

文章编号: 1005 - 1538(2016)03 - 0025 - 05

生物酶对跨湖桥遗址丝状真菌抑菌作用的研究

吴 健, 楼 卫

(萧山跨湖桥遗址博物馆, 浙江杭州 311202)

摘要: 确定萧山跨湖桥遗址空气、土壤、字幕墙和独木舟侵蚀丝状真菌的种类,探讨生物酶对侵蚀丝状真菌的有效抑菌浓度,为消除生物危害提供参考依据。采用经典方法对侵蚀丝状真菌进行分离、鉴定,并对生物酶的有效抑菌浓度进行研究。空气中主要的丝状真菌有:黑曲霉(*Aspergillus niger*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、展青霉(*Penicillium patulum*)和圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)。土壤中主导菌为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)、圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)、展青霉(*Penicillium patulum*)、黑青霉(*Penicillium nigricans*)、宛氏拟青霉(*Paecilomyces varioti*)和枝孢霉(*Cladosporium*)。字幕墙侵染菌为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。独木舟侵蚀菌为宛氏拟青霉(*Paecilomyces varioti*)。不同的丝状真菌对生物酶的感应性/耐受性有很大不同。单一的几丁质酶对丝状真菌的生长发育有抑制作用,但几丁质酶和葡聚糖酶的复合协同作用更能有效地抑制丝状真菌的生长发育。

关键词: 跨湖桥;丝状真菌鉴定;生物酶;抑菌作用

中图分类号: Q93 - 3 **文献标识码:** A

0 引 言

萧山跨湖桥遗址地处浙江省杭州市,位于钱塘江南岸萧山区湘湖景区,距今 7000 ~ 8000 年,为我国长江流域最早的新石器时代遗址之一,文化内涵十分丰富。由于遗址展示厅位于湘湖(为萧山区的备用水源)水下 6 ~ 8m,常年处于高湿度环境(相对湿度在 70% ~ 100%),加之遗址土壤中含海洋无机盐和动植物遗存的有机质非常丰富,致使遗址微生物危害十分严重,考虑到遗址环境的特殊性,摒弃了合成抑菌剂,选用生物酶进行试验,探索适合土遗址的安全有效的微生物防治途径,展望了生物酶在文物保护中的应用前景,为我国南方潮湿地区土木结构遗址的可持续性保护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1) 生物酶:是一种无毒、对环境友好的生物催化剂,其化学本质为蛋白质。目前酶处理工艺已被公认为是一种符合环保要求的绿色生产工艺,它不仅有抑菌作用,又因无毒无害,用量少,而有利于生态环境的保护。因此,经过遴选确定几丁质酶作为

试验材料。

几丁质酶(Chitinase, from *Strepto - myces gri-seus*)518units/g;葡聚糖酶(Dextranase, from *Penicillium* sp.)25.3μ/mg。西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司生产。

2) 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[1]:马铃薯 200g;葡萄糖 20g;琼脂 15g;蒸馏水 1L;pH 6.0。

1.2 试验设备

1) 撞击式空气微生物采样器,JWL - 6 型,六级;

2) 电热恒温水浴槽,DK - S 25(室温 ~ 95℃);

3) 生物安全柜,Hfsafe - 1200;

4) 生化培养箱,LRH - 250A,15 ~ 40℃ ± 1℃;

5) 生物显微镜,Olympus BX41T,F1000 ×。

1.3 试验方法

1.3.1 采样及样本处理

1) 空气采样:采用仪器法(撞击式空气微生物采样器),采样高度距离地面 1.0 ~ 1.2m。采集的培养基平板运送到实验室后,直接放入 28℃ 培养箱中培养 48 ~ 96h 后分离、鉴定。

2) 土壤采样:用无菌金属小勺采集表层土壤

3~5g装入无菌玻璃试管中。

3) 独木舟采样:用无菌金属小勺刮取少许独木舟软腐木,装入无菌玻璃试管中。

采集的土壤样本和软腐木样本运送到实验室后在无菌条件下分别称取 1g 放入装有 99mL 灭菌生理盐水并带玻璃珠的三角烧瓶中,振荡 30min,静置后,取 1mL 并注入 9mL 灭菌生理盐水,振摇试管,混合均匀,并做 10 倍递增稀释。分别取不同稀释度的样品液 0.1mL 于 PDA 平板,用无菌玻璃三角刮棒涂布于培养基表面,培养方式同 1.3.1.1。

