

敦煌莫高窟第 98 窟壁画表面菌斑的群落结构分析

武发思^{1,2,3,4} 汪万福^{1,2,3,4,5*} 马燕天⁵ 贺东鹏^{1,2,3,4} 樊再轩^{1,2,3,4}

向婷⁵ 徐瑞红^{1,2,3,4} 冯虎元⁵

- (1. 敦煌研究院保护研究所 甘肃 敦煌 736200)
- (2. 国家古代壁画与土遗址保护工程技术研究中心 甘肃 敦煌 736200)
- (3. 甘肃省古代壁画与土遗址保护重点实验室 甘肃 敦煌 736200)
- (4. 古代壁画保护国家文物局重点科研基地 甘肃 敦煌 736200)
- (5. 兰州大学 生命科学学院 甘肃 兰州 730000)

摘要:【目的】确定第 98 窟壁画表面白色污染物内微生物微观特征, 分析其群落组成、结构特点及诱发壁画病害微生物产生的因素, 为石窟寺保护和旅游管理提供建议。【方法】利用无菌手术刀收集壁画表面白色污染物样品; 利用扫描电子显微镜(SEM)分析样品中微生物体微观形貌; 通过提取样品总 DNA、扩增细菌 16S rDNA、构建克隆文库、测序和系统发生关系分析等技术研究壁画微生物群落组成与结构特点。【结果】壁画白色污染物中存在大量具有微生物特征的结构体, 形态多呈短杆状和卵圆形, 大小在 (3.0–5.5) μm × (1.5–2.5) μm 之间。共得到克隆文库序列 111 条, 主要为变形菌门 γ -变形菌亚门肠杆菌科(Enterobacteriaceae)与假单胞菌科(Pseudomonadaceae)成员。群落组成和结构分析表明所得序列主要隶属于肠杆菌属(*Enterobacter*)、埃希菌属(*Escherichia*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和克雷伯菌属(*Klebsiella*); 埃希菌属和肠杆菌属为优势属, 分别占克隆文库中总序列的 46.8%和 35.1%, 二者在自然界分布广泛, 大多属于人类致病菌。【结论】莫高窟第 98 窟壁画表面白色污染物主要为病害细菌生长所形成的菌斑群落集成。变形菌门在壁画细菌克隆文库中占绝对优势, 壁画病害微生物的出现和蔓延可能与该洞窟之前长期旅游开放存在一定关联。

关键词: 敦煌壁画, 菌斑, 16S rDNA, 克隆文库, 群落组成, 结构特征, 旅游开放

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31260136, 31070344); 国家文物局文物保护科学与技术研究重点课题(No. 20110208); 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAC07B02); 敦煌莫高窟第 98 窟保护修复工程项目

*通讯作者: Tel: 86-937-8869043; 信箱: wwanfu@hotmail.com

收稿日期: 2012-11-21; 接受日期: 2013-03-05

Community structures of bacterial colonies on wall paintings in Cave 98 at Mogao Grottoes, Dunhuang

WU Fa-Si^{1,2,3,4} WANG Wan-Fu^{1,2,3,4,5*} MA Yan-Tian⁵ HE Dong-Peng^{1,2,3,4}
FAN Zai-Xuan^{1,2,3,4} XIANG Ting⁵ XU Rui-Hong^{1,2,3,4} FENG Hu-Yuan⁵

(1. Conservation Institution of Dunhuang Academy, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(2. National Research Center for Conservation of Ancient Wall Paintings and Earthen Sites, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(3. Key Laboratory for Conservation of Ancient Wall Paintings and Earthen Sites in Gansu, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(4. Key Scientific Research Base of Conservation for Ancient Mural, State Administration for Cultural Heritage, Dunhuang, Gansu 736200, China)

