

## 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

颜菲<sup>1</sup>, 葛琴雅<sup>2</sup>, 李强<sup>1</sup>, 于森<sup>1</sup>, 朱旭东<sup>1\*</sup>, 潘皎<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>天津市南开大学生命科学学院微生物系, 天津 300071

<sup>2</sup>北京市中国文化遗产研究院, 北京 100029

**摘要:**【目的】通过对云冈石窟石质文物表面及云冈石窟周边岩石样品中微生物的研究, 建立可用于快速检测石质文物中微生物的方法。【方法】选取云冈石窟石质样品和云冈石窟周边岩石样品作为研究对象, 应用 PCR-DGGE 技术对样品中的微生物群落结构进行了分析研究。【结果】根据系统发育树聚类分析, 可以得出云冈石窟中检测出的微生物主要分为四大类群:  $\gamma$ -变形菌纲、鞘脂杆菌门、 $\alpha$ -变形菌纲和放线菌纲; 根据 GenBank 数据库中的序列比对结果, 可以知道云冈石窟周边类似岩石样品中的微生物主要属于  $\gamma$ -变形菌纲、厚壁菌门和  $\alpha$ -变形菌纲等。【结论】本实验成功检测出云冈石窟石质样品表面及云冈石窟周边岩石样品中的微生物类群, 为云冈石窟的保护工作提供了有力依据, 同时也证明了 DEEG 和分子克隆技术相结合的方法是检测石质文物中微生物群落结构的一种可操作性强、快速、准确的检测手段。

**关键词:** 石质文物, 微生物群落, 16S rRNA, DGGE

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 05-0629-08

云冈石窟位于山西省大同市西郊武州山南麓, 石窟依山开凿, 东西绵延 1 km, 因地势较高, 东南面又有山岭阻挡海洋气流, 故较邻近的华北平原气温低, 降水少, 昼夜温差较大。石窟长期暴露在自然界中, 受到多重因素的腐蚀与损坏。除去物理、化学因素对文物的影响, 生物尤其是微生物的腐蚀也是造成文物损坏的一个重要因素<sup>[1]</sup>。从微观上的石面裂化矿物、腐生矿物和晶体沉积, 到宏观上的一些石面的片状剥落、裂开和粉化等, 微生物污染和腐蚀不仅破坏了文物的外观和结构, 也对古建筑、石刻和纪念碑表面的雕刻、文字和画作等对人类文明具有重要意义。人们早已发现在古旧

石质建筑上附生着大量微生物, 尤其是大理石或石灰石表层有许多喜钙微生物, 它们是侵蚀大理石等石材的主要祸害之一<sup>[2]</sup>。例如, 在某些气候条件下凹坑地衣会造成大理石崩解; 异养菌能够从石灰石中溶解钙, 其中丝状真菌溶解矿物的能力特别强; 硝化细菌可以分泌硝酸并改变钙联结材料的化学组成; 硫杆菌能够产生硫酸并腐蚀其所寄居的石材等。由此可见, 我们对云冈石窟的保护迫在眉睫。为了更有针对性地保护石窟, 我们必须先要对石窟中石质文物中的微生物类群进行深入了解, 在此基础上制定合适的方案有效的保护石质文物。

传统的微生物研究方法, 如显微镜观察微生物

基金项目: 国家科技支撑计划 (2009BAK53B01)

\* 通信作者: Tel: +86-22-23505961; Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn; panjiaonk@nankai.edu.cn

作者简介: 颜菲 (1986-), 女, 河北省唐山市人, 硕士研究生, 主要从事微生物学的研究。E-mail: yanfeiaggie@mail.nankai.edu.cn

收稿日期: 2011-12-26; 修回日期: 2012-03-19

形态、微生物计数、纯种分离纯化和生理生化反应存在很大的缺陷<sup>[3]</sup>。研究证明,可分离培养土壤微生物种类仅占土壤微生物种类总数的 0.1% - 1%<sup>[4]</sup>,若以这极少部分的微生物来代表环境中复杂的微生物群体将导致极大的误差。因此,传统的微生物培养和鉴定方法不足以反映微生物环境中的真实情况,需要其他技术来补充。

