



研究报告

天梯山石窟壁画保存环境中空气细菌的季节性变化

段育龙^{Δ1,4} 武发思^{Δ2,3,5} 汪万福^{*1,2,3,4,5} 贺东鹏^{2,5} 卢秀善⁶

1 中国科学院西北生态环境资源研究院 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室 甘肃 兰州 730000

2 敦煌研究院 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 兰州大学生命科学院 细胞活动与逆境适应教育部重点实验室 甘肃 兰州 730000

4 中国科学院大学 北京 100049

5 甘肃省古代壁画与土遗址保护重点实验室 甘肃 敦煌 736200

6 天梯山石窟管理处 甘肃 武威 733000

摘要:【背景】微生物侵蚀是古代壁画常见生物病害,影响壁画的长久保存和安全陈展。空气微生物作为壁画病害菌的主要来源,近年在文物赋存环境监测和预防性保护中引起广泛重视。【目的】对天梯山石窟壁画的2处保存地,即天梯山原址和武威西夏博物馆壁画保存环境中的空气细菌浓度、群落结构及其季节变化规律进行分析。【方法】利用生物气溶胶采样器,在2016年春、夏、秋、冬4季分别采集各位点空气样品;基于传统培养方法获得空气中细菌浓度及纯培养菌株;通过提取细菌基因组DNA、扩增其16S rRNA基因、测序和系统发生关系分析等技术研究不同位点细菌群落时空动态变化规律;结合环境监测数据,分析影响文化遗产地空气细菌群落变化的主要因素。【结果】空气可培养细菌的总浓度在16.7–1451.8 CFU/m³范围内变动。原址第18窟和第13窟,各季节细菌浓度无显著性差异,且呈明显季节性变动规律,总体特征为夏秋季低,冬春季高。西夏博物馆外空气细菌浓度在各季节均高于库房内,冬季最高。本研究共鉴定出19个细菌属,隶属于4个门;其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、肉食杆菌属(*Carnobacterium*)、*Pseudoclavibacter*和薄层菌属(*Hymenobacter*)为优势属。【结论】天梯山石窟空气细菌群落结构具有明显的时空分布特征;相对湿度、温度及季节性降水均会影响其变化;鉴定得到部分种属具备引起壁画生物腐蚀的潜势;本研究可为当地开展遗址和馆藏环境中文物预防性保护提供本底资料。

关键词: 空气细菌, 群落特征, 古代壁画, 监测预警

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31500430, 31560160); Science and Technology Plan of Gansu Province (1604WKCA003, 18JR3RA004); CAS “Light of West China” Program (18JR3RA004); Project of Gansu Cultural Relics Bureau (GWJ2014003)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-937-8869043; E-mail: wwanfu@hotmail.com

Received: 09-03-2018; Accepted: 28-08-2018; Published online: 19-10-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31500430, 31560160); 甘肃省科技计划项目(1604WKCA003, 18JR3RA004); 中国科学院“西部之光”人才培养引进计划(18JR3RA004); 甘肃省文物局课题(GWJ2014003)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 0937-8869043; E-mail: wwanfu@hotmail.com

收稿日期: 2018-03-09; 接受日期: 2018-08-28; 网络首发日期: 2018-10-19

Seasonal variation of airborne bacteria of the Tiantishan Grottoes and Western Xia Museum, Wuwei

DUAN Yu-Long^{Δ1,4} WU Fa-Si^{Δ2,3,5} WANG Wan-Fu^{*1,2,3,4,5} HE Dong-Peng^{2,5}
LU Xiu-Shan⁶

1 Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, CAS, Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China

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

3 MOE Key Laboratory of Cell Activities and Stress Adaptations, School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

5 Key Laboratory for Conservation of Ancient Wall Paintings and Earthen Sites, Gansu Province, Dunhuang, Gansu 736200, China

6 Administrative of the Tiantishan Grottoes, Wuwei, Gansu 733000, China

Abstract: [Background] Microbial deterioration is a common biological disease in ancient wall paintings, which seriously threaten the long-term safety preservation and exhibition of the wall paintings. As the main source of the harmful microorganisms to wall paintings, airborne microorganisms have attracted extensive attention in the monitoring and preventive conservation of cultural relics in recent years. **[Objective]** Systematic survey of culturable airborne bacteria, including the concentration, community structure and seasonal variation, was carried out in environments of wall paintings preserved at Tiantishan Grottoes and Western Xia Museum, China. **[Methods]** Bio-aerosol sampler containing R₂A agar was used for sampling in all four seasons in 2016. Traditional culture-based method to acquire the airborne bacterial concentration information and purified strains; by the extraction of genomic DNA, amplification of bacteria 16S rRNA gene region, sequencing, and phylogenetic analysis, thereafter the bacteria community composition and distribution characteristics of different study sites were clarified. Combined with environmental monitoring data, to disclosure the main factors which responsible for the dynamic changes of the airborne bacteria at the site. **[Results]** The concentration of culturable airborne bacteria was in a range from 16.7 to 1 451.8 CFU/m³. There was no significant difference in bacteria concentration between the Cave 18 and Cave 13, namely, the two sites at the Tiantishan Grottoes, with the obvious characteristics of the seasonal variation, briefly speaking, Winter and Spring were higher than Summer and Autumn. Meanwhile, there was significant difference in bacteria concentration between the inside and outside of the Xixia Museum, the square outside of the museum were far more than the inside of the museum at the four seasons, particularly in the winter. A total of 19 bacteria genera that affiliated to four phylum were detected, among which, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Brevundimonas*, *Carnobacterium*, *Pseudoclavibacter* and *Hymenobacter* were the dominant ones. **[Conclusion]** The airborne bacterial community structures of the Tiantishan Grottoes showed a distinct characteristic of the seasonal variation and spatial distribution; RH, temperature and seasonal rainfall were all have influences on the airborne bacteria distribution; some of the genera have potential of causing biodeterioration of the ancient wall paintings at this site; this study could provide supporting information for the preventive protection of cultural relics that preserved at local site and museums.