(5. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: [Objective] In this study, we aimed to observe the detailed features of microbes within white spots adhered to the surface of ancient wall paintings in Cave 98, Mogao Grottoes; meanwhile, we explore microbial community composition and structure characteristics, analyze factors that induce the explosion of microbial diseases on murals; thereafter, our results could serve with scientific support for cave conservation and tourism management. **[Methods]** Samples of white spots on murals were carefully collected by sterile scalpel and sealed in eppendorf tubes. A part of samples was used for observation of microbes by the scan electronic microscope (SEM); another part was used for the total genomic DNA extraction, followed steps were the bacterial 16S rDNA amplification, clone library construction, sequencing, and phylogenetic analysis, afterwards, the microbial community composition and structure characteristics were clarified. **[Results]** A number of objects that similar to microbes were observed in white spots of wall paintings, which shaped short rod or ovoid, with the volume ranged among 3.0 μm –5.5 μm multiply by 1.5 μm –2.5 μm . About 111 appropriate sequences were retrieved from clone library in this study. All sequences were similar to members of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* that both belong to phylum of γ -proteobacteria. Results of community analysis indicated that sequences were mainly affiliated to genus *Enterobacter*, *Escherichia*, *Azotobacter*, *Serratia*, and *Klebsiella*; *Enterobacter* (46.8%) and *Escherichia* (35.1%) were dominant in our study, both of them are ubiquitous microbes in nature, and human pathogenic bacteria as known. **[Conclusion]** The white spots on murals in Cave 98 were caused by colony formation of bacterial growth. Members of proteobacteria dominated in the clone library of our study sites. As a result, we speculated that explosion and spread of microbes in Cave 98 was related to long-term tourism in this cave previously.

Keywords: Dunhuang murals, Microbial colonies, 16S rDNA, Clone library, Community composition, Structure characteristics, Tourism opening

敦煌莫高窟是集壁画、彩塑和建筑于一体的遗址博物馆, 第一批全国重点文物保护单位, 1987 年被列入“世界文化遗产名录”, 是世界上现存规模最大、内容最丰富的佛教艺术圣地, 具有极高的历史文化价值、艺术价值和科学价值。然而, 长期受风沙磨蚀和突降雨水冲蚀等自然因素、动物侵害和微生物腐蚀等生物因素、以及历史上战争与人类活动的影响和破坏, 这些珍贵的文化遗产正在不断地承受着裂隙、空鼓、酥碱和霉变等多种病害, 导致其产生不同程度的开裂、大面积剥落以及颜料层变色, 严重威胁到其长久保存和陈展弘扬^[1]。

微生物病害是影响古壁画保存和文物安全的常见问题之一。包括法国拉斯科史前洞穴、西班牙阿尔塔米拉洞穴和埃及图坦卡门墓在内的多处世界遗产地珍贵壁画均存在着极其严重的微生物病害问题, 尽管这些古壁画所附存的地理位置和气候环境存在极大差异, 但微生物病害的暴发和大肆蔓延主要与遗产地原有保存微环境的改变和当地无节制的旅游开放有着必然的联系^[2-4]。近期研究发现, 游客的进出已影响了世界遗产地敦煌莫高窟所附存环境中空气微生物的浓度、群落组成和结构特征^[5-6]。毋庸置疑, 访客的参观活动可对地下遗址、墓葬、洞穴或石窟寺中壁画保存原有环境形成极大扰动, 并对其固有的脆弱微生态系统平衡造成较大冲击^[7]。

长期以来, 国内外在壁画微生物类群分析和腐蚀机理研究方面已开展了大量工作^[8-10]。传统的分离培养技术在壁画微生物种类鉴定中被普遍应用, 其在病害菌株生理特性研究方面具有明显优势^[11-13]。然而, 目前大部分微生物仍无法通过培养获得, 外源营养的介入使得基于培养的技术无法准确揭示如史前岩画和干旱区壁画这些寡营养介质中微生物群落的真实信息。近年来, 微生物群落分子检测技术因其敏感性和准确性

而广受微生物学家和文物保护工作者青睐, 其在短期内得到文物腐蚀微生物群落组成和结构方面的重要信息^[14-16]。

微生物病害是引起敦煌莫高窟古代壁画色变的关键因素之一。早在 2004 年冬季进行洞窟壁画病害现状调查中, 初次发现第 98 窟东壁及东坡壁画表面存在粉末状白色污染物, 与壁画颜料层结合程度差, 轻触即可掉落, 这一现象引起了课题组的极大兴趣, 并给予高度关注^[17]。本研究结合扫描电子显微镜技术和微生物分子鉴定技术, 对该洞窟壁画污染物内细菌群落组成和结构特征进行了深入分析。研究成果将为石窟寺壁画的有效保护和合理利用提供理论依据与技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样点简介: 第98窟位于莫高窟南区下层第96窟和第100窟之间, 该窟开凿于五代曹议金任节度使时期(公元914-935), 洞窟由前室(殿堂)、甬道和主室三部分组成, 前室已塌毁(图1)。洞窟壁画病害主要有裂隙、空鼓、酥碱、起甲、脱落和微生物污染。