由于分子生物学技术可以通过直接从环境样品中提取微生物 DNA 或直接在原位对微生物进行研究,而不需要对微生物进行分离培养,因而能够动态研究微生物群落的多样性,能够真实地反映微生物的存在状态,因此,近年来越来越多的研究者开始应用分子生物学技术对环境微生物进行研究<sup>[5-6]</sup>。目前,基于 16S rRNA 基因的分子微生态学技术对传统的培养方法给予了很大的补充<sup>[7-8]</sup>。这些技术可以把微生物群落定性和定量化,还可以为微生物种属发育关系提供科学的分类依据。

变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) 是近几年应用比较广泛的分子技术之一。1979 年 Fischer 和 Lerman 首先提出了 DGGE 技术<sup>[9]</sup>,最初用于医学上基因点突变的检测。自 1993 年 Muzer 等<sup>[10]</sup>把 DGGE 技术引入微

生物生态学领域以来,它已成为一种研究微生物多样性和种群差异的重要工具,能够弥补传统微生物研究方法的不足。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

土壤样品总 DNA 提取试剂盒 (天津原平皓生物技术有限公司),DNA Gel Extraction Kit (OMEGA 公司),Poly-Gel DNA Extraction Kit (OMEGA 公司),引物由北京六合华大有限公司合成,PCR 试剂均购自宝生物有限公司,PCR 仪为美国 BIO-RAD 公司 (原 MJ Research 公司) PTC220 型 PCR 仪,凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel-Doc XR 凝胶成像系统。

### 1.2 样品的采集

本研究以云冈石窟 38 号窟和云冈石窟周边类似岩石为研究重点。石质样品由中国文化遗产研究院的工作人员定点采集,样本采集后立即置于 4℃ 冰盒保存。将从 38 号窟不同位置采集的样品编号为 1-4 (表 1)。从云冈石窟周边类似岩石样品,钻孔取样,样品截断,标记为 Y 外 (1.2 cm),Y 中 (1.5 cm),Y 内 (2 cm),进行微生物检测。

表 1 云冈石窟取样表

Table 1 Sampling table of Yungang Grottoes

Sample number	Sampling location	Sampling environment	Sampling method
1	North wall in 38 grotto	Black mudstone	Scraping
2	North wall in 38 grotto	Rotten sandstone	Scraping
3	North wall in 38 grotto	Dust full	Scraping
4	North wall in 38 grotto	Greenblack power	Scraping

### 1.3 样品总 DNA 的提取

选用天津原平皓生物技术有限公司的土壤样品总 DNA 提取试剂盒,对石质样品进行前处理并提取每份样品的总 DNA。分别取 250 mg 样品进行提取,总 DNA 溶于 50 μL 洗脱溶液中。

### 1.4 细菌 16S rRNA 保守区的扩增

以 38 号窟的 1、2、3、4 号样品的总 DNA 为模板,以 341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 907r (5'-CCCGTCAATTCATTTGAGTTT-3') 为首引物<sup>[11]</sup>,进行 PCR,PCR 反应条件 (touchdown PCR) 为 95℃ 5 min,16 × (95℃ 1 min,63℃ 降至 55℃,每循环降 0.5℃,72℃ 1 min),14 × (95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min),72℃ 10 min。再以首轮

PCR 反应的产物为模板,以 341fGC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 为引物,进行巢氏 PCR,PCR 反应条件 (touchdown PCR) 为 95℃ 5 min,16 × (95℃ 1 min,63℃ 降至 55℃,每循环降 0.5℃,72℃ 1 min),14 × (95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min),72℃ 10 min。

以云冈石窟周边岩石 Y 外、Y 中和 Y 内样品总 DNA 为模板,采用通用引物 GC-338F (CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGGCGCGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) 为引物进行 PCR,PCR 反应条

件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;最终 72 °C 延伸 10 min。将得到的 PCR 产物均采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 进行纯化回收。

### 1.5 PCR 产物的 DGGE 分析

每个样品各取 PCR 产物 20 μL 进行变性梯度凝胶电泳,参考 Muyzer 和 Q. Y. Yan 的方法,根据本研究实际情况,进行了预实验以摸索适合本实验的最佳电泳条件,最后确定电泳条件是:聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 6%,变性剂的梯度范围为 40% - 70%,电压为 160 v,温度为 60°C,电泳时间 200 min。电泳完毕后,将胶于含有 EB 的 1 × TAE 缓冲液中染色,将染色后的凝胶用凝胶影像分析系统分析,观察每个样品的电泳条带并拍摄。

