

泉州湾宋代海船保存环境的微生物调查^{*}

费利华 林永峰 吴耿峰（泉州海外交通史博物馆 福建泉州 362000）

摘要：为了解船体保存环境中的微生物种类及数量，笔者采集保存区域环境的9个沉降样品进行培养与菌落数量统计，并将分离、纯化的菌株进行形态鉴定，再利用分子生物学手段，对分离的菌株进行种属鉴定，调查结果显示：受采样时间、气候等因素影响，本次调查采集到的菌落总数较少，符合《室内空气质量标准》（GBT18883-2002）的要求。船体保存区域环境中存在的优势细菌种属为芽孢杆菌属与微球菌属，真菌以枝孢霉属为主要类群；分离得到的大部分细菌与真菌为条件致病菌，正常条件下是安全的，但细菌中的炭疽杆菌、金黄色葡萄球菌、真菌中的枝孢霉属等菌类具有潜在健康危害；采集分离到的红贝菌是木材腐朽菌，木霉可降解木材纤维素，这类真菌不利于船体的保存。因此，加强对船体保存环境的治理与控制有益于船体的保护与公共卫生安全。

关键词：泉州湾宋代海船 微生物调查 细菌真菌分子 生物学腐朽

一、研究背景

室内空气中的微生物污染不仅是人类致病的重要因素^[1]，同时，微生物作用亦可导致各种材料的劣变^[2]。因此，室内空气中的微生物污染不容忽视。博物馆展厅不仅是人流量较大的公共场所，亦是珍贵文物保存展示的特殊环境，所以，博物馆展厅环境的空气质量不仅关系到参观者的身体健康，亦可能影响展示文物的安全保存，特别是博物馆藏品中的纸张、木质、皮革等有机质文物往往是微生物滋生繁殖的良好载体，而微生物在生长过程中产生的各种酶、有机酸等成分，可分解有机质分子，造成文物的降解劣化，降低文物的价值，甚至造成文物的损毁。因此，博物馆环境中的细菌和真菌等空气微生物亦是馆藏文物保存环境质量的重要参数。

泉州湾宋代海船1974年发掘出土，1978年在泉州市开元寺内建成古船陈列馆并开始对外展示。多年来，开放式展示且缺乏环境调控设施对船体的稳定保存带来

很大的影响，船体出现多种病害。为了加强船体保护，需要对船体保存环境状况有更全面的了解。本研究通过对船体保存区域环境中的微生物数量与种类进行检测调查与分析，一方面可了解船体保存环境中是否存在对船体有害的致病微生物，为保护工作提供参考，同时亦可对陈列馆内环境的卫生安全进行评估。

