 16S rRNA 的基因序列, 合成引物 8F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系 25 μL: *Taq* DNA 聚合酶 2 μL, 1×*Taq* buffer 2.5 μL, 25 mmol/L

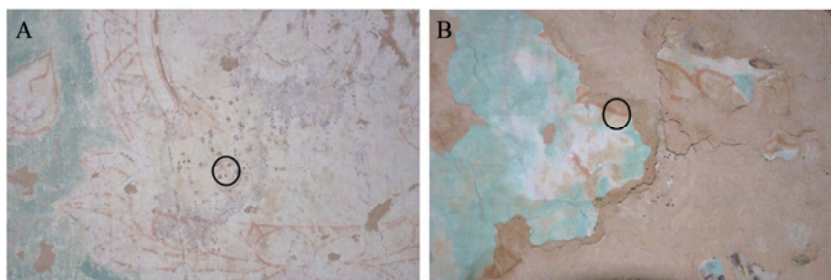


图 1 莫高窟 245#壁画采样点之一

Fig. 1 One of sampling point in the Mogao Grottoes 245#

注: A 图中的圈为洞窟内南壁上的采样点, B 图的圈为北壁上的采样点。

Note: The circle in left picture is a sampling point in the south of grotto (A); the circle in right picture is a sampling point in the north of grotto (B).

MgCl<sub>2</sub> 3 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 引物各 10 pmol。扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min、58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。

**1.2.4 限制性内切酶分析(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA):** 将扩增的 16S rDNA 片段用限制性内切酶 *Hae* III (5'...GG/CC...3')和 *Alu* I (5'... AG/CT...3')进行双酶切。反应体系: 取 10 μL 扩增产物, 加入 *Hae* III 和 *Alu* I 各 1.5 uL。在 37 °C 反应 15 h 后, 反应产物在 2.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后进行带谱分析。

**1.2.5 16S rDNA 序列测定:** 将双酶切带谱不同的 16S rRNA 基因进行重新扩增, 经纯化试剂盒纯化后, 送至北京六合华大基因科技有限公司测序, 测序引物为 27F (5'-GGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 517F (5'-CCAGCAGCCGCGTAAT-3'), 测得基因序列经过 Chimera check with Bellerophon (Version 3)检测无嵌合体后, 提交至 GenBank 数据库 (Http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

**1.2.6 序列比对及系统发育树的构建:** 将序列在 GenBank 数据库进行比对, 下载高质量最相似的序列进行系统发育树的构建。通过软件 ClustalX 2.1<sup>[13]</sup>进行多序列联配, 使用 Jukes & Cantor<sup>[14]</sup>法计算进化距离, 用邻位相连法 (Neighbor-Joining method)<sup>[15]</sup>分析后通过软件 MEGA 5.0<sup>[16]</sup>构建系统发育树, 通过 Bootstrap<sup>[17]</sup>法对树进行评估分析。

**1.2.7 壁画颜料对细菌生长的影响:** 红色颜料对微生物生长的影响试验所用培养基是分别在 NA 中加入铅丹(Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 1 g/L、土红(Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 1 g/L、朱砂(HgS) 1 g/L。在试管中加入 10 mL 培养基, 制成斜面, 将分离鉴定后的菌接入试管, 用不接菌和不加颜料的斜面做对照, 25 °C 培养 3-6 d。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的分离及双酶切结果

通过上述方法从 8 个空气样、10 个壁画样品中共分离出 76 株细菌。其中空气样中 39 株、壁画样品中 37 株。经过限制性内切酶双酶切分析, 确定空气样中有 17 株不同菌株, 壁画样中有 12 株不同菌株, 两个样品共有的菌株有 7 株。

### 2.2 16S rRNA 序列比对分析结果

如表 1 所示, 经比对, 共得到 22 株不同的细菌, 归属于 8 个属, 分别为 *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Erythrobacter*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Enterobacter*、*Kocuria*、*Arthrobacter*。其中空气中有 6 个属, 分别为 *Bacillus*、*Arthrobacter*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Enterobacter*、*Kocuria*。壁画上有 *Bacillus*、*Arthrobacter*、*Paenibacillus*、*Erythrobacter* 4 个属。