### 1.6 DGGE 条带的序列分析及系统发育树的构建

用灭菌手术刀切下待回收 DGGE 条带,采用 OMEGA 公司 Poly-Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带,分别以其作为模板再进行一轮 PCR 扩增,将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后,连接到 pEASY-T 载体上,并转化至 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,由北京六合华大有限责任公司对插入的细菌 16S rRNA 片段进行序列测定<sup>[12]</sup>。实验过程中,每一条 DGGE 条带都做了 TA 克隆,并且随机挑取 3 个克隆进行测序,3 个克隆序列一致的认为是该序列代表的 DGGE 条带。

将测得的序列在 GenBank 数据库资料上进行比对,以其中同源性最高的序列确定为参照菌株,相似性 ≥97% 的序列视为同一序列型(sequence type)<sup>[13]</sup>,经 ClustalX 软件处理,剪齐序列头尾,输出分析结果的 Aln 文件。将文件转换为 MEGA 格式,并使用 MEGA4.0 软件,以邻接法(neighbor-joining, NJ),自展(bootstrap)重复次数 1000 次构建系统发育树,有许多 Model 供选择,默认为 Kimura 2-parameter。

### 1.7 DGGE 图谱分析

观察各样品的 PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱结果,采用 Quantity One 分析软件(Bio-Rad)对各样品条带的灰度进行分析,获得各条带细菌在细菌群落中所占比例。

## 2 结果

### 2.1 样品总 DNA 的提取

选用天津原平皓生物技术有限公司的土壤样品总 DNA 提取试剂盒,提取每份样品的总 DNA,将总 DNA 溶于 TE 后取 10 μL 用于电泳检测,结果因样品量少,样品的总 DNA 没有电泳带。

### 2.2 16S rRNA 保守区的扩增

云冈石窟 38 号窟样品 1、2、3、4 号首轮 PCR 产物为 600 bp 的特异性条带,大小与预期结果相符。以 1、2、3、4 号首轮 PCR 产物进行巢式 PCR,结果获得 150 bp 的特异产物,与预期结果相符。这些产物可用于后续的 DGGE 分析。

以云冈石窟周边类似岩石样品 Y 外、Y 中和 Y 内为模板扩增到 200 bp 的 DNA 片段可用于 DGGE 分析。

### 2.3 各样品的 PCR 产物的 DGGE 图谱分析

将云冈 38 号窟 1、2、3、4 号样品的细菌 16S rRNA 的巢氏 PCR 产物进行 DGGE 凝胶电泳分析,结果如图 1 所示。云冈石窟周围类似岩石样品的细菌种群的 16S rRNA PCR 产物的 DGGE 分析结果如

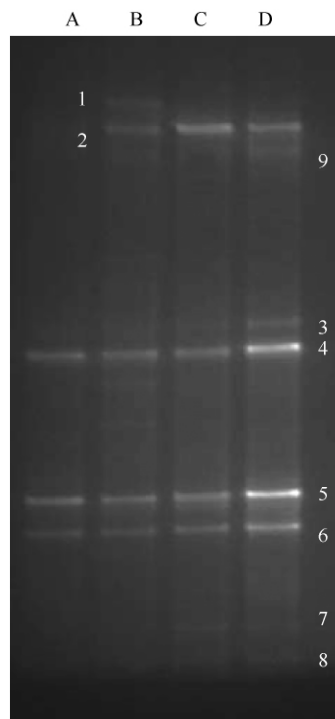


图 1 38 号窟不同样品的细菌的 DGGE 指纹图谱

Fig. 1 Bacterial DGGE profile of different samples in No. 38 Grottoe. A, B, C and D are representative for the four samples in 38 Grottoe, and 1-9 are representative for the nine bands isolated from the samples in 38 Grottoe.