二、调查方式与结果

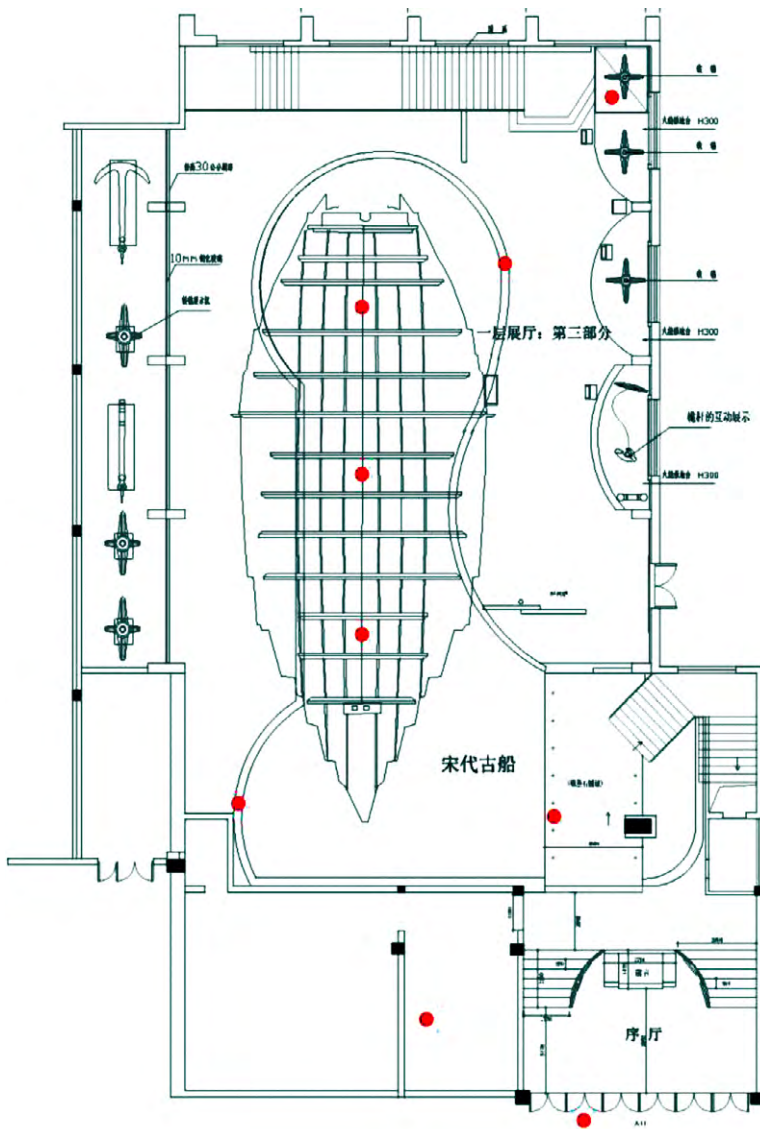
本次调查主要对船体保存环境中的真菌与细菌的菌落数量进行统计，并采用形态学及分子生物学鉴定手段，对采集的菌类种属进行鉴定。

1. 自然沉降法取样

取样时间：2015年6月24日。取样时船馆内温度28.5℃，相对湿度62%，室外温度29.0℃，湿度82%，有阵雨。

依据《GB/T18204.3-2013 空气沉降法微生物检测

^{*} 本文为全国重点文物保护单位专项经费资助项目“泉州湾宋代海船抢救性保护工程”的相关研究（国家文物局第[141797]号）。



图一 微生物采样布点图

表一 空气沉降样品菌落统计

样品来源	细菌菌落数 (CFU/皿)	真菌菌落数 (CFU/皿)
陈列馆外	36	13
船舱头部	3	0
船舱中部	0	0
船舱尾部	5	0
木槌展柜	1	0
4爪铁锚展柜	6	2
船体东侧参观通道	4	0
船体西侧参观通道	0	0
展厅入口处	2	1
共计	57	16

标准》《WW/T0016-2008 馆藏文物保存环境质量检测技术规范》，以营养琼脂为细菌培养基，以孟加拉红为真菌培养基，共采集陈列馆门口、展厅入口、参观通道、船舱以及密闭展柜共 9 个部位的沉降样品(图一)。其中在两个展柜内取样的目的是对比密闭与开放环境下的微生物数量的差异。平板暴露时间为 5 分钟。

2. 培养并统计菌落总数

将本次调查获得的古船陈列馆内外不同区域来源的空气沉降样品 9 份置于培养箱内培养，细菌恒温培养箱温度 35 ~ 37，培养时间 48 小时；霉菌培养箱温度 28±1。培养时间 48 ~ 96 小时，然后对各样品生长平板上的细菌和真菌菌落数进行统计，共得到 57 个细菌菌落和 16 个真菌菌落(表一)。

通过菌落总数的统计数据可以发现，船馆内不同区域空间来源样品中的微生物数量较少，而室外样品中，无论是细菌数和真菌数都占到了检测总数的一半以上(细菌 63.16%，真菌 76.47%)，另外密闭的四爪铁锚展柜内的细菌与真菌菌落总数均高于室内其它几个采样点。

