

陕西长安南礼王村出土壁画的 微生物类群鉴定

郭爱莲

(西北大学,西安 710069)

单 晔 杨文宗

(陕西历史博物馆,西安 710061)

摘要 对陕西长安南礼王村出土壁画的微生物进行了初步分析鉴定,结果表明细菌、霉菌数量几乎各半,放线菌一种。主要微生物类群为霉菌类 8 个;细菌类群 7 个,一种链霉菌。

关键词 壁画 长安南礼王村 微生物 霉菌 细菌

80年代初,陕西文物考古工作者对西安南毗邻的长安县南礼王村唐代韦氏家族墓地进行了发掘,出土了一批唐墓壁画。几年后,我们对这批壁画进行保护。修复时,发现其画面已布满黑、褐色的斑点。微生物是造成这种现象的重要原因,它们使画面模糊不清,其危害是相当严重的。

根据以往对壁画颜料、材质的分析、壁画制作工艺的研究,壁画保存不妥,会出现被微生物污染的情况。

唐代墓葬壁画的制作是严格按照一定工序进行的,包括墙壁处理,起稿、定稿、着色。一般在墓葬竣工后,开始壁画创作,墙体有土墙、砖墙之分。在土墙绘制壁画时,需先将墙面铲平。砖墙绘制壁画时,需用泥浆把砖缝堵塞磨平。然后在土墙或砖墙上抹上麦草泥作底子,待麦草泥干后即开始作画。画面是用筛后的白灰加上剪短的麻类纤维一起在水中浸泡,并充分搅拌均匀后呈糊状物,抹在麦草泥底子上,唐代壁画颜料以天然矿物质为主,有的是将矿物质简单加工而成,在有的颜料中也发现有少量植物颜料。一般这些颜料多呈粉状,不能直接作画,必须用皮胶、鱼鳔胶等和水调制。

从壁画制作工艺考虑,因麦草、麻类纤维及颜料中各种胶的存在,创造了微生物生存的条件。发掘后暴露在空气中,加之墓内阴暗潮湿,RH有时达 80%以上。所以即使在墓内微生物也会蔓延开来。

唐墓壁画在墓中难以保存,随时都有塌陷的可能。为了保护好壁画,目前较好的办法是将画面揭取下来,放置在保存条件好的博物馆内。揭取壁画时,首先用白布贴在要揭的画面上,以稳定画面不脱落。使用的粘合剂是天然树脂——桃胶。揭取后的壁画,用铺有棉花或泡沫塑料的两块板夹紧。由于取回后一时难以修复,时间久了,也会生长微生物。

微生物在生长繁殖过程中产生的酶、有机酸等代谢物从菌体分泌到材料中使壁画底面石灰层剥落,颜色也随之脱落。微生物产生的色素会引起颜色改变,因此制止壁画微生物的产生和对已造成影响壁画画面斑点的清理是一项非常重要的工作。本文对壁画上产生的微生物进行了分析检验,了解其分类状况,确立有效的防止微生物污染的技术,采取适当的防治方法。

1 材料与方法

1.1 样品采集 样品取自陕西省长安县南礼王村出土的壁画画面的贴布。

1.2 培养基 实验中所用均为无菌生理盐水。

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基(分离培养细菌用) 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、琼脂 20g、水 1000ml, pH 7.2, 0.1MPa 灭菌 25min。

1.2.2 察氏培养基^[1](分离培养霉菌用) NaNO₃ 2g、K₂HPO₄ 1g、KCl 0.5g、MgSO₄ 0.5g、FeSO₄ 0.01g、蔗糖 30g、琼脂 20g、水 1000ml, pH 自然, 0.05 MPa 灭菌 20~25min。

1.2.3 高氏合成1号培养基(分离培养放线菌用) 可溶性淀粉 20.0g、KNO₃ 1.0g、K₂HPO₄ 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、NaCl 0.5g、FeSO₄·7H₂O(10%)已滴、琼脂 20g、蒸馏水 1000ml; pH 7.2~7.4, 0.1MPa 灭菌 25min。

