李心坚,徐亚男,杨秋霞,等.龙门石窟敬善寺区域生物病害调查与研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(2):119-129.
Li X J, Xu Y N, Yang Q X,et al.Investigation and research on biological diseases of the Jingshan Temple area in the Longmen Grottoes[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(2):119-129.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202311016

龙门石窟敬善寺区域生物病害调查与研究

李心坚[1],徐亚男[2],杨秋霞[2],许鹏[3],魏鑫丽[2*]

(1.龙门石窟研究院,河南 洛阳 471000;2.中国科学院微生物研究所 真菌学国家重点实验室,北京 100101;
3.辽宁有色勘察研究院有限责任公司,辽宁 沈阳 110014)

摘　要:[目的]生物病害侵蚀露天石质文物,使其发生表面变色及风化等不可逆变化。龙门石窟是世界上造像最多、规模最大的石刻艺术宝库,敬善寺区域是龙门石窟的重要组成部分,了解该区域石质文物的生物病害情况,对石质文物保护及病害防治措施的提出具有重要意义。[方法]本研究对该区域31个样点石质文物的生物病害进行样品采集。基于形态观察,结合ITS、16S rDNA特征片段的测序分析,对生物病害物种地衣、微型真菌、细菌、苔藓和藻类等进行鉴定;对受生物侵蚀的文物本体通过扫描电镜进行形貌观察;采用薄层层析法检测地衣体中的化学酸,结合高效液相色谱法测定地衣和由生物结皮状复合物与沉积物中分离真菌的化学酸含量。[结果]形态观察和高通量测序结果显示,龙门石窟敬善寺区域内生物病害种类主要为地衣、苔藓、藻类、真菌和细菌,其中地衣7种,苔藓3种,藻类1种,真菌20种,可培养细菌7种,主要包括蓝细菌和放线菌门等,高通量测序结果与传统培养结果具有高度一致性和互补性。扫描电镜观察到不同侵害生物对石质文物的侵蚀深度不同,其中非地衣型真菌菌丝深入岩石深度可达100 μm。调查区域内常见、具明显特征结构且覆盖度较大的主要生物病害为地衣和苔藓,其中中华石果衣(*Endocarpon sinense*)最为明显;同时地衣和真菌样品中可检测到柠檬酸,琥珀酸、草酸,乳酸、富马酸等有机酸。[结论]本研究首次较为系统地调查了龙门石窟敬善寺区域石质文物生物病害的物种和分布,从细胞侵入和有机酸产生2方面分析了其中代表性生物产生的病害及程度;生物病害的发育与石窟所处环境密切相关,研究结果为石窟微环境控制和石质文物生物病害防治提供了理论依据。

关键词:龙门石窟; 石质文物; 中华石果衣; 地衣; 苔藓; 有机酸
中图分类号:S182;K879.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)02-0119-11

文物是人类历史发展过程中遗留下来的具有历史、文化及科学价值的实物。其中不可移动的石质文物(以下简称石质文物)如:石窟、石雕、岩画等,因其历史悠久,分布范围广泛,具有重要的历史与科学价值,为研究古代文明提供了完善的实物资料[1]。石质文物往往由于体量较大,不宜整体进行移动,因此随着环境条件的复杂多变,会遭受各种因素引发的破坏,生物病害即是其中最为常见的一类[2]。可引发石质文物生物病害的如细菌、藻类、真菌和地衣等生命体,它们在石质文物表面及其裂隙中繁衍生长,掩盖石刻精美纹饰,导致石质文物表面变色及表层风化等不可逆变化[2-4]。

龙门石窟是全国重点文物保护单位,世界文化遗产,是具有极高艺术价值和历史价值的中国皇家石窟,被联合国教科文组织评价为:“龙门石窟是中国北魏晚期至唐代(公元493年~907年)期间,最具规模和最为优秀的造型艺术,代表了中国石刻艺术的最高峰。”敬善寺区域作为龙门石窟重要的组成部分,共有编号洞窟97个,包括由唐太宗

收稿日期:2023-11-09　　**修回日期**:2024-01-17
基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFC1523400);国家自然科学基金(32370105);河南兴文化工程文化研究专项项目(2022XWH119)
作者简介:李心坚,副研究馆员,研究方向:石窟寺保护;徐亚男,硕士研究生,研究方向:地衣生物学
*通信作者:魏鑫丽(ORCID:0000-0001-5470-9590),研究员,研究方向:地衣生物学,E-mail: weixl@im.ac.cn

李世民之妃韦氏出资营造的皇家洞窟敬善寺、对我国早期佛教传播影响深远的21个优填王造像龛[5]、龙门石窟刻有《金刚经》的3处洞窟之一429窟等。敬善寺区域坡面径流造成地表水无序排放,洞窟存在不同程度渗漏现象,生物病害发育,对石窟寺的安全保存不利。研究引发石窟寺生物病害的物种类型,揭示其对石窟文物的侵蚀机理,从而实施针对性的保护,对石窟寺保护具有重要的现实意义。国际上对石质文物生物病害尤其微生物病害的研究已有一个多世纪,在微生物多样性、生态功能、退化机理及防治技术等方面取得了较大进展。我国近年来对包括龙门石窟[6]、云冈石窟[7]、乐山大佛[8]、麦积山石窟[9]等石质文物的微生物病害开展了一定的研究,但研究主要集中在对砂岩质文物生物病害种类、侵蚀机理方面,对石灰岩质文物生物病害的研究相对较少。龙门石窟对生物病害的研究主要涉及部分区域的调查和腐蚀机理的探讨[10],未涉及敬善寺区域,亟需借助新型多学科手段进一步开展研究。

因此,本研究以龙门石窟敬善寺区域生物病害调查为切入点,对调查区域采集到的生物病害样品进行分析,进一步揭示生物病害物种种类及分布,探究损伤机理,旨在为后续的生物病害控制提供依据,并为石窟寺修复和减缓生物病害进程等方面提供借鉴和参考。