另外，依据公式 $m = \frac{N \times 50000}{A \times t}$ (m 为空气中菌落总数，cfu/m³；N 为平板平均菌落数，cfu；A 为平板面积，cm²；t 为平板暴露时间，min) 计算，船馆内的细菌数量为 365cfu/m³，真菌数量为 26cfu/m³，均远低于 2500 cfu/m³，符合《室内空气质量标准》(GBT18883 - 2002) 的要求。

3. 分离菌株的形态鉴定

对采集平板上生长出来的细菌与真菌菌落进行分离纯化，经过初步的形态排重，挑选出具有代表性的 33 株细菌与 13 株真菌观察其形态。

(1) 细菌菌株的形态鉴定

将细菌菌株在牛肉膏蛋白胨固体培养基上生长后观察形态，对不同培养时间的单菌落直径做了统计，同时记录了各菌株的产色素情况、透明度、菌落形态及湿润度(表二)。

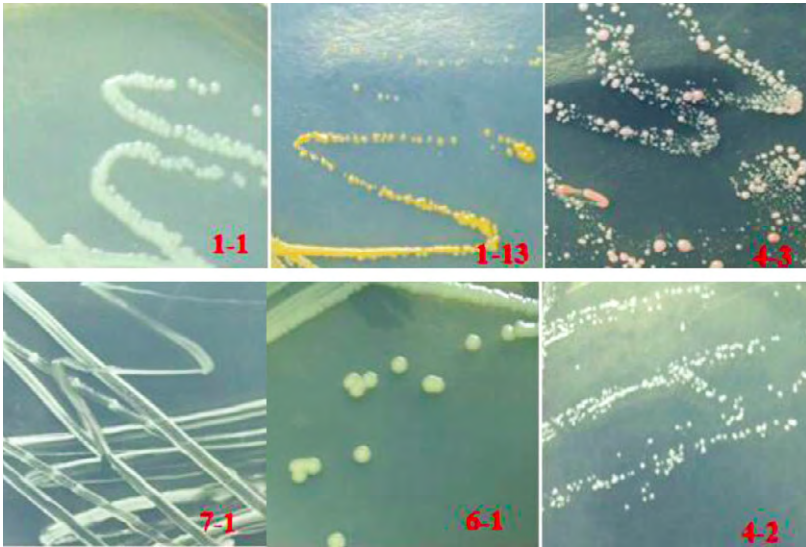
表二 细菌菌株的形态学鉴定结果

样品来源	样品编号	固体培养特征							显微形态		革兰氏染色
		菌落大小 / mm 生长时间 / h	颜色	透明度	边缘	高度	形状	湿润	形状	排列方式	
陈列馆外	1-1	2/24	白	不透明	平整	平	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-2	3/24	白	不透明	平整	平	圆	湿润	短杆状	单个 / 成团	阳性
	1-3	3/24	橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	单个 / 成团	阳性
	1-4	3/24	浅橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	短杆状	单个 / 成团	阳性
	1-5	3/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	多聚	阳性
	1-6	3/24	橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	短杆状	单个 / 成团	阳性
	1-7	4/24	橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	短杆状	单个 / 成团	阳性
	1-8	4/24	白	不透明	平整	平	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-9	1.5/12	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-10	1/12	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-11	4/12	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-12	1/12	白	不透明	平整	平	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	1-13	1/12	浅橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成对	阴性
	1-14	2/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性
	1-15	1/48	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	多聚	阳性
	1-16	2/48	乳白	不透明	平整	平	圆	湿润	丝状	放线状成团	阳性
船舱头部	2-1	4/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成对	阴性
	2-2	2/72	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性
船舱尾部	4-1	1/24	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	4-2	1/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	二联 / 四联	阳性
	4-3	1/96	粉红	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	八叠	阳性
	4-4	3/48	浅橙	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	八叠	阳性
木槌展柜	5-1	3/24	白	不透明	平整	平	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
4爪铁锚展柜	6-1	3.5/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成对	阴性
	6-2	1/12	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性
	6-3	1/12	橘红	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性
	6-4	2/48	浅黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性
	6-5	1/72	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
船体东侧参观通道	7-1	2/48	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	多聚	阳性
	7-2	1/24	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	多聚	阳性
	7-3	2/12	白	不透明	平整	隆起	圆	湿润	杆状	多聚	阳性
	7-4	1/24	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	二联 / 四联	阳性
入口处	9-1	1.5/24	黄	不透明	平整	隆起	圆	湿润	球状	单个 / 成团	阳性

