

文章编号:1005-1538(2018)04-0099-05

# 志丹苑元代水闸遗址霉菌及防霉剂 抑菌效果的再调查与评估

丁佳荣<sup>1</sup>, 张 岚<sup>1</sup>, 郭红樱<sup>2</sup>, 张遐耘<sup>2</sup>, 陈 宸<sup>2</sup>

(1. 上海市历史博物馆, 上海 200003; 2. 浙江省微生物研究所, 浙江杭州 310012)

**摘要:** 志丹苑元代水闸遗址中处于潮湿环境条件下的木构件经 IPBC(碘代丙炔基氨基甲酸酯 Iodopropyl - nyl Butyl Carbamate)处理已有 8 年, 2012 年时测得其细菌总量及真菌总量比 2007 年分别减少 89.25% 和 55.56%, 且木构件中微生物主要类群也在变化。可近年发现 IPBC 药物的药效在缩短, 为了更加有效地治理志丹苑元代水闸遗址饱水木构件上生长的霉菌, 对遗址木构件霉菌种类再次进行调查, 并对防霉剂 IPBC 抑菌性能进行再评估。本研究从遗址木构件中分离到 8 类高丰度霉菌, 通过菌落形态特征、培养特性和 DNA - ITS 序列分析等方法进行菌种的鉴定, 发现种类与前几次有明显不同。例如, 本次在遗址广泛分布着的一种盘菌科下未分类的菌及绿色木霉都是前几次未曾发现过的。用滤纸片抑菌圈法对这些菌进行 IPBC 抑菌试验。分析结果发现, 木质文物霉菌的防治药物有待升级。

**关键词:** 遗址; 木质文物; 霉菌; 鉴定; 防霉剂

**中图分类号:** K878.4 **文献标识码:** A

## 0 引言

霉菌的生长是木质文物腐烂的主要原因, 因此防霉是博物馆文物保护工作中的重要内容之一<sup>[1,2]</sup>。志丹苑元代水闸遗址发现于 2001 年 5 月, 遗址内有大量木构件, 由于长时间处于潮湿状况, 防霉工作极为重要。自 2002 年 5 月正式发掘来, 共开展了三次微生物菌群调查, 分别在 2002、2006、2012。2007 年起选择了防霉剂 IPBC(碘代丙炔基氨基甲酸酯 Iodopropyl - nyl Butyl Carbamate)处理木材。至今遗址木构件一直采用该防霉剂, 以 1 份原液兑 20 份水的浓度配比(约 5%), 解决侵蚀木构件的霉腐问题。该方法是经过抑菌验证, 证明对当时的微生物生长具有明显的抑制作用。但是, 随着时间的推移, 木构件中的菌群对防霉剂会产生耐药性。遗址木质文物从初期每两个月用防霉剂喷涂一次, 到目前不到一个月就要再次喷药。为此 2015 年 9 月再次对遗址内的空气及木构件的霉菌进行了种类调查。从木构件上分离到 8 株高丰度霉菌, 用 IPBC 对分离到的菌种进行了实验室抑菌效果评价, 为下一步筛选更有效的防霉剂奠定了

基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基及试剂

**1.1.1 分离培养基(PDA)** 马铃薯 200g; 葡萄糖 20g; 琼脂 15g; 氨苄青霉素 100mg; 蒸馏水 1L; pH = 6.0。

**1.1.2 鉴定培养基(查氏)** 硝酸钠 3g; 磷酸氢二钾 1g; 硫酸镁 0.5g; 氯化钾 0.5g; 硫酸亚铁 0.01g; 蔗糖 30g; 琼脂 20g; 蒸馏水 1000mL。

**1.1.3 提取试剂盒** Qiagen 69504; PCR 试剂: PCR Amplification Reagents。

**1.1.4 防霉剂** 碘代丙炔基氨基甲酸酯, 三博生化科技(上海)有限公司生产。

### 1.2 设备

医用净化工作台 YJ - 1300A 净化等级 100 级; 生化培养箱 LRH - 250A (15 ~ 40) ± 1.0°C; ABI 3730XL 测序仪。

### 1.3 采样

**1.3.1 木构件文物霉菌采样点** 采样点共计 13 处, 分别为 M1 - 1、M1 - 2、M2 - 1、M2 - 2、M3、M4、

收稿日期: 2017 - 05 - 16; 修回日期: 2018 - 03 - 01

作者简介: 丁佳荣(1975—), 男, 2003 年本科毕业于中央戏剧学院戏剧学专业, 馆员, 研究方向为文化遗产保护, E-mail: 2681000782@qq.com