1 材料和方法

1.1 研究区域及采样点

本调查研究以龙门石窟西山敬善寺区域为整体,随机选取31个采样点(图1),采样点类型涉及洞窟内岩壁与地表、洞窟门口、洞窟间岩面、佛像表面等,采集样品的原则为生物病害肉眼可见,即已明显引发石窟表面颜色变化或直接可见生物体(个体或群体)。

1.2 试剂材料

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA,北京奥博星生物技术有限责任公司)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSA,北京奥博星生物技术有限责任公司)、孟加拉红培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司)、PCR试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)、CTAB(纯度99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)等。

1.3 试验方法

1.3.1 生物病害样品采集

采集生物病害样品共64份,包含地衣9份,苔藓9份,附着于石窟表面的沉积物9份,生物结皮状复合物30份,与石窟具有紧密接触特征的疑似微型真菌及地衣样品7份。采集时用无菌手术刀在石窟表面轻轻刮取,放入无菌袋或无菌离心管中,置于盛放干冰的样品箱中,次日带回实验室,−80 ℃保存备用。

1.3.2 微生物分离与纯化

称取生物结皮状复合物和沉积物各0.5 g,移入离心管中与100 μL无菌水混合,在离心管内用玻璃研磨棒研磨,加入1000 μL无菌水混匀,制成1100 μL混合溶液。从中吸取100 μL,分别滴加在PDA、TSA与孟加拉红培养基中,每种培养基2个重复,25 ℃恒温培养36 h,长出菌落后用划线法纯化,直至出现单菌落,取单菌落扩大培养。

1.3.3 DNA提取、测序和片段分析

DNA提取采用改良CTAB法[11]。真菌扩增ITS片段,细菌扩增16SrDNA片段。PCR扩增反应体系为25 μL:DNA 2 μL,2×Taq PCR MasterMix 13 μL,上下游引物各1 μL(表1),超纯水8 μL。真菌DNA扩增的反应条件:95 ℃预变性2 min,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸72 s,33个循环,72 ℃后延伸2 min;细菌DNA扩增的反应条件:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性1 min,58 ℃退火1 min,72 ℃延伸1.5 min,共30个循环,72 ℃后延伸10 min。PCR产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测,委托北京天一辉远有限公司进行测序。

1.3.4 系统发育分析

在NCBI网站下载参考序列,与本研究所获得的序列进行系统发育分析,并选择合适的外群,利用BioEdit v. 7.0.5[12]中的ClustalW Multiple Alignment[13]进行序列比对。对单基因数据集进行最大似然法[14]分析,使用在线网站Cipres Science Gateway (http://www.phylo.org)中的RAxML HPC v. 8.2.6[15]构建系统发育树,运算方法选择GTR+I+G模型,每个节点假设1000次重复来评价自展值,得到的树文件用FigTreeV.1.4.2查看和编辑,自展支持值(Bootstrap support values)≥75%的分枝具有可信度。



图中红色数字1~31为31个采样点,采样点后括号内的数字为本研究中所取样品的具体编号,即从01至96的间断数字(数字不连续的原因在于采样过程有其它性质的样品一起参与了编号,并共同保藏于标本馆中),黑色数字为石窟编号

The numbers in red font represent the 31 sampling sites, the discontinuous numbers from 0 to 96 in the following brackets represent the sample number (the reason for the discontinuity in numbers is that other samples unrelated to this study were also collected and numbered together), and the numbers in black font represent the Grottoes number

图1　区域生物病害采集平面图

Fig.1　Regional disease sampling sites

表1　PCR扩增反应所用引物

Table 1　Primers used in this study

序号 No.	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
1	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG[16]
2	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC[16]
3	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA[17]
4	27F	GGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG[18]
5	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT[18]

1.3.5　物种鉴定

地衣物种鉴定基于形态学观察和ITS片段分析;苔藓物种鉴定及由生物结皮状复合物和沉积物中分离培养出的真菌物种鉴定基于形态学观察;生物结皮状复合物和沉积物高通量测序的物种鉴定基于USEARCH方法,对各样品的Effective Tags进行聚类,将序列相似性达到97%的序列聚类成1个OTU,OTU即分类操作单元(Operational Taxonomic Unit)。

1.3.6　生物病害程度检测

利用扫描电子显微镜(Hitachi SU8010)对部分代表微生物侵蚀文物本体的情况进行了形貌观察。利用薄层层析方法[19-21]检测地衣体中的化学酸。利用高效液相色谱法测定地衣和由生物结皮状复合物与沉积物中分离培养出的真菌中化学酸的含量。色谱条件为:XSelect HSS T3色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm,Waters公司,美国),流动相为20 mmol·L^{-1}磷酸水溶液,流速1.0 mL·min^{-1};检测波长220 nm。

2　结果与分析

2.1　微生物在内的生物病害种类组成

本研究调查的龙门石窟敬善寺区域内的生物病害由地衣、微型真菌、细菌、苔藓和藻类组成(表2~表3)。其中最具明显个体结构特征的为地衣和苔藓,经鉴定确认地衣7种,隶属于子囊菌门(Ascomycota)3纲(茶渍纲Lecanoromycetes,异极

衣纲Lichinomycetes和散囊菌纲Eurotiomycetes)3目(黄枝衣目Teloschistales,异极衣目Lichinales和瓶口衣目Verrucariales)3科(黄枝衣科Teloschistaceae,异极衣科Lichinaceae和瓶口衣科Verrucariaceae)3属;苔藓4种,隶属于真藓门(Bryophyta)真藓纲(Bryopsida)丛藓目(Pottiales)丛藓科(Pottiaceae)4属。