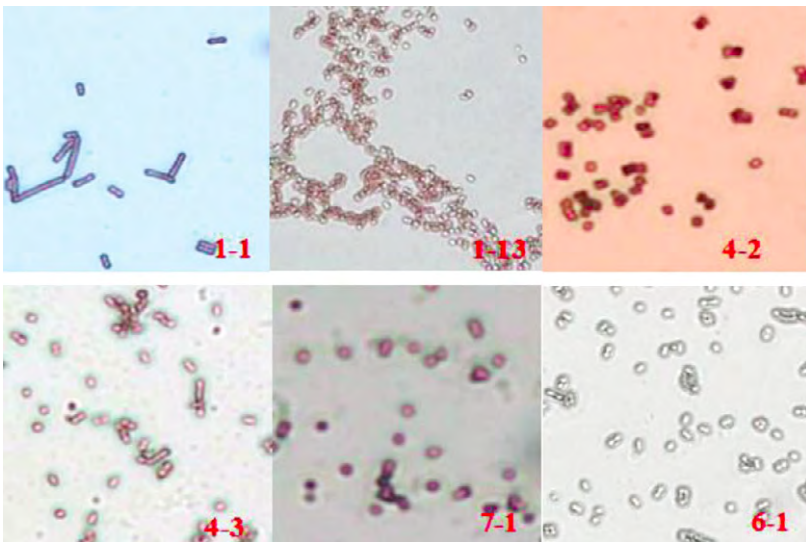
分析表中数据可以发现,所记录的菌落多呈圆形,湿润,符合细菌的菌落特征,且不同菌株的产色素呈现丰富的多样性。

对 33 株细菌进行革兰氏染色后,采用 10×40 的放大倍数进行显微观察,对细菌的形状、排列方式及染色结果进行记录。从表二的数据可以看出,细菌的形状主要为球状和杆状,其中球状 17 株(占总数的

51.5%),杆状 15 株(占总数的 45.5%),另有 1 株编号为 1-16 的菌株显微镜下观察为丝状(图二)。经革兰氏染色鉴定,革兰氏阳性细菌的数量为 30 株(占总数的 90%),显著高于革兰氏阴性细菌的数量(3 株,占总数的 10%)。图三为部分菌株革兰氏染色的显微照片,其中 1-13 为革兰氏阴性球菌,6-1 为革兰氏阴性杆菌,1-1 为革兰氏阳性杆菌,4-2、4-3 和 7-1 均为



图二 部分细菌菌株的单菌落形态



图三 部分细菌菌株的显微形态

革兰氏阳性球菌。

(2) 真菌菌株的形态学鉴定

真菌菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上生长后观察形态,对不同培养时间的单菌落直径做了统计,同时记录了各菌株的产色素情况、透明度、菌落形态及湿润度(表三)。分析表中数据可以发现,菌株的固体平板上呈现出表面干燥、绒毛状、中间与边缘颜色具明显差异的典型真菌形态菌落(图四、五)。