1.1.2 样品采集: 课题组于2011年9月2日在莫高窟第98窟东披和东壁(图1中红色线条标记区)壁画表面白色污染区域(图2A、B)用无菌手术刀轻轻刮取表层白色粉末状样品(图2C、D)。采样过程应避免损伤到壁画颜料层, 以利于壁画的保护; 同时应避免收集到其它粉尘颗粒, 以减少外源性污染物对后期群落结构分析的影响。实验样品全部收集至2 mL无菌Eppendorf管中, 带回实验室后一部分用于扫描电镜分析, 另一部分用于基因组总DNA的提取。

1.2 方 法

1.2.1 样品SEM分析: 取少量壁画表面白色污染

物样品, 固定于导电胶带上, 在真空环境下 ($< 5 \text{ Pa}$) 喷金 90 s ($I=40 \text{ mA}$), 完成制样后使用扫描电子显微镜 (JSM-6610LV, JEOL. Ltd.) 分析供试样品中菌体的微观形貌特征。

1.2.2 样品总 DNA 提取: 称取采集到的壁画表面样品 25 mg, 使用 E.Z.N.ATM SP DNA 抽提试剂盒 (OMEGA BIO-TEK, USA), 根据操作说明完成样品基因组总 DNA 的提取, 分装后置于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 目标片段扩增: 合成细菌通用引物 27F ($5' \text{-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'}$) 和 1492R ($5' \text{-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'}$), 完成 16S rDNA 的扩增。反应体系 ($25 \text{ } \mu\text{L}$) 包括 $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ $10\times$ 缓冲液, 1 U 的 *Taq* 聚合酶 (Tiangen Co., Beijing, China), dNTPs 0.2 mmol/L , MgCl_2 2.5 mmol/L , 引物 $0.2 \text{ } \mu\text{mol/L}$, 及 $2.0 \text{ } \mu\text{L}$ DNA 模板 (约含 5 ng DNA)。扩增程序为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 共 30 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$

10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小与特异性。

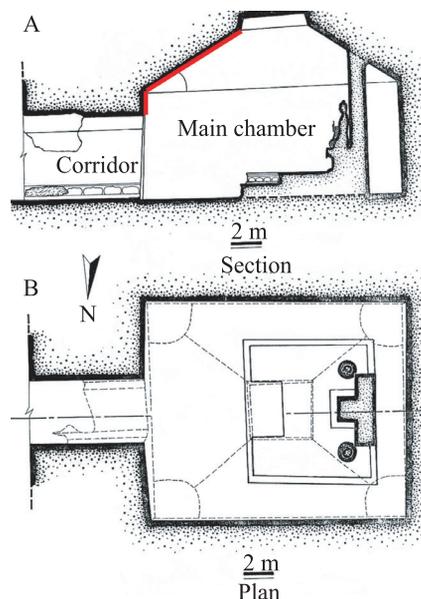


图 1 莫高窟第 98 窟剖面与平面位置信息

Fig. 1 Plane and section profiles information of Cave 98 at Mogao Grottoes



图 2 莫高窟第 98 窟微生物病害典型区域 (A, B) 及实验样品采集 (C, D)

Fig. 2 Typical microbial disease areas (A, B) and experimental sample collecting (C, D) in Cave 98, Mogao Grottoes

1.2.4 克隆文库构建: 使用琼脂糖 DNA 纯化试剂盒(Tiangen Co., Beijing, China)纯化扩增产物。取纯化后产物 3 μL , 与 pGEM-T 载体(Promega)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接, 连接产物克隆至 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中(Tiangen)。根据蓝白斑筛选实验(LB 培养基中 AMP 浓度为 100 mg/L, X-Gal 为 20 g/L, IPTG 为 200 g/L)构建细菌 16S rDNA 克隆文库。

1.2.5 测序与嵌合体检测: 分别挑取150–200个白斑, 利用通用引物T7/SP6扩增验证阳性克隆子中插入片段的大小。验证无误后的克隆斑挑取至装有液体LB培养基的离心管中(含Amp 100 mg/L), 过夜摇培(37 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min)后送交测序公司完成测序(Shanghai majorbio Bio-technology Co., Ltd.)。所得序列使用CONTIGEXPRESS软件编辑(Informax, MD, USA)和在线嵌合体检测^[18]后, 全部提交至 GenBank 数据库。