Keywords: Airborne bacteria, Community characteristics, Ancient wall paintings, Monitoring and precaution

细菌和真菌等微生物无处不在, 其广泛存在于各种生境中, 岩穴、石窟寺、考古现场等遗址地和馆藏环境中的文物因微生物活动而导致的生

物侵蚀现象十分严重^[1-4]。法国拉斯科洞穴(Lascaux Cave)、西班牙阿尔塔米拉岩穴(Altamira Cave)和 Tito Bustillo 洞穴等地的研究表明, 微生物

过度增殖会引起壁画颜料层色变、结构损伤和脱落等病害^[5-8]。空气是微生物的重要储存库, 已知存在于空气中的细菌及放线菌约 1 200 种, 真菌则高达 40 000 种^[9], 它们可随气流传输到各个角落, 无论室内环境还是户外, 当其沉降、附着在壁画等文物表面后, 在适宜的营养、温度和湿度等外界条件下, 便有暴发的可能, 引起文物材料的生物退化和生物降解。探明文物保存环境空气中微生物的浓度、群落结构、分布特征等已成为当前文化遗产预防性保护的重要内容, 相关研究成果可为文物保护及旅游开放管理提供数据支持。

壁画作为极具价值的文化遗产, 按保存场所的不同, 可将其分为原址保存和异地保存两种方式, 前者是指壁画的原生环境, 如岩穴、石窟、寺庙、墓室等, 当这些壁画的原生环境受到破坏而威胁其安全保存时, 就需要将其进行揭取、搬迁至博物馆内异地保存^[10]。针对壁画保存环境中空气微生物已有大量研究, 涉及浓度、群落组成、分布特征及其影响因素等。研究表明, 空气中微生物通常附着在灰尘等溶胶粒子上以生物气溶胶的形式存在, 其来源复杂, 主要可分为自然来源和人为来源, 包括植被与土壤、蔬菜、畜牧业、农业生产和交通运输^[11]等。目前, 常用菌落形成单位(Colony forming unit, CFU)这一指标来反映单位体积空气中可培养微生物的数量, 它可作为文物赋存环境中微生物暴发的早期预警与环境控制的重要生态学指标^[12-16]。

基于 16S rRNA 基因和 ITS (Internal transcribed spacer)区域的序列分析法、PCR-DGGE、高通量测序技术等广泛用于文物赋存环境中空气微生物的分析鉴定^[17-19]。因研究位点的地域、微环境和研究方式的不同, 各地空气微生物浓度及群落组成差异很大, 尤其是博物馆内外环境空气微生物差异更为明显^[18-24]。影响文物保存环境中空气微生物浓度及群落结构的因素很多, 主要有温度、相对湿度、太阳辐射、风向、降雨及人为扰动等^[25-26]。研究表明, 人为活动, 如游客参观和考古挖掘活动,

会明显改变文物赋存的微生境条件进而影响空气微生物状况, 无论是洞窟、墓葬还是博物馆, 其体积相对较小, 且多为封闭或半封闭结构, 空气交换不畅, 大量游客集中在一起, 会导致其内部微环境中 CO₂ 浓度、温度、相对湿度等显著增加^[27-28]。游客活动一方面会将地表沉积粉尘重悬至空气, 造成大气颗粒物浓度上升; 另一方面, 游客可将外源性微生物带入文化遗产地, 引起空气微生物浓度增加^[29-30]。空气微生物中有些种类既是引起壁画生物腐蚀的病害菌, 又是条件性致病菌, 在人员密集的情况下易引起疾病威胁人体健康^[26,31]。鉴于此, 多数重要文化遗产地已停止对游人开放或对游客数量进行限制并优化参观模式。

目前, 针对石窟寺等壁画原生环境, 抑或是博物馆环境中空气微生物国内外已有大量研究, 但对因赋存环境变化而引起的空气微生物群落结构差异, 及对文化遗产潜在影响的研究则很少。天梯山石窟作为重要的文化遗产地, 此前还没有对该地壁画保存环境中空气微生物群落的相关报道, 值得注意的是, 因历史原因该地壁画多经搬迁后入博物馆保藏, 其保存状态与少数的原址遗留壁画迥异, 即搬迁壁画表面及浅层密布菌丝、孢子, 而未搬迁壁画则未见此情形, 两地空气微生物群落结构的不同与两者保存状态和微生物侵蚀程度差异之间的关系有待研究。本研究以天梯山石窟文物的两处保存环境, 即原址和博物馆库房环境为研究对象, 利用分子生物学技术分析不同样点空气中可培养细菌浓度和群落组成的季节变动规律, 明确优势种属; 通过对原址、库房内环境监测数据进行分析, 揭示影响空气细菌浓度及群落组成的环境因子; 相关研究将为石窟寺及博物馆空气微生物监测和防治提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样点简介

天梯山石窟位于甘肃省武威市城南约 60 km 处

的天梯山北麓, 始建于十六国时期的北凉, 后经北魏、北周、隋、唐、西夏、元、明等朝代开凿或重修, 距今已有 1 600 年的历史。天梯山石窟, 又名“凉州石窟”, 是我国早期石窟艺术的代表, 其对后世开凿的云冈石窟、龙门石窟均有直接影响, 在佛教东渐的过程中有着重要作用, 极具史学价值、艺术价值, 学界称其“石窟鼻祖”、“石窟源头”。2001 年 6 月 25 日, 天梯山石窟被国务院公布为第五批全国重点文物保护单位。

天梯山石窟位于高寒半干旱气候区, 年平均气温 4.9 °C, 冬季寒冷, 年均降水量 159 mm。1958 年, 因黄羊河水库修建, 为保护石窟免受水库蓄水影响, 次经甘肃省人民政府批准, 由敦煌研究院(时称敦煌文物研究所)和甘肃省博物馆对天梯山石窟所存壁画和彩塑进行异地搬迁。天梯山石窟遗存 18 处大小洞窟, 除部分造像和因体量太大无法搬迁外, 其余彩塑 40 余尊, 揭取壁画 526 块约 200 m², 及经卷、文书等异地搬迁至甘肃省博物馆。2005 年, 国家文物局和甘肃省政府决

定, 除少量壁画、彩塑作为省博物馆馆藏文物外, 其余运回武威, 现暂存于武威西夏博物馆。由于地震及搬迁仓促、揭取技术落后及后期保存环境不良等原因, 揭取的壁画受损严重; 普遍存在颜料层起甲、霉变、酥碱等病害, 当前正在西夏博物馆实施紧急修复保护。

1.1.2 样品采集

选取天梯山石窟第 13 窟和第 18 窟赋存环境, 以及西夏博物馆库房内部和外部广场 4 个监测位点, 分别命名为 TT13、TT18、TMI 和 TMO (图 1)。第 13 窟, 内有 23.8 m 高的释迦牟尼造像, 其外筑有 18 m 高的钢筋混凝土围堰大坝, 呈半包围结构, 将其与黄羊河水库蓄水隔开; 第 18 窟, 现仅遗存中心塔柱, 其位置较 13 窟高, 且地势开阔, 这两处是目前天梯山石窟原址仍然遗存壁画的洞窟。西夏博物馆位于武威市凉州区东南文庙近旁, 外部广场及周边人流量较大, 馆内库房保存有搬迁的天梯山石窟壁画彩塑, 近年正在开展修复工作。针对各研究位点, 在 2016 年 4 月、6 月、10 月和 12 月中



图 1 天梯山石窟和西夏博物馆空气细菌采样位点

Figure 1 The four sampling sites of the airborne bacteria at the Tiantishan Grottoes and the Xixia Museum

注: A, B: 天梯山石窟第 18 窟和第 13 窟; C, D: 西夏博物馆外广场和库房。

Note: A, B: Cave 18 and cave 13 of the Tiantishan Grottoes, respectively; C, D: The inside and outside of the Xixia Museum, respectively.