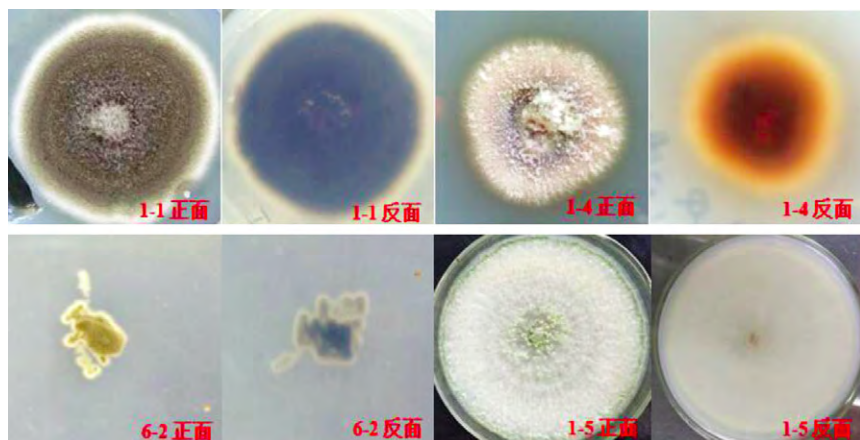
4. 分离菌株的分子生物学鉴定

(1) 细菌菌株的分子生物学鉴定

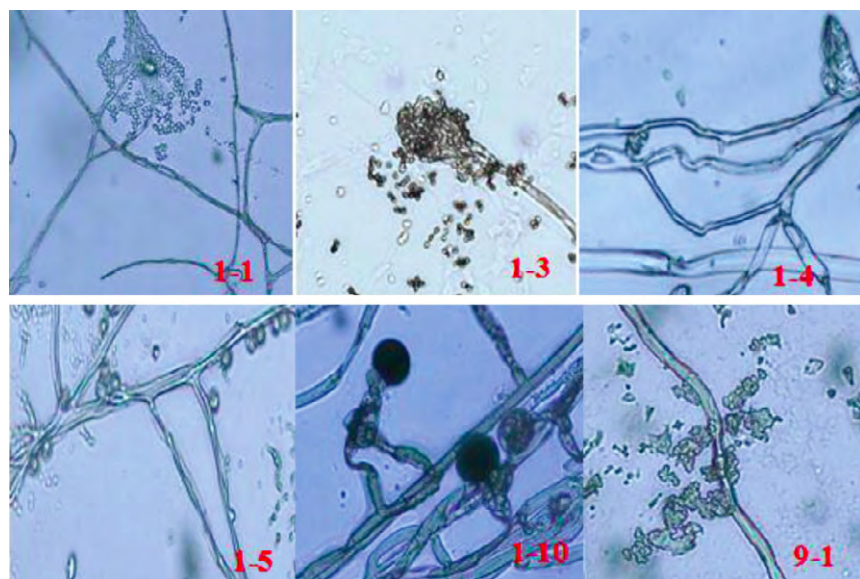
将从空气沉降样品中挑选分离培养的33株细菌,应用16S rRNA基因通用引物对(27F和1492R)通过菌落PCR进行基因扩增。对扩增产物进行0.9%琼脂糖凝胶电泳,检测产物条带纯度及大小后,对1400bp大小的目的片段进行胶回收,胶回收产物进行DNA序列测定。对获得的33株细菌16S rRNA序列与同源序列进行分析与比对,依据比对结果,得到菌株的种属如表四。鉴定出细菌菌株分别分布在12个属,其中以芽孢杆菌属(10株),微球菌属(5株),微小杆菌属(4株)为主要类群,未检测到未知种属。