从生物群体构成的结皮状复合物和沉积物中分离培养出绿藻、微型真菌和细菌,其中:绿藻共1目(胶毛藻目Chaetophorales);微型真菌20种,隶属于子囊菌门3纲(座囊菌纲Dothideomycetes,散囊菌纲Eurotiomycetes,粪壳菌纲Sordariomycetes)5目(煤炱目Capnodiales,散囊菌目Eurotiales,肉座菌目Hypocreales,格孢腔菌目Pleosporales,粪壳菌目Sordariales)8科(格孢腔菌科Pleosporaceae,曲霉科Aspergillaceae,枝孢霉科Cladosporiaceae,毛壳科Chaetomiaceae,麦角菌科Clavicipitaceae,Neopyrenochaetaceae,线虫草科Ophiocordycipitaceae,球腔菌科Phaeosphaeriaceae)11属;细菌包括蓝细菌门共3目(拟色球藻目Chroococcidiopsidales,念珠藻目Nostocales,颤藻目Oscillatoriales)4科(拟色球藻科Chroococcidiopsidaceae,微鞘藻科Microcoleaceae,念珠藻科Nostocaceae,伪枝藻科Scytonemataceae);细菌门2目(肠杆菌目Enterobacterales,芽孢杆菌目Bacillales)2科(肠杆菌科Enterobacteriaceae,芽孢杆菌科Bacillaceae),放线菌门1目(小单孢菌目Micromonosporales)1科(小单孢菌科Micromonosporaceae)。通过高通量测序复合物和沉积物中未检测到绿藻,但检测到了大量微型真菌和细菌,检测到的真菌占比最大的为子囊菌门,种类组成与上述培养结果具有高度一致性(表3);检测到的细菌多样性相比培养方法更强,包括变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、黏

表2 调查区域内地衣和苔藓的种类组成

Table 2 Lichen and moss species composition within the survey area

采样点 Sampling site	样品号 Sample No.	生物类型 Biotype	纲 Class	目 Order	科 Family	种 Species
16	20200249	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	中华石果衣(*Endocarpon sinense*)
18	20200253	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	中华石果衣(*Endocarpon sinense*)
	20200254	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	石果衣(*Endocarpon pusillum*)
	20200255	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	石果衣属(*Endocarpon* sp.)
	20200256	地衣	异极衣纲	异极衣目	异极衣科	未定至属种
25	20200272	地衣	茶渍纲	黄枝衣目	黄枝衣科	丽石黄衣(*Xanthoria elegans*)
31	20200294	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	黑边石果衣(*Endocarpon nigromarginatum*)
	20200295	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	白色石果衣(*Endocarpon pallidulum*)
	20200296	地衣	散囊菌纲	瓶口衣目	瓶口衣科	黑边石果衣(*Endocarpon nigromarginatum*)
10	20200217	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	灰土对齿藓(*Didymodon tophaceus*)
	20200218	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	小扭口藓(*Barbula indica*)
	20200220	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	灰土对齿藓(*Didymodon tophaceus*)
12	20200233	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	卷叶湿地藓(*Hyophila involuta*)
17	20200252	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	铜绿净口藓(*Gymnostomum aeruginosum*)
19	20200257	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	卷叶湿地藓(*Hyophila involuta*)
22	20200265	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	卷叶湿地藓(*Hyophila involuta*)
24	20200270	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	卷叶湿地藓(*Hyophila involuta*)
	20200271	苔藓	真藓纲	丛藓目	丛藓科	卷叶湿地藓(*Hyophila involuta*)

注:采样点为图1中1~31的红色数字;样品号中202002为研究者按年度采集的统一编号,末2位数字为本研究中取样的具体编号,即从01至96的间断数字,对应图1采样点红色数字后括号内的数字

Note: Sampling sites correspond to the red number in the Fig. 1; the number 202002 of Sampling No. is numbered uniformly by year by the authors, and the last two numbers of Sampling No. is the real sample No. authors collected, the discontinuous numbers from 0 to 96, listed in the following brackets after the sampling site numbers in the Fig. 1

球菌门(Myxococcota)、芽单孢菌门(Gemmatimonadetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、Patescibacteria、厚壁菌门(Firmicutes),另外还包括古菌中的泉古菌门(Crenarchaeota)。高通量测序结果与传统培养结果具有互补性,完整地反映了结皮状的复合物和沉积物中的生物组成(表3)。

2.2　微生物在内的生物病害物种主要分布情况

在采样区域内(图1)采集到的不同种类生物病害样品分布情况为:

