文章编号:1005-1538(2011)01-0013-06

敦煌莫高窟洞窟内外空气中微生物的对比研究

马燕天 1 ,汪万福 2* ,马 旭 1 ,武发思 2 ,马晓军 1 ,安黎哲 1 ,冯虎元 1 (1. 兰州大学生命科学学院,甘肃兰州 730000; 2. 敦煌研究院保护研究所,甘肃敦煌 736200)

摘要:环境空气中微生物会引起文物的损坏,因此开展针对文物保护的空气微生物研究非常重要。本研究利用 Anderson FA-I型空气采样器在莫高窟封闭洞窟(常年不开放)中和洞窟外(检票口)采样,研究了空气中微生物的 种群动态和群落。结果表明,洞窟内的细菌数量远远高于洞窟外,而洞窟内外的真菌数量相差不大。空气中的细菌和真菌的季节性变化不明显,但夏季洞窟外环境中真菌数量最高,冬季洞窟内环境细菌数量较多。洞窟外环境空气中的细菌数量与环境空气温度、太阳辐射强度、地表温度以及风速呈显著正相关,而与空气相对湿度呈显著负相关。窟外环境空气中的真菌数量与游客数量呈显著正相关。此外,空气中的细菌主要分布在采样器的第一、三、四级中,而真菌分布以第二、三、四级为主。研究还表明,敦煌莫高窟空气中的主要真菌为枝孢属,无孢菌,青霉属,链格孢属和曲霉属的种类。

关键词: 莫高窟;文物保护;空气微生物中图分类号: K879.2 文献标识码: A

0 引 言

敦煌石窟和壁画艺术是我国和世界人民的珍 贵文化遗产,其研究和保护价值不言而喻。微生 物作为破坏壁画的主要因素之一,会对敦煌壁画 造成严重的破坏,如一些细菌可以代谢壁画颜料, 造成壁画的色变[1,2]。微生物形成的菌落及其分 泌的色素会污染壁画[3,4],真菌和放线菌菌丝体可 以侵入壁画内部造成物理损害[5]。洞窟中的微生 物来源广泛,既有修筑洞窟的材料本身含有的,也 有各种动物、昆虫(它们本身也会对壁画造成损 坏[6])直接带进去的,还有漂浮在空气中进而粘附 在洞窟内的[7]。已有研究证明,空气中微生物与 文物的生物腐蚀密切相关,在这个过程中空气充 当着微生物扩散载体的角色[8,9]。一些人类的活 动如交通车辆和参观人流会带入大量的微生物, 使周围空气中的微生物数量倍增[10~12]。敦煌莫 高窟每年接待大量的游客,因此,探索和研究莫 高窟窟区环境空气中微生物的数量和分布,以及 微生物与游客的关系,对于保护莫高窟极为重 要。

1 研究材料与方法

1.1 试验设备与试剂

Anderson FA-I型空气采样器(辽阳市应用技术研究所),BS-II型干热培养箱(上海跃进医疗机械厂),灭菌锅(上海三申医疗器械厂),SW-CJ型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),CX41型显微镜(奥林巴斯),PB-21型PH计(赛多利斯),DifcoR2AAgar(法国DB公司),蔗糖(烟台市双双化工有限公司),氯化钠(天津市光复科技发展有限公司)

1.2 采样

- 1.2.1 采样地点 分2个采样点:
- a)编号为54号洞窟:常年封闭保护的洞窟,未受到人为因素的干扰。
- b)游客检票口:距离洞窟口5m左右的开放环境,每天有大量的游客在这里接受检票,进入窟区参现
- 1.2.2 采样方法 采用国产的 Anderson 生物粒子取样器(FA-I型)进行测定。采样器每一级可以截留的有效粒子直径范围分别为:>7.0μm(第一

收稿日期:2010-04-12;修回日期:2010-08-03

基金项目:古代壁画保护国家文物局重点科研基地开放课题资助(200801),中国博士后科学基金资助(20080430109),国家自然科学基金资助(40940005),国家文物局文物保护科学与技术研究课题资助(200701)。

作者简介:马燕天(1985一),男,博士研究生,主要从事微生物生态学方面的研究。

^{*}通讯作者:汪万福,E-mail:wwanfu@hotmail.com,fhy891@163.com

级), $4.7 \sim 7.0 \mu m$ (第二级), $3.3 \sim 4.7 \mu m$ (第三级), $2.1 \sim 3.3 \mu m$ (第四级), $1.1 \sim 2.1 \mu m$ (第五级), $0.65 \sim 1.1 \mu m$ (第六级)。空气细菌和真菌的采样高度为距地面 1.5 m,采样时间均为 5 min。

