

# 馆藏纸质书画文物上霉菌的分离与鉴定

唐欢<sup>1</sup>,王春<sup>1</sup>,范文奇<sup>1</sup>,周理坤<sup>1</sup>,马冠华<sup>2</sup>

(1. 重庆中国三峡博物馆,重庆 400015; 2. 西南大学植物保护学院,重庆 400715)

**摘要:** 霉菌污染会影响馆藏纸质书画的保存和展示。对书画污染菌进行分离及鉴定,有助于提高文物霉变防治工作的针对性,进而提高防治效果。本研究利用传统的纯培养法从遭受霉菌污染的馆藏纸质书画表面分离得到8株霉菌,通过形态特征观察和rDNA转录间隔区序列ITS(Internal Transcribed Spacer)测序分析。结果表明:8株霉菌分属于曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)和木霉属(*Trichoderma*)。研究结果可为馆藏纸质书画文物防霉剂的研发和文物霉菌的综合防治提供靶标和依据。

**关键词:** 霉菌;书画;文物;分离与鉴定;rDNA-ITS

**中图分类号:** K879.2 **文献标识码:** A

## 0 引言

我国传统的纸质书画文物是呈现历史风貌的珍贵载体,是研究人类社会活动的重要资料,是人类极其宝贵的文化遗产和财富。但是,受纸张的组成及加工工艺等纸质本身的性质所决定,比起其他材质的文物,纸质书画文物更容易受到霉菌的侵蚀,进而变质糟朽。

霉菌是对单细胞或多细胞,不形成大型肉孢子实体的丝状真菌的统称,在分类上属于真菌门的各个亚门,通过无性或或有性孢子进行繁殖。霉菌的孢子是空气中数量最多的气传生物学微粒<sup>[1]</sup>,空气中真菌孢子数量可以达到20万个/m<sup>3</sup><sup>[2]</sup>。一旦在适宜的温度、湿度条件下,大量附着于书画表面的孢子,即可依靠纸张的纤维素、纸浆中的淀粉及动物胶等为营养物质进而生长形成菌落,对书画文物造成严重破坏。纸质书画文物发生霉损后,轻者出现纸张变色,色素或字迹褪色,形成多种颜色且难以清洗的霉斑,纸质酸度增加等现象;重者则发生纸张粘连,机械强度下降,脆裂糟朽,无法修复<sup>[3]</sup>。鉴于上述现象,针对纸质书画文物的防霉剂的筛选和研发已成为当前文物保护工作中的一项研究热点<sup>[4~6]</sup>。

值得注意的是,不同种类的真菌对抗真菌制剂的敏感性不同,而不同的真菌抑制剂也具有不同的

抑菌谱,为了提高文物防霉剂抑制霉菌的专一性,在防霉剂的筛选和研发工作中做到有的放矢,对污染文物的霉菌种属进行调查和研究是十分重要且基础的工作。因此,本研究对侵袭馆藏纸质书画文物的霉菌进行了分离和鉴定,以期能为馆藏纸质书画文物防霉剂的研发和文物霉菌的综合防治提供靶标和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

带有霉斑的纸质书画文物皆由三峡库区某博物馆提供,书画表面霉斑颜色呈黑色、黄色、棕褐色等(图1~2)。利用一次性无菌拭子取样器单一方向轻



图1 书画表面霉斑 I  
Fig. 1 Mold contaminated on the ancient Chinese calligraphy and paintings I

收稿日期:2014-06-16; 修回日期:2014-10-10

基金项目:重庆中国三峡博物馆项目资助(2013-KTZ01)

作者简介:唐欢(1979—),女,2001年毕业于西南师范大学生物教育专业,副研究馆员,研究方向:文物微生物病害防治,E-mail: tanghuan3gm@163.com