图 2 所示。不同的条带表示该样品中不同细菌的 16S rRNA 的保守区,每个样品可分离得到数目不等、位置不同的条带。图 1 中有 9 条条带比较明显,图 2 中有 24 条条带较明显,将这些条带为优势条带,将其回收后测序。图 1、图 2 中数字标注的 DNA 条带为优势条带。图中位置一致的 DNA 带,可以被认为是同一种微生物的特征 16S rRNA 序列。

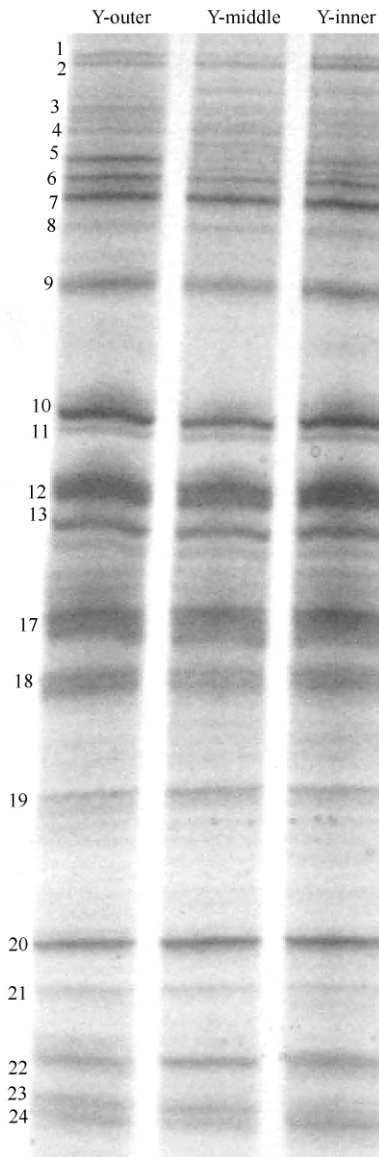


图 2 云岗石窟周边不同样品的细菌的 DGGE 指纹图谱  
Fig. 2 Bacterial DGGE profile of different samples near Yungang Grottoes. 1 - 24 are representative for the twenty-four bands isolated from the samples near Yungang Grottoes.

#### 2.4 DGGE 凝胶优势条带回收测序及序列分析

将云岗石窟 38 号窟样品的 PCR-DGGE 图谱中的 9 条优势条带和云岗石窟周边岩石样品的 PCR-

DGGE 图谱中的 24 条优势条带切胶回收,对这 33 条条带进行测序。测序结果递交 GenBank 数据库(表 2 和表 3),并与 GenBank 中的序列进行比对。

结果发现,云岗石窟 38 号窟样品中含有假单胞菌属、微杆菌属及其他未培养微生物,根据系统发育树聚类分析,可以得出检测出的微生物主要分为四大类群: $\gamma$ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria),鞘脂杆菌门(Sphingobacteria), $\alpha$ -变形菌纲(Alpha-proteobacter)和放线菌纲(Actinobacteria)。而 $\alpha$ -变形菌纲和 $\gamma$ -变形菌纲均具有广泛多样的代谢能力,其中不乏硝化杆菌属、红假单胞菌属、根瘤菌属等已知对石质材料有明确侵蚀能力的微生物,如表 2 和图 3 所示。与云岗石窟周边岩石样品同源性最高的序列也多为未培养微生物,分属于 Gamma-proteobacteria, Firmicutes 和 Alpha-proteobacteria(表 3)。在 Y-外样品中,第 5、9、12、17、19 号条带,代表的 *Lactobacillus* 在种群中所占比例最多,总共为 23.7%。第 7、11、20 号条带,代表的 Uncultured Firmicutes bacterium clone 在种群中所占比例次之,总 12.7%。第 10 号条带,代表 *Anaerobiospirillum* 在种群中所占比例也较多,为 6.36%。在 Y-中样品中,第 9、12、17、19 号条带,代表的 *Lactobacillus* 在种群中所占比例最多,总共为 21.36%。第 7、11、20 号条带,代表的 Uncultured Firmicutes bacterium clone 在种群中所占比例次之,总共为 14.39%。第 10 号条带,代表 *Anaerobiospirillum* 在种群中所占比例也较多,为 6.37%。

### 3 讨论

云岗石窟历史悠久,规模宏大,内容丰富,品位高雅,尤以高超技艺和独特风格在我国雕塑艺术史上占有重要一页。但是千余年来这座举世闻名的艺术宝库却受到严重的破坏,除去物理、化学因素影响外,微生物腐蚀也是造成文物损坏的一个重要因素。不经微生物分离培养,直接从土壤中抽提总 DNA,分析其中 16S rRNA 的序列多态性,以此反映微生物的种群构成,是近年来逐步发展起来的新方法。该方法对于研究云岗石窟石质样品中微生物群落组成具有重要的理论和现实意义<sup>[14]</sup>。