采样之前先配制培养基,试验中采用 R2A 培养基^[13]培养细菌,PDA 培养基培养真菌。所有配制好的培养基经过 48h 的空培养确定无污染后用于采样。采样平皿用 90mm 的玻璃平皿。灭菌后在无菌的条件下加入 25mL 的培养基。采样器各层的孔眼至采样面的距离(即撞击距离)为 2mm。采样过程中每次更换培养基时都要用 75% 的酒精对采样器进行表面消毒。采样时间从 2008 年 9 月-2009 年 8 月,每月上旬采样一次,每次三个重复。

1.3 微生物的培养和计数

所有采集的样品在运送到实验室后在培养箱中进行培养,细菌 37℃,真菌 25℃,培养 48~72h 后进行下一步的实验。分别在各级采样皿上进行菌落记数。根据各级空气微生物的粒子数量。利用公式进行校正,然后计算出空气微生物的数量。具体校正公式^[14](1)和计算公式(2)如下:

$$Pr = N(\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \dots + \frac{1}{N-r+1})$$
 (1)

$$C(\text{CFU/m}^3) = \frac{T \times 1000}{t(\min) \times F(\text{L/min})}$$
 (2)

式中,Pr表示每一级采样器上获得有效菌落数(即经过校正的菌落数量),N表示每一级采样器上开孔的数目,r表示每一级采样器上获得的实际菌落数量,C表示微生物的数量,T为六层采样器上获得的有效菌落数的总和,t表示采样时间,F表示空气流量。

1.4 微生物的分离鉴定

经过培养的微生物首先根据培养形态特征进行 分类计数,然后挑取不同形态的菌落进行分离纯化, 并使用甘油冻存管保存菌种。培养出的真菌根据其 显微镜下菌丝和孢子的形态学特征进行了主要优势 菌属的鉴定。

1.5 数据统计

用美国 OMEGA GENINERING 公司的粘附性温度探头和 VAALA 公司的 HMP35AC 型湿度探头监测洞窟内温、湿度,洞窟外温、湿度用莫高窟崖顶全自动气象站数据,数据采集密度分别为 30′和 15′一次。游客数据由敦煌研究院接待部统计。

实验中所有数据都是用 Excel 2007 和 SPSS 16. 0 进行编辑分析的,对部分数据进行了一维方差 (ANOVA)分析和相关性分析。

2 结果和讨论

2.1 洞窟内外微生物种群的差异

空气中细菌数量远远高于真菌,洞窟空气中的细菌数量($(1.1 \sim 1.4 \times 10^3)$ CFU/m³)远远高于窟外环境($(3.7 \sim 5.2 \times 10^2)$ CFU/m³)空气中的数量,而真菌在窟内($(1.9 \sim 3.0 \times 10^2)$ CFU/m³)和窟外($(1.7 \sim 3.1 \times 10^2)$ CFU/m³)的数量并没有显著的差异(图1)。在窟内环境空气中的细菌在数量上占优势,在窟外环境空气中细菌和真菌数量相当。

全年细菌数量的最高值出现在未开放窟的十一月,其数量为 $(2.1~2.9)\times10^3$ CFU/m³,最低值出现在窟外环境的二月份,其数量为 $(0.77~1.26)\times10^2$ CFU/m³。而真菌数量的最高值则出现在窟外的八月份,为 $(0.66~1.2)\times10^3$ CFU/m³,最低值出现在窟外的九月份,为 $(0.24~0.32)\times10^2$ CFU/m³(图3)。与世界其他地区的空气微生物调查结果相比,敦煌莫高窟区的微生物数量很低,如北京市的空气微生物数量范围为 $(0.071~22.1)\times10^3$ CFU/m³[14],在波兰的上西里西亚为 $(0.013~4.3)\times10^3$ CFU/m³[15],在法国马赛为 $(0.08~2.8)\times10^3$ CFU/m³[16],在南非的约翰内斯堡为 $(0.175~8.5)\times10^3$ CFU/m³[17]。