M5、M6、M7、M8、M9、M10、M11。

**1.3.2 采样方法** 选择木构件长霉部位,用无菌手术刀将表层腐木除去,取内层部分 3~5g 装入灭菌袋中。

#### 1.4 试验方法

**1.4.1 木构件文物霉菌分离** 在无菌条件下,13 处木构件样品用稀释法分别进行微生物培养,分离。

**1.4.2 木构件文物霉菌鉴定**<sup>[3-5]</sup>

1) 形态观察。菌落形态观察包括菌落大小、菌落正反面颜色、菌落质地等;

2) 显微观察:显微观察菌丝和孢子形态特征;

3) DNA-ITS 序列分析<sup>[6]</sup>。

收集菌体用液氮,研磨破壁。使用 Qiagen 69504 试剂盒提取 DNA,引物 ITS1:TCCGTAGGTGAACCT-GCGG ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR 反应体系见表 1,PCR 反应条件见表 2。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system

( $\mu\text{L}$ )

试剂名称	加样量
DNA 模板	1.0
PCR 扩增试剂	12.5
引物 F(10 $\mu\text{M}$ )	0.5
引物 R(10 $\mu\text{M}$ )	0.5
二次蒸馏水	10.5
总体积	25.0

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环数
95	预变性 2min	
95	变性 20s	
55	退火 20s	30 个循环
72	延伸 30s	
72	继续延伸 10min	

注:①ITS 引物的退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ ,V4 区退火温度为 51 $^{\circ}\text{C}$ 。

将合格 PCR 产物扩增产物与 T 载体连接后送测序公司测序,获得的 ITS 序列上机进行测序,所得结果在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站上进行比对。同源性比较,并结合形态特征,对样品系进行分类鉴定。

**1.4.3 IPBC 抑霉试验** 试验以滤纸片法进行。把供试菌制成 10<sup>5</sup> 浓度的孢子悬浮液,取 1mL 菌悬液至 9cm 直径的培养皿中,倒入约 15mL 已灭菌的培养基,与菌液混匀,制成平板。然后,将吸附了 20 $\mu\text{L}$  的 5% IPBC 的,直径 8mm 的滤纸片贴于带菌琼脂平板正中。27 $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱中培养 14d。用游标卡尺测量抑菌圈直径。每种防霉灭菌剂做 3 个平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离、鉴定结果

2007 至今遗址木构件一直使用 IPBC 防霉剂。经过这么多年的驯化,木构件中大多是耐药性的菌群,同时随着木构件成分的变化,木构件中的菌群结构也会跟着发生改变(不同的微生物专注于不同的营养成分)。本次从木构件样品中分离到 8 类霉菌。按照《真菌鉴定手册》的方法进行了菌种的鉴定,分别是:1) 盘菌科菌下未分类菌(*Pezizaceae unclassified*);2) 高大毛霉(*Mucor Mucedo*);3) 绿色木霉(*Trichoderma viride*)4) 镰刀霉(*Fusarium keratoplasticum*)5) 枝顶孢霉(*Monacrosporium sp.*);6) 裴氏着色真菌(*Fonsecaea pedrosoi*);7) 黄绿青霉(*Penicillium citreo-viride*);8) 黄柄曲霉(*Aspergillus niger*)。

### 2.2 遗址木构件各霉菌在木构件样品中的分布

不同部位的木构件上所长的霉菌是不一样的,对 13 个样品逐一进行的霉菌的筛查分析结果见表 3。

表3 不同霉菌在不同木构件样品中的分布

Table 3 Different molds in different wooden samples in distribution

样品编号	M1-1	M1-2	M2-1	M2-2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
绿色木霉	√	√	√	-	√	√	√	√	√	-	√	-	-
镰刀霉	-	-	-	-	-	-	√	-	√	√	√	-	-
盘菌科菌	-	-	-	-	√	√	-	√	-	-	-	√	√
枝顶孢霉	-	-	-	-	-	-	-	√	-	√	-	-	-
着色真菌	-	√	√	-	-	-	-	√	-	-	-	-	-
高大毛霉	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	√
黄绿青霉	-	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	√	-
黄柄曲霉	-	-	√	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

从表3可看出绿色木霉在13个样品中出现9次,是分布最广的一种霉菌。其次是盘菌科菌和镰刀霉。

遗址实际使用IPBC浓度对遗址木构件样品中分到的8类霉菌进行抑制试验,结果见表4。

5% IPBC浓度对遗址木构件样品中分到的8类霉菌进行抑制试验所得抑菌圈见图1。

2.3 IPBC对试验霉菌的抑制作用

表4 IPBC对试验霉菌的抑制作用

Table 4 Inhibitory effects of IPBC on the molds

(mm)