通讯作者:马冠华,E-mail:nikemgh@swu.edu.cn



图2 书画表面霉斑Ⅱ

Fig.2 Mold contaminated on the ancient Chinese calligraphy and paintings Ⅱ

拭霉斑处,然后将带菌拭子放回管中,标明采样编号、采样时间,置于冰盒中,带回实验室进行分离培养。

### 1.2 试剂及主要设备

霉菌分离、纯化用沙氏葡萄糖培养基(SDA),固体及液体培养基基质颗粒,瓷珠菌种保存管均购自青岛海博生物技术有限公司,培养基高压灭菌后备用。真菌DNA提取试剂盒购自Omega公司(E. Z. N. A. Fungal DNA Kit),Taq DNA聚合酶、缓冲液体系、引物定制均由Invitrogen公司提供。

真菌培养用人工气候箱为Binder公司KBF240(E5.2)型;PCR仪为ABI公司9700型;凝胶成像系统为Bio-Rad公司Gel Doc 2000型;测序仪为ABI公司Applied Biosystems 3730XL。显微镜为重庆奥特光学仪器有限公司BK5000型。显微摄像采用美国Photometrics公司CoolSNAP Clolor 3.3M系统。

### 1.3 霉菌的分离、纯化

无菌条件下,将擦拭了书画霉斑样品的采样拭子头用无菌剪刀剪下,放入盛有液体SDA培养基的锥形瓶中,为了防止培养过程中霉菌在培养基液体表面形成菌膜,瓶中置少量无菌玻璃珠。25℃,100r/min震荡培养的条件下对霉菌进行培养3d后,用无菌去离子水对培养液进行10倍倍比稀释,分别将稀释梯度设置为 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 及 $10^{-4}$ ,取不同浓度梯度稀释液200 $\mu$ L均匀涂布于沙氏葡萄糖琼脂上,25℃,RH 70%倒置培养3d,选择分离效果明显,菌落形态、颜色多样的平板,分别挑取菌落进行划线纯化。对产孢量较大的霉菌,划线培养1~2次后仍可能

存在污染,需对其进行多次划线纯化。对得到的纯化霉菌,使用瓷珠菌种保存管将其冻存于-20℃备用。

### 1.4 霉菌的形态观察

**1.4.1 菌落形态观察** 利用无菌镊子从瓷珠冻存管中夹取吸附了菌液的红色瓷珠1粒,置于沙氏葡萄糖琼脂平板的中心,25℃,RH 70%倒置培养4d,连续观察菌落的生长速度、外观形态、湿润程度、颜色变化等情况。

**1.4.2 菌落显微形态观察** 以水为浮载剂,用解剖针从菌落的边缘挑取少量带有孢子的菌丝,放入载玻片上,将菌丝挑散开,加盖玻片,在光学显微镜下观察菌丝和孢子的微观形态,并显微照相保存。

### 1.5 霉菌基因组DNA的提取

对纯化得到的霉菌进行培养,条件同1.2。根据真菌DNA提取试剂盒提供的提取说明,取菌丝200mg至2mL离心管中,反复冻融3~4次,加入20 $\mu$ L溶菌酶,37℃培养箱内放置1h;加入20 $\mu$ L蛋白酶K,漩涡震荡混匀,再加入20 $\mu$ L RNase 漩涡震荡并室温静置2min。加入200 $\mu$ L的PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer,漩涡震荡至均匀溶液。将离心管置于55℃水浴锅裂解10min,加入100%乙醇,漩涡震荡5s。从试剂盒中取吸附柱与收集管,并将吸附柱置于收集管上,将溶液转移至吸附柱中,22℃,10000r/min离心1min。丢掉收集管,将吸附柱置于一个新的收集管中,加入500 $\mu$ L洗脱液1至吸附柱上,室温10000r/min离心1min。丢掉收集管,将吸附柱置于一个新的收集管中,加入500 $\mu$ L洗脱液2,22℃,最大转速离心3min。将纯化柱转移至1.5mL离心管中,加入100 $\mu$ L Purelink™ Genomic Elution Buffer至纯化柱中,室温静置5min,12000r/min离心1min,得到DNA洗脱液。