利用 DGGE 分离 16S rRNA 的 PCR 产物,从梯度凝胶 DNA 条带的数量、条带中 DNA 浓度及条带的分布来分析石质样品中细菌的群落特征,是一种

快速研究石质样品中微生物群落的方法<sup>[15]</sup>。本文通过应用 DGGE 技术,分析了云冈石窟 38 号窟及云冈石窟周边类似岩石样品中的细菌群落组成,从不

同样品的 DGGE 图谱可以看出,每个样品均可以分离得到数目不等、位置各异的条带,表明每个样品中都存在不同的微生物类群。

表 2 38 号窟样品 DGGE 切胶条带的序列比对结果及其在种群中所占的比例

Table 2 Sequence alignment results and the proportional in population of DGGE sequenced clone of the samples in No. 38 Grottoe

Band	GenBank accession number	Closest organism	Similarity /%	Proportion /%
1	JQ180225	Uncultured bacterium (FJ753412.1)	90	5.36
2	JQ180226	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. (FJ868262.1)	98	6.76
3	JQ180227	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. (AM711886.1)	94	9.43
4	JQ180228	Soil bacterium (EU515384.1)	90	25.2
5	JQ180229	Uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium (GQ351484.1)	83	30.28
6	JQ180230	Uncultured bacterium (GU564130.1)	85	17.92
7	JQ180231	Uncultured bacterium (HM326366.1)	93	3.08
8	JQ180232	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp. (GQ365756.1)	97	1.04
9	JQ180233	Uncultured bacterium (GQ153955.1)	94	0.93