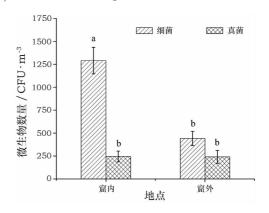


图1 不同地点的微生物数量比较

Fig. 1 Comparison of airborne bacteria concentrations in different sites

2.2 空气中微生物的季节性变化

空气中的微生物往往会随着季节交替而出现较大的变化^[18],然而在敦煌莫高窟,微生物数量在各个季节的变化不是很明显(图2)。

真菌数量的最高值和最低值均出现在窟外环境中,最高值出现在夏季,最低值在春季。而细菌数量的四季分布很均一,只在冬季的窟外环境中数量比较低。同时,洞窟内外微生物数量的比较还发现,在夏季,窟外真菌的数量高于库内环境;而在冬季窟内

细菌的数量高于窟外。敦煌莫高窟地处内陆,常年大风干旱,平均空气湿度低于30%。常年持续的大

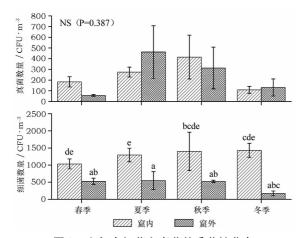


图 2 空气中细菌和真菌的季节性分布

Fig. 2 The seasonal distributions of airborne bacteria and fungi

风一方面可以对空气中的微生物起到稀释作用^[19],另一方面可以带来新的微生物,这样就使空气微生物数量保持在一个稳定的范围内。在夏季,莫高窟区的植物生长茂盛,同时会向空气中释放大量的的真菌孢子,而这些漂浮于空气中的孢子不能或极少量进入封闭的洞窟。而在冬季,洞窟内的温度高于洞窟外,有利于细菌的繁殖。

2.3 空气中微生物数量与环境因素

空气中微生物的数量会受到诸多环境因素的影响。在封闭的洞窟环境中,气温最高值出现在九月份(18.26℃),最低值在一月份(2.40℃),而空气湿度在一月(22.7%)和二月(25.9%)有一个小的高峰。在窟外环境中,温度的最低值(-8.71℃)和相对湿度的最高值(59.05%)均出现在了一月份(图 3)。

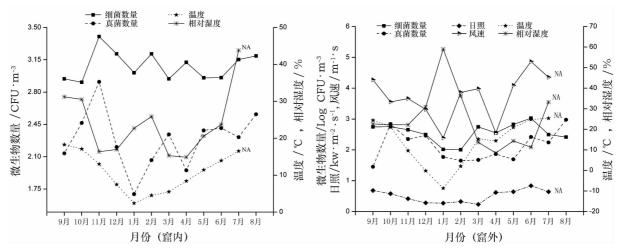


图 3 微生物数量与环境因子的月际变化

Fig. 3 Monthly variations of airborne microorganism concentrations (CFUs/m³) and other environmental parameters

对微生物数量与环境因素的相关性分析表明(表 1),在窟外环境空气中微生物的数量会受到诸多因素 的影响,而在封闭洞窟内,则没有发现对微生物数量 有显著影响的因素。窟外环境空气中的细菌数量与 气温、太阳辐射强度、地表温度具有显著的正相关,而 与相对湿度呈显著的负相关。通常情况下,较高的气 温和相对湿度有利于微生物的生长,一般来说,高湿 度的气候往往出现在夏季,但是在敦煌莫高窟,夏季 的太阳辐射极为强烈,这种强辐射本身会杀死一些空 气中的微生物。同时,莫高窟全年的降雨很少,即使 有降雨,也会迅速被强太阳辐射蒸发。所以,莫高窟 环境中的高湿度气候往往出现在冬季,但这个季节的 温度非常低,在这种低温下绝大多数的微生物都无法 生长。研究还发现空气微生物数量与风速也存在显 著的正相关。一些研究表明,较强的风可以稀释空气 中的微生物,但这种情况通常发生在海滨等空气比较 洁净的地域^[20]。地面的尘土颗粒上包含着大量的微生物,它是空气中微生物的一个重要来源。地面的任何扰动,如人流,机动车辆,以及大风等都会将这些尘土颗粒带到空气中^[21]。在莫高窟,大风会扬起

表 1 微生物数量与环境因素间的 Pearson 相关性分析

Table 1Pearson Correlation Analysis for bacterial CFUs and
environmental parameters(CFU \cdot m $^{-3}$)