### 1.6 真菌ITS基因片段的PCR扩增及测序<sup>[7-8]</sup>

真菌ITS基因片段扩增的引物序列为ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')。

PCR反应体系为25 $\mu$ L,其中模板量为1 $\mu$ L(20ng/ $\mu$ L),10 $\times$  PCR buffer 2.5 $\mu$ L,10m M dNTP Mixture 0.5 $\mu$ L,50m M MgCl<sub>2</sub> 0.8 $\mu$ L,引物ITS1、ITS4(12.5pm/L)各1 $\mu$ L,Platinum® Taq DNA聚合酶0.2 $\mu$ L,无菌双蒸水18 $\mu$ L。PCR反应条件为94℃预变性5min;94℃ 30s,52℃ 30s,72℃

1min30s,35个循环;最后72℃延伸5min。PCR扩增完毕,产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物送Invitrogen公司进行测序。

### 1.7 序列比对

测序返回的序列,其同源性通过互联网与Genbank进行比对,网址为www.ncbi.nlm.nih.com。比对后的序列经BankIt sequence submission工具向Genbank提交序列具体信息,申请获得Genbank的Accession Number。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离纯化

通过分离纯化,从纸质书画文物表面获得8株霉菌。

### 2.2 形态观察

8个菌株经纯培养后观察发现,在培养基上呈现不同的菌落颜色及形态特征,菌落颜色包括灰、绿、黄等,菌落形态有平展型和绒毛状,有些菌株菌丝高度发达,有些则未见菌丝明显生长。

菌株1菌落生长较快,在SDA培养基上25℃培养3d,直径6.8cm,致密,菌落边缘整齐平展,白色,中间深褐色,其上气生菌丝较发达,白色,绒状,略呈放射状,初生菌丝无色,生长3d后呈灰褐色(图3A);分生孢子梗无色,光滑,分生孢子头呈射状,顶囊近球形(图3A-1),分生孢子圆形且平滑(图3A-2)。符合米曲霉鉴定特征。

菌株2和菌株5菌落及显微形态特征表现一致,即菌落生长较快,在SDA培养基上于25℃培养3d后直径为6.6~6.9cm,菌落半毛绒状,颜色为黄绿色,随着培养时间的延长,可分泌出现棕色小液滴(图3B、图3E);分生孢子头辐射状,顶囊近球形,小梗双层,呈放射状排列,黄色,孢子链状排列(图3B-1)。符合黄曲霉特征。

菌株3和菌株7菌落及显微形态特征一致,即在SDA培养基上于25℃培养3d后直径为7.6~7.8cm,菌落边缘整齐,深黑褐色,粉末状,表面有大量放射状沟回。产孢能力旺盛,分生孢子头辐射状,分生孢子梗直立;圆形顶囊,顶囊着生双层小梗,第一层较第二层明显粗壮,分生孢子梗亦呈放射状向四周发散,孢子圆形,黑褐色(图3G-1)。符合黑曲霉特征。

菌株4菌落生长极为迅速,培养3d后即可完全铺满平板表面。菌落颜色黄绿色至绿色,菌落平坦且边缘规则,气生菌丝不明显(图3D)。分生孢子梗主轴粗,侧向有多级分枝,分枝轮生且不规则,部分分枝基部膨大呈长瓶型(图3D-1),分生孢子光滑,椭圆形(图3D-2)。符合木霉属特征。

菌株6和菌株8菌落生长极为迅速,菌落颜色呈灰褐色或白色,菌丝丰富,蔓延至整个培养皿(图3F、图3H);菌丝无隔膜,有分枝,有假根和匍匐枝,孢子囊表面平滑近球形,内有大量椭圆形孢囊孢子(图3H-1)。符合根霉属典型特征。