表三 真菌菌株的形态学鉴定结果

样品来源	样品编号	固体培养特征							显微形态	
		菌落大小/mm 生长时间/h	颜色	透明度	边缘	高度	形状	湿润	菌丝形态	孢子形态
陈列馆外	1-1	37/72	深棕	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	椭圆形
	1-2	15/72	深绿	不透明	不齐	隆起	不规则	干燥	单根	椭圆形
	1-3	20/72	深绿	不透明	不齐	隆起	不规则	干燥	多细胞分枝	圆形/椭圆形
	1-4	35/72	橘红	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	分枝	椭圆形
	1-5	87/72	白	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	圆形
	1-6	18/72	深绿	不透明	不齐	隆起	不规则	干燥	单根	椭圆形
	1-7	12/72	深绿	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	多细胞分枝	球形/椭圆形
	1-8	15/72	白棕	不透明	不齐	隆起	不规则	干燥	单根	椭圆形
	1-9	37/72	深绿	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	椭圆形
	1-10	38/48	白	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	圆形
4爪铁锚展柜	6-1	35/96	棕绿	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	长梭形
	6-2	15/72	绿	不透明	不齐	隆起	不规则	干燥	单根	椭圆形
入口处	9-1	40/96	深绿	不透明	不齐	隆起	圆	干燥	单根	椭圆形



图四 部分真菌菌株的单菌落形态



图五 部分真菌菌株的显微形态

(2) 真菌菌株的分子生物学鉴定

从空气沉降样品中挑选分离培养的 13 株真菌，采用 CTAB 法分别提取各菌株的基因组 DNA，应用真菌内转录间隔区 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 通用引物对 (ITS1, ITS4) 进行基因扩增。扩增产物在 0.9% 琼脂糖凝胶电泳检测条带纯度及大小后，对 1400bp 大小的目的片段进行胶回收，胶回收产物进行 DNA 序列测定。对获得的 13 株真菌 ITS 序列进行同源序列分析比对，依据比对结果，得到菌株的种属如表五。鉴定出的真菌分布在 7 个属，其中以枝孢霉属 (5 株) 为主要类群，其余分别是青霉属 2 株、茎点霉属 2 株、红贝菌属 1 株、木霉属 1 株、黑孢子菌属 1 株、格孢腔菌属 1 株。

三、结果分析

1. 由于采样时间在上午刚开馆之际，室内空气特别是船舱底部空气还未明显受室外气流以及参观人流的影

响，且刚下过阵雨，空气中湿度较高，浮尘较少，因此，本次调查得到的菌落总数不多，但种类丰富，真菌菌落总数远少于细菌，室内采集到微生物数量明显较室外少，展柜内的菌落总数高于室内其它采样点。

2. 在 33 株细菌和在 13 株真菌中，大多是条件致病菌，在正常情况下不会导致疾病发生。值得注意的是在室内分离到 3 株 (4-1、6-5、7-3) 与炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 高度同源性，炭疽杆菌是引起炭疽病的病原菌，另外，蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*) 亦均是人体病原菌，不过上述菌类数量较少且均需在一定条件下才能大量繁殖生长，一般不会造成传染性疾病的发生，但对展厅进行定期清洁消毒是必要的。分离到的优势真菌为枝孢霉属，枝孢霉属的孢子在空气中广泛存在，虽然枝孢菌很少会对人类造成致病性，但空气中传播的枝孢菌孢子是极重要的过敏原，会广泛地引起哮喘病人发作或有类似呼吸系统疾病患者的过敏反应。由于枝孢菌在

潮湿环境中易于生长，所以在博物馆中保持适宜的空气湿度是必要的。

3. 木材的腐朽劣变除了由物理、化学作用引起外，最主要的还是生物破坏，其中微生物是造成木材降解腐朽的重要因素^[3]。细菌对木材的腐朽作用发生在几乎缺氧的状况下，比如长期埋在土里、置于水中或长期处于高湿状态，且细菌对木材的破坏性相对比较小，而真菌对木材的破坏程度与速度远远高于细菌，特别是木材腐朽真菌^[4]。

本次空气沉降样品中分离出的红贝菌属是在阔叶树原木上常见的能够使树干、腐木和硬木材上产生白色腐朽的真菌，在热带比较普遍^[5]，被收录于《中国储木及建筑木材腐朽菌》中，此类真菌是否与船体局部的腐朽病害有关值得关注，需进一步研究。分离到的木霉能够分泌多种胞外酶系，如纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶等，因而能够对多种物质产生作用，其中，纤维素酶是其产