因子	窟内细菌	窟外细菌	窟内真菌	窟外真菌
温度	-0.107	0.716 *	0.337	0.193
相对湿度	-0.211	-0.720 *	-0.187	-0.093
太阳辐射强度		0.673 *		0.171
风速		0.659 *		0.041
风向		-0.524		-0.194
降雨量		-0.385		-0.243
地表温度		0.723 *		0.207
游客数量		0.235		0.725 * *

^{*}表示显著性在0.05水平(双侧检验);**表示显著性在0.01水平(双侧检验)。

地面的沙尘,进而将微生物带到空气中。实验中的另一个发现是,窟外环境空气中的真菌数量随着旅游人数的增加而增加,这表明莫高窟的游客也是空气中真菌的一个重要来源^[22]。

根据莫高窟游客接待中心的统计,将游客参观时间分为淡季和旺季,淡季从十一月到第二年的四月,旺季从五月到十月,旺季平均每天的参观人数约为淡季的7.6倍。游客人数只对窟外环境有影响,而对封闭的洞窟无影响(图4)。在窟外环境中,旅游旺季空气中微生物数量高于旅游淡季,特别是真菌尤为明显。

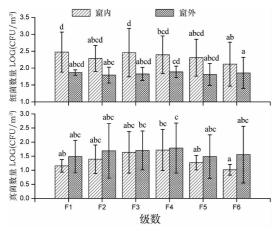


图 4 游客对空气微生物数量的影响

Fig. 4 The concentration variations of airborne microorganisms between the tourist season and travel off – season

2.4 空气中微生物的粒径分布

基于 Anderson 采样器的特点,不同粒径的粒子会被截留在不同孔径的采样器分级上。空气微生物在采样器上的粒径分布也可以反映出空气的质量状况。实验发现莫高窟窟内与窟外空气中微生物的粒径分布大致相同,只是真菌与细菌的粒径分布具有不同的特点(图 5)。真菌主要分布在第二、三、四级中,占总数的 68.0%;细菌主要分布在第一、三、四级中,占总数的 56.8%。

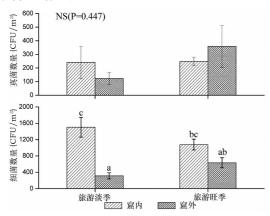


图 5 空气微生物的粒径大小分布 Fig. 5 The size distributions of airborne microorganisms on six stages

2.5 空气中真菌的主要种属组成

研究中发现莫高窟空气中真菌的优势菌属主要为, 枝孢属(Cladosporium), 无孢菌(Non – sporing fungi)青霉属(Penicillium), 链格孢属(Alternaria), 曲霉属(Aspergillus), 这与已报道的世界其他地区的研究结果相吻合^[24,25](图 6)。在洞窟内, 枝孢属为第一

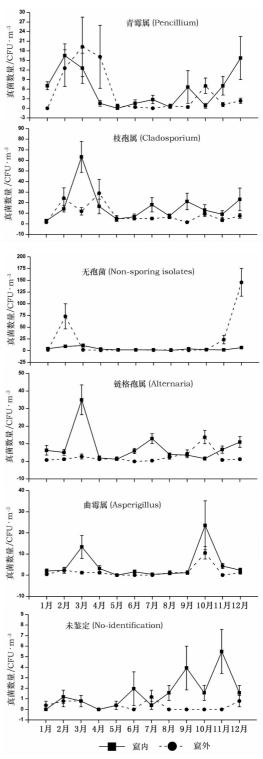


图 6 洞窟内外主要优势真菌的分布 Fig. 6 The monthly distributions of dominant fungi in and out cave

优势菌属(占总的真菌数量的 40%),其它菌属依次为青霉属,链格孢属,无孢菌和曲霉属。在洞窟外,无孢菌为第一优势菌属(占总真菌数量的 40%),其它依次为枝孢属,青霉属,链格孢属,曲霉属。这些主要优势真菌在一年内的分布上与真菌总数的分布大体相似,在温暖的月份数量增高(8~11 月平均的真菌数量为(3.4~5.3)×10²CFU/m³),在寒冷的月份数量降低(1~4 月平均的真菌数量为(0.71~1.02)×10²CFU/m³)。但曲霉属在十月份出现峰值(0.05~1.98)×10³CFU/m³),与其他真菌有所不同。无论是在洞窟内还是在洞窟外,链格孢属和枝孢属的真菌在全年内均有较高的数量(链格孢属平均值为:(0.02~1.34)×10²CFU/m³),枝孢属为:(0.04~1.91)×10²CFU/m³)。而无孢菌只在夏季和秋季的数量非常高(平均值为:(0.01~0.14)×10²CFU/m³))。