首都博物馆曾从其馆藏书画中分离出22株霉菌,经形态分析鉴定分属于烟曲霉、棒曲霉,黑曲霉及意大利青霉,其中,烟曲霉和棒曲霉为优势种<sup>[9]</sup>。此外,对书画上“狐斑”形成菌的研究中,Mary-Lou E. Florian<sup>[10]</sup>、吴兴焕<sup>[11]</sup>以及上海博物馆陈元生等<sup>[12]</sup>的研究均显示侵蚀纸质书画而形成色素沉积的真菌以曲霉属、青霉属为主,包括灰绿曲霉群、局限曲霉群、青霉状曲霉、孔曲霉、光饱青霉等。本研究结果显示,从三峡库区某博物馆采集的书画污染霉菌也包括曲霉属,如黑曲霉、黄曲霉和米曲霉,还有部分根霉和木霉。从形态观察的结果中可以发现,曲霉属的真菌产孢能力旺盛,根霉假根发达,木霉生长极其迅速,这些特点便于其附着于书画表面并在适宜条件下快速生长。

除了附着生长之外,曲霉、木霉通常能够产生高活性的纤维素酶,对纤维素的分解能力很强,在米曲霉的生物降解作用下,纤维会发生断裂导致织物出现破洞和破损<sup>[13]</sup>,黄曲霉、黑曲霉及烟曲霉等对染料具有脱色作用<sup>[14-16]</sup>,上述霉菌的作用对纸质书画文物均可造成损伤。

### 2.3 分子生物学鉴定结果

将分离获得的8株真菌的ITS序列上传至Genbank,获得登录号KF908784-KF908791。对8株真菌的ITS序列与Genbank数据库中的已知的ITS序列进行同源性比对,结果表明,提交的8个序列与数据库中参照序列的同源性大于或等于99%(表1),分别对应曲霉属中的黑曲霉2株(菌株3和7),黄曲霉2株(菌株2和5),米曲霉(菌株1)。根霉属中的米根霉2株(菌株6和8)。木霉属中的长梗木霉(菌株4)。