1.2.4 无氮培养基(鉴定用) 甘露醇 10g、KH₂PO₄ 0.2g、MgSO₄·7H₂O 1.2g、NaCl 0.2g、CaSO₄·2H₂O 0.2g、CaCO₃ 5.0g、琼脂 20g、蒸馏水 1000ml, pH 7.2, 0.05MPa 灭菌 20min。

1.2.5 葡萄糖氧化发酵培养基(鉴定用) 蛋白胨 2g、NaCl 5g、K₂HPO₄ 0.2g、葡萄糖 1%、水洗琼脂 5~6g、1%溴百里酚蓝水溶液 3ml、蒸馏水 1000ml, pH 7.0, 0.05MPa 灭菌 25min。

1.2.6 葡萄糖发酵培养基(鉴定用) 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、葡萄糖 10g、水 1000ml, pH 7.2, 加溴甲酚紫 0.04% 水溶液 20ml, 0.05MPa 灭菌 25min。

1.2.7 pH 4.5 生长培养基(鉴定用) 用牛肉膏蛋白胨培养基成分, pH 调为 4.5, 灭菌。

1.2.8 乙醇氧化培养基(鉴定用) 蛋白胨 2g、NaCl 5g、K₂HPO₄ 0.2g、乙醇 1%、溴百里酚蓝 1% 水溶液 3ml、蒸馏水 1000ml, pH 7.2, 0.05MPa 灭菌 25min。

1.2.9 硝酸盐还原培养基(鉴定用) 牛肉膏 3g、蛋白胨 10g、NaCl 5g、KNO₃ 1g、水 1000ml, pH 7.4, 0.1 MPa 灭菌 25min。

1.2.10 水解纤维素培养基(鉴定用) NH₄NO₃ 1.0g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5g、KH₂PO₄ 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、NaCl 1.0g、CaCl₂ 0.1g、FeCl₃ 0.02g、酵母膏 0.05g、8g 纤维素粉、15g 琼脂、水 1000ml, pH 7.2。在培养皿中先加 15ml 2% 的水洗洋菜, 凝后加 5ml 混合纤维素粉的琼脂培养基, 凝后点种。

1.3 试验方法

1.3.1 将古壁画上的盖布按一定面积用无菌镊子平放在三种不同的分离培养基上, 或用无菌镊子将布在培养基上反复擦示, 或用无菌水将布浸泡, 摇匀, 分别吸取 0.2ml, 冷至 45℃ 左右, 于三种不同的分离培养基中, 摇匀, 冷却凝固, 在适温下培养(细菌 30℃ ± 1℃ 1~2 天, 霉菌 28℃ ± 1℃, 1~2 周), 每种方法作一块平板, 计算生长出不同微生物的数目。

1.3.2 将细菌接入不同的鉴定用培养基, 按规定培养、检查。

1.3.3 细菌鉴定方法主要为: ①接触酶(过氧化氢酶)反应。取一环培养 18~24h 的菌苔涂于干净的载玻片上, 然后滴上一滴 3%~10% 的过氧化氢, 观察有无气泡产生。

②氧化酶反应。在干净培养皿里放一张滤纸, 滴上二甲基对苯撑二胺的 1% 水溶液, 仅使滤纸湿润即可, 用接种环取培养 18~24h 的菌落, 涂沫在湿润的滤纸上, 在 10s 内涂沫的菌苔现红色者为阳性, 10~60s 现红色者为延迟反应, 否则为阴性。

③抗酸染色。按常规制涂片, 并于玻片下缓缓加热, 使染液冒蒸气但不沸腾, 并继续滴加染液, 不使涂片上染液蒸干, 保持 5min, 涂片冷后, 倾去染液, 用酸性酒精脱色, 水洗, 用吕氏美

蓝复染 2~3min,水洗,吸干,镜检。

④牛奶中可于 72℃ 存活 15min 测验。用无菌脱脂牛奶将测定菌制成菌悬液,分装于 4 个试管,另用未加菌装有同等量的牛奶作对照。放入水浴锅(水浴锅的水面要高于牛奶液面),待水浴锅中的温度上升到 72℃ 时,开始计算时间,并保持 15min,到达 15min 时,立即将测定管从水浴中取出,浸于冷水迅速冷却。然后将用 72℃ 处理过的牛奶悬液和未用 72℃ 处理的牛奶悬液分别接种到适宜培养基中,适温培养 3~7 天,观察生长情况。