旬进行空气细菌采样；需要指出的是，西夏博物馆库房内，春、夏、秋3季采样时均有文保人员进行文物修复工作，冬季修复工作暂停，库房关闭，没有人员活动。采用 A. P. Buck 公司生物气溶胶采样器 Bio-Culture Pump™，距地面 1.5 m；将直径为 9 cm 的 R₂A 平板置于采样器内，每次采样设 3 个重复。空气流量为 90 L/min，采样时间 2 min。R₂A 平板(g/L)：酵母提取物 0.5，蛋白胨 0.5，酪蛋白氨基酸 0.5，葡萄糖 0.5，可溶性淀粉 0.5，K₂HPO₄ 0.3，MgSO₄·7H₂O 0.05，丙酮酸钠 0.3，琼脂 15.0，pH 7.2。

1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、pGEM-T 连接试剂盒和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，北京天根生化科技有限公司；Agarose, Biowest 公司。

生物安全柜，苏州安泰空气技术有限公司；不锈钢立式压力灭菌器，上海申安医疗器械厂；恒温振荡器，上海世平实验设备有限公司；恒温培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；PCR 扩增仪、小型冷冻高速离心机，Eppendorf 公司；DNA 提取涡旋仪，MP Biomedicals 公司；凝胶电泳系统，北京六一生物科技有限公司；凝胶电泳成像分析系统，Bio-Rad 公司；酶标仪，Thermo Fisher Scientific 公司；生物气溶胶采样器 Bio-Culture Pump™，A. P. Buck 公司；双通道温湿度数据记录仪，Onset HOBO 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌落计数

将 R₂A 平板置于室温培养 7–15 d，用菌落形成单位计数，将其换算为单位体积空气内细菌数。

1.2.2 细菌的分离及基因组 DNA 提取

在对菌落进行计数时，对其进行简单的形态学分类，包括菌落的生长形态、大小、色泽、折光性等指标。经初步形态分类、计数、划线分离和纯化后的所有单菌落，直接使用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA，操作步骤按照试剂盒说明书，将 DNA 置于 -70 °C 保存待用。

1.2.3 目标片段扩增、纯化

合成细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')，完成细菌 16S rRNA 基因序列的扩增。PCR 反应体系(25 μ L)：10 \times 缓冲液 2.5 μ L，*Taq* DNA 聚合酶 1 U，dNTPs 0.2 mmol/L，MgCl₂ 2.5 mmol/L，上、下游引物各 0.2 μ mol/L，DNA 模板(约 10 ng) 2.5 μ L。PCR 反应条件：94 °C 3 min；94 °C 1 min，58 °C 1 min，72 °C 1.5 min，共 30 个循环；72 °C 10 min。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段的大小和特异性。

1.2.4 扩增片段酶切、纯化及克隆

所有单菌落的 PCR 产物均经过限制性酶切片多态性分析(RFLP)，筛选出不同酶切谱型的 PCR 产物，采用基于 *Bsu*R I 和 *Csp*6 I 两种限制性内切酶的双酶切体系(15 μ L)：*Bsu*R I 2.5 μ L，*Csp*6 I 2.5 μ L，Buffer Tango 1.5 μ L，ddH₂O 3.0 μ L，PCR 产物 10.0 μ L。37 °C 恒温水浴锅温育 4 h 后使用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测；凝胶成像后对各样品电泳图谱进行比对，谱型一致的归为一类。将条带清晰的不同谱型所对应的菌株挑出，再次进行 PCR 扩增(50 μ L)，扩增体系及扩增程序同 1.2.3，PCR 产物经过琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化后，与 pGEM-T 载体于 16 °C 过夜连接，连接产物克隆至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。

1.2.5 测序与嵌合体检测

每一菌株挑取 3–5 个阳性克隆菌斑(白色菌斑)，利用通用引物 T7/SP6 扩增并验证阳性克隆子中插入片段的大小。验证无误的克隆菌斑挑至装有 LB 培养液的离心管中(含 100 mg/L Amp)，37 °C、150 r/min 培养过夜后送交美吉生物技术公司测序。序列经嵌合体检测后，将有效序列提交至 NCBI (National Center for Biotechnology Information)数据库 GenBank。

1.2.6 序列比对及系统发育树构建

在 NCBI 中经 BLAST 比对，通过 MEGA 7.0 软件邻接法(Neighbor-Joining method)分析构建所

得典型序列与相似序列间系统发育树。

1.2.7 群落结构分析

统计系统发育树中相同种属的相关序列总量, 计算对应菌株在各培养平板上的数目, 并将其换算为 CFU 占比, 完成群落组成与结构分析。群落结构图用 OriginPro 2016 软件输出。

1.2.8 CCA 分析

自 2016 年 4 月起至 2017 年 4 月, 各位点温度、相对湿度使用双通道温湿度数据记录仪实时记录, 数据采集频次为 30 min 一次。降雨量数据来自当地气象站。环境数据用 SPSS 16.0 软件分析, 细菌浓度与环境因子间相关性用皮尔森相关性分析(Pearson correlation analysis)计算; 空气中细菌群落结构与各环境因子间关系利用 CANOCO 4.5 软件中典型对应分析(Canonical correlation analysis, CCA)进行计算输出。

2 结果与分析

2.1 细菌浓度的季节变化

监测期内, 空气中可培养细菌总浓度为 16.67–1 451.8 CFU/m³, 平均值和中间值分别为 627.17±62.03 CFU/m³ 和 579.35 CFU/m³ (表 1)。各位点中, TMO 细菌浓度最高, 与其他位点间均呈显著性差异 ($P<0.05$), TT18 与 TMI 间浓度差异显著 ($P<0.05$)。