表四 细菌菌株分子生物学鉴定结果

样品来源	样品编号	同源菌株	种属	同源性 /%
陈列馆外	1-1	<i>Bacillus cereus</i>	芽孢杆菌属	99.86%
	1-2	<i>Exiguobacterium indicum</i>	微小杆菌属	99.72%
	1-3	<i>Chryseomicrobium amylolyticum</i>	<i>Chryseomicrobium</i>	99.58%
	1-4	<i>Exiguobacterium profundum</i>	微小杆菌属	99.79%
	1-5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	葡萄球菌属	99.36%
	1-6	<i>Exiguobacterium indicum</i>	微小杆菌属	99.79%
	1-7	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	微小杆菌属	99.78%
	1-8	<i>Bacillus aryabhattai</i>	芽孢杆菌属	99.80%
	1-9	<i>Bacillus thaonhiensis</i>	芽孢杆菌属	99.86%
	1-10	<i>Bacillus drentensis</i>	芽孢杆菌属	98.48%
	1-11	<i>Bacillus siamensis</i>	芽孢杆菌属	99.86%
	1-12	<i>Bacillus thioparans</i>	芽孢杆菌属	99.79%
	1-13	<i>Paracoccus niistensis</i>	副球菌属	97.23%
	1-14	<i>Paenibacillus uliginis</i>	类芽孢杆菌属	98.17%
	1-15	<i>Micrococcus endophyticus</i>	微球菌属	99.50%
	1-16	<i>Streptomyces cavourensis</i>	链霉菌属	99.43%
船舱头部	2-1	<i>Acinetobacter junii</i> CIP	不动杆菌属	99.57%
	2-2	<i>Micrococcus flavus</i>	微球菌属	99.93%
船舱尾部	4-1	<i>Bacillus anthracis</i>	芽孢杆菌属	99.54%
	4-2	<i>Kocuria kristinae</i>	库克菌属	98.08%
	4-3	<i>Sporosarcina koreensis</i>	芽孢八叠球菌属	98.24%
	4-4	<i>Sporosarcina koreensis</i>	芽孢八叠球菌属	98.25%
木槌展柜	5-1	<i>Bacillus subterraneus</i>	芽孢杆菌属	98.95%
4爪铁锚展柜	6-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	不动杆菌属	99.86%
	6-2	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	微球菌属	99.93%
	6-3	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	微球菌属	99.71%
	6-4	<i>Curtobacterium herbarum</i>	短小杆菌属	99.28%
	6-5	<i>Bacillus anthracis</i>	芽孢杆菌属	99.69%
船体东侧通道	7-1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	葡萄球菌属	100.00%
	7-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	葡萄球菌属	100.00%
	7-3	<i>Bacillus anthracis</i>	芽孢杆菌属	99.60%
	7-4	<i>Kocuria marina</i> KMM	库克菌属	99.86%
入口处	9-1	<i>Micrococcus aloeverae</i>	微球菌属	99.93%


表五 真菌菌株分子生物学鉴定结果

样品来源	样品编号	同源菌株	种属	同源性 /%
陈列馆外	F1-1	<i>Phoma multirostrata</i>	茎点霉属	100.00%
	F1-2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	枝孢霉属	100.00%
	F1-3	<i>Penicillium sp.</i>	青霉属	99.00%
	F1-4	<i>Earliella scabrosa</i>	红贝菌属	99.37%
	F1-5	<i>Trichoderma atroviride</i>	木霉属	100.00%
	F1-6	<i>Cladosporium sp.</i>	枝孢霉属	100.00%
	F1-7	<i>Penicillium citrinum</i>	青霉属	100.00%
	F1-8	<i>Cladosporium oxysporum</i>	枝孢霉属	99.79%
	F1-9	<i>Phoma multirostrata</i>	茎点霉属	100.00%
	F1-10	<i>Nigrospora sp.</i>	黑孢子菌属	99.00%
4爪铁锚展区	F6-1	<i>Pleosporales sp.</i>	格孢腔菌属	99.00%
	F6-2	<i>Cladosporium halotolerans</i>	枝孢霉属	100.00%
入口处	F9-1	<i>Cladosporium oxysporum</i>	枝孢霉属	100.00%