菌名	5% 药物平均抑菌圈直径	
	7d	14d
绿色木霉	4.1	3.8
镰刀霉	1.7	1.1
盘菌科菌	5.2	4.8
枝顶孢霉	2.3	1.6
着色真菌	3.4	2.7
高大毛霉	2.4	1.5
黄绿青霉	3.5	3.4
黄柄曲霉	4.7	4.7

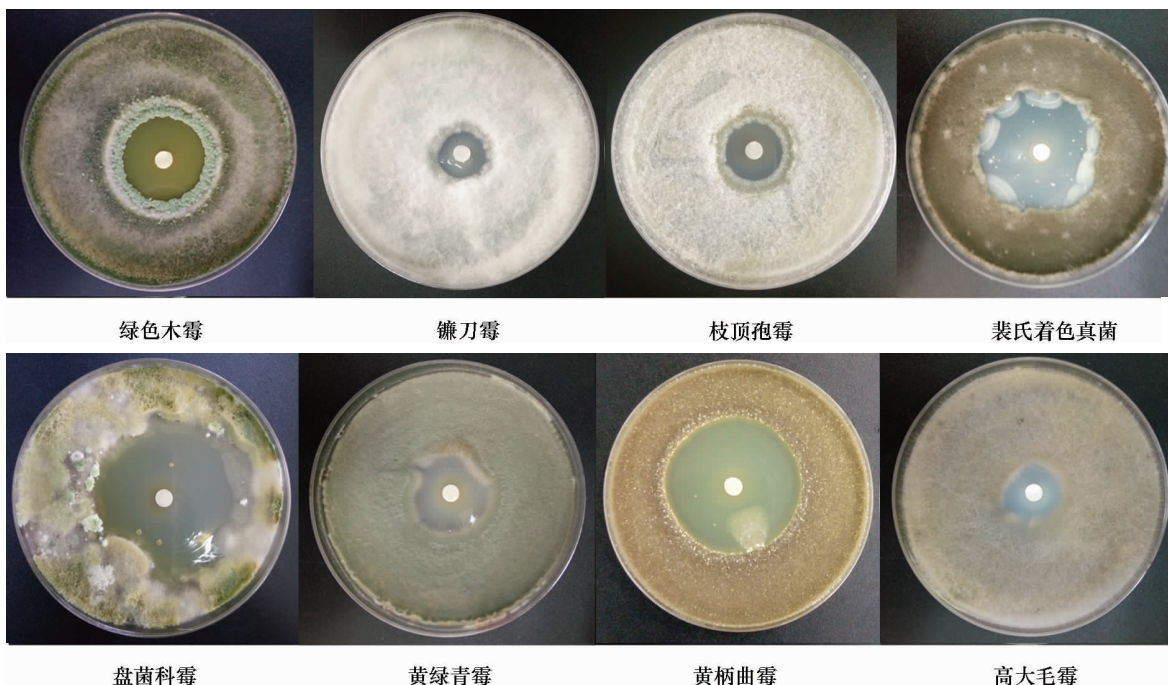


图1 5%的IPBC对8株试验菌第14d的抑菌圈

Fig.1 Inhibition zone of 5% IPBC on 8 test molds on the 14th day

5% 的 IPBC 浓度对分离到的木构件霉菌绿色木霉、盘菌科菌、镰刀霉、枝顶孢霉、裴氏着色真菌、高大毛霉、黄绿青霉、黄柄曲霉进行抑菌试验。结果显示 IPBC 对绿色木霉、盘菌科菌、黄柄曲霉的抑制作用较强,而对枝顶孢霉、高大毛霉、镰刀霉抑制作用较差,特别对镰刀霉作用最弱。

### 3 讨论

干湿交替是防霉大忌。遗址内的木构件为了保

湿,防干裂,要阶段性喷水,增加了防霉工作的难度。遗址于 2007 年、2012 年均对 IPBC 处理前后木桩群进行过霉菌类型鉴定,结果如表 5。对比 2.1 的结果分析可知,木桩本次分离到多种前两次未分离到过的霉菌类型,包括分布最广的绿色木霉和盘菌科下未分类的一株菌。这些霉菌里要特别引起注意的是绿色木霉,它以产纤维素酶高而著名。自然界腐烂的植物上常能见到,它的大量出现势必会加快木构件的降解。筛选高效抑制绿色木霉的防霉剂势在必行。

表 5 IPBC 处理前后木桩群侵蚀微生物种类变化

Table 5 The changes of species of erosion microbes in pre - and post - IPBC wooden material