### 2.3 同源性对比及系统发育树的构建

通过上述方法, 利用 NCBI 中的 BLAST 工具对测序结果进行同源性对比, 结果见图 2。

### 2.4 空气与壁画表面细菌数量及种属分布

如图 3 所示, 空气样中有 6 个属, 其中 *Bacillus* 占总数的 41.3%, *Arthrobacter* 占 24.1%, *Pseudomonas* 为 20.7%, 其它 3 个属总共只占 13.9%。壁画样中的 4 个属 *Bacillus* 为 85.2%, *Arthrobacter* 为 7.4%, 其它两个属各占 3.7%。两者中含量最多的均为 *Bacillus*。

### 2.5 细菌的生理生化反应

从壁画上分离的 11 株菌中, 7 株具有明胶液化和酪蛋白水解能力, 6 株具有淀粉液化能力。从空气中分离出的 14 株菌种, 8 株具有淀粉水解能力和明胶液化能力, 9 株具有酪蛋白水解能力。这与壁画中的营养成分相关联。详见表 2。

表 1 敦煌 245#窟中可培养微生物 16S rRNA 序列比对分析  
Table 1 Analysis of culturable bacterial 16S rRNA in the Mogao Grottoes245#

Number of isolates (Accession No.)	Division	Species	Source	Identified (%)	Accession No.
DHXJ01(JN244971)	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.	Mountain snow	99	EF103214
DHXJ02(JN244972)	Pseudomonada- ceae	<i>Pseudomonas xan- thomarina</i>	Populus stem	99	HM854232
DHXJ03(JN244973)	Pseudomonada- ceae	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>stutz- eri</i>	Sea	99	AJ244724
DHXJ04(JN244974)	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	Mine soil	98	EU863835
DHXJ05(JN244975)	Enterobacteri- aceae	<i>Enterobacter hor- maechei</i>	—	98	EF428236
DHXJ06(JN244976)	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp.	Tuber magnatum	99	DQ279315
DHXJ07(JN244977)	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	Wheat	99	EF656456
DHXJ08(JN244978)	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	—	99	HM753632
DHXJ09(JN244979)	Bacillaceae	<i>Bacillus megaterium</i>	Phosphate rich soil from Dianchi	99	HQ242768
DHXJ10(JN244980)	Bacillaceae	<i>Bacillus simplex</i>	Mural painting biofilm	99	AJ628744
DHXJ11(JN244981)	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i> sp.	Antarctic sediments	99	FJ889675
DHXJ12(JN244982)	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Human clinical specimens	99	EU086782
DHXJ13(JN244983)	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>	Root	99	JF700489
DHXJ14(JN244984)	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i> sp.	Agricultural soil	98	AY572475
DHXJ15(JN244985)	Erythrobac- teraceae	<i>Erythrobacter</i> sp.	Marine	97	DQ985049
DHXJ16(JN244986)	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>	Host faeces	99	FN397486
DHXJ17(JN244987)	Bacillaceae	<i>Bacillus simplex</i>	Rape leaves	99	GU086427
DHXJ18(JN244988)	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	Tufa core	99	AM934692
DHXJ19(JN244989)	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	Sediments	99	DQ079004
DHXJ20(JN244990)	Bacillaceae	<i>Bacillus firmus</i>	Mycorrhiza	99	HQ285922
DHXJ21(JN244991)	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus harenae</i>	Desert sand	97	AY839867
DHXJ22(JN244992)	Bacillaceae	<i>Bacillus</i> sp.	—	98	EU070374

注: —: 没有数据. Source 与 Accession No.为相似菌的信息.

Note: —: No data. Source and Accession No. is the information of similar strain.