1.2.6 序列比对及系统发育树构建: 所得序列在 GenBank 数据库中进行比对, 获得其最相似的参考序列。通过MEGA 5.0软件中的最大相似模型法完成克隆文库所得典型序列与其相似序列间系统发生关系分析。

1.2.7 群落结构分析: 统计系统发育树中相同种属序列数量, 计算其在克隆文库中所占百分比, 完成群落组成与结构分析。

2 结果与分析

2.1 污染样品的扫描电镜分析

通过对第98窟壁画表面白色污染物完成扫描电子显微镜分析, 初步判定白色污染物主要是细菌生长集聚形成的菌斑, 其中存在大量具有微生物特征的结构体(图3A), 其形态组成相对单一, 大部分呈短杆状、卵圆形或梭形(图3B–D), 形态大小在(3.0–5.5) μm ×(1.5–2.5) μm 之间。扫描电镜下, 多数菌体形态结构发生一定程度的变形, 甚

至干瘪。究其原因, 可能与病害微生物所附存的微生境有关。由于洞窟内相对湿度常年较低, 洞窟所依附崖体内水分和盐分的运移极易导致壁画表面形成NaCl、NaNO₃和Na₂SO₄等不同类型的盐富集。一般而言, 高盐浓度和低相对湿度均易引起菌体细胞失水, 导致其形态结构发生改变。另一方面, 菌体干瘪可能是因为其已经死亡, 或是因为所观察到的菌体本身就是细菌芽孢, 尚无法给出定论, 需进一步深入探究。

2.2 阳性克隆的筛选

提取样品基因组总DNA, 利用通用引物27F/1492R扩增细菌16S rDNA, 扩增产物经割胶纯化、与载体连接后转入感受态细胞完成目标片段的克隆转化。本研究中, 通过蓝白斑筛选实验共得到白色阳性克隆菌斑193个, 二次扩增验证后获得具有合适片段大小(约1 600 bp)的阳性克隆斑156个, 全部送交测序公司完成了序列测定。

2.3 测序及序列比对

阳性克隆斑摇培菌液经测序共得到片段大小合适的序列 111 条, 完成在线嵌合体检测后全部提交至 NCBI 数据库(序列号: KC119222–KC119332)。通过BLAST序列比对, 确定了NCBI 数据库中与本研究测序得到序列相似度最高序列的科属、物种和分离源等基本信息(表 1)。结果显示, 克隆文库中测序所得序列主要与肠杆菌(*Enterobacter* sp.)、埃希菌(*Escherichia blattae*)、圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)、沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)具有较高的相似度, 它们隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和假单胞菌科(Pseudomonadaceae)。通过对比 NCBI 数据库中相似序列的分离源信息发现, 这些序列主要分离于土壤、火山沉积物和废水处理器等样品中。