霉菌种类	2007 年	2012 年
真菌	顶孢头孢霉 <i>Cephalosporium acremonium</i>	展青霉 <i>Penicillium patulum</i>
	轮枝孢属 <i>Verticillium</i>	圆弧青霉 <i>Penicillium cyclopium</i>
	毛球镰孢霉(柔毛镰刀菌) <i>Fusarium flocciferum</i>	-
	特异青霉(点青霉) <i>Penicillium notatum</i> Westling	-

IPBC 是优异的防霉剂,高效环保,是本遗址常用防霉剂。用 IPBC 对分离到的霉菌进行单菌抑菌试验发现,其对绿色木霉和盘菌的抗性较强,但是这两个菌还是在遗址木构件中广泛存在。造成这样结果的原因是木构件不间断喷水防裂使药物流失,药效不能很好地发挥。因此,药物的抗流失性和施用方法也是今后值得研究的方向。

### 4 结论

本次工作探明了遗址木桩上主要危害菌的丰度及种类,这为有针对性筛选防霉剂及使用浓度和使用期限奠定了良好的物质基础。目前,正在利用分离到这 8 种霉菌为试验指示菌,有针对性地筛选抑制遗址木材特定霉菌的防霉剂,特别是抑制绿色木霉和盘菌,包括对 IPBC 的改良。已找到与对照防霉剂 IPBC 比更广谱,抑菌效果明显,持久性提高的药物。实地试验正在进行中,相关试验结果将陆续发表。

#### 参考文献:

[1] 王春蕾,田金英.关于霉菌调查工作的几个问题[C]//第三届文物保护技术协会论文集.北京:紫禁城出版社,2005:253-255.  
WANG Chun - lei, TIAN Jin - ying. Some problems on the investigation of fungi [C]//Proceedings of the association for the

protection of cultural relics. Beijing: The Forbidden City Press, 2005:253-255.

- [2] 武望婷.文物上霉菌的分离及分子生物学鉴定[J].中国国家博物馆馆刊,2012(10):131-137.  
WU Wang - ting. Isolation, identification and sequence analysis of DNA - ITS of mildew species sampled from cultural relics [J]. Journal of National Museum of Chinese History, 2012(10):131-137.
- [3] 戴芳澜.真菌的形态和分类[M].北京:科学出版社,1987:57-63,162-165,306-313.  
DAI Fang - lan. Fungal morphology and classification [M]. Beijing: Science Press, 1987:57-63,162-165,306-313.
- [4] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:60-74,267-272,487-520,534-570,602-639.  
WEI Jing - chao. Identification of the fungi Handbook [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979:60-74,267-272,487-520,534-570,602-639.
- [5] 孙鹤龄.医学真菌鉴定初编[M].北京:科学出版社,1987:212-216.  
SUN He - ling. Identification of medical fungi [M]. Beijing: Science Press, 1987:212-216.
- [6] 张志华,洪奎.核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J].华南热带农业大学学报,2006,12(2):39-43.  
ZHANG Zhi - hua, HONG Kui. Application of nucleic acid sequence direct analysis in fungal identification [J]. Journal of South China University of Tropical Agriculture, 2006, 12(2):39-43.

## Reinvestigation of fungal species and reevaluation of the antifungal effect of the fungicide used for the Zhidanyuan Sluice Site of the Yuan Dynasty

DING Jia - rong<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>1</sup>, GUO Hong - ying<sup>2</sup>, ZHANG Xia - yun<sup>2</sup>, CHEN Chen<sup>2</sup>

(1. Shanghai History Museum, Shanghai 200003, China;

2. Microbiology Institute, Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** At the Zhidanyuan Sluice Site of the Yuan Dynasty, the wooden components in the humid environment have been treated with 3 - iodo - 2 - propynyl - butyl - carbamate (IPBC), a fungicide, for eight years. According to a survey in 2012, the total amount of bacteria and fungi were reduced by 89% and 56% in comparison with those recorded in 2007. However, the efficacy period of IPBC has been found to be shortened in recent years. Therefore, we reinvestigated fungal species on the wooden components and reevaluated antifungal effects of IPBC, in order to effectively arrest fungal growth on the water - saturated wooden components of the sluice site. In this study, eight high - abundance molds were isolated from the wooden components. The identification of the strains by morphological characteristics, culture characteristics and DNA - ITS sequence analysis shows that the species are significantly different from the previous ones. Widely distributed are an unclassified fungus and *Trichoderma viride* which have not been found at the site previously. The antifungal effects of IPBC on these fungi were tested using the method of filter paper fungistasis; the results show that the antifungal agents for wooden relics at the sluice site need to be updated.

**Key words:** Site; Wooden relics; Fungi; Identification; Fungicide

(责任编辑 谢 燕)