4) 字幕墙采样:用 10cm×10cm 灭菌板置于字幕墙处,用浸有灭菌生理盐水采样液的棉拭子 1 支,在灭菌板内横竖来回涂抹,并随之转动棉拭子,剪去手接触部分,将棉拭子放入装有 10mL 采样液的试管中待运送到实验室后在无菌条件下取 1mL 并注入 9mL 灭菌生理盐水,振摇试管,混合均匀,后面操作同 1.3.1.3。

1.3.2 丝状真菌的分离、鉴定

培养基平板菌落长成后,选择不同菌落进行分离、纯化。采用点植法和载玻片培养法,根据菌落生长速度、菌落和培养基颜色变化、表面质地、渗出物等,并结合显微镜下观察的菌丝形状、孢子梗特征、孢子着生方式和孢子形态等,对分离、纯化的菌株作进一步的分类、鉴定^[2-3]。

1.3.3 抑菌试验

1) 孢子悬液的制备

将供试菌株接种在 PDA 斜面上,置于 28℃ 恒温培养箱内培养 5d~7d 后,用无菌生理盐水将成熟的孢子洗下,孢子原液用无菌脱脂棉进行过滤,在孢子滤液中加入无菌玻璃珠后置摇床振荡 5min,用血球计数板计算孢子数量并调节孢子浓度在 10²~10³

个/mL,备用。

2) 生物酶处理试验

(1) 几丁质酶处理:将几丁质酶 10g 溶于 5mL 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH6),用 0.45μm 的超滤膜过滤除菌。将 15mL 培养基倾入平皿,冷却制成平板后,分别吸取 0.05mL (处理①)、0.1mL (处理②)和 0.2mL (处理③)酶液涂布于培养基上,静置片刻后将供试菌种的孢子悬液 0.1mL 涂布于 PDA 平板,28℃,培养 3~5d,观察生长情况并计数。

(2) 复合酶处理:将葡聚糖酶 2g 溶于 5mL 0.1mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH 6),用 0.45μm 的超滤膜过滤除菌。将 15mL 培养基倾入平皿,冷却制成平板后,分别吸取 0.05mL (500U)、0.1mL (1000U)和 0.2mL (2000U)酶液涂布于培养基上,随之加入几丁质酶液,加入量根据不同试验菌单一酶处理效果不明显的浓度,静置片刻后操作同上。

2 试验结果

2.1 丝状真菌的鉴定结果

丝状真菌的鉴定结果见表 1。从表 1 可见空气中主要的丝状真菌有:黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、展青霉 (*Penicillium patulum*)和圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*)。土壤中主导菌为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*)、展青霉 (*Penicillium patulum*)、黑青霉 (*Penicillium nigricans*)、宛氏拟青霉 (*Paecilomyces varioti*)和枝孢霉 (*Cladosporium*)。字幕墙侵染菌为杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)。独木舟侵蚀菌为宛氏拟青霉 (*Paecilomyces varioti*)。

表 1 不同样本丝状真菌鉴定结果

Table 1 The identification results of filamentous fungi in different samples

样本来源	分类地位	菌种名称
空气	子囊菌纲-散囊菌科	曲霉属
		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
		土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>)
		青霉属
土壤	子囊菌纲-散囊菌科	展青霉 (<i>Penicillium patulum</i>)
		圆弧青霉 (<i>Penicillium cyclopium</i>)
		曲霉属
		黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
		土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>)
		聚多曲霉 (<i>Aspergillus sydowii</i>)
		杂色曲霉 (<i>Aspergillus versicolor</i>)
		青霉属
		圆弧青霉 (<i>Penicillium cyclopium</i>)
		展青霉 (<i>Penicillium patulum</i>)
		黑青霉 (<i>Penicillium nigricans</i>)

(续表 1)