各位点空气细菌浓度随季节变动规律如图 2 所示。除 TMI 以外的其他各位点, 在冬、春两季空气细菌浓度均显著高于夏、秋两季。监测期内, 冬季 TMO 位点空气细菌浓度最高(1 451.8±25.9 CFU/m³), TMI 位点最低(16.67±5.57 CFU/m³)。

表 1 不同位点间空气中细菌浓度(CFU/m³)变化
Table 1 Total airborne bacteria (CFU/m³) enumerated on R₂A agar plates from the four sampling sites

位点	平均值	中间值	最小值	最大值
Sampling sites	Mean	Median	Minimum	Maximum
TT18	667.02±124.44b	657.40	266.70	1 086.60
TT13	518.82±113.50bc	451.54	140.73	1 031.50
TMO	994.68±104.69a	896.77	733.40	1 451.80
TMI	328.17±69.41c	385.00	16.67	526.00
Total	627.17±62.03	579.35	281.20	1 409.20

注: a, b 和 c 表示显著性差异。

Note: a, b and c means significant difference.

在天梯山原址监测的 2 个位点, TT18 和 TT13 在夏季和冬季细菌浓度接近; 秋季, 二者差异不显著; 春季 TT18 位点则显著高于 TT13 位点 ($P<0.05$)。

在西夏博物馆外环境 TMO 在各季空气细菌浓度均高于馆内仓库 TMI, 且除夏季外均呈显著性差异 ($P<0.05$)。

各位点空气细菌浓度与温度、相对湿度和降雨量等自然环境因子间的相关性关系如表 2 所示。除西夏博物馆内空气细菌浓度与温度、湿度呈正相关外, 其余各位点均与温度、相对湿度呈负相关; 各位点空气细菌浓度与降雨量呈负相关, TT18 位点呈显著性负相关 ($P<0.05$)。

2.2 菌株分离及系统发育树构建

经测序共得到片段大小合适的序列 36 条, 序

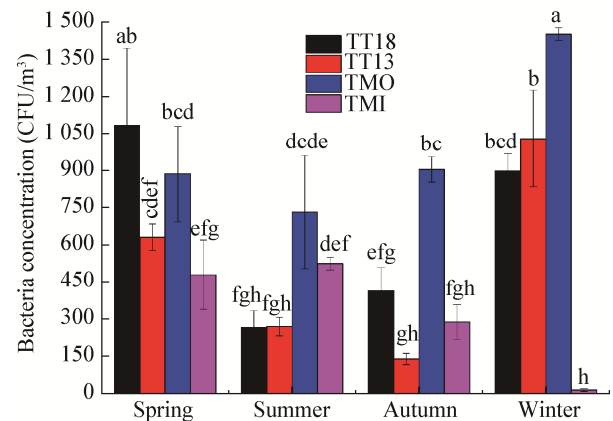


图 2 不同季节(4、6、10 和 12 月)各研究位点的空气细菌浓度

Figure 2 The bacteria concentrations at the four sites in different seasons (April, June, October, December)

Note: Different lower case letters indicate significant difference ($P<0.05$).

表 2 空气细菌 CFU 与环境因子间的皮尔森相关性分析
Table 2 Pearson correlation analysis for bacterial concentrations and environmental parameters

位点	温度	相对湿度	降雨量
Sampling sites	Temperature (°C)	RH (%)	Rainfall (mm)
TT18	-0.899	-0.533	-0.975*
TT13	-0.893	-0.797	-0.895
TMO	-0.926	-0.474	-0.655
TMI	0.670	0.532	—

注: *: 在 0.05 的水平上呈显著性差异; —: 表示无降水。

Note: *: Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); —: No precipitation.

列号为 MG694500–MG694535; 通过 BLAST 序列比对, 确定了 NCBI 数据库中与本研究所得序列相似度最高的序列所属科属、物种及分离源等信息(表3)。通过比对 NCBI 数据库中相似序列的分离源信息发现, 这些序列来源十分复杂, 土壤、多年冻土、壁画、沙漠、水体、动植物和其他生物制品均有。随后, 选取典型序列及 NCBI 数据库中与之相似度最高的序列, 基于此构建天梯山石窟原址与西夏博物馆环境中空气细菌的系统发育树(图3)。

2.3 群落组成与结构特征比较

本研究共鉴定得到 19 个细菌属, 隶属于放线菌门 (*Actinobacteria*, 47.37%)、变形菌门 (*Proteobacteria*, 26.32%)、厚壁菌门 (*Firmicutes*, 21.05%) 和拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 5.26%)。占比超过 5% 的优势细菌属共 8 个(图4), 其中, 不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 占比最高, 为 17.45%; 其余为节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、考

克氏菌属 (*Kocuria*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*)、*Pseudoclavibacter* 和薄层菌属 (*Hymenobacter*), 分占 10.6%、10.24%、8.87%、8.22%、8%、5.62% 和 5.19%, 其共占总 CFU 的 74.18%。棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 和产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 等占比较低, 分别为 4.25%、4.04%、3.46%、3.03%、2.67% 和 2.24%。

天梯山石窟第 13 窟和第 18 窟及西夏博物馆内、外各季节空气细菌群落组成见图 5。

在天梯山石窟原址, 春季, TT18 处优势菌属为产碱杆菌属 (36.53%) 和芽孢杆菌属 (28.84%), TT13 处为节杆菌属 (45.96%) 和拟诺卡氏菌属 (29.84%)。夏季, TT18 处优势细菌属为不动杆菌属 (43.90%) 和产碱杆菌属 (29.27%), TT13 处为节杆菌属 (71.43%) 和链霉菌属 (20.41%)。秋季, TT18 处节

表 3 天梯山石窟和西夏博物馆空气中细菌 16S rRNA 基因片段序列比对分析

Table 3 Analysis of typical 16S rRNA gene sequence in the air environment of the Tiantishan Grottoes and the Xixia Museum