1.3.4 丝状真菌点植培养法:将察氏培养基融化冷却至 45℃ 左右,倒入无菌培养皿(约 10~15ml),冷却、凝固,接种少量霉菌孢子,点植于平板上适当的位置,成三角形的三点,将培养皿倒置在恒温箱中培养 1~2 周,观察菌落的特征。

1.3.5 将丝状真菌培养不同的时间,在洁净的载玻片中央滴一滴乳酸苯酚液,用接种针从培养皿的菌落上,挑取少许菌体,置载片的液滴中,并将菌丝体挑开,加盖玻片,在显微镜下观察菌丝、子实体的形态、孢子等。

2 实验结果

2.1 从三种不同分离培养微生物的培养基平板来看,细菌类群和真菌类群数量几乎各半,放线菌只有一种。

2.2 每平方厘米平均细菌 130~150 个左右,霉菌 110~130 个左右,放线菌一个。

2.3 通过菌落形态、菌丝体、孢子、子实体等的结构、形态、颜色、大小等^[2]特征作为丝状真菌分类的依据,参照“常见与常用真菌”中的检索表^[3],鉴定霉菌结果如下。①毛霉(*Mucor Micheliex Friex*)。菌落白色疏松,蔓延快,菌丝体无横隔,菌丝体无假根和匍匐丝,孢囊梗直接由菌丝体长出,孢囊梗直立,孢子囊顶生,球形,内有孢子,囊内有囊轴,无囊托,孢子卵球形。②青霉(*Penicillium Link*)。菌落灰绿色,绒状,菌丝体有横隔膜,分生孢子梗顶端生有扫帚状的帚状枝,培养基背面无色和褐黄色,孢子形状多为球形。为青霉属里的不同种,有桔青霉(*P. citrinum Thom*)常现青霉(*P. frequentans*)和黄绿青霉(*P. citreo-viride*)。③拟青霉(*Paecilomyces Bainier*)。菌落黄绿色,松絮状,反面黄褐色,小梗逐渐变尖细长,孢子卵形。④黑根霉(*Rhizopus nigricans Ehrenbery*)。菌落黑色,有匍匐丝和假根,假根对方生出孢囊梗;孢囊梗直立,顶端形成孢子囊,黑色,孢子囊近球形,里有孢囊孢子,孢囊孢子球形。⑤黑曲霉(*Aspergillus niger van Tieghem*)。菌落黑色,绒状,背面黄白色,菌丝分隔,分生孢子梗从细胞长出,顶囊球形,表面生小梗,呈放射状生出,分生孢子自小梗顶端相继形成,孢子球形。⑥杂色曲霉(*Aspergillus Versicolor (Vuill) Tiraboschi*)。菌落黄绿色,反面黄橙色,红色。菌丝分隔,分生孢子头疏松放射状,顶囊半球形,分生孢子球形。⑦短梗霉(*Aureobasidium Viala et Boyer*)。菌落黑色;有皱,菌丝有横隔,分生孢子椭圆形,常几个连在一起。⑧交链孢霉(*Alternaria Nees ex wallr*)。菌落黑色绒状,背面黑色,菌丝分隔,分生孢子梗较短,分生孢子褐色,有尖喙,常多个成链,大小不规律……。

2.4 以细菌的菌落形态、个体形态、生理特征、生化特征等作为分类根据,参照文献^[4-5]鉴定细菌。

①微球菌(*Micrococcus cohn*)。菌落浅黄色,细胞球状,不规则的细胞堆团,在牛肉膏蛋白胨培养基上良好生长,革兰氏阳性,不运动,在无氮培养基上不能生长,接触酶反应有气泡产生,为阳性,氧化葡萄糖产酸。②芽孢杆菌(*Bacillus cohn*)。细胞杆状,革兰氏阳性,在肉汁胨