生的主要酶系之一，因此，木霉具有较强分解纤维素的能力^[6]，如在船体表面生长，对船体木材有一定的破坏性。虽然上述菌类仅在船馆入口处各检测分离到1株，但室外微生物是室内微生物的重要来源，且泉州宋船是开放式展示，因此这些真菌对船体的影响不容忽视。由于这两类菌在湿热环境下容易生长，所以控制相对较低的温度和湿度对船体保护有一定积极作用。

4. 本次调查分离的细菌菌落以芽孢杆菌属、微球菌属为优势种属，真菌菌落以枝孢霉属为主要类群，这与前人关于空气中微生物种属的研究结果是基本相符的^[7]。与国内其它博物馆的研究结果相比较则有一定差异，如首都博物馆空气微生物中细菌以微球菌与杆菌类为主，真菌以青霉属为主^[8]，重庆中国三峡博物馆的空气微生物中细菌以微球菌属为主，真菌以曲霉属为主^[9]。对比发现：三个馆的优势细菌种属较为接近，但在真菌的优势种属上存在差异，分析除了与地域地理环境、采样方法、采集时间等差异有关外，可能与展厅环境有一定关系。首都博物馆与重庆中国三峡博物馆均使用空调系统，展厅相对密闭，室内外空气交换缓慢，而泉州湾古船陈列馆是开放式，室内外空气很容易交换，因而室内环境中的优势菌与室外基本是一致的。

四、结语

根据本次对泉州宋船船体保存区域环境中微生物的调查与分析,受采样时间、季节等因素影响,本次调查所得船体保存环境中的微生物菌落数量较少;船体保存区域环境中存在的优势细菌种属为芽孢杆菌属与微球菌属,真菌以枝孢霉属为主要类群;分离得到的大部分细菌与真菌为条件致病菌,正常条件下不会导致疾病的发生,不过部分菌类如炭疽杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、枝孢霉菌等对人体健康具有潜在危害;采集分离到的红贝菌属是可引起木材腐朽的真菌,木霉可降解木材纤维素,这类真菌不利于船体的保存。由于病原菌、木腐菌在湿热的环境下易于生长,因此,实施船体保存环境的监测与调控,并定期对船体及展厅进行清洁消毒,不仅对船体保护是有益的,亦有利于公共卫生安全。(本研究中的微生物采样委托泉州市鲤城区疾控中心完成,微生物种属鉴定委托厦门大学生命科学学院完成,一并致谢!)

注释:

- [1] 高新景、李劲松:《室内空气污染物的研究进展》,《微生物免疫学进展》2006年第3期,第48~52页。
- [2] 吕嘉栎:《轻化工产品防霉技术》,化学工业出版社,2003年。
- [3] 李坚:《木材保护学》,科学出版社,2006年,第75页。
- [4] 郭梦麟、蓝浩帆、邱坚:《木材腐朽与维护》,中国计量出版社,2010年,第180页。
- [5] 戴玉成:《中国储木及建筑木材腐朽菌图志》,科学出版社,2009年,第66页。
- [6] 闫峰、徐凤花、顾金刚、姜瑞波:《木霉属真菌的生物降解及生物转化作用研究进展》,《微生物学杂志》2009年第3期,第77~80页。
- [7][9] 唐欢、范文奇、周理坤、王春:《重庆中国三峡博物馆临时展厅内空气微生物调查检测》,《中国微生态学杂志》2014年第4期,第420~424页。
- [8] 武望婷、何海平:《首都博物馆内空气微生物种属调查》,《中国文物科学研究》2012年第1期,第75~77页。