Typical clones (Accession No.)	Family	Species	Source	Identity (%)
A13 (MG694500)	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hospital	99
A35 (MG694521)	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Water	99
C2 (MG694529)	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus muralis</i>	Murals	100
A18 (MG694505)	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i> sp.	Murals	99
A23 (MG694509)	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i> sp.	Hydrocarbon	99
A19 (MG694506)	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium inhibens</i>	Permafrost	99
A25 (MG694511)	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	Snow crabs viscera	99
F14 (MG694532)	<i>Hymenobacteraceae</i>	<i>Hymenobacter</i> sp.	Water	98
A20 (MG694507)	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium callunae</i>	Water	99
F12 (MG694530)	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas roseiflava</i>	Sunflower root	99
C1 (MG694528)	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Murals	100
A38 (MG694524)	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces scopiformis</i>	Sunflower root	99
A37 (MG694523)	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i> sp.	Desert	99
A29 (MG694515)	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Soils	100
A28 (MG694514)	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	Desert	99
A30 (MG694516)	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Rathayibacter tritici</i>	Wheat	99
A16 (MG694503)	<i>Bacillales Family XII.Incertae Sedis</i>	<i>Exiguobacterium indicum</i>	Mosquito midgut	99
A15 (MG694502)	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	Soils	99
A32 (MG694518)	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Massilia</i> sp.	Soils	99

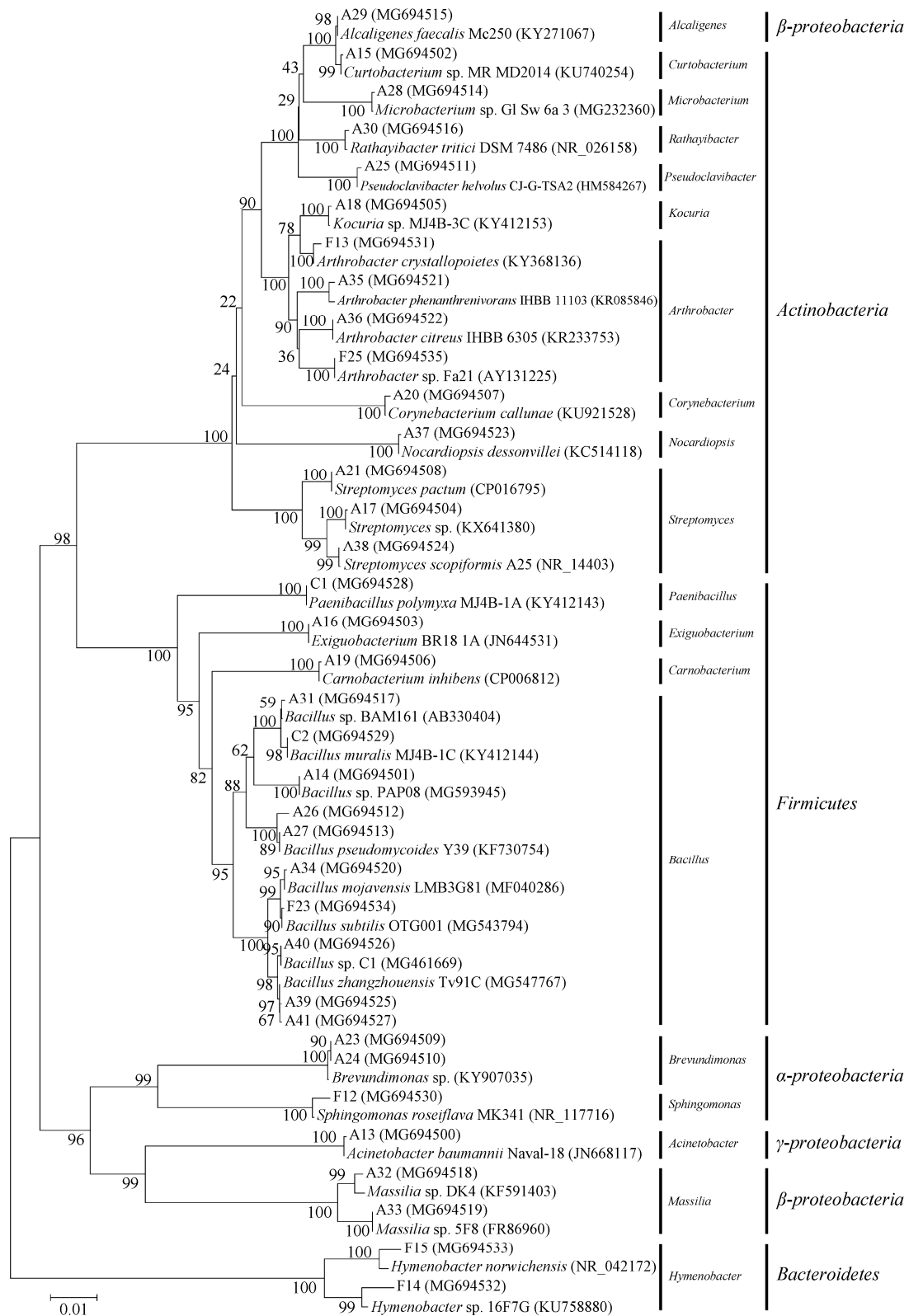


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的空气细菌系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of airborne bacteria based on 16S rRNA gene sequences

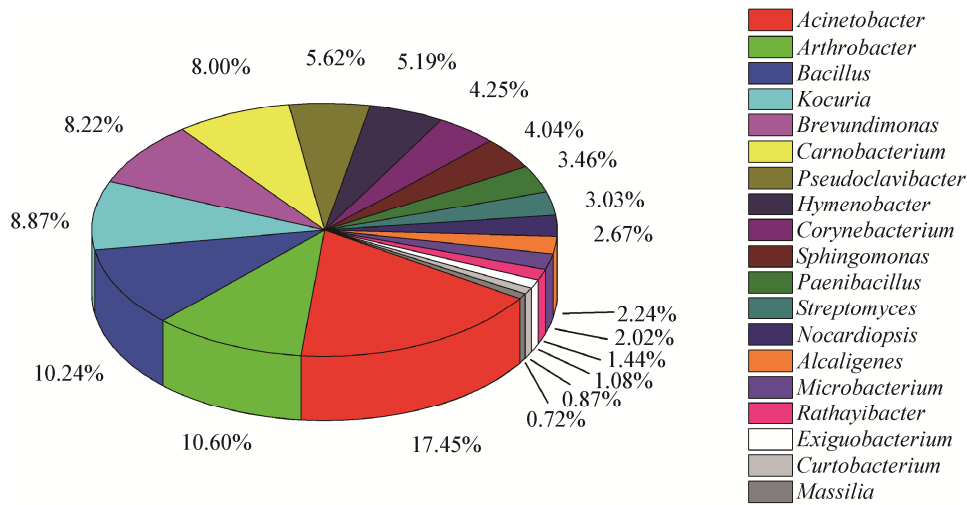


图 4 天梯山石窟和西夏博物馆空气细菌组成(属)

Figure 4 Proportions of bacterial genera detected in environment of the Tiantishan Grottoes and the Xixia Museum