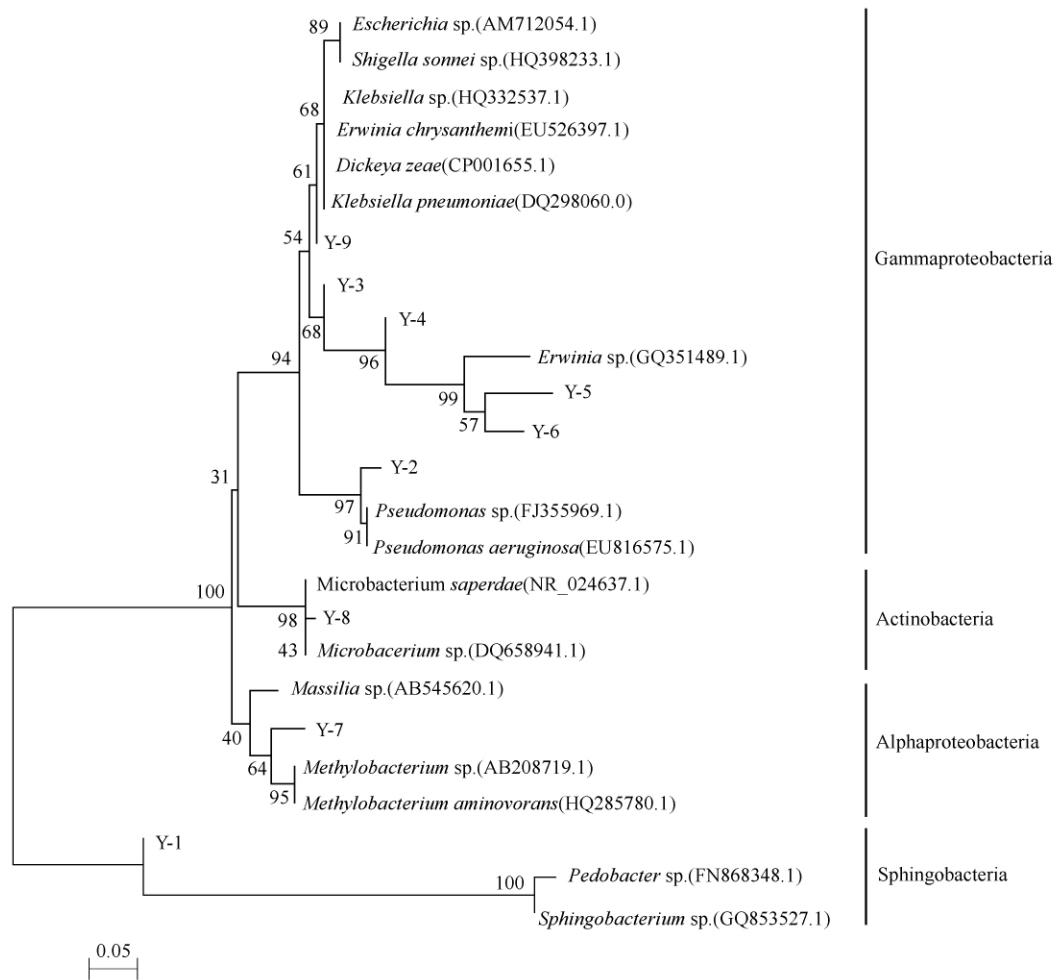


图 3 38 号窟样品 DGGE 切胶条带的系统发育树. 序列的 GenBank 登录号列于括号中,标尺长度为 5% 的核苷酸置换率

Fig. 3 Phylogenetic tree of sequences from DGGE bands of samples in No. 38 Grottoe. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The scale bar: 5% sequence divergence.

表3 云冈石窟周围样品 DGGE 切胶条带序列比对结果及其在种群中所占的比例

Table 3 Sequence alignment results and the proportional in population of DGGE sequenced clone of the samples near Yungang Grottoes

Band	GenBank accession number	Closest genera	Proportion%			
			Similarity%	Y-outer	Y-middle	Y-inner
2	JQ248030	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (JF915343)	98	3.58	2.78	3.49
4	JQ248031	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> (FJ944696)	99	3.65	3.48	2.88
5	JQ248032	<i>Lactobacillus sp.</i> ( AB559567)	100	4.74		
6	JQ248033	<i>Acinetobacter sp.</i> ( JN000337)	98	5.14	4.29	4.74
7	JQ248034	Uncultured Firmicutes bacterium clone(GU959162)	100	4.97	5.99	4.85
9	JQ248035	<i>Lactobacillus murinus</i> (HQ668465)	100	4.30	4.28	4.43
10	JQ248036	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> (EU863654)	97	6.36	6.24	6.24
11	JQ248037	Uncultured Firmicutes bacterium clone(GU958887)	99	3.65	3.55	3.76
12	JQ248038	<i>Lactobacillus johnsonii</i> (HQ828141)	98	6.22	6.89	6.40
17	JQ248039	<i>Lactobacillus reuteri</i> (CP002844)	99	5.76	6.37	3.65
19	JQ248040	<i>Lactobacillus murinus</i> (HQ668465)	98	2.68	3.82	5.23
20	JQ248041	Uncultured Firmicutes bacterium clone(GU956121)	97	4.08	4.85	4.62
21	JQ248042	Uncultured Sphingomonadales bacterium(JF733117)	99	2.18	2.52	3.13
22	JQ248043	<i>Anaerobiospirillum sp.</i> ( EU863654)	95	3.37	3.46	4.62
23	JQ248044	<i>Pseudomonas putida</i> (CP002870)	99	2.93	3.63	2.26
		No sequence		36.39	38.66	39.70

No sequence is representative for the sequences that don't have homology with the known sequences in GenBank.

研究中发现,云冈石窟 38 号窟样品中的假单胞菌属细菌 (*Pseudomonas*) 占到种群的 16.19%。假单胞菌为革兰氏阴性无芽孢杆菌,目前已确认的有 29 种,常见代表种有铜绿假单胞菌(绿脓杆菌)、荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌等。在微生物与岩石土壤作用的相关研究中,发现该属细菌有较强的解磷作用,即将植物等难以利用的含磷成分转变为可以利用的磷盐形式,特别是以溶解不溶性磷酸盐类为特征的无机解磷作用。此外,该属的部分种类在 N 元素循环中也扮演着重要角色,如斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas geniculata*) 等的部分菌株具有联合固氮作用,即可将空气中的游离氮气以  $\text{NH}_3$  形式固定下来。固定下来的  $\text{NH}_3$  在其它亚硝化、硝化微生物作用下可氧化生成硝酸、亚硝酸,对岩石等材料造成腐蚀。调查研究发现,云冈石窟的周边环境中含有高浓度的含磷、硫、氨的大气污染物质,该属的细菌可将这些物质降解并进一步产生酸性物质,云冈石窟的石质文物主要是由砂岩构成,砂岩的胶结物中含有大量的  $\text{CaCO}_3$ ,这些酸性物质会对云冈石窟的石质文物及周边岩石造成腐蚀。研究中还发现 38 号窟石质样品表面的微杆菌属占到种群的 1.04%,微杆菌隶属于放线菌门,革兰氏阳性。到目前为止有关该类菌与土壤岩石相互作用方面的相关研究还比较少,但在煤矿、黄铁矿