培养基上有芽孢产生。运动,接触酶反应阳性,但根据菌落颜色,菌体大小,孢子着生位置和形状可分为三个种。③棒状杆菌(*Corynebacterium* Lehmann et Neumann)。菌落白色,为棒状杆菌,一端较大,老培养和幼培养形态无大变化,不形成芽孢,革兰氏阳性,在无氮培养基上不能生长,抗酸染色阳性,在水解纤维素培养基上菌落周围没有透明圈,即不水解纤维素、接触酶阳性,胞壁染色有横隔,对葡萄糖弱发酵产酸,在脱脂牛奶中于 72℃ 存活 15 分钟为负反应,即不能存活。④弧菌(*Vibrio pacinai*)。菌落白色,湿润,菌体不形成芽孢, $0.7 \times 1.2 \sim 2.8 \mu$, 在无氮培养基上不能生长,细胞弧状,革兰氏阴性,在肉汁胨培养基上不产生明显的非水溶性色素,发酵葡萄糖产酸、运动、氧化酶阳性。⑤黄杆菌(*Flavobacterium* Sp)。菌落黄色,菌体杆状,在无氮培养基上不长,不形成芽孢,革兰氏染色阴性,在肉汁胨培养基上产生黄色非水溶性色素、运动,不发酵葡萄糖。⑥短杆菌(*Brevibacterium* Sp)。菌落黄白色,菌体杆状,较短,革兰氏阳性,不产生芽孢,胞壁染色无横隔,弱发酵葡萄糖产酸,在牛肉膏蛋白胨培养基上良好生长。⑦假单胞菌(*Pseudomonas* Migula)。菌落白色,杆状, $0.5 - 0.9 \times 1.6 - 2.2 \mu$, 革兰氏阴性,运动,不形成芽孢,在无氮培养基上不生长,不产生明显的非水溶性色素,不发酵葡萄糖产酸,接触酶阳性,氧化酶阳性,在 pH 4.5 的培养基中不能生长,不能氧化乙醇为乙酸,硝酸盐还原反应为阳性。

2.5 在高氏合成 1 号培养基上只生有一种放线菌、菌落白色、绒毛状,有典型的气丝、基丝、孢子丝、孢子椭圆,按照放线菌的分类原则^[6],鉴定为链霉菌(*Streptomyces* Sp)。

参 考 文 献

- 1 范秀容,李广斌,沈 萍. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社,1989:260
- 2 张纪忠. 微生物分类学. 上海:复旦大学出版社,1990,181.
- 3 科学院<常见与常用真菌>编写组. 常见与常用真菌. 北京:科学出版社,1973:31
- 4 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京:科学出版社,1978:1
- 5 Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology (Eighth Edition). Baltimore: The williams & wilkins company. 1974: 217
- 6 阮继生. 放线菌分类基础. 北京:科学出版社. 1977:30

Identification of Microbial population on the Excavated Fresco from Nanliwang Village Chang An County ShannXi Province

Guo Ailian

(Northwest University Xian 710069)

Shan Wei Yang Wenzong

(Shaanxi History Museum, Xian 710061).

Abstract

The preliminary identification of growing microbial population on the ancient fresco from Nanliwang Village at Changan county in Shannxi Province was done. The result is that the count of population bacteria and mould is nearly half-and-half. *Streptomyces* sp has one species. Main microbial populations have *Mucor* Micheli ex Friex. *Penicillium* Link, *pacecilomyces* Bainier,

Rhizopus nigricans Ehrenbery, *Aspergillus niger* Van Tieghem, *Aspergillus Versicolor* (Vuill) Tiraboschi, *Aureobasidium Viala et Boyer*, *Alternaria Nees ex Wallr*, *Micrococcus Cohn*, *Bacillus Cohn*, *Corynebacterium Lehman et Neumann*, *Vibrio pacini*, *Flavobacterium Sp.*, *Brevibacterium sp.*, *one Streptomyces Sp.*

Key words Ancient fresco Nanliwang village Microorganism Mould Bacteria

1996-04-08 收到