2.4 构建系统发育树

选择经BLAST比对后代表性序列和NCBI数

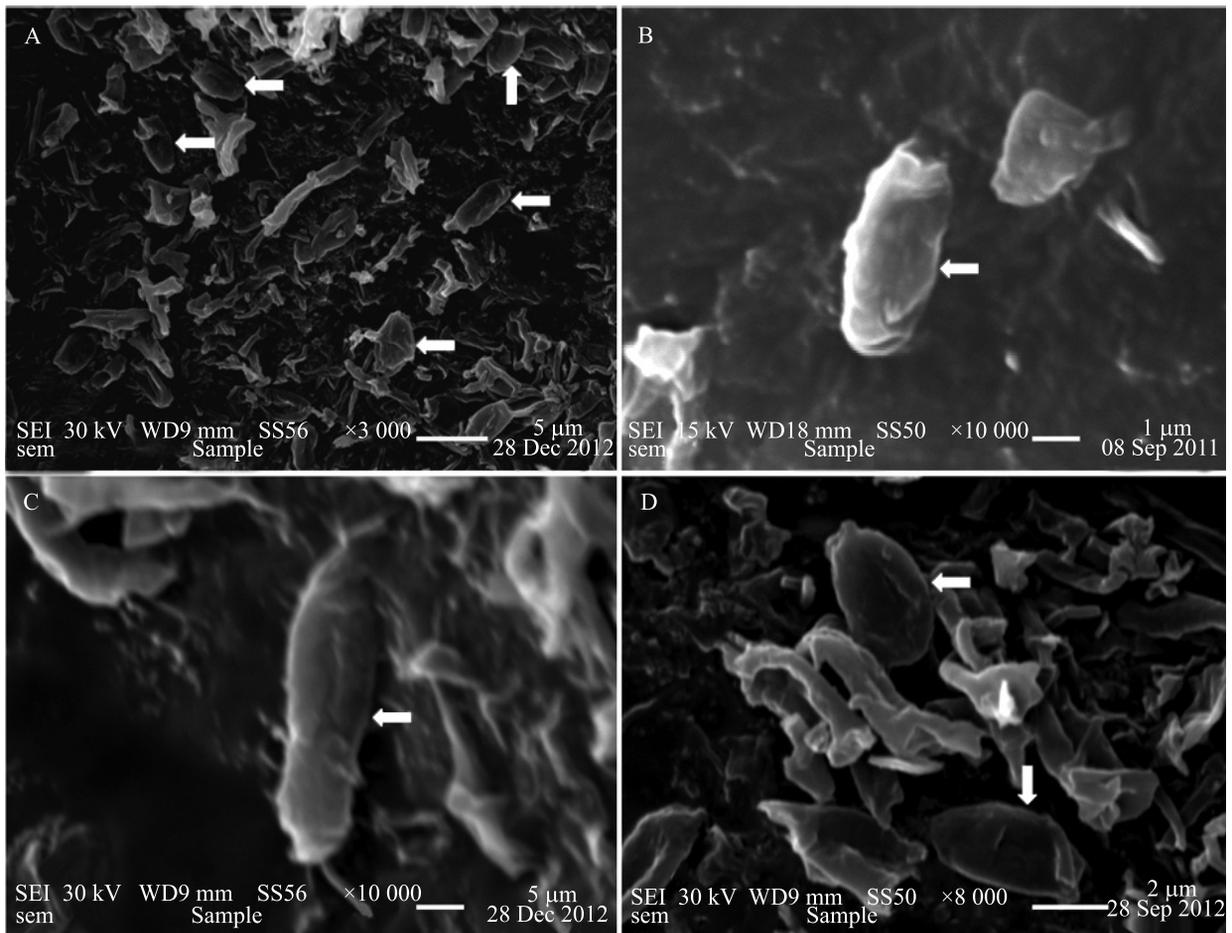


图3 莫高窟第98窟壁画白色污染物扫描电子显微镜分析(箭头所示为微生物体)

Fig. 3 SEM analysis of white pollutants of murals in Cave 98, Mogao Grottoes (the arrows indicate microbes)

表1 莫高窟第98窟壁画表面菌斑16S rDNA克隆文库典型序列比对分析

Table 1 Analysis of typical 16S rDNA clone library sequences blast on murals of Cave 98, Mogao Grottoes

Typical clones (Accession No.)	Family	Species	Source	Identity (%)	Accession No.
wp9 (KC119230)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	Volcanic deposits	99	DQ490329
wp10 (KC119231)	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> sp.	Wastewater	99	JN049594
wp15 (KC119236)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	Soil	99	HQ189499
wp21 (KC119242)	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia blattae</i>	Hind-gut	98	JN175333
wp23 (KC119244)	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Paddy soil	99	AB696769
wp29 (KC119250)	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Agricultural soil	99	EF634032
wp38 (KC119259)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rhizosphere soil	98	JQ993364
wp44 (KC119265)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	Alkaline soil	98	HE662664
wp55 (KC119276)	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia blattae</i>	Genomic DNA	98	CP001560
wp57 (KC119278)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Tannery effluent	99	GU265554
wp61 (KC119282)	Enterobacteriaceae	<i>Serratia marcescens</i> subsp.	Wastewater treatment tank	99	NR_036886
wp64 (KC119285)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	Sediment	98	EU545406
wp68 (KC119289)	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> sp.	Poultry waste	99	GQ478256
wp86 (KC119307)	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp.	Lateritic soil	99	CP000647
wp99 (KC119320)	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia blattae</i>	Genomic DNA	98	CP001560

据库中与之相似程度最高的序列, 构建莫高窟第 98 窟壁画病害细菌 16S rDNA 及其相似序列间系统发生关系树, 从图 4 可以看出, 所有序列均属于变形菌门 γ -变形菌亚门, 所属门类单一。