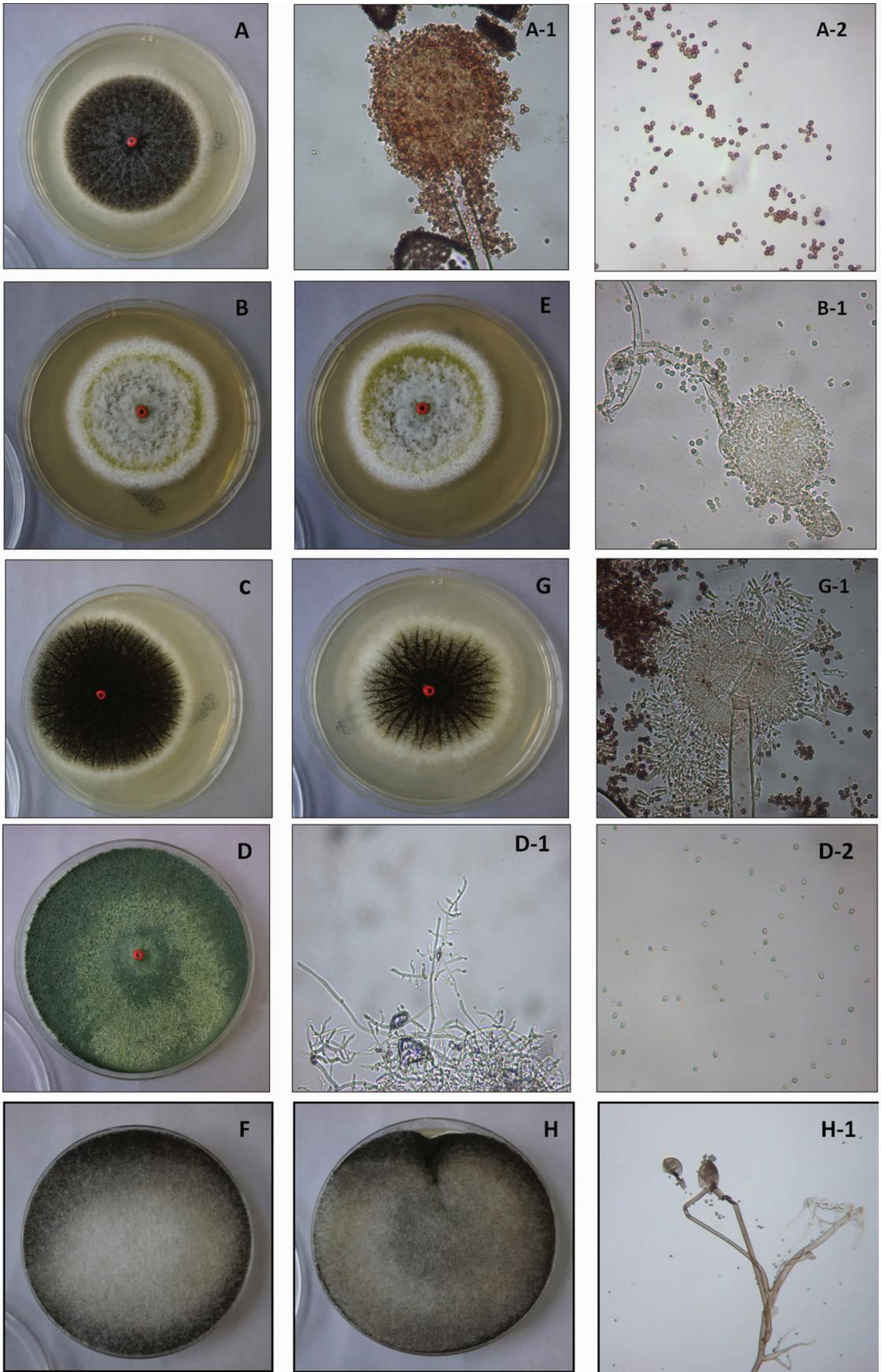


图 3 书画表面霉斑分离获得的真菌在 SDA 培养基上的菌落及形态特征

注:菌落中心为菌种保存用红色瓷珠

Fig. 3 Filamentous growth and morphological characteristics of fungi isolated from antique paintings on SDA solid media

表 1 真菌序列同源性比对结果

Table 1 Identification of fungi by sequence alignment

No.	长度/bp	相似种	参考序列号	相似度%
1	599	<i>Aspergillus oryzae</i> strain PW2961	KF908784	99
2	583	<i>Aspergillus flavus</i>	KF908785	99
3	574	<i>Aspergillus niger</i> strain WA0000019042	KF908786	99
4	555	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain CEN506	KF908787	99
5	556	<i>Aspergillus flavus</i> strain SV/09-06	KF908788	99
6	578	<i>Rhizopus oryzae</i>	KF908789	99
7	561	<i>Aspergillus niger</i> strain SS10	KF908790	99
8	575	<i>Rhizopus oryzae</i> strain CBS 146.90	KF908791	99