9份具明显结构特征的地衣分布于敬善寺区域的303～306窟之间的岩面、331～307窟之间岩表的裂隙、415～414窟之间的分界石以及摩崖三佛龛南侧壁面。

9份苔藓分布于443窟的洞口,307窟南造像底部裂隙处、332窟南壁、403窟洞口南侧底部和413窟南壁。

9份沉积物分布于284～260窟之间、289窟、284窟壁面、305窟、362窟北壁、363窟、403窟、443窟内壁面和445窟地面。

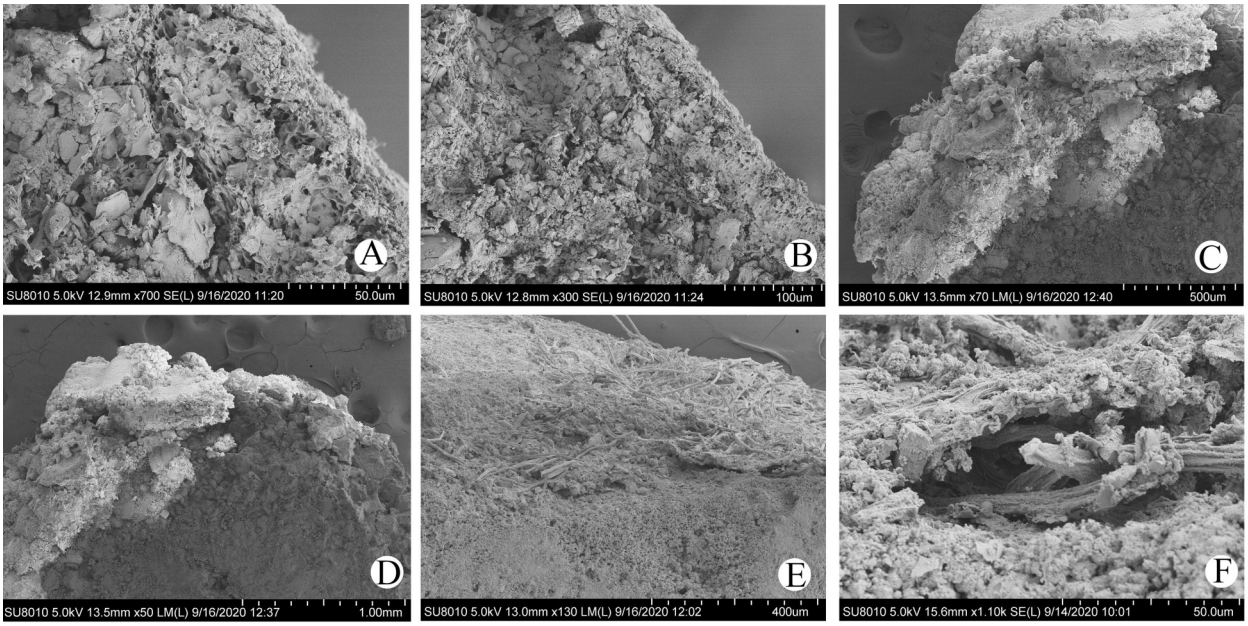
7份待进一步确定的微型真菌和地衣分布于286窟下侧、288窟南侧、292窟、440窟壁面、445窟和303窟和306窟之间的岩面。

30份生物结皮复合物分布于261窟造像周边、285窟～260窟之间、288窟内正壁造像下地面、443窟内壁面、437窟造像底部和墙壁、439窟地面和壁面上、445窟壁面、地面和水道处、307窟内南侧造像底部、332窟造像右臂处、362窟窟口、404窟窟口、416窟地面、418窟内壁、419窟壁面、422窟北侧、摩崖三佛龛地面、摩崖三佛龛最南侧造像水沟内、摩崖三佛龛说明牌旁地面、摩崖三佛龛主佛上。

调查显示主要生物病害为地衣和苔藓,原因为其在调查区域内常见,具明显特征结构,且盖度较大。

2.3　代表生物病害的致害程度检测

本研究选择了6份具代表性的微生物和植物病害样品,包括地衣、微型真菌和绿藻,因为地衣是由真菌和藻类或蓝细菌组成的联合共生体,也是调查区域内常见的生物病害。从外部形态观察,这些生物样品与石窟接触紧密。对这6份样品进行扫描电镜观察,检测其对石窟岩石的侵蚀程度(图2、图3),结果表明位于采样点4(286窟)石窟表面的地衣(样品号20200206),其菌丝进入白



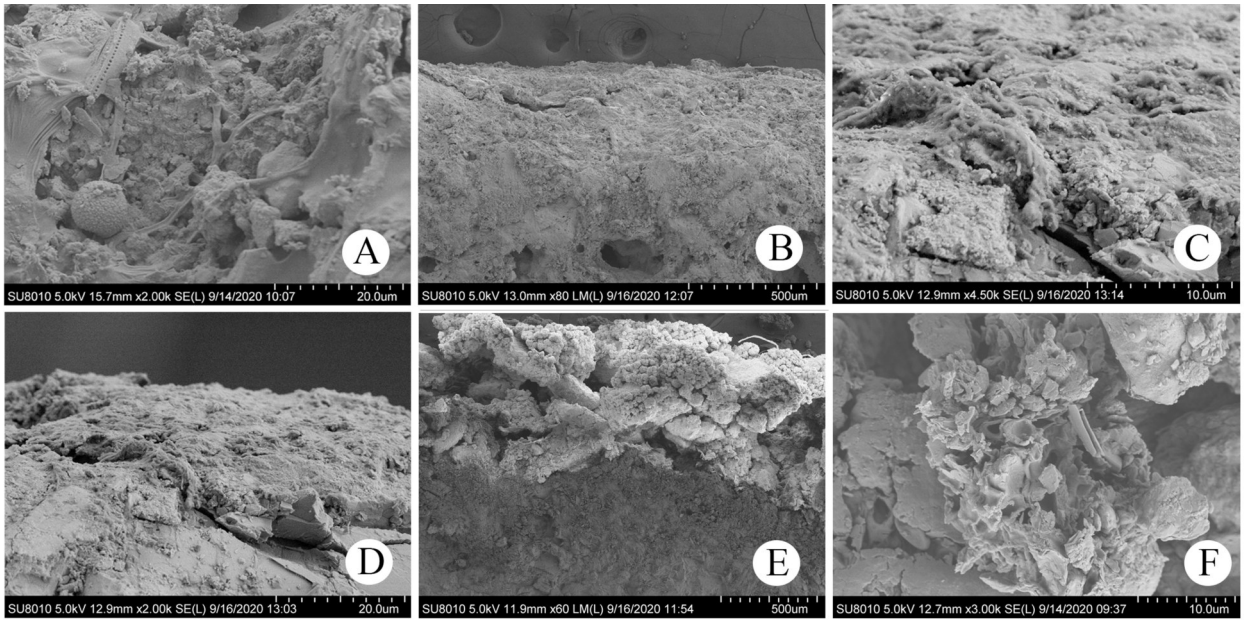
A～B 样品为位于采样点4(286窟)石窟表面的地衣(样品号20200206);C～D 为位于采样点8(292窟)石窟表面的地衣(样品号20200215);E～F 样品为位于采样点14(445窟)石窟表面的非地衣型真菌(样品号20200241)

A～B. Lichen 20200206 is located on the surface of grotto (No. 286) of sampling site 4; C～D. Lichen 20200215 is located on the surface of grotto (No. 292) of sampling site 8; E～F. Fungi 20200241 is located on the surface of grotto (No. 445) of sampling site 14