2.5 群落组成与结构分析

克隆文库测序共得到序列 111 条, BLAST 序列比对与系统发生关系分析后确定所得序列主要属于 5 个属, 分别为肠杆菌属(*Enterobacter*)、埃希菌属(*Escherichia*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和克雷伯菌属(*Klebsiella*)。其中埃希菌属和肠杆菌属为优势属, 分别占文库中序列总数的 46.8% 和 35.1%; 克雷伯菌属最少, 仅占序列总数的 2.7% (图 5)。

3 讨论

本研究通过 SEM 分析, 初步确定了莫高窟

第 98 窟东壁及东披壁画表面白色污染物主要是微生物生长所形成的菌斑。污染物中菌体多数呈短杆状、卵圆形或梭形, 大小在 $(3.0-5.5) \mu\text{m} \times (1.5-2.5) \mu\text{m}$ 之间, 其主要通过生长代谢和扩散在壁画表面形成白色克隆斑。徐淑青等之前在该洞窟壁画病害现状调查中曾提到过这类白色粉状覆着物, 其在洞窟东壁和东披零星分布, 总面积达 2.02 m^2 [17]。近期调查发现此类白色污染物面积有所增大, 本研究利用 SEM 技术初步确定了污染物中存在菌体结构, 具有生理活性菌体的生长和扩散造成壁画污染面积进一步扩大。

通过克隆文库测序共获得序列 111 条, BLAST 序列比对显示所有序列隶属于肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*)。群落组成和结构分析表明壁画表面细菌类群主要有肠杆菌属(*Enterobacter*)、

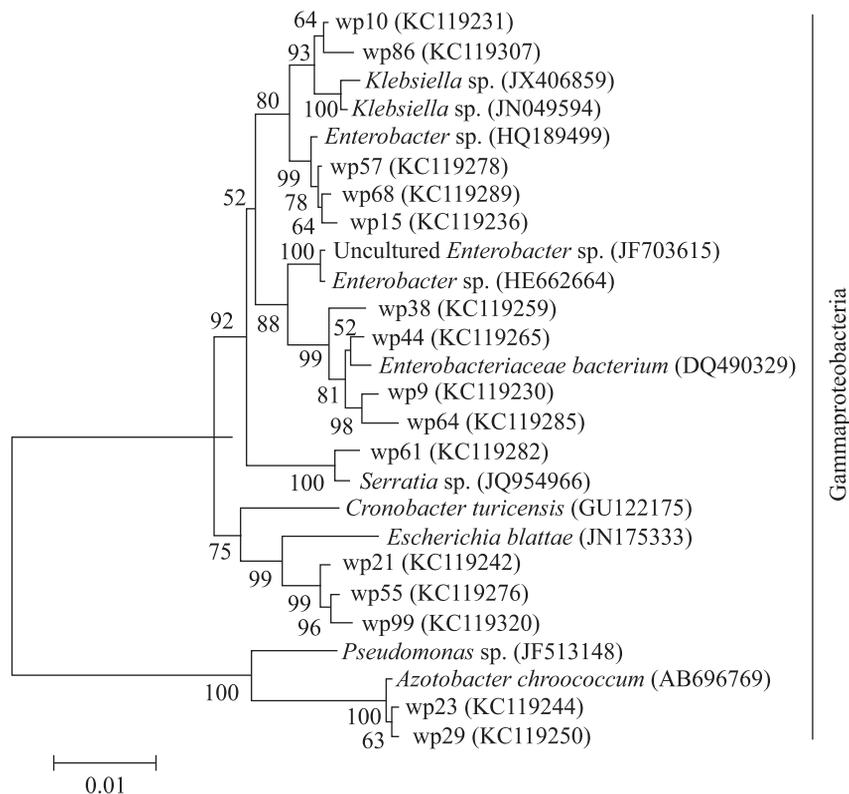


图 4 莫高窟第 98 窟壁画病害细菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of bacterial 16S rDNA sequences derived from the wall paintings in Cave 98, Mogao Grottoes