传统的真菌分类依据主要是依靠形态结构观察,但是形态学鉴定往往耗时较长,需要长时间对菌落的生长速度、颜色变化、孢子成熟过程和菌丝的结构特点进行检测,同时部分真菌的形态特征复杂,且随着培养条件和环境的改变而变化,因此会造成真菌鉴定结果不一致<sup>[17]</sup>。与传统形态学观察相比,利用分子生物学方法对真菌进行种属鉴定具有灵敏快速、准确性高等优点,一般来说,提交序列与数据库中参照序列的同源性大于或等于 99%,则可视二者为同一种<sup>[18]</sup>,因此,序列分析技术在微生物分类、鉴定的研究中倍受青睐,并在我国文物保护工作中也得以应用。如武发思等<sup>[19]</sup>利用细菌通用引物对魏晋墓腐蚀壁画的细菌类群构建了克隆文库,发现假诺卡氏菌属和酸菌属是壁画细菌类群的优势种属;葛琴雅等<sup>[20]</sup>构建了细菌的 16SrRNA 基因克隆文库及真菌 ITS 克隆文库用以研究壁画菌害的主要种群;颜菲等<sup>[21]</sup>则利用 PCR-DGGE 技术对石质文物表面的微生物群落进行了多样性分析。对馆藏文物微生物病害研究中,首都博物馆闫丽等<sup>[9]</sup>利用 ITS 区 rRNA 基因序列分析技术鉴定了从书画上分离出来的 22 株真菌,申艾君等<sup>[22]</sup>利用真菌 18SrRNA 基因的鉴定方法,研究了馆藏竹木漆器类文物的霉菌污染情况。上述工作推动了分子生物学研究手段在我国文物保护领域中的应用,尤其是在文物微生物病害诊断和防治方面,但与大量的国外同类研究相比,尚属于起步阶段,还值得大力推动和深度发展。Santos 等<sup>[23]</sup>运用多种分子生物学手段(PCR-DGGE,测序以及荧光原位杂交)结合电子显微镜观察,对古代油画表面的微生物进行了分析,并以此揭示了油画表面细菌与真菌的相互关系,Pedro 等<sup>[24]</sup>利用 Real-time PCR 的方法对拉斯科洞窟内壁画表面的黑色微生物进行定量检测, Maria 等<sup>[25]</sup>利用 PCR-DGGE 技术结合克隆文库的构建研究油

画表面的细菌与真菌微生物群落,均提供了先进的研究方法和可行的研究方向。

### 3 结 论

霉变是馆藏纸质书画文物的主要病害之一,对霉菌的种属鉴定可以更有针对性地选择和使用霉菌抑制剂。本实验通过形态学检测及真菌 ITS 区 rRNA 基因序列进行序列比对分析,获得如下结论:

- 1) 本研究分离得到的书画污染霉菌种类包括黑曲霉、黄曲霉和米曲霉,还有部分根霉和木霉。
- 2) 本研究所分离得到的侵袭书画的霉菌菌株通过传统形态观察和分子生物学鉴定方法均可以对其进行分类鉴定,但 ITS 序列比对结果可将霉菌快速直接鉴定到种的水平,较形态学鉴定更高效。将微生物的分子生物学鉴定技术引入至文物保护相关工作中,可提高微生物分类鉴定的效率和准确性。
- 3) 受采样点数量有限的限制,本研究分离获得的菌株数量较少,为了更全面了解博物馆馆藏纸质书画的染霉情况,还需开展更多的采样调查。

### 参考文献:

- [1] Lacey J. Allergy and allergic disease[M]. London: Black Science, 1997: 858-883.
- [2] 邢来君,李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 193.  
XING Lai-jun, LI Chun-ming. General mycology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 193.
- [3] 马淑琴. 文物霉害的防治[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 7-8.  
MA Shu-qin. Prevention of mold of cultural relics[M]. Beijing: Science Press, 1997: 7-8.
- [4] 王克华,周新光,吴来明,等. 三种植物成分防霉活性及其对纸张、颜料影响的实验研究[J]. 文物保护与考古科学, 2012, 24(3): 67-71.  
WANG Ke-hua, ZHOU Xin-guang, WU Lai-ming, et al. Study of the mildewproof activity of three components of plant and influ-