3 结 论

- (1) 莫高窟封闭洞窟中的细菌数量远远高于 窟外环境,如果单从微生物的角度考虑,空气中微生 物数量越高,则微生物粘附到壁画上的几率也将越 高,对壁画损害的可能性会增加。然而,空气中微生 物与壁画损害的具体关系尚不明确,其详细机制有 待于进一步研究。
- (2) 莫高窟空气中的细菌受环境温度和湿度的影响较真菌敏感,并且大风扬沙会增加空气中的细菌数量。游客是莫高窟空气中真菌的重要来源,游客数量的增加会引起窟区空气中真菌数量的增加。
- (3) 莫高窟空气中主要真菌及携带真菌的微粒其直径范围在 2~10μm 之间,而空气中大多数细菌及携带细菌的微粒直径范围在 2~6μm,或是大于8μm。
- (4) 莫高窟空气中的优势真菌依次为枝孢属, 无孢菌,青霉属,链格孢属,曲霉属。

致谢:感谢敦煌研究院保护研究所张国彬、李红寿和邱飞等 在采样过程中的帮助,以及兰州大学生命科学学院生物实验 室各位老师及同学的帮助。

参考文献:

- [1] Clone I I, Models AR. Cave paintings in Jeopardy [J]. Science, 2002. 297 (5578):47.
- [2] 冯清平,杨 玲,张晓君,等. 使敦煌壁画红色铅丹变色菌株生理特性的研究[J]. 微生物学报,1998,38(6):454-460. FENG Qing-ping,YANG Ling,ZHANG Xiao-jun,et al. Study of the physiological characteristics of a strain which can change the color of red lead on Dunhuang Mural[J]. J Microbiol, 1998,38 (6):454-460.

- [3] 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.
 FENG Qing ping, MA Xiao jun, ZHANG Xiao jun, et al. Stud
 - ies on microbial factor on color change of Dunhuang mural; I. Classification of microbes on color changed mural and property of some typical species [J]. J Microbiol, 1998, 38(1):52 56.
- [4] 冯清平,张晓军,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.

 FENG Qing ping, MA Xiao jun, MA Qing lin, et al. Studies on microbiological factor in colour change of Mogao Graffito's mural; II. Effect of microorganism on the pigment of imitative mural[J]. J Microbiol, 1998, 38(2):131-136.
- [5] 冯清平,张晓君,马晓军,等. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究Ⅲ. 枝孢霉在石窟壁画铅丹变色中的作用[J]. 微生物学报, 1998, 38(5):365-370.

 FENG Qing ping, ZHANG Xiao jun, MA Xiao jun, et al. Studies on microbial factor on color change of Dunhuang Mural: III. Effect of Cladosporium sp. on color change of red lead in the surface of Mural[J]. J Microbiol, 1998, 38(5):365-370.
- [6] 汪万福,蔺创业,王 涛,等. 仿爱夜蛾成虫排泄物对敦煌石窟壁画的损害及其治理[J]. 昆虫学报,2005,48(1):74-81.
 WANG Wan fu, LIN Chuang ye, WANG Tao, et al. Damages by excretion of Apopestes spectrum (Esper) imagos on the Dunhuang murals and their control [J]. Acta Entomol Sin, 2005, 48(1):74-81
- [7] Valme J, Sergio S M, Cesareo S J. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage; A review [J]. Int Biodet Biodegr, 2008, 62(4):325-330.
- [8] Saiz Jimenez C, Gonzalez J. Aerobiology and cultural heritage; some reflections and future challenges [J]. Aerobiologia, 2007, 23 (2); 89 – 90.
- [9] Nugari M P, Realini M, Roccardi A. Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores [J]. Aerobiologia, 1993, 9 (2):131-139.
- [10] Lugauskas A, Sveistyte L, Ulevicius V. Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas[J]. Annals Agri Envir Med, 2003, 10(2): 233 - 239.
- [11] Thatcher T L, Layton D W. Deposition, resuspension, and penetration of particles within a residence [J]. Atm Envir, 1995, 29 (13): 1487 1497
- [12] Yoon Y H, Brimblecombe P. Contribution of dust at floor level to particle deposit within the Sainsbury Centre for Visual Arts [J]. Stud Conserv, 2000, 45(2):127-137.
- [13] Reasoner D J, Geldreich E E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water [J]. Appl Envir Microbiol, 1985, 49 (1):1-7.
- [14] Fang Zhi guo , Ouyang Zhi yun , Zheng Hua , et al. Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing , China [J]. Microbial Ecol , 2007 , 54 (3) :487 –496.
- [15] Pastuszka J S, Paw K T. Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland [J]. Atm Envir, 2000, 34 (22):