杆菌属和链霉菌属分别占 55.56%和 25.0%，TT13 处优势菌变成肉食杆菌属(60%)和棒状杆菌属(20%)。冬季，TT18 处为短波单胞菌属(52.27%)和考克氏菌属(31.82%)，而 TT13 处薄层菌属(62.79%)为优势菌属。

TMI 处，春、夏、秋 3 季最优势菌属均为不动杆菌属，其占比逐季下降，依次为 65.43%、58.06%和 37.93%，至冬季被棒状杆菌属所取代；

同时，除秋季未检测到棒状杆菌属外，春、夏、冬 3 季均有检出，且占比逐季上升，依次为 13.17%、16.10%和 66.67%。TMO 处优势菌属随季节变化。春季为考克氏菌属(36.06%)和肉食杆菌属(25.82%)；夏季为芽孢杆菌属(29.88%)和类芽孢杆菌属(27.58%)；秋季为鞘氨醇单胞菌属(42.22%)和节杆菌属(26.67%)；冬季为薄层菌属(60%)和鞘氨醇单胞菌属(32.73%)。

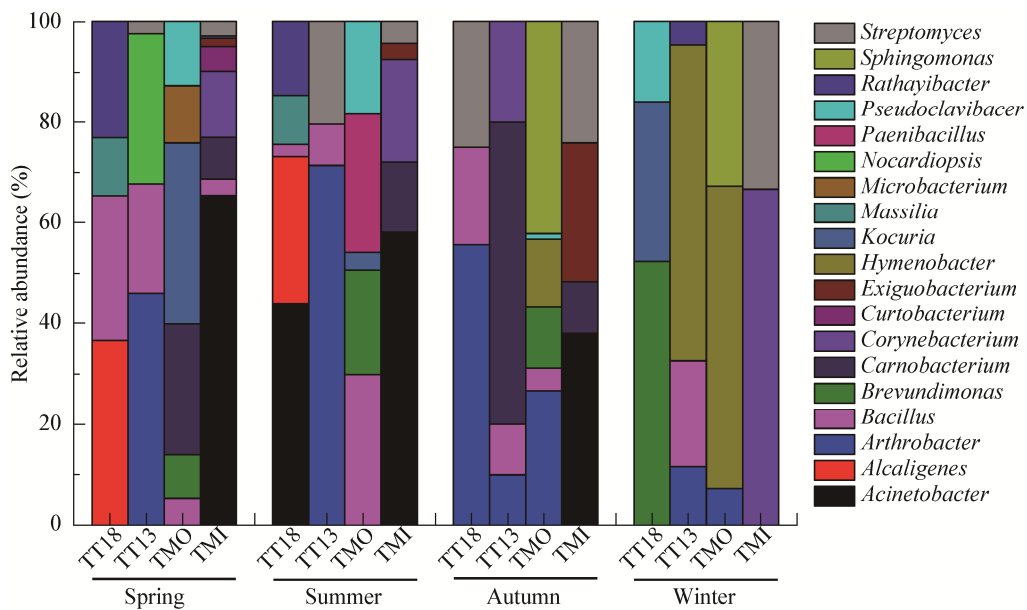


图 5 各位点优势空气细菌相对丰度(属)

Figure 5 Relative abundance of the dominant bacterial genera at the four sites

通过 CCA 分析, 天梯山石窟 13 窟和 18 窟及西夏博物馆内外在不同季节的空气细菌群落结构有较大差异(图 6), 各环境因子对其差异的贡献率由高到低依次为相对湿度>温度>降雨量, 对应值为 0.620、0.438 和 0.355。相对湿度(RH)与温度(T)呈负相关, 与降雨量呈正相关。馆内环境(TMI)与原址空旷环境(TT13)中细菌群落结构差异明显。

3 讨论与结论

天梯山石窟第 13 窟和第 18 窟, 各个季节细菌浓度较接近, 无显著性差异, 且细菌浓度有明显季节性变动规律, 总体特征为夏秋季低, 冬春季高。西夏博物馆外空气细菌浓度在各季节均高于库房内, 馆外广场空气细菌浓度高于原址第 13 窟和第 18 窟, 冬季细菌浓度最高, 这可能与冬季采暖造成城市环境空气污染等因素相关。通过皮尔森相关性分析发现, 除 TMI 处空气细菌浓度与温度和相对湿度呈非显著正相关外, 其他各位点空气细菌浓度均与温湿度呈负相关, 户外三处位点

基本一致。降雨与 TT18、TT13 和 TMO 三处的空气细菌浓度呈负相关, 在 18 窟处相关性显著 ($P<0.05$); 两相比较, 博物馆内空气中细菌浓度与室外各位点受温度、相对湿度的影响相反, 这应与武威地区地处高寒半干旱气候区, 降雨较少有关, 该地空气相对湿度的增加主要由降雨引起, 但降雨可对空气起到净化作用, 而降低空气中细菌浓度; 且该地气温较低, 外环境空气中的主要微生物类群可能更适应较低温度。此外, 原址 13 窟和 18 窟夏季空气细菌浓度比冬、春两季低, 这可能是原址的主要降雨发生在夏季的缘故。除受温度、相对湿度及降雨量等自然因素影响外, 人为扰动对空气细菌浓度影响也很大, 这在西夏博物馆内、外表现尤为明显, 该博物馆位于武威市主城区, 周边人流密集, 空气中浮尘和微生物含量上升^[28-29]。而馆内, 建筑物本身对外环境污染物有阻隔作用, 除文保人员修复壁画外, 基本无其他人员进出, 尤其在冬季, 修复工作暂停, 无人员活动, 库房内、外差异更加显著, 细菌浓度仅 16.7 CFU/m³; 库房内受人为干扰程度要远低于户外, 这是博物馆内外空气细菌浓度差异最可能原因。

本研究鉴定出的 19 个细菌属, 分属放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 其分别占 39.36%、32.66%、22.28%和 5.19%。其中, 不动杆菌属、节杆菌属、芽孢杆菌属、考克氏菌属、短波单胞菌属、肉食杆菌属和薄层菌属为优势菌属, 各位点空气细菌群落差异明显, 这与不同位点温度、相对湿度、太阳辐射、风向、降雨等自然条件差异有很大关联^[17]。馆外检测到 10 个属, 考克氏菌属为最优细菌属(16.70%), 其次为芽孢杆菌属(12.25%)、短波单胞菌属(12.08%)、*Pseudoclavibacter* (11.37%)及肉食杆菌属(11.19%)等; 馆内则检测到 8 个属, 其中不动杆菌属(60.38%)占比最大, 棒状杆菌属(14.82%)和肉食杆菌属(9.70%)次之。芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属