- ence test on paper and pigments[J]. *Sci Conserv Archaeol*, 2012, **24**(3): 67-71.
- [5] 王春,周理坤,彭翔凤. 馆藏文物霉菌综合治理方法[J]. *中国文物科学研究*, 2010, (1): 61-63.  
WANG Chun, ZHOU Li-kun, PENG Xiang-feng. Comprehensive treatment methods for mold of collections of cultural relics[J]. *China Cult Herit Sci Res*, 2010, (1): 61-63.
- [6] 周新光,吴来明,王克华,等. 植物中药成分应用于文物虫霉病害防治中的适用性探讨[J]. *文物保护与考古科学*, 2012, **24**(Suppl): 20-24.  
ZHOU Xin-guang, WU Lai-ming, WANG Ke-hua, et al. Research on the applicability of Chinese herbal medicines for prevention and control of pest and mold damage to relics [J]. *Sci Conserv Archaeol*, 2012, **24**(Suppl): 20-24.
- [7] 张翠香,李娜,李倩,等. 柑橘青霉的分离鉴定与特性分析[J]. *华中师范大学学报:自然科学版*, 2014, **48**(1): 86-90.  
ZHANG Cui-xiang, LI Na, LI Qian, et al. Identification and characteristic analysis about *Penicillium spp.* from Citrus [J]. *J Central China Normal Univ(Nat Sci)*, 2014, **48**(1): 86-90.
- [8] White T J, Bruns T, S Lee, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[D] // Innis MA et al eds PCR protocols. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [9] 闫丽,高雅,贾汀. 古代书画文物上污染霉菌的分离与鉴定研究[J]. *中国文物科学研究*, 2011, (1): 78-82.  
YAN Li, GAO Ya, JIA Ting. Isolation and identification of the molds from antique paintings[J]. *China Cult Herit Sci Res*, 2011, (1): 78-82.
- [10] Mary L E, Florian L M. The ecology of the fungal fox spots in a book published in 1854[J]. *Restaurator*, 1999, **20**: 137-150.
- [11] 吴兴焕,王燕婷,汪碧涵. 博物馆馆藏麻织品上褐斑真菌研究[J]. *台湾农业化学与食品科学*, 2006, **44**(5): 283-291.  
WU Hsin-huan, WANG Yen-ting, WANG Pi-han. Study of the foxing-causing Fungi on Linen Textiles from Museum Collections [J]. *Taiwanese J Agri Chemi Food Sci*. 2006, **44**(5): 283-291.
- [12] 陈元生,解玉林. 书画上“狐斑”成因研究[J]. *文物保护与考古科学*, 2002, **14**(Suppl): 63-76.  
CHEN Yuan-sheng, XIE Yu-lin. Study of the fox spots on the painting[J]. *Sci Conserv Archaeol*, 2002, **14**(Suppl): 63-76.
- [13] 牛建涛,张小英,官伟波. 纤维素纤维织物在米曲霉作用下的生物降解[J]. *上海纺织科技*, 2013, **41**(5): 1-3, 19.  
NIU Jian-tao, ZHANG Xiao-ying, GUAN Wei-bo. Biodegradation of cellulose fabric under the effect of *Aspergillus* [J]. *Shanghai Textile Sci Technol*, 2013, **41**(5): 1-3, 19.
- [14] 董新姣,陈艳乐. 黄曲霉对酞青染料脱色研究[J]. *浙江师大学报:自然科学版*, 2000, **23**(1): 60-63.  
DONG Xin-jiao, CHEN Yan-le. Study on phthalocyanine dye-decolorization by *Aspergillus flavus* [J]. *J Zhejiang Normal Univ(Na Scies)*, 2000, **23**(1): 60-63.
- [15] 刘效梅,辛宝平,徐文国,等. 黑曲霉对水溶性染料的吸附研究[J]. *化工环保*, 2005, **25**(5): 341-345.  
LIU Xiao-mei, XIN Bao-ping, XU Wen-guo, et al. Study on adsorption of water soluble dyes by *Aspergillus Niger* [J]. *Environ Prot Chem Indust*, 2005, **25**(5): 341-345.
- [16] 肖继波,胡勇有. 烟曲霉菌吸附染料的解吸及其机理[J]. *环境科学与技术*, 2008, **31**(5): 18-21, 41.  
XIAO Ji-bo, HU Yong-you. Desorption and mechanism of dye adsorbed growing mycelia of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Envir Sci Technol*, 2008, **31**(5): 18-21, 41.
- [17] Balajee S A, Sigler L, Brandt M E. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century[J]. *Med Mycol*, 2007, **45**(6): 475-490.
- [18] Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2003, **69**(1): 327-333.
- [19] 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**: 51-58.  
WU Fa-si, WANG Wan-fu, HE Dong-peng, et al. Molecular techniques used to analyze the bacterial groups on mural paintings in Wei and Jin Dynasty Tombs, Jiayuguan [J]. *Dunhuang Res*, 2011, **6**: 51-58.
- [20] 葛琴雅,李哲敏,孙延忠,等. 壁画菌害主要种群之分子生物学技术检测[J]. *文物保护与考古科学*, 2012, **24**(2): 14-21.  
GE Qin-ya, LI Min-zhe, SUN Yan-zhong, et al. Application of molecular biological techniques in identifying pathogenic microbes on mural paintings [J]. *Sci Conserv Archaeol*, 2012, **24**(2): 14-21.
- [21] 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.  
YAN Fei, GE Qin-ya, LI Qiang, et al. Analysis of microbial community on the surface of the historic stone and nearby rock samples in Yungang Grottoes [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2012, **52**(5): 629-636.
- [22] 申艾君,王明道,刘康,等. 馆藏竹木漆器类文物污染霉菌类群的鉴定与分析[J]. *河南科学*, 2011, **29**(8): 923-926.  
SHEN Ai-jun, WANG Ming-dao, LIU Kang, et al. Identification and analysis of contaminated mold species from the bamboo, wood and lacquer collected in Henan Museum [J]. *Henan Sci*, 2011, **29**(8): 923-926.
- [23] Santos A, Cerrada A, García S, et al. Application of molecular techniques to the elucidation of the microbial community structure of antique paintings[J]. *Microb Ecol*, 2009, **58**(4): 692-702.
- [24] Pedro M, Martin S, Fabiola B, Claude A, et al. Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the Lascaux Cave, France [J]. *Sci Total Envir*, 2013: 443, 478.
- [25] María del Mar López-Miras, Inés Martín-Sánchez, Frica Yebra-Rodríguez, et al. Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration [J]. *Plos One*, 2013, **8**(11): e80198.