图2　不同微生物侵蚀岩石的SEM图

Fig.2　SEM photos of different microbe eroding rocks

云岩岩石内部约50 μm,菌丝与浅表层岩石颗粒之间发生接触,且出现缠绕现象,证明存在侵蚀;图2C和2D显示:位于采样点8(292窟)石窟的地衣(样品号20200215)在白云岩上未深入内部,但可见菌丝与接触的岩石颗粒有相互作用,推测其有潜在侵蚀作用;图2E和2F显示:位于采样点14(445窟)石窟的非地衣型真菌(样品号20200241)的菌丝与白云岩浅表层的岩石颗粒有接触,伴有菌丝相互缠绕现象,深入岩石内部约100 μm,说明其对岩石有明显的侵蚀作用。



A～B位于采样点13(440窟)石窟表面的绿藻(样品号20200240);C～D位于采样点14(445窟)石窟表面的非地衣型真菌(样品号20200245);E～F位于采样点16(洞窟303至306之间)石窟表面的中华石果衣*Endocarpon sinense*(样品号20200249)

A～B. Lichen 20200240 is located on the surface of grotto (No. 440) of sampling site 13; C～D. Lichen 20200245 is located on the surface of grotto (No. 445) of sampling site 14; E～F. Fungi 20200249 is located on the surface of grotto (No. 303～No. 306) of sampling site 16

图3 不同生物侵蚀岩石的SEM图

Fig.3 SEM photos of different organisms eroding rocks

图3A和3B显示,位于采样点13(440窟)石窟表面附着物的绿藻(样品号20200240),藻细胞深入至白云岩岩石内部50 μm处,与岩石颗粒有相互接触,两者之间接触的紧密程度较高,推断该附着物对岩石的侵蚀作用较为明显;图3C和3D显示,位于采样点14(445窟)石窟的非地衣型真菌(样品号20200245)仅限于表面而未深入岩石内部,但与岩石颗粒有相互接触,推测其对岩石仍存在侵蚀作用;图3E和3F显示,位于采样点16(洞窟303和洞窟306之间)石窟的中华石果衣*Endocarpon sinense*(样品号20200249)中的菌丝不仅与岩石表面有紧密接触,而且可见已延伸至岩石内部,与岩石颗粒有相互接触,推测对岩石有一定侵蚀作用。

生物侵蚀的产生原因除了物理作用,也与化学作用有很大关系[22-23]。化学作用一般利用生物产生的有机酸等化合物,使石窟表面发生层状片状剥落、风化裂隙等病害。高效液相色谱系统检测结果显示(表4),在8份地衣样品中,石果衣*Endocarpon pusillum*(样品号20200254)、石果衣*Endocarpon* sp.(样品号20200255)和丽石黄衣*Xanthoria elegans*(样品号20200272)含有柠檬酸;地衣待定物种(样品号20200273、20200291、20200293)和黑边石果衣*Endocarpon nigromarginatum*(样品号20200294)含有琥珀酸;黑边石果衣*Endocarpon nigromarginatum*(样品号20200296)含有乳酸和琥珀酸。对从生物结皮复合物中分离培养出的5种非地衣型真菌进行液体培养后,极细枝孢*Cladosporium tenuissimum*(样品号20200202)含有柠檬酸,淡紫拟青霉*Purpureocillium lilacinum*(样品号20200231)、聚多曲霉*Aspergillus sydowii*(样品号20200226)、葡萄汁曲霉*Aspergillus uvarum*(样品号20200274)和桔青霉*Penicillium citrinum*

(样品号20200284)含有2～3种以上的有机酸。

表3　生物结皮样品的高通量测序结果与实验室培养结果比较

Table 3　Comparison of culture results between high－throughput sequencing and culture－dependent methods

样品号 Sample No.	高通量测序结果 High－throughput sequencing result	培养结果 Culture result
20200201	Cyanobacteria 蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	Cyanobacteria 蓝细菌 *Bacillus thuringiensis* 苏云金芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 蜡样芽孢杆菌
20200202	Cyanobacteria 蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	Cyanobacteria 蓝细菌 *Cladosporium tenuissimum* 极细枝孢 *Cladosporium subuliforme* 枝孢属 *Alternaria angustiovoidea* 古链格孢
20200205	Cyanobacteria蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	Cyanobacteria蓝细菌 *Bacillus cereus* 蜡样芽孢杆菌
20200209	uncultured_bacterium	*Cladosporium halotolerans* 耐盐枝孢 *Purpureocillium lilacinum* 淡紫拟青霉 *Cladosporium* sp. 枝孢属
20200212	Cyanobacteria蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	Cyanobacteria蓝细菌 *Bacillus* sp. 芽孢杆菌属
20200216	Chloroflexi 绿弯菌门 unclassified_Fungi 未知真菌	*Chroococcidiopsis*拟色球藻属 *Lelliottia amnigena*河生肠杆菌 Chaetophorales 胶毛藻目
20200226	Nostocaceae 念珠藻科 unclassified_Fungi 未知真菌	*Aspergillus versicolor* 彩色曲霉 *Aspergillus sydowii* 聚多曲霉 *Cladosporium tenuissimum* 极细枝孢 *Bacillus albus* 白色杆菌 Nostocaceae 念珠藻科
20200231	*Tychonema* 常丝藻 unclassified_Fungi 未知真菌	*Tychonema* 常丝藻 *Purpureocillium lilacinum* 淡紫拟青霉 *Cladosporium halotolerans* 耐盐枝孢
20200232	*Rubrobacter* 红色杆菌属 unclassified_Fungi 未知真菌	*Rubrobacter* 红色杆菌属 *Bacillus thuringiensis* 苏云金芽胞杆菌 绿藻 *Thyronectria*乳突赤壳属 *Cladosporium halotolerans* 耐盐枝孢
20200234	*Rubrobacter* 红色杆菌属 unclassified_Fungi 未知真菌	*Rubrobacter* 红色杆菌属 *Aspergillus costaricensis* 曲霉属 *Penicillium atramentosum* 黑绿青霉 *Metarhizium marquandii* 马昆德绿僵菌 *Bacillus wiedmannii* 韦德曼芽孢杆菌
20200242	*Rubrobacter* 红色杆菌属	*Rubrobacter* 红色杆菌属
20200247	unclassified_Potamolinea	*Cladosporium halotolerans* 耐盐枝孢 *Septoriella hibernica* *Bacillus* 芽孢杆菌属
20200268	Beijerinckiaceae拜叶林克式菌科 Micromonosporaceae小单孢菌科 *Scytonema* 伪枝藻 unclassified_Fungi 未知真菌	*Aspergillus* sp. 曲霉属 *Micromonosporaceae* 小单孢菌科 *Scytonema* 伪枝藻