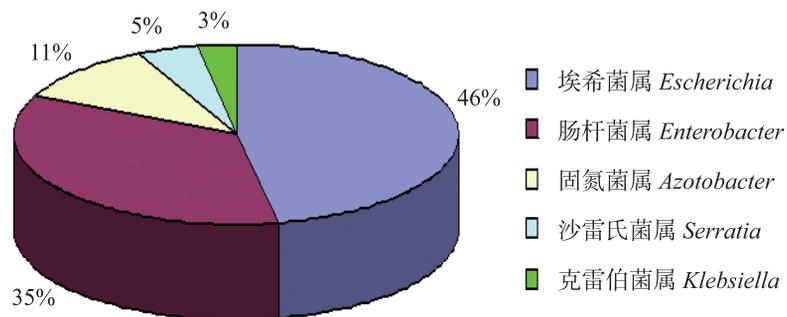


图5 莫高窟第98窟壁画表面细菌群落中主要种属所占百分比

Fig. 5 Proportions of bacterial genus detected among the bacterial community on the wall paintings in Cave 98, Mogao Grottoes

埃希菌属(*Escherichia*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和克雷伯菌属(*Klebsiella*)。其中埃希菌属和肠杆菌属为优势属,分别占克隆文库序列的46.8%和35.1%,这与莫高窟微生物病害已有研究结果存在较大差异。冯清平等通过传统培养技术确定了壁画变色颜料样品中优势细菌属为芽孢杆菌属(*Bacillus*)和产碱菌属(*Alcaligenes*)^[8,13]。张景林等近期采用纯培养技术和16S rDNA鉴定技术分析发现,莫高窟第245窟内壁画表面霉点中细菌主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、内芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)和赤细菌属(*Erythrobacter*),共4个属^[12]。与本研究不同,二者所采集的样品均为壁画表面颜料发生褐色或黑色霉变的区域,研究材料和方法的不同必然会造成壁画表面微生物群落组成的差异。同为壁画表面白色菌斑,分子鉴定表明西班牙旧石器时代洞穴内病害微生物主要为假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)成员^[19]。就研究方法而言,传统的富集培养手段仅可得到1%左右的壁画微生物类群,而可能与壁画变色和老化有关的其它99%的微生物则难以恢复培养,故而无法准确体现壁画病害微生物多样性^[14,20]。不仅如此,壁画表面微生物类群通常存在时空动态演替过程,洞窟微环境或营养源的改变都会引起病害微生物群落结构发生新

的变化^[2,9]。

系统发生关系分析表明,克隆文库中所得序列均属于变形菌门 γ -变形菌亚门。已有研究表明,变形菌门细菌通常可占到洞穴中微生物群落总数的45%–50%^[9],在法国拉斯科史前洞穴壁画上,变形菌门甚至达到细菌总数的98%,进一步分析表明,这种群落结构的变化主要归因于拉斯科洞穴最近70年以来受到考古发掘和参观访问等人类活动的影响^[21]。众所周知,埃希菌、肠杆菌、沙雷氏菌和克雷伯菌属成员广泛存在于土壤、大气和水环境中,通常与人类活动关系密切,多数成员为人类致病菌。在莫高窟第245窟细菌多样性的近期报道中,洞窟内空气样品中就检测到了肠杆菌的存在^[12]。洞窟附存环境气溶胶中的微生物孢子若附着至壁画表面,一旦条件适宜,即可萌发生长和扩散,造成壁画美学价值的降低和材质结构损坏。莫高窟第98窟属于大型洞窟,10年前作为开放洞窟一直对游客开放参观,后因酥碱等严重的壁画病害问题停止对外开放,并随后开展抢救性的保护修复工作,此项工作至今一直在进行中。该洞窟壁画微生物病害的暴发时间没有准确记录,但目前研究已确定这些病害微生物主要属于与人类活动密切相关的致病菌,因而我们可以初步推测,微生物病害的发生和蔓延可能与过去大量游客涌入并长时间滞留于洞窟中存在

一定关联。

随着旅游文化产业的发展, 包括莫高窟在内的诸多遗产地和文化景区所面临的游客承载力日益增大。游客数量的突增必然会导致洞窟内温度、相对湿度和CO₂浓度急剧升高, 长期形成的洞窟内相对稳定的微环境平衡不断遭到破坏, 水汽含量的剧增可为壁画病害微生物的生长提供有利条件。研究发现, 游客参观对西班牙阿尔塔米拉洞穴微环境平衡造成了极大的扰动, 洞穴中微生物孢子浓度和群落组成发生了很大改变^[22]。与之相似, 已有研究表明莫高窟洞窟内温度、相对湿度和CO₂浓度会随着游客的进入而显著升高^[23-24], 与长年关闭洞窟相比, 长期开放与季节性开放洞窟中空气微生物浓度和群落组成均发生了明显改变^[5-6]。