## 2.6 壁画颜料对细菌生长的影响试验结果

红色为敦煌壁画上的主要颜色之一, 其色变极为明显。不同时期所用的红色颜料有所不同, 主要为铅丹( $Pb_3O_4$ )、土红( $Fe_2O_3$ )和朱砂( $HgS$ )。试验表明: 土红本身对微生物的生长影响不大, 只有 5 株在其中生长受到抑制, 其余都能正常生长; 铅丹和朱砂对微生物生长影响非常大, 在含

有铅丹的培养基中, 有 7 株不能生长, 8 株生长受到抑制, 只有 DHXJ05 (Enterobacteriaceae)、DHXJ08 (Bacillaceae)、DHXJ16 (Bacillaceae)和 DHXJ17 (Bacillaceae)能正常生长; 在含有朱砂的培养基里, 有 6 株不能生长, 11 株生长受到抑制, 仅有 DHXJ05 (Enterobacteriaceae)和 DHXJ15 (Erythrobacteraceae)能正常生长。如表 3 所示。

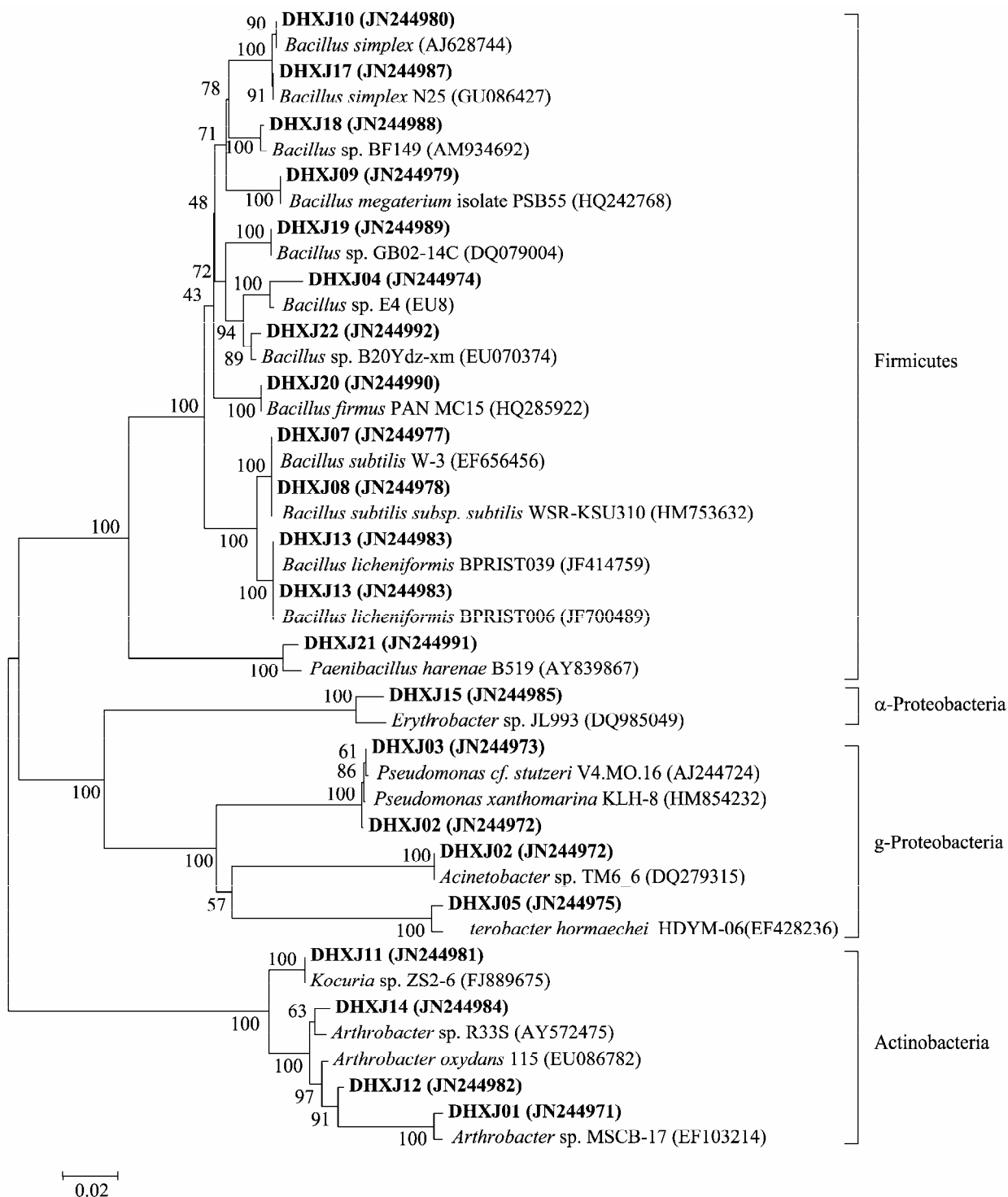


图 2 莫高窟 245#中可培养细菌 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of culturable bacterial 16S rRNA in the Mogao Grottoes 245#

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1 000 replicates. The GenBank accession number is showed in parentheses. Bar: 0.02 substitution per nucleotide.

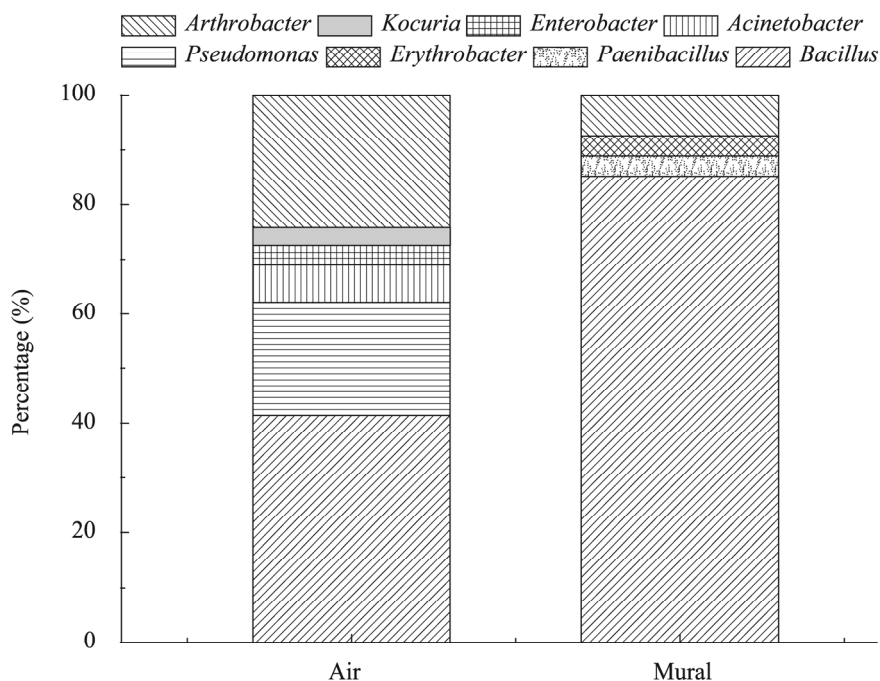


图 3 莫高窟 245#空气、壁画细菌的种属分布状况

Fig. 3 The distribution of bacterial species in air and wall of the Mogao Grottoes 245#