样本来源	分类地位	菌种名称	
字幕墙	半知菌纲-丛梗孢科	宛氏拟青霉属	宛氏拟青霉(<i>Paecilomyces varioti</i>)
	半知菌纲-暗色孢科	枝孢霉属	枝孢霉(<i>Cladosporium</i>)
	子囊菌纲-散囊菌科	曲霉属	杂色曲霉(<i>Aspergillus versicolor</i>)
	独木舟	半知菌纲-丛梗孢科	宛氏拟青霉(<i>Paecilomyces varioti</i>)

2.2 几丁质酶处理结果

从表 2 可以看出,不同浓度的几丁质酶对 9 种丝状真菌有不同的抑菌效果:圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)、黑青霉(*Penicillium nigricans*)对几丁质酶较为敏感,100U 酶活力即能较好地抑制菌丝的生长发育,而其它 7 种丝状真菌抑制生长的效果不明

显;当酶活力达到 200U 时枝孢霉属(*Cladosporium*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)的生长发育受到抑制,而聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)、展青霉(*Penicillium patulum*)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)和宛氏拟青霉(*Paecilomyces varioti*)的抑制效果仍然不明显。

表 2 含不同浓度几丁质酶的平板上丝状真菌的生长情况
Table 2 The growth of the filamentous fungi on the plats with different concentrations of chitinase

供试菌种	对照	50U(处理 ①)	100U(处理 ②)	200U(处理 ③)
黑曲霉	57,4 ~ 5mm	62,2 ~ 3mm	54,1mm	53,初萌发
土曲霉	236,13 ~ 14mm,菌丝长、浓密	194,11 ~ 12mm,	203,9 ~ 10mm	187,7 ~ 8mm
聚多曲霉	菌落浓密,成片,多不可计,产孢	菌落浓密,成片,多不可计	菌落浓密,多不可计	菌落较浓密,多不可计
杂色曲霉	738,3 ~ 4mm,产孢	624,3mm	584,2 ~ 3mm	575,2mm
圆弧青霉	424,4 ~ 5mm,产孢,有色素渗入培养基	409,4 ~ 5mm,产孢,有色素渗入培养基	40,4 ~ 5mm,产孢	26,4 ~ 5mm,产孢
展青霉	924,3 ~ 4mm,孢子浓密	832,3 ~ 4mm,孢子浓密	754,3 ~ 4mm,孢子较浓密	416,3 ~ 4mm,形成孢子
黑青霉	496,3mm 菌落浓密	282,3mm 菌落稀疏	124,2mm 菌落稀疏	87,2mm 刚形成菌落
宛氏拟青霉	菌落浓密,成片,多不可计,产孢	菌落浓密,成片,多不可计	菌落浓密,多不可计	菌落较浓密,多不可计
枝孢霉	656,菌落密集	632,菌落较密集	278,菌落较密集	183,菌落稀疏

2.3 复合酶处理结果

从表 3 ~ 5 可以看出,几丁质酶 + 葡聚糖酶复合酶对 9 种丝状真菌的抑菌效果比单一的几丁质

酶的抑菌效果好,尤其是当单一几丁质酶处理效果不明显时,复合酶的协同作用显示出较好的抑菌效果。

表 3 复合酶处理平板上丝状真菌的生长情况(一)
Table 3 The growth of the filamentous fungi on the plats with composite enzymes (I)

供试菌种	对照	50U 几丁质酶 + 500U 葡聚糖酶	50U 几丁质酶 + 1000U 葡聚糖酶	50U 几丁质酶 + 2000U 葡聚糖酶
圆弧青霉	424,4 ~ 5mm,产孢,有色素渗入培养基	39,4 ~ 5mm,初产孢	28,4 ~ 5mm,初产孢	25,4 ~ 5mm,初产孢
黑青霉	多不可计,菌落浓密	220,菌落稀疏	128,菌落稀疏	86,菌落稀疏

表 4 复合酶处理平板上丝状真菌的生长情况(二)
Table 4 The growth of the filamentous fungi on the plats with composite enzymes (II)

供试菌种	对照	100U 几丁质酶 + 500U 葡聚糖酶	100U 几丁质酶 + 1000U 葡聚糖酶	100U 几丁质酶 + 2000U 葡聚糖酶
黑曲霉	50,产孢明显	30,产孢明显	35,少量产孢	29,初产孢
土曲霉	124,菌落密集,产孢明显	68,菌落密集,少量产孢	6,生长期,未产孢	2,生长期,未产孢
枝孢霉	745,菌落浓密	293,菌落密集	233,菌落密集	185,菌落稀疏