## Isolation and identification of molds from ancient Chinese calligraphy and paintings in museums

TANG Huan<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, FAN Wen - qi<sup>1</sup>, ZHOU Li - kun<sup>1</sup>, MA Guan - hua<sup>2</sup>

(1. China Three Gorges Museum, Chongqing, 400015; 2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716)

**Abstract:** Contamination by mold is a major potential risk for ancient Chinese calligraphy and paintings on display in museums. The isolation and identification of these microorganisms is helpful for developing a useful approach to control deterioration. In this study, the traditional pure culture - dependent method was performed, and 8 strains of mold were isolated from the paper paintings. In addition to typical mold characteristics, they were identified by ITS sequencing. The results of the morphological and molecular biological investigations show that *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. and *Trichoderma* spp. are present in these in these specimens.

**Key words:** Mold; Calligraphy and painting heritage; Cultural relics; Isolation and identification; rDNA - ITS

(责任编辑 谢 燕)

· 通 讯 ·

### 关于 DOI 注册的通告

为了促进学术成果的传播,本刊已与同方知网(北京)技术有限公司签订协议,加入了国际 DOI 中国出版物注册与服务中心成为会员。DOI——Digital Object Identification,意为“数字对象唯一标识”。

从 2015 年第 1 期始,本刊所刊载的学术论文,都将进行国际 DOI 注册,进入国际 DOI 信息服务体系,实现数字化资源的国际化共享。

本刊 DOI 前缀:10.16334/j.cnki.cn31-1652/k.

特此通告。

《文物保护与考古科学》编辑部