等污染处理中,发现该属部分细菌具有良好的脱硫能力,虽目前的研究显示其脱硫能力主要是针对含硫杂环类有机物,但不可排除其它种可能具有无机硫代谢能力而会对云冈石窟石质文物造成破坏。其他 38 号窟样品中检测出的微生物主要为非培养微生物,相关序列同源度较低,难以进行准确的种属鉴定。但就其所属门类而言,Alpha-proteobacteria 及 Gamma-proteobacteria 均具有广泛多样的代谢能力,其中不乏硝化杆菌属、红假单胞菌属、根瘤菌属等已知对石质材料有明确侵蚀能力的微生物。西班牙研究人员在对阿尔塔米拉山洞中旧石器时代晚期彩色岩画的研究中也发现,Alpha-proteobacteria、Gamma-proteobacteria 和 *Pseudomonas* 在彩色岩画样品中的微生物种群中所占的比例也较高,另外在彩色岩画样品的微生物种群中还存在酸杆菌门 (Acidobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的细菌<sup>[16]</sup>。

在云冈石窟周边类似岩石样品中主要含有以下几个种属的微生物:(1) 乳杆菌属 (*Lactobacillus*): 革兰氏染色阳性、无芽孢杆菌,分解糖的主要终产物是乳酸;(2) 厚壁菌门 (Firmicutes): 多数为革兰氏阳性。很多厚壁菌可以产生内生孢子,它可以抵抗脱水和极端环境,轻度嗜盐碱;(3) 不动杆菌属 (*Acinetobacter*): 不动杆菌广泛分布于外界环境中,主要存在于水体和土壤中,可降解自然环境中的污

染物;(4)厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*):其模式种为产琥珀酸螺菌,发酵碳水化合物主要产生乙酸和琥珀酸,也可能产生少量的乳酸和甲酸;(5)假单胞菌属(*Pseudomonas*):少数为固氮菌,具有耐盐、耐碱、兼性厌氧、不运动等特性。这些微生物多属于异养型微生物,异养型微生物可以利用石质文物中的有机材质作为自身生长繁殖的碳源和氮源,同时会产生有机酸和无机酸等物质,它们直接与石材中的组分发生反应(如螯合或酸化),这样长期作用后使石质文物易于酥碱分化、变色甚至褪色,这是石质文物腐蚀风化的重要原因之一<sup>[17]</sup>。此外还存在一些可以生存在极端环境的微生物,及可以降解环境污染物的微生物,这与云冈石窟的自然环境相关。

由此可见,微生物对石质的文物有极大的危害,这些巨大的危害性甚至超过水、光、气、有害元素等因素对文物的危害。微生物腐蚀研究还有很大的潜力,随着研究的深入,人们会发现微生物对文物的腐蚀程度大大高于人们现在对它们的想象程度,抑制微生物的腐蚀将成为今后文物保护工作的重中之重<sup>[18]</sup>。现今国际上用于防止微生物腐蚀石质文物的方法有很多,比较常用的是清洗法、使用防腐防霉杀菌剂和应用加固封护剂等方法。清洗法一般可以有效清除微生物,但不应该产生任何危及将来再处理的物质,更重要的是不能引起任何严重划痕、裂隙及其他损伤石质文物的后果。但是清洗之后并不能完全解决问题,因为残留在石质文物中的微生物仍可以继续生长,因此需要研制出适合于特定环境的防腐防霉杀菌剂。这类杀菌剂应该不仅可以杀灭石质文物上生长的菌类微生物,还应可以预防新的菌类微生物再生,这就达到了以防为主、防治结合的文物保护基本原则。此外还可以在石质文物表面使用化学防护或化学加固材料进行化学保护,以减轻或阻止其毁损。现代有机聚合物因具有较好的粘结性、防水性和抗酸性而被广泛的应用于石质文物的保护和加固。在一般情况下微生物是石质文物的破坏因素,但在某些特殊情况下微生物也有缓解其他因素腐蚀石质文物的作用,例如草酸钙膜的防酸雨作用等。研究微生物腐蚀石质文物的机理,对于我们控制微生物生长,保护石质文物和古迹具有十分重要的作用;另外,也告诫我们在开发使用新型维修防护材料时都应该考虑材料本身带来或引起的生物破坏问题<sup>[17]</sup>。