续表

样品号 Sample No.	高通量测序结果 High-throughput sequencing result	培养结果 Culture result
20200274	*Rubellimicrobium* *Microcoleus paludosus* 沼地微鞘藻 *Potamolinea magna* unclassified_Fungi 未知真菌	*Aspergillus uvarum* 葡萄汁曲霉 *Bacillus bingmayongensis* 兵马俑芽孢杆菌
20200284	*Microcoleus paludosus* 沼地微鞘藻 unclassified_Fungi 未知真菌	*Microcoleus paludosus* 沼地微鞘藻 *Collariella robusta* 粗壮围领毛壳 *Collariella carteri* 毛壳属 *Neopyrenochaeta maesuayensis*
20200285	*Microcoleus paludosus* 沼地微鞘藻 Cyanobacteria 蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	*Microcoleus paludosus* 沼地微鞘藻 *Alternaria angustiovoidea* 链格孢属 *Aspergillus ochraceopetaliformis* 赭曲霉
20200288	*Potamolinea magna* 蓝细菌 unclassified_Fungi 未知真菌	*Alternaria angustiovoidea* 链格孢属

表4 不同微生物高效液相色谱法检测到的有机酸

Table 4 Types of organic acids identified in the representative microbe

样品号 Sample No.	微生物类型 Microbial type	含有的有机酸 Organic acid
20200254	石果衣*Endocarpon pusillum*(地衣)	柠檬酸
20200255	石果衣*Endocarpon* sp.(地衣)	柠檬酸
20200272	丽石黄衣*Xanthoria elegans*(地衣)	柠檬酸
20200273	待定物种(地衣)	琥珀酸
20200291	待定物种(地衣)	琥珀酸
20200293	待定物种(地衣)	琥珀酸
20200294	黑边石果衣*Endocarpon nigromarginatum*(地衣)	琥珀酸
20200296	黑边石果衣*Endocarpon nigromarginatum*(地衣)	乳酸,琥珀酸
20200202	极细枝孢*Cladosporium tenuissimum*(真菌)	柠檬酸
20200231	淡紫拟青霉*Purpureocillium lilacinum*(真菌)	草酸,柠檬酸,富马酸
20200226	聚多曲霉*Aspergillus sydowii*(真菌)	乳酸,柠檬酸,富马酸
20200274	葡萄汁曲霉*Aspergillus uvarum*(真菌)	草酸和乳酸
20200284	桔青霉*Penicillium citrinum*(真菌)	乳酸,柠檬酸,富马酸

3 讨论

龙门石窟敬善寺区域的生物病害种类多样,其中主要的生物病害如地衣对石窟的侵蚀既有物理作用,又有化学作用。本研究选择了包括地衣在内的6份与石窟相关且连带岩石的生物样品进行了扫描电镜观察(图2、图3),发现不同生物对石窟岩石的侵害深度不同,真菌菌丝或藻细胞通过石窟岩石纹理由岩石表面的间隙向岩石内部渗透,在湿度影响下发生膨胀或收缩,使文物表面出现碎裂、剥落、空鼓以及崩解等现象。石窟碎裂同时也伴随着化学作用,对地衣以及生物结皮复合物中的真菌检测结果显示,它们至少能分泌1种有机酸,且呼吸产生的CO_2等气体与岩石发生化学反应,加速对石窟的腐蚀过程。地衣是由真菌和藻类或蓝细菌组成的共生联合体[24-25],被称为先锋生物,因地衣重要的生物学特性之一即为风化岩石,助力原始土壤的形成[22,26]。但因为地衣具有不同的生长型,其含有的有机酸种类也不尽相同,因此石质文物上生长的不同种类的地衣致害程度也不完全相同,这也是本研究对不同地衣样

品以及代表性的真菌和藻类样品通过扫描电镜观察和高效液相色谱法进行化学酸检测的原因,以期通过藻细胞、真菌菌丝细胞在岩石上向下生长的深度以及地衣和真菌产生的有机酸情况进行综合判断。

在本研究调查的敬善寺区域中,还鉴定出4种苔藓,分别为灰土对齿藓、卷叶湿地藓、铜绿净口藓、小扭口藓,均属于丛藓科。这4种苔藓的化学相关资料欠缺,因此本研究无法对其产生的化合物进行定向检测。已有研究表明苔藓植物具有多种生物活性,主要含有萜类、甾醇、芳香族化合物、黄酮类化合物及脂类[27-28]。苔藓植物还可以分泌一些酸性物质[29],溶解岩石中的矿物质,降低岩石颗粒之间的凝聚力。据此推断敬善寺区域的4种苔藓也具有潜在的化学侵蚀作用。此推断基于有关其它苔藓的相关报道,并结合了现场观察。苔藓与地衣的物理侵蚀作用类似,利用假根向石质文物内部侵蚀,具有很强的侵蚀深度。本研究中苔藓样品20200217(灰土对齿藓)对石窟表层岩石具有明显的侵蚀作用,该苔藓假根延伸能力较强,与石窟土层形成了高度约38 mm的蜂窝状形貌。苔藓是一类不可忽视的石窟常见植物,敬善寺白云岩石质的高含钙量石材能够为苔藓提供适宜的生长条件,但石窟文物表面苔藓的研究尚不充足,对石窟的作用有待深入研究。