表 5 复合酶处理平板上丝状真菌的生长情况(三)

Table 5 The growth of the filamentous fungi on the plats with composite enzymes (III)

供试菌种		对照	200U 几丁质酶 + 500U 葡聚糖酶	200U 几丁质酶 + 1000U 葡聚糖酶	200U 几丁质酶 + 2000U 葡聚糖酶
聚多曲霉	450, 菌落密集	42,	8,	3	
杂色曲霉	764, 菌落浓密	628, 菌落较浓密	473, 菌落较浓密	452, 菌落稀疏	
展青霉	940, 5 ~ 6mm, 孢子浓密	548, 5 ~ 6mm, 孢子浓密	443, 5 ~ 6mm, 孢子较浓密	331, 3 ~ 4mm, 孢子初形成	
宛氏拟青霉	52, 菌落棕色, 13 ~ 15mm, 孢子覆盖	66, 菌落产孢明显, 10 ~ 12mm,	56, 菌落初产孢, 4 ~ 6mm,	46, 少数菌落开始产孢, 4 ~ 6mm,	

注: C - 酶: 几丁质酶; D - 酶: 葡聚糖酶。

3 讨 论

1) 抑菌效果

几丁质酶和葡聚糖酶对丝状真菌的生长发育有抑制作用, 但不同属或同一属不同种类的丝状真菌对几丁质酶和葡聚糖酶的敏感性有很大差异, 对于生长初期的圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*) 和黑青霉 (*Penicillium nigricans*), 单一的几丁质酶 100U 即有抑制作用; 但对于同一属的展青霉效果不明显。当几丁质酶复合葡聚糖酶, 其协同作用对丝状真菌的生长发育有明显的抑制效果。黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 和枝孢霉 (*Cladosporium*) 在单一的几丁质酶 100U 处理抑制效果不明显时, 复合葡聚糖酶不同浓度, 即显示出不同程度的生长受阻; 对几丁质酶敏感性较低的聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、展青霉 (*Penicillium patulum*) 和宛氏拟青霉 (*Paecilomyces varioti*) 在复合葡聚糖酶 2000U 时, 显示出较明显的生长受限。

2) 抑菌机理

生物酶是一类具有催化功能的特殊蛋白质, 酶分子由氨基酸长链组成。其中一部分链成螺旋状, 一部分成折叠的薄片结构, 而这两部分由不折叠的氨基酸链连接起来, 而使整个酶分子成为特定的三维结构。其具有如下特性: 一是高效性。催化效率是一般无机催化剂的 $10^3 \sim 10^6$ 倍; 二是专一性。仅能促进特定化合物、特定化学键和特定化学变化; 三是低反应条件。可在较温和的常温、常压下进行; 四是易变性失活。在受到紫外线、热、射线、表面活性剂、金属盐、强酸、强碱及其它化学试剂如氧化剂、还原剂等因素影响时, 酶蛋白的二级、三级结构有所改变。这些特性说明酶作为一种催化剂, 不但能提高化学反应的速率, 而且使用方便、安全有效。

几丁质 (Chitin) 又称甲壳素、甲壳质, 是由 N - 乙酰氨基葡萄糖以 $\beta - 1, 4$ - 糖苷键聚合而成的直链

大分子, 广泛存在于大多数丝状真菌细胞壁中, 并在细胞壁生长中起着重要作用^[4]。几丁质酶 (chitinase, EC3. 2. 1. 14) 是分解几丁质的一类蛋白质。多数丝状真菌具有丰满的营养性菌丝体, 并以菌丝顶端延长和分枝生长方式向四周生长形成菌落, 菌丝顶端部位为生长点延伸区, 其细胞壁内层是几丁质, 外层为蛋白质; 在亚顶端部位成熟区, 其细胞壁内层结构与延伸区基本相同为几丁质, 而外层为葡聚糖蛋白交织网层。当顶端生长受到几丁质酶的影响, 细胞壁结构被破坏, 导致菌丝生长受阻。当受到几丁质酶和葡聚糖酶的影响形成的叠加效应共同作用于菌丝生长点的延伸区和成熟区, 使细胞壁破裂, 从而抑制菌丝的生长和分枝。

