

The Biological Identification and Optimization of Culture Condition for a *Alternaria* Strain Mold on Paper Relics

Yuwei Zhong¹, Bo Liu², Dacheng Duan¹, Chenshu Liu³, Qijiu Li¹, Songbin Ben^{1*}

¹Liaoning University of Life Sciences, Shenyang Liaoning

²Liaoning Provincial Museum, Shenyang Liaoning

³Liaoning Province Shiyuan High School, Shenyang Liaoning

Email: 732246460@qq.com, *bensongbin007@163.com

Received: Feb. 26th, 2016; accepted: Mar. 18th, 2016; published: Mar. 23rd, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To isolate and identify the fungus on paper heritage as well as optimized culture conditions. **Method:** Through morphology (three implantation, microscopic observation microstructure) and Molecular Biology 18S rDNA ITS sequence amplification a strain on the paper relics is identified. The fungal culture condition is optimized by using single factor analysis and orthogonal test. **Results:** Two identified results showed that it was a strain of *Alternaria* mold (*Alternaria eichhorniae*). The optimum for its cultivation conditions is 28°C, pH 5.5, shaking frequency 125 r/min. **Conclusion:** The strain is identified as a *Alternaria* mold (*Alternaria eichhorniae*) whose culture condition is easier to achieve in our laboratory, which makes basis for further analysis of components of mildew on paper artifacts and cleaning mildew with biological research, and also provides scientific basis for prevention and treatment of mold on paper artifacts.

Keywords

Mold, Microbes, Paper Relics, Culture Conditions, Optimization

纸质文物上一株交链孢霉生物学鉴定及其培养条件的优化

仲雨微¹, 刘博², 段大程¹, 刘辰澍³, 李其久¹, 贲松彬^{1*}

*通讯作者。

文章引用: 仲雨微, 刘博, 段大程, 刘辰澍, 李其久, 贲松彬. 纸质文物上一株交链孢霉生物学鉴定及其培养条件的优化[J]. 生物过程, 2016, 6(1): 24-34. <http://dx.doi.org/10.12677/bp.2016.61004>

¹辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳

²辽宁省博物馆, 辽宁 沈阳

³辽宁省实验中学, 辽宁 沈阳

Email: 732246460@qq.com, bensongbin007@163.com

收稿日期: 2016年2月26日; 录用日期: 2016年3月18日; 发布日期: 2016年3月23日

摘 要

目的: 对带有“霉斑”的纸质文物上的霉菌进行分离鉴定并优化其培养条件。方法: 通过形态学观察(三点植入法、镜下显微结构观察法)与分子生物学18S rDNA ITS序列扩增相结合对纸质文物上霉菌进行鉴定, 采用单因素分析及正交试验对霉菌培养条件进行优化。结果: 两种方法的鉴定结果均显示该菌株为链格孢霉菌(*Alternaria eichhorniae*), 其培养最佳条件为28℃, pH 5.5, 摇床震荡频率125 r/min。结论: 确定该菌为链格孢霉菌(*Alternaria eichhorniae*), 其培养条件实验室较易达到, 为下一步纸制文物上的霉斑成份分析及生物法清洗霉斑的研究奠定基础, 并为纸质文物上霉菌防治提供科学依据。

关键词

霉菌, 微生物, 纸质文物, 培养条件, 优化

1. 引言

我国古代造纸主要原料是植物纤维, 其化学组成为纤维素、半纤维素、木质素, 少量蛋白质和脂质成分等, 这些常成为霉菌微生物培养基, 因此极易受到微生物的侵蚀。“霉斑”即是古代纸质文物受到微生物污染及侵蚀后产生的最主要的结果。其不仅损害文物质地的机械强度而且影响观瞻效果, 更有可能导致文物面貌全非、破坏殆尽。但关于“霉斑”成份研究目前国内外鲜有报道, 所以本文对纸质文物上霉斑处的霉菌进行分离纯化培养及鉴定, 并对其培养条件进行优化。目的是更好地了解污染纸质文物的霉菌的特性, 为下一步对纸制文物上霉斑模拟、霉斑成份分析、以及霉斑生物法清洗的研究奠定基础, 同时为霉菌防治和文物保护提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 文物样本

带有“霉斑”晚清书法作品裱件(表面菌丝体已经处理)。

2.1.2. 仪器设备

台式恒温振荡器、电热恒温培养箱 DNP-9082 型、DYY-2 稳压稳流电泳仪、立式压力蒸汽灭菌器、PCR 仪、可见分光光度计(比色杯)、PH 计、高速冷冻离心机。

2.1.3. 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA): 马铃薯洗净去皮, 200 g 切成小块, 加适量水, 煮沸半小时后, 用 8 层纱布过补滤, 在滤液中加入 10 g 琼脂粉, 20 g 葡萄糖, 最后补足 1000 mL 水分, 分装, 灭菌, 备用。

其中液体培养基和固体培养基成份和配方相同, 只是不加琼脂粉。

2.1.4. 引物

用真菌通用 ITS1 和 ITS4 引物扩增 18S-rDNA 基因片段, 其中上游引物为 ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', 下游引物为 ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', 由上海生物工程有限公司合成。

2.2. 污染霉菌复苏及分离纯化

将文物裱件边上带有“霉斑”部分用紫外局部照射 30 min, 用已灭菌棉签轻轻擦拭霉斑处放入倒有马铃薯培养基的培养皿中, 28℃恒温培养, 待菌落长出后, 进行划线纯化, 反复多次后得到五种纯菌落。将纯化后的菌株, 保存在含液体石蜡的 PDA 斜面试管中(4℃冰箱中保存)。选取一种菌株进行鉴定。

2.3. 三点植入观察法

用已灭菌的接种环蘸取少量上述已纯化好的菌种孢子, 在固体马铃薯培养基上点成三角形三个点。然后将培养皿倒置在 28℃恒温培养箱中培养, 培养 3~7 天后拍照观察并记录菌落特征。

2.4. 插片观察

将无菌盖片以 45°左右的角度并排插入平板培养基中, 插入深度为盖片的三分之一左右。用无菌接种环挑取霉菌的孢子悬液, 接种于盖片与琼脂培养基的交界线上。在 28℃下培养 3 天左右, 显微镜下观察并拍照。

结合菌落特征、镜下结构观察及记录结果, 查找真菌鉴定手册和相关的文献资料, 依据菌种菌落形态、大小、颜色、生长速率、培养基颜色变化以及菌丝体和孢子的形态特征, 进行鉴定。

2.5. 霉菌 DNA 提取

霉菌基因组 DNA 的提取采用简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA 方法[1]。

2.6. 18S rDNA 序列扩增

将上述提取 DNA 作为模板, 以 ITS1 和 ITS4 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系见表 1, PCR 反应条件为: 95℃预变性 3 min, 95℃变性 45 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 重复变性到延伸步骤 28 循环, 72℃延伸 10 min, PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测后拿到上海生物工程有限公司测序。

Table 1. PCR amplification reaction system (50 μl)
表 1. PCR 扩增反应体系(50 μl)

样品 Sample	添加量 Addition amount
10 × PCR Buffer	5 μl
dNTP Mixture	1 μl
Primer 1	1 μl
Primer 2	1 μl
Template DNA	2 μl
Ex-Taq	1 μl
Sterile water	up to 50 μl

2.7. 进化树构建

将测序