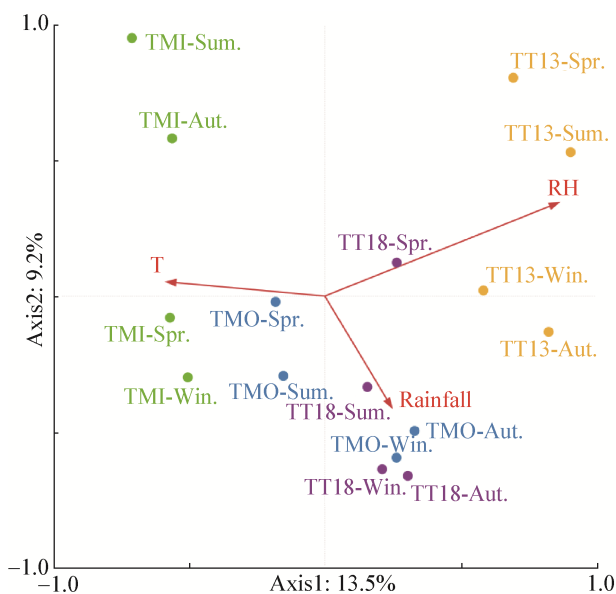


图 6 不同监测点四个季节空气细菌群落组成与环境因子的典型相关性分析

Figure 6 Canonical correlation analysis for bacterial communities and environmental parameters from the four sites at different seasons

和微杆菌属等为城市空气中的常见细菌属^[26],其他菌属并非城市空气中的常见类群,其出现应与采样时的气象条件、人类活动及周边复杂环境等有关。不动杆菌属占馆内空气细菌总 CFU 的 60% 以上,除冬季外,春、夏、秋 3 季均有检出,该属出现于库房的时间与修复工作开展同步,可能与修复人员活动有关。不动杆菌属为 γ -变形菌门成员,是常见的条件致病菌^[32],其大量出现在库房这种狭小密闭的环境中,对工作人员健康有潜在威胁,有必要采取阶段性通风透气措施以减少此类病害菌对文物和工作人员的危害。原址第 13 窟和第 18 窟间空气细菌群落结构差异也较大,前者共 8 个属,后者为 10 个属,共有细菌属有 4 个,分别为节杆菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属和拉氏杆菌属。通过 CCA 分析,相对湿度、温度及降雨等环境因子均会对空气细菌群落产生影响。其中,相对湿度对第 13 窟在各季空气细菌群落结构的影响大于其他因素;降雨量则对第 18 窟及博物馆外广场空气细菌群落结构影响较其他因素更明显;博物馆内空气细菌群落则受温度、相对湿度的协同作用。受客观条件所限,诸如风速、风向、太阳辐射和游客等数据未能纳入此次分析,它们对空气中细菌群落组成及分布同样有影响^[12,33],尚待进一步研究。

由上所知,天梯山石窟原址和西夏博物馆空气中细菌群落组成有很大差异,但其与两地壁画迥异的微生物侵蚀状况间是否有关联还有待商榷。空气与壁画作为两种截然不同的生境,空气微生物能在多大程度上影响壁画微生物群落的组成还不得而知;引起西夏博物馆馆藏壁画生物侵蚀的优势病害菌是否是细菌也未可知。为回答这些问题,未来可在理清两地壁画微生物群落结构特征的基础上与周围空气中微生物群落结构进行对比。本研究鉴定得到的部分细菌属,如节杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、诺卡氏菌属等均属于异养菌,它们是墓室、岩穴等环境壁画表面的常见菌属^[33-34]。一旦其沉降到壁画表面,一方

面其很可能利用壁画制作材料中的有机成分,如动物胶结材料,造成文物基质材料的降解、老化;另一方面它们普遍具备旺盛的次级代谢能力,能向外分泌色素和酸类,沾染、腐蚀壁画^[35]。如在对西班牙南部某处岩画表面微生物进行调查时,发现芽孢杆菌属为最优细菌属,且以巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)分布最为广泛,将该菌属与壁画常用红色颜料铁红(Fe_2O_3 , Fe(III)-(hydr)oxides)在 TSB 培养液中培养一段时间后,会将 Fe(III)转变为 Fe(II),导致铁红褪色^[36]。可以说,天梯山石窟赋存环境中空气细菌种属具备引起壁画微生物病害的潜势,但这些分离菌株对古代壁画颜料及有机材料的腐蚀退化能力还有待今后进一步测试评估。

针对天梯山石窟空气细菌浓度、群落结构和分布特征及当地气候特点,建议今后对洞窟及周边环境空气微生物变动情况进行长期监测,并将其纳入整体的监测预警体系,以期为该地旅游开放和文物预防性保护提供科学依据。

致谢: 感谢武威天梯山石窟管理处和敦煌研究院文物保护技术服务中心相关工作人员给予本研究的帮助。

REFERENCES

- [1] Gonzalez JM, Portillo MC, Saiz-Jimenez C. Diverse microbial communities and the conservation of prehistoric paintings[J]. *Microbe*, 2008, 3: 72-77
- [2] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma)[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 235-247
- [3] Ma YT, Zhang H, Du Y, et al. The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7752
- [4] Duan YL, Wu FS, Wang WF, et al. The microbial community characteristics of ancient painted sculptures in Maijishan Grottoes, China[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0179718
- [5] Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al. The microbiology of Lascaux Cave[J]. *Microbiology*, 2010, 156(3): 644-652
- [6] Dupont J, Jacquet C, Denetière B, et al. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex[J]. *Mycologia*, 2007,