4 结 论

字幕墙的霉斑主要是由杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) 引起, 可采用 200U 几丁质酶 + 2000U 葡聚糖酶涂抹去除。独木舟软腐处主要存在宛氏拟青霉 (*Paecilomyces varioti*), 可用 200U 几丁质酶 + 1000U 葡聚糖酶点涂渗入以控制其生长。土壤中主导菌为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*)、聚多曲霉 (*Aspergillus sydowii*)、杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*) 等, 必要时可采用 200U 几丁质酶 + 2000U 葡聚糖酶喷洒。鉴于跨湖桥遗址侵蚀微生物主要是丝状真菌, 考虑到遗址水环境的特殊性, 采用几丁质酶和葡聚糖酶等生物酶抗菌剂, 有利于跨湖桥水环境的安全及人身健康, 符合当今可持续性发展的理念。

参考文献:

[1] 周宇光. 菌种目录 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 230.
ZHOU Yu - guang. Strain list [M]. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 1997: 230.
[2] 戴芳澜. 真菌的形态和分类 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 75 - 155, 297 - 306.
DAI Fang - lan. Fungal morphology and classification [M]. Bei-

jing; Science Press, 1987:75 – 155,297 – 306.

[3] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979: 129 – 135,487 – 642.

WEI Jing – chao. Identification of the fungi handbook[M]. Shang-

hai; Shanghai Science and Technology Press, 1979:129 – 135, 487 – 642.

[4] Rinaudo M. Chiten and chitosan; properties and applications[J]. Prog Polym Sci, 2006,(31):603 – 632.

Study of biological enzymes’ inhibition of filamentous fungi on the Crosslake Bridge ruins

WU Jian, LOU Wei

(Museum of Crosslake Bridge ruins, Hangzhou 311202,China)

Abstract: Experiments were done to exam the inhibitory effect of enzymes on erosive filamentous fungi in the soil, word walls and canoes at the Crosslake Bridge ruins in Xiaoshan. Classical methods were used to separate and identify the fungi, and the suitable concentrations of anti – fungal reagents were investigated. *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium patulum* and *Penicillium cyclopium* were found in the air. *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowii*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium patulum*, *Penicillium nigricans*, *Paecilomyces varioti* and *Cladosporium* were found in the soil. *Aspergillus versicolor* was found on the wordwall, and *Cladosporium* on the canoe. The different filamentous fungi have different reactions and tolerances to the enzyme reagents. Chitinase can inhibit only the growth and development of filamentous fungi, while the composite synergies of chitinase and glucanase resulted in more effective inhibition.

Key words: Crosslake Bridge; Identification of filamentous fungi; Enzyme; Inhibitory effect

(责任编辑 谢 燕)

· 通 讯 ·

“加固与交流——文化遗产的加固材料与方法:跨学科对话”
国际研讨会会议通知

为庆祝文化遗产保护研究项目成立 30 周年,德国希尔德斯海姆应用科学与艺术大学(University of Applied Sciences and Arts in Hildesheim, Germany)将于 2018 年 1 月举办“加固与交流——文化遗产的加固材料与方法:跨学科对话”国际研讨会,旨在促进文物保护的跨学科交流。会议将展现最新研究成果,就新方法对其他类型文物的适用性进行讨论,以启发新思路。

主要议题:合适加固材料的选择标准(例如:性能、渗透行为、粘结能力);保护方法对保护效果的影响与未来发展;加固必要性的确定,以及长期保护效果的评估;技术或材料方面有所创新或借鉴其他学科的特殊解决方案。

会议时间:2018 年 1 月 25 ~ 27 日
会议地点:德国希尔德斯海姆应用科学与艺术大学
会议所用语言为德语及英语。论文或海报的摘要(不超过一页)请发送至 konsolidieren.fb@hawkhg.de,截止日期为 2016 年 10 月 31 日。具体会议信息请参考来源: <http://193.175.110.9/hornemann/english/2353.php>

《文物保护与考古科学》编辑部转发