当壁画遭受到微生物的代谢腐蚀和生长损坏时, 对于病害微生物类群的定性研究则尤为必要, 盲目地使用化学杀灭剂则可能会对文物表面固有微环境造成不可挽回的破坏, 使微生物病害进一步加剧或引发新的次生病害^[25]。分子克隆技术在腐蚀微生物群落快速、准确检测方面具有传统培养分离手段无可替代的优势, 其在生物腐蚀机理的研究方面也具有良好的应用前景。为了进一步确定洞窟壁画病害微生物的生长活性状况和代谢特征, 有必要引入Real-time、高通量测序和Biolog等技术开展深入研究。

如何处理好世界遗产地保护与利用间的关系依然是当前亟待解决的关键问题。洞窟开放与否及其游客承载量大小的判定必须以洞窟微环境监测为基本依据, 壁画病害微生物的监测及有效预防无疑将为遗产地科学保护和合理利用提供理论依据和技术支撑。

参 考 文 献

[1] 李最雄. 敦煌石窟的保护现状和面临的任务[J].

敦煌研究, 2000(1): 10-23.

- [2] Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al. The microbiology of Lascaux Cave[J]. *Microbiology*, 2010, 156(3): 644-652.
- [3] Saiz-Jimenez C, Cuezva S, Jurado V, et al. Paleolithic art in peril: policy and science collide at Altamira cave[J]. *Science*, 2011, 334(6052): 42-43.
- [4] Pitts, M. The Guardian[EB/OL]. www.guardian.co.uk/culture/2011/jan/17/tutankhamun-tomb-to-close. January 17, 2011, p. G2.
- [5] Wang WF, Ma X, Ma YT, et al. Molecular characterization of airborne fungi in caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(5): 726-731.
- [6] Wang WF, Ma YT, Ma X, et al. Diversity and seasonal dynamics of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *Aerobiologia*, 2012, 28(1): 27-38.
- [7] Allemand L, Bahn PG. Best way to protect rock art is to leave it alone[J]. *Nature*, 2005, 433(7028): 800.
- [8] 冯清平, 李最雄, 马晓军, 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*, 1998a, 38(2): 131-136.
- [9] Ciferri O. Microbial degradation of paintings[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 879-885.
- [10] Sterflinger K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2010, 24(1/2): 47-55.
- [11] Garg KL, Jain KK, Mishra AK. Role of fungi in the deterioration of wall paintings[J]. *The Science of the Total Environment*, 1995, 167(1/3): 255-271.
- [12] 张昺林, 唐德平, 张楠, 等. 敦煌莫高窟中细菌多样性的研究[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 614-623.
- [13] 冯清平, 李最雄, 马晓军, 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*, 1998b, 38(1): 52-56.
- [14] González JM, Saiz-Jimenez C. Application of

- molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks[J]. *International Microbiology*, 2005, 8(3): 189–194.
- [15] Mitchell R, Mcnamara CJ. *Cultural Heritage Microbiology, Fundamental Studies in Conservation Science*[M]. Washington DC: ASM Press, 2010.
- [16] 武发思, 汪万福, 贺东鹏, 等. 嘉峪关魏晋墓腐蚀壁画细菌类群的分子生物学检测[J]. *敦煌研究*, 2011(6): 56–63.
- [17] 徐淑青. 莫高窟第98窟现状调查报告[J]. *敦煌研究*, 2005(5): 75–77.
- [18] 嵌合体在线检测系统[EB/OL]. <http://rdp8.cme.msu.edu>.
- [19] Stomeo F, Portillo MC, Gonzalez JM, et al. *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with Paleolithic paintings[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(4): 483–486.
- [20] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127–141.
- [21] Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. Bacteria and free-living amoeba in the Lascaux Cave[J]. *Research in Microbiology*, 2009a, 160(1): 38–40.
- [22] Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, et al. Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 18(6): 1037–1045.
- [23] 张拥军, 王宝义, 前川信. 观众对洞窟环境影响的实验分析[A]//敦煌研究文集-石窟保护(上集)[C]. 兰州: 甘肃民族出版社, 1993.
- [24] 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.
- [25] Bastian F, Alabouvette C. Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: The case of Lascaux Cave[J]. *International Journal of Speleology*, 2009b, 38(1): 55–60.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。