表 2 19 株从敦煌 245#窟分离出的菌株的生理生化特性

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of 19 strains isolated from the Mogao Grottoes 245#

Number of isolates	Source	Voges-Prokauer	Methyl red	Citrate	H <sub>2</sub> S production	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Casein hydrolysis
DHXJ01	Air	-	+	-	+	-	-	-
DHXJ02	Air	-	-	-	+	+	-	-
DHXJ03	Air	-	-	+	-	-	-	+
DHXJ04	Air	-	+	+	+	+	+	-
DHXJ05	Air	-	-	-	+	-	-	+
DHXJ08	Air	+	+	-	+	-	+	+
DHXJ09	Air & Mural	-	+	+	+	+	+	+
DHXJ10	Air	-	-	-	+	+	+	+
DHXJ12	Air & Mural	-	+	-	+	+	-	+
DHXJ13	Air & Mural	-	-	-	+	+	+	+
DHXJ14	Air	-	-	+	-	+	-	-
DHXJ15	Mural	-	-	+	+	-	-	+
DHXJ16	Air & Mural	+	+	-	+	+	+	+
DHXJ17	Air & Mural	-	-	-	-	+	+	+
DHXJ18	Mural	-	+	-	+	-	+	-
DHXJ19	Air & Mural	-	-	+	-	-	+	-
DHXJ20	Mural	-	+	-	+	+	+	+
DHXJ21	Mural	-	+	-	+	+	-	-
DHXJ22	Mural	-	+	-	+	-	-	-

注: -: 反应为阴性; +: 反应为阳性.