龙门石窟敬善寺调查区域的生物病害除了以个体形式存在的地衣和苔藓外,还包括以结皮形式存在的复合物和沉积物。2种类型的生物病害在石窟的分布情况不同,地衣和苔藓主要覆盖在石窟外周的岩面,以结皮形式存在的复合物和沉积物主要覆盖在石窟内部的岩壁或地面。基于培养和高通量测序综合分析,发现生物结皮主要由包括蓝细菌在内的细菌和真菌组成。虽然生物结皮内的细菌和真菌的生物量相比地衣和苔藓较小,且与石窟接触连接不紧密,随着时间推移,这些生物群落在石质文物上可能会形成连续程度不一的生物膜,从而产生生物腐蚀[2];但最近也有研究指出,以蓝细菌为主要组分的生物结皮覆盖于夯土长城城墙表面,显著增强了城墙抗压强度等系列特性,对长城起到了很好的保护作用[30]。生物结皮内的蓝细菌属于自养微生物,兼具固碳和固氮的重要生态学功能,可以为生物群落中的异养微生物(如异养细菌和真菌)提供有机物质,而本研究显示由生物结皮中分离培养出的真菌,当其大量生长时会产生有机酸,因此石质文物上的生物结皮存在危害隐患。

龙门石窟依山而建,置于户外环境中,因此石窟生物病害受所在周边环境的影响,灰尘及植物残体在石窟上的堆积会为生物提供营养来源从而有助于生物定殖。现场勘察发现真菌和藻类在石窟内外壁面及佛像本身的水迹处更加明显,加之洞窟内地面及角落处存在积水现象,真菌和藻类产生的孢子在潮湿的环境中会进一步定殖在石窟及周边环境,加剧石窟的生物病害。

虽然相比石窟风化、洞窟渗漏水以及危岩体崩塌病害,生物病害破坏程度看似相对较小,但在长期累积效应作用下,其对文物的破坏作用仍不容忽视[3]。

4　结论

本研究首次较为系统的查明了敬善寺区域生物病害物种种类主要由地衣、苔藓、藻类、真菌和细菌组成,其中地衣7种,苔藓3种,藻类1种,真菌20种,可培养细菌7种。地衣和苔藓以个体形式存在,主要覆盖于石窟外周岩壁,与岩壁接触紧密,它们具有明显特征结构,且盖度较大,是敬善寺区域最主要的生物病害,它们对石窟的侵蚀既有物理作用,又有化学作用;不同地衣对石窟岩体的物理侵蚀深度不同,含有的有机酸种类也不尽相同,因此对石窟造成的损伤亦有不同。蓝细菌等细菌、真菌以生物结皮形式存在,主要覆盖在石窟内部的岩壁或地面,与基物接触不紧密,虽然生物量低,但由于生物群落稳定,随时间累积,仍存在危害隐患。生物病害的发育与石窟所处环境密切相关,应通过对石窟微环境控制并定期对生物病害的发展进行监测,有效防治生物病害。

参　考　文　献

[1]Bar-Oz G, Lev-Yadun S. Paleolithic cave rock art, animal coloration, and specific animal habitats[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(20): E1212.

[2]Tretiach M, Bertuzzi S, Candotto Carniel F. Heat shock treatments: a new safe approach against lichen growth on outdoor stone surfaces [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(12): 6851-6859.

[3]魏鑫丽，蒋淑华，魏江春.石质文物地衣生物腐蚀及防治的研究进展[J].菌物学报,2015，34(5):863-870.
Wei X L，Jiang S H，Wei J C. Research progress of lichen biodeterioration and its treatment on stone cultural relics[J]. Mycosystema，2015，34(5)：863-870.

[4]中华人民共和国国家文物局,WW/T002-2007,石质文物病害分类与图示[S].北京：文物出版社,2008:1-13.
National Cultural Heritage Administration. WW/T002-2007，The classification and symbols for the diseases of ancient stone objects[S]. Beijing：Cultural Relics，2008：1-13.

[5]李文生.我国石窟中的优填王造像——龙门石窟优填王造像之早之多为全国石窟之最[J].中原文物，1985，4：102-106.
Li W S. Statues of Udayana in China's grottoes-there are as many status of Udayana in Longmen grottoes as there are in China[J]. Cultural Relics of Central China，1985,4:102-106.

[6]范子龙.龙门石窟微生物病害调查与腐蚀机理探讨[C].中国化学会,2012.
Fan Z L. Investigation of microbial diseases and discussion of corrosion mechanism in Longmen Grottoes [C]. Chinese Chemical Society，2012.

[7]颜菲,葛琴雅,李强,等.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[J].微生物学报，2012,52(5):629-636.
Yan F，Ge Q Y，Li Q，et al. Analysis of microbial community on the surface of the historic stone and nearby rock samples in Yungang Grottoes[J]. Acta Microbiologica Sinica，2012，52(5)：629-636.

[8]Bai F Y，Chen X P，Huang J Z，et al. Microbial biofilms on agiant monolithic statue of Buddha：The symbiosis of microorganisms and mosses and implications for bioweatherring [J]. International Biodeterioration & Biodegradation，2021，156:105106.

[9]Duan Y L，Wu F S，，He D P，et al. Bacterial and fungal communities in the sandstone biofilms of two famous Buddhist grottoes in China [J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2021,163:105267.

[10]武发思,李洁.石质文物微生物研究现状与展望[J].石窟与土遗址保护研究,2022,1(4):14-33.
Wu F S，Li J. The current status and future prospects for microbial research on stone cultural relics[J]. Research on the Conservation of Cave Temple and Earthen Sites，2022，1(4)：14-33.