致谢 感谢武汉大学测试中心童华教授课题组提供的钻孔取样样品,感谢南开大学宋存江教授、马挺副教授和李国强副教授在 DGGE 技术上提供的指导与帮助。

## 参考文献

- [1] 张秉坚,陈劲松. 石材的腐蚀机理和破坏因素. 石材 (*Stone*), 1999, (11): 14-17.
- [2] Bock E, Sand W. The microbiology of masonry biodeterioration. *J Appl Bacteriol*, 1993, 74: 503-504.
- [3] Th. Warscheid J. Braams Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46(4): 343-368.
- [4] Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 369-394.
- [5] Steele HL, Streit WR. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 247(2): 105-111.
- [6] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, 68(4): 669-685.
- [7] 郑雪松,杨虹,李道棠,韩文卿. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*) 2003, 9(6): 678-684.
- [8] Felske A, Wolterink A, Van Lis R, Akkermans AD. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3): 871-879.
- [9] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141.
- [10] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [11] Huang X, Tian Y, Luo YR, Liu HJ, Zheng W, Zheng TL. Modified sublimation to isolate phenanthrene-degrading bacteria of the genera *Sphingomonas* and *Burkholderia* from Xiamen oil port. *Marine Pollution Bulletin* 2008, 57(6-12): 538-543.

- [12] Sun HY, Deng SP, Raun WR. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10) :5868-5874.
- [13] 周峻沛, 邹长松, 顾英琦, 莫明和. 16S rDNA-RFLP 方法分析抑菌土中的细菌多样性. 云南大学学报(自然科学版) [ *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)* ] 2007, 29 (4) :424-429.
- [14] 刘慧杰, 杨彩云, 田蕴等. 基于 PCR-DGGE 技术的红树林区微生物群落结构. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2010, 50(7) :923-930.
- [15] 王岳坤, 洪蔡. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2005, 45(2) :201-204.
- [16] M. Carmen Portillo, Juan M. Gonzalez. Comparing bacterial community fingerprints from white colonizations in Altamira Cave (Spain). *World J Microbiol Biotechnol* 2009, 25:1347-1352.
- [17] 张秉坚. 石质文物微生物腐蚀机理研究. 文物保护与考古科学 (*Sciences of Conservation and Archaeology*), 2001, 13(2) :15-20.
- [18] 许飞. 文物保护技术新世纪展望. 东南文化 (*Southeast Culture*) 2002, 159(2) :93-96.

## Analysis of microbial community on the surface of the historic stone and nearby rock samples in Yungang Grottoes

Fei Yan<sup>1</sup>, Qinya Ge<sup>2</sup>, Qiang Li<sup>1</sup>, Miao Yu<sup>1</sup>, Xudong Zhu<sup>1\*</sup>, Jiao pan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Key Subject of Microbiology, Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

<sup>2</sup> Chinese Academy of Cultural Heritage, Chaoyang District, Beijing 100029, China

**Abstract:** [Objective] In order to study the microorganisms on the surface of the ancient stones in Yungang Grottoes and nearby rock samples, a rapid microbial detection assay was designed. [Methods] The microbial community composition from the rock samples of the Yungang Grottoes and nearby was analyzed by PCR-DGGE. [Results] According to the phylogenetic analysis, the microbes from the rock samples of Yungang Grottoes were divided into four groups: Gamma-proteobacteria, Sphingobacteria, Alpha-proteobacter and Actinobacteria. By aligning the sequencing results in GenBank, Gamma-proteobacteria, Firmicutes and Alpha-proteobacter were found in the rock samples near Yungang Grottoes. [Conclusion] Our research successfully detected the microbial community composition on the surface of the rock samples in and near the Yungang Grottoes, which brought us significant theoretical basis for the future protection of the Yungang Grottoes. We also proved that the combination of DGGE and molecular cloning was a useful, rapid and accurate method for detecting the microbial community composition on stone relics.

**Keywords:** historic stone, microbial community, 16S rRNA, DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Science & Technology Pillar Program (2009BAK53B01)

\* Corresponding author. Tel: +86-22-23505961; Fax: +86-22-23506510; E-mail: xudong82@nankai.edu.cn; panjiaonk@nankai.edu.cn

Received: 26 December 2011 / Revised: 19 March 2012