- 3833 3842.
- [16] Di Giorgio C, Krempff A, Guiraud H, et al. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles [J]. Atm Envir, 1996, 30(1):155-160.
- [17] Yousefi V, Rama D B K. Monitoring of air for microbial and metal contamination at selected sites in the vicinity of Johannesburg, South Africa[J]. Sci Total Envir, 1992, 116(1-2):159-167.
- [18] Abdel Hameed A A, Khoder M I, Yuosra S, et al. Diurnal distribution of airborne bacteria and fungi in the atmosphere of Helwan area, Egypt J]. Sci Total Envir, 2009, 407 (24):6217 -6222.
- [19] WU Yi Hua, Chan Chang chuan, Rao Carol Y, et al. Characteristics, determinants, and spatial variations of ambient fungal levels in the subtropical Taipei metropolis [J]. Atm Envir, 2007, 41 (12):2500-2509.
- [20] El Morsy E S M. Preliminary survey of indoor and outdoor airborne microfungi at coastal buildings in Egypt [J]. Aerobiologia, 2006, 22(3):197 – 210.
- [21] HU Ta feng, LEE Shun cheng, CAO Jun ji, et al. Characteriza-

- tion of winter airborne particles at Emperor Qin's Terra cotta Museum, China[J]. Sci Total Envir, 2009, **407** (20):5319 5327.
- [22] Sanchez Moral S, Luque L, Cuezva S, et al. Deterioration of building materials in Roman catacombs: The influence of visitors [J]. Sci Total Envir, 2005, 349 (1-3); 260-276.
- [23] FANG Zhi guo, OUYANG Zhi yun, ZHENG Hua, et al. Concentration and size distribution of culturable airborne microorganisms in outdoor environments in Beijing, China[J]. Aerosol Sci Technol, 2008, 42(5):325 334.
- [24] FANG Zhi guo, OUYANG Zhi yun, HU Li feng, et al. Culturable airborne fungi in outdoor environments in Beijing, China [J]. Sci Total Envir, 2005, 350 (1-3);47-58.
- [25] Polymenakou P N, Mandalakis M, Stephanou E G, et al. Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean [J]. Envir Health Perspect, 2008, 116(3):292-296.

The comparative study of airborne microorganisms between close cave and outside cave environments in Mogao Grottoes, Dunhuang

MA Yan – tian¹, WANG Wan – fu², MA Xu¹, WU Fa – si², MA Xiao – jun¹, AN Li – zhe¹, FENG Hu – yuan¹*

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Conservation Institute of Dunhuang Academy, Dunhuang 736200, China)

Abstract: It is very important to investigate the airborne microorganisms due to the fact that the biodeterioration can be induced by such microorganisms. In this study, the Anderson FA – I air sampler was used for the sampling of airborne microorganisms both in a closed cave (closed to all visitors) and at an outside site (the entrance gate) at the Mogao Grottoes. It was found that the concentration of airborne bacteria in the cave was much higher than the outside, but no significant difference in concentration of fungi was observed between the two sites. There were slight variances of airborne microorganism concentrations according to the season, the highest fungi concentration season outside being during the summer. Inside the case, the bacteria concentration was the highest during winter. The significant positive correlations were made between the outside cave bacteria concentration and air temperature, solar radiation, surface temperature and wind speed, while a negative correlation was seen with air relative humidity. Meanwhile a positive correlation was found between outside cave fungi concentration and the number of visitors. The airborne bacteria mainly distributed on stages 1,3 and 4, and fungi at stages 2,3 and 4. The most abundant fungi found in the Dunhuang Mogao Grottos were Cladosporium, and the non – sporing fungi: Penicillium, Alternaria and Aspergillus.

Key words: Mogao Grottoes; Heritage conversation; Airborne microorganism

(责任编辑 谢 燕)