[11]Rogers S O，Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues[M]//Plant Molecular Biology Manual A6. Boston：Kluwer Academic Publishers，1988：1-10.

[12]Hall T A. BioEdit：a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [C]. Nucleic Acids Symposium，1999. 41(41)：95-98.

[13]Thompson J D，Higgins D G，Gibson T J. CLUSTAL W：improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting，position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research，1994. 22(22)：4673-4680.

[14]Miller M A，Pfeiffer W T，Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees[C]. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans LA，USA. IEEE，2010：1-8.

[15]Stamatakis A. RAxML version 8：a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. Bioinformatics，2014，30(9)：1312-1313.

[16]White T J，Bruns T，Lee S，et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols：a guide to methods and applications. San Diego：Academic Press. 1990：315-322.

[17]Gardes M，Brun T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Molecular Ecology，1993，2(2)：113-118.

[18]Heuer H，Krsek M，Baker P，et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients [J]. Applied and Environmental Microbiology，1997，63(8)：3233-3241.

[19]Culberson C F，Kristinsson H D. A standardized method for the identification of lichen products [J]. Journal of Chromatography A，1970，46：85-93.

[20]Culberson C F. Improved conditions and new data for identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method[J]. Journal of Chromatography A，1972，72(1)：113-125.

[21]Orange A，James P W，White F J. Microchemical methods for the identification of lichens[M]. London：British Lichen Society，2001：1-101.

[22]Chen J，Blume H P，Beyer L. Weathering of rocks induced by lichen colonization—a review[J]. CATENA，2000，39 (2)：121-146.

[23]Wilson M J. Weathering of rocks by lichens with special reference to stonework：a review[M]//Stone Deterioration in Polluted Urban Environments. Boca Raton：CRC Press，2004：67-76.

[24]Honegger R. Functional aspects of the lichen symbiosis[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology，1991，42：553-578.

[25]Hawksworth D L，Grube M. Lichens redefined as complex ecosystems[J]. New Phytologist，2020，227(5)：1281-1283.

[26]Lindsay D C. The role of lichens in Antarctic ecosystems[J]. The Bryologist，1978，81(2)：268-276.

[27]Asakawa Y. Chemical constituents of the bryophytes[M]//Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna：Springer，1995：1-562.

[28]吴秀祯，娄红祥.苔藓植物的化学生态学[J].天然产物研究与开发，2007，19(6)：1073-1078.
Wu X Z，Lou H X. Chemical ecology of bryophytes[J]. Natural Product Research and Development，2007，19(6)：1073-1078.

[29]刘吉开,曾陇梅,吴大刚.苔藓植物活性成分研究进展[J].化学通报，1993，56(2)：1-5.

Liu J K, Zeng L M, Wu D G. Research progress on active components of bryophytes[J], Chemistry, 1993, 56(2):: 1-5.
[30]Cao Y S, Bowker M A, Delgado-Baquerizo M, et al. Biocrusts protect the Great Wall of China from erosion[J]. Science Advances, 2023, 9: eadk5892.

Investigation and research on biological diseases of the Jingshan Temple area in the Longmen Grottoes

Li Xinjian[1], Xu Yanan[2], Yang Qiuxia[2], Xu Peng[3], Wei Xinli[2*]

(*1.Longmen Grottoes Academy, Luoyang 471000, China; 2.State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3.Liaoning Non-ferrous Geological Exploration and Research Institute Co., Ltd., Shenyang 110014, China*)

Abstract: [Objective]Biologic diseases erode open-air stone cultural relics, causing irreversible changes such as surface discoloration and weathering. The Longmen Grottoes is the largest repository of stone carvings in the world, and the Jingshan Temple area is an important part of the Longmen Grottoes. Understanding the biologic diseases of stone cultural relics in this area is of great significance for the protection of the stone cultural relics and the formulation of disease prevention and control measures. [Methods]In this study, sample of biologic diseases on stone cultural relics were collected from 31 sampling points in the Jingshan Temple area. Based on morphological observations and sequencing analysis of ITS and 16S rDNA characteristic fragments, lichens, micro fungi, bacteria, mosses, and algae were identified. The morphology of the biological disease on the relics was observed by scanning electron microscopy. The thin-layer chromatography method was used to detect the chemical acids of lichen thallus, and the high-performance liquid chromatography method was used to determine the chemical acid content of lichens and fungi in the biological crust-like complexes and deposits. [Results]Morphological observations and high-throughput sequencing results showed that the main biologic diseases in the Jingshan Temple area of the Longmen Grottoes were lichens, mosses, algae, fungi, and bacteria, including seven species of lichens, three species of mosses, one species of algae, 20 species of fungi, and at least seven species of cultivable bacteria, mainly including cyanobacteria and actinomycetes. The results of high-throughput sequencing were highly consistent and complementary to the traditional cultivation results. Scanning electron microscopy revealed that different invading organisms had different depths of erosion on stone cultural relics, with non-lichenized fungal hyphae penetrating to a depth of up to 100 μm into the rock. The main biological diseases found in the survey area with obvious characteristic structures and larger coverage were lichens and mosses, among which *Endocarpon sinense* was the most prominent. Organic acids such as citric acid, succinic acid, oxalic acid, lactic acid, and malic acid, were detected in both lichen and fungal samples. [Conclusion]This study systematically investigated the species and distribution of biological diseases of stone cultural relics in the Jingshan Temple area of the Longmen Grottoes for the first time. The diseases and extent caused by the representative organisms were analyzed from the perspectives of cell invasion and organic acids production. The development of biologic diseases is closely related to the microenvironment of the grottoes. The research results provide a theoretical basis for the control of the microenvironment of the grottoes and the prevention and control of biologic diseases of stone cultural relics.

Keywords: Longmen Grottoes, Stone cultural relics, *Endocarpon sinense*, Lichens, Mosses, Organic acids

(编辑:郭玥微)