- 99(4): 526-533
- [7] Portillo MC, Saiz-Jimenez C, Gonzalez JM. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of “white colonizations” in the Altamira Cave, Spain[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(1): 41-47
- [8] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, et al. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(7): 392-400
- [9] Song LH, Song WM, Shi W, et al. Health effects of atmospheric microbiological pollution on respiratory system among children in Shanghai[J]. *Journal of Environment and Health*, 2000, 17(3): 135-138 (in Chinese)
宋凌浩, 宋伟民, 施玮, 等. 上海市大气微生物污染对儿童呼吸系统健康影响的研究[J]. *环境与健康杂志*, 2000, 17(3): 135-138
- [10] Wang WF, Zhao LY, Pei QQ, et al. Exploration and practice of conservation of wall paintings in the museum: the case of conservation of wall paintings collected in the Gansu Museum from Tiantishan Grottoes, Wuwei[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2015, 27(4): 101-112 (in Chinese)
汪万福, 赵林毅, 裴强强, 等. 馆藏壁画保护理论探索与实践——以甘肃省博物馆藏武威天梯山石窟壁画的保护修复为例[J]. *文物保护与考古科学*, 2015, 27(4): 101-112
- [11] Bonazza A, de Nuntis P, Mandrioli P, et al. Aerosol impact on cultural heritage: deterioration processes and strategies for preventive conservation[A]//Tomasi C, Fuzzi S, Kokhanovsky A. *Atmospheric Aerosols: Life Cycles and Effects on Air Quality and Climate*[M]. Weinheim: Wiley, 2016: 645-670
- [12] Wang WF, Ma YT, Ma X, et al. Seasonal variations of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(4): 309-315
- [13] Wang WF, Ma X, Ma YT, et al. Seasonal dynamics of airborne fungi in different caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, 64(6): 461-466
- [14] Docampo S, Trigo MM, Recio M, et al. Fungal spore content of the atmosphere of the cave of Nerja (southern Spain): diversity and origin[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(4): 835-843
- [15] Wu WT, He HP, Yan L, et al. The isolation and identification of bacteria in the air of Capital Museum and their significance for protection of cultural relics[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2012, 24(1): 76-82 (in Chinese)
武望婷, 何海平, 闫丽, 等. 首都博物馆空气中细菌的分离鉴定及在文物保护中的意义[J]. *文物保护与考古科学*, 2012, 24(1): 76-82
- [16] E J, Wu FS, Wang WF, et al. Monitoring and research on microbes in the environment of the wall paintings in No. 5 of the Wei and Jin Tombs[J]. *Dunhuang Research*, 2013(6): 109-116 (in Chinese)
俄军, 武发思, 汪万福, 等. 魏晋五号壁画墓保存环境中空气微生物监测研究[J]. *敦煌研究*, 2013(6): 109-116
- [17] 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
- [18] Tang H, Fan WQ, Wang C, et al. A dynamic study on the species and quantity of microorganisms in the micro-environment, Chongqing China Three Gorges Museum[J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2017, 29(1): 35-43 (in Chinese)
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
- [19] Gaüzère C, Moletta-Denat M, Blanquart H, et al. Stability of airborne microbes in the Louvre Museum over time[J]. *Indoor Air*, 2014, 24(1): 29-40
- [20] Gaüzère C, Moletta-Denat M, Bousta F, et al. Airborne microbiology in museum through molecular approach: preliminary study[C]. *Indoor Air Quality*, 2010
- [21] Ruga L, Orlandi F, Romano B, et al. The assessment of fungal bioaerosols in the crypt of St. Peter in Perugia (Italy)[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 98: 121-130
- [22] Gaüzère C, Moletta-Denat M, Bousta F, et al. Reliable procedure for molecular analysis of airborne microflora in three indoor environments: an office and two different museum contexts[J]. *Clean - Soil, Air, Water*, 2013, 41(3): 226-234
- [23] Anaya M, Borrego SF, Gámez E, et al. Viable fungi in the air of indoor environments of the National Archive of the Republic of Cuba[J]. *Aerobiologia*, 2016, 32(3): 513-527
- [24] Lazaridis M, Katsivela E, Kopanakis I, et al. Indoor/outdoor particulate matter concentrations and microbial load in cultural heritage collections[J]. *Heritage Science*, 2015, 3: 34
- [25] Tanaka D, Terada Y, Nakashima T, et al. Seasonal variations in airborne bacterial community structures at a suburban site of central Japan over a 1-year time period using PCR-DGGE method[J]. *Aerobiologia*, 2015, 31(2): 143-157
- [26] Xue LG, Jiang JR, Famous E. Progress in research and monitoring of urban airborne microbes[J]. *Environmental Engineering*, 2017, 35(3): 152-157, 162 (in Chinese)
薛林贵, 姜金融, Famous E. 城市空气微生物的监测及研究进展[J]. *环境工程*, 2017, 35(3): 152-157, 162
- [27] Zhang GB, Xue P, Hou WF, et al. The study on micro-environment of the cave affected by the visitors of the Mogao Grottoes[J]. *Dunhuang Research*, 2005(4): 83-86 (in Chinese)
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
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Yan F, Ge QY, Li Q, et al. Analysis of microbial community on the surface of the historic stone and nearby rock samples in Yungang Grottoes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(5): 629-636 (in Chinese)
颜菲, 葛琴雅, 李强, 等. 云冈石窟石质文物表面及周边岩石样品中微生物群落分析[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 629-636
- [31] Carlo ED, Chisesi R, Barresi G, et al. Fungi and bacteria in indoor cultural heritage environments: microbial-related risks for artworks and human health[J]. Environment and Ecology Research, 2016, 4(5): 257-264
- [32] Rosa R, Depascale D, Cleary T, et al. Differential environmental contamination with *Acinetobacter baumannii* based on the anatomic source of colonization[J]. American Journal of Infection Control, 2014, 42(7): 755-757
- [33] Ciferri O. Microbial degradation of paintings[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 879-885
- [34] Pepe O, Sannino L, Palomba S, et al. Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches[J]. Microbiological Research, 2010, 165(1): 21-32
- [35] Heyrman J, Mergaert J, Denys R, et al. The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 181(1): 55-62
- [36] Gonzalez I, Laiz L, Hermosin B, et al. Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (south Spain)[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(1/2): 123-127

2019 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-1)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	海洋微生物药物创新论坛	中国微生物学会海洋微生物专业委员会	1 月	60	福建 厦门	林厚文 13801985620
2	生物信息学培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	3 月	50	山东 泰安	吴莹 1590145568
3	第四届国际休克与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素	3 月 29-31 日	1200	广东 广州	刘志锋 13711598120
4	人兽共患病学术交流研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	4 月	200	岳阳/ 浙江莫干山	蒋毅 13520419382
5	生物安全培训	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	北京	贾晓娟 010-64806013
6	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第五次学术交流会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	山东 梁山	贾晓娟 010-64806013
7	第六届中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物专业委员会	5 月	200	湖北 宜昌	胡育骅 010-53218310
8	2019 年人兽共患病国际研讨会暨中国狂犬病年会	中国微生物学会	5 月 10-11 日	2000	安徽 合肥	娜日莎, 刘霞 010-84039863
9	第十届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物专业委员会	6 月	800	甘肃 敦煌	吕相征 13693022236
10	全国昆虫病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	6 月 21-22 日	200	江苏 镇江	吴莹 1590145568