Note: -: Negative reaction; +: Positive reaction.

表 3 3 种红色颜料对细菌生长的影响  
Table 3 Effect of 3 kinds of red paint on the growth of bacteria

	铅丹 Pb <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	土红 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	朱砂 HgS
DHXJ01	-	++	-
DHXJ02	+	+	-
DHXJ03	-	+	+
DHXJ04	+	++	-
DHXJ05	++	++	++
DHXJ08	++	+	+
DHXJ09	+	++	+
DHXJ10	+	++	-
DHXJ12	+	++	-
DHXJ14	-	++	-
DHXJ15	-	++	++
DHXJ16	++	++	+
DHXJ17	++	++	+
DHXJ18	-	+	+
DHXJ19	+	+	+
DHXJ20	+	++	+
DHXJ21	-	+	+
DHXJ22	-	+	+

注: -: 不能生长; +: 能生长, ++: 生长良好.

Note: -: Not grow; +: Can grow; ++: Grow well.

### 3 讨论

敦煌位于河西走廊的最西段。该地区气候极为干燥, 降水量稀少, 属于典型的大陆性干旱气候。莫高窟的环境应该不适应微生物生长。根据鉴定结果, 壁画样中有 4 个属, 含量最多的依次为 *Bacillus*、*Arthrobacter*、*Paenibacillus*、*Erythrobacter*。这与冯清平等<sup>[5]</sup>的研究结果优势菌为 *Bacillus* 和 *Alcaligenes* 略有不同, 应该是由于两次研究所选洞窟不同造成的。245#属于中层窟, 受地下水和崖体顶部渗水的影响小, 而他们的样

品来源于下层窟和三层窟, 壁画酥碱、起甲问题比较严重<sup>[18]</sup>。从其来源来看, 芽孢杆菌(*Bacillus*)属、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)细菌是一类在土壤中含量为丰富的细菌, DHXJ10、DHXJ17、DHXJ18、DHXJ22 等菌的相似菌都来自贫瘠、恶劣的条件, 对极端环境的适应能力很强。节杆菌属(*Arthrobacter*)细菌广泛分布于自然环境当中, 特别是土壤中, 其数量上的优势以及碳源利用上的多样性等特征显示, 它们可能在土壤或其他环境的矿化过程中起重要的作用。然而目前已分离发现了相当数量的 *Arthrobacter* 属的耐冷菌/嗜冷菌 (*Psychrotrophs/Psychrophiles*), 这些菌株主要分离自南极的土壤、池塘和湖泊, 还有一些冰川和积雪地带<sup>[19]</sup>。

莫高窟空气中细菌的种类和数量都比壁画上的丰富, 在 245#窟中, 空气中的优势菌为 *Bacillus*、*Arthrobacter* 和 *Pseudomonas*。目前仅有汪万福等<sup>[10]</sup>研究了窟内微生物数量随着季节、洞窟开放与否的变化情况。245#窟以前是开放洞窟, 目前关闭进行修复。分离出的细菌 DHXJ05、DHXJ12 是人类常携带有的细菌, 很有可能是游客带入的。游客使窟内的微生物多样性进一步增加, 使壁画可能遭受新微生物的威胁。

莫高窟壁画是由直接附着于岩壁的地仗层和表面的颜料层组成。地仗层是由粘土、矿物碎屑和一些植物纤维如棉、麻、麦草等(不同时代添加的不同)制成的, 颜料层是在颜料中加入了一些骨胶, 然后直接涂在地仗层表面。根据本次研究的结果, 分离出的细菌大多具有分解蛋白的能力, 可以直接利用骨胶。红色颜料中生长较好的 DHXJ05、DHXJ08、DHXJ15、DHXJ16、DHXJ17 均有蛋白水解能力。特别在含有朱砂的培养基中, 从壁画中分离出的 11 株菌中, 唯有 DHXJ12 (*Micrococcaceae*)不能生长。而来自空气的 14 株



菌中只有 8 株能生长。颜料本身对细菌生长的影响也非常明显, 铅丹朱砂的抑菌效果非常明显, 铁红则影响很小。

根据敦煌研究院与美国盖蒂保护研究所在开放洞窟 323#进行的游客对洞窟环境影响的试验显示: 每人每小时呼出水汽的 67%, 约 21 g 水, 呼出二氧化碳的 52.3%, 约 4.7 L, 在观众离开洞窟时将留在窟内<sup>[20]</sup>。参考 Lascaux cave 保护经验, 游客对洞窟内环境的影响不容忽视。敦煌壁画能较好的保存至今, 其中一个重要原因就是所处的干旱环境, 而游客却带来了微生物生长必需的水, 提供了微生物生长所需要的环境条件, 这些微生物有可能对壁画造成危害, 因此做好莫高窟微生物病害预防工作极为重要。

本实验由于采用了纯培养的方法, 分离出的细菌种类受到一定限制, 可能还有一些未分离出来但对壁画影响很大的微生物。因此, 采用一些非培养技术, 通过分析其遗传多样性程度和代谢能力, 希望对敦煌壁画微生物病害的防治提供更全面的参考。

## 参 考 文 献

- [1] 郑国钰, 马清林. 甘肃酒泉、嘉峪关壁画墓霉菌分离鉴定与防治研究[J]. 文物保护与考古科学, 1996, 8(1): 43-50.
- [2] 陈红歌, 贾新成. 密县汉墓霉变壁画霉菌的分离鉴定[J]. 敦煌研究, 1996, 3: 145-148.
- [3] 郭爱莲, 单暉, 杨文宗. 陕西长安南礼王村出土壁画的微生物类群鉴定[J]. 文物保护与考古科学, 1997, 9(1): 39-43.
- [4] Gurtner C, Heyrman J, Piñar G, et al. Comparative analyses of the bacterial diversity on two different biodeteriorated wall paintings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2000, 46(3): 229-239.
- [5] 冯清平, 马晓军, 张晓君, 等. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究- I. 色变壁画的微生物类群及优势菌的检测[J]. *微生物学报*, 1998, 38(1): 52-56.
- [6] 冯清平, 张晓君, 马清林, 等. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究- II. 微生物对模拟石窟壁画颜料的影响[J]. *微生物学报*, 1998, 38(2): 131-136.
- [7] 杨玲, 冯清平, 张晓君, 等. 一株使敦煌壁画红色颜料变色菌株氧化铅丹特性的研究[J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 1999, 35(1): 145-148.
- [8] Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al. The microbiology of Lascaux Cave[J]. *Microbiology*, 2010, 156(3): 644-652.
- [9] Bastian F, Alabouvette C, Jurado V, et al. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave[J]. *Naturwissenschaften*, 2009, 96(7): 863-868.
- [10] Wang WF, Ma Y T, Ma X, et al. Seasonal variations of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2010, 64(4): 309-315.
- [11] 侯文芳, 薛平, 张国彬, 等. 莫高窟第217窟微环境监测分析[J]. *敦煌研究*, 2007(5): 93-97.
- [12] 唐丽杰. 微生物学实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2005: 108-111.
- [13] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [14] Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules[M]. New York: Academic Press, 1969: 21-132.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.

- [17] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17(6): 368-376.
- [18] 樊锦诗. 敦煌莫高窟的保护与管理[J]. *敦煌研究*, 2000(1): 1-4.
- [19] 陈明霞. 7株深海及南极来源的 *Arthrobacter* 属菌株鉴定[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2005.
- [20] 张国彬, 薛平, 侯文芳, 等. 游客流量对莫高窟洞窟内小环境的影响研究[J]. *敦煌研究*, 2005(4): 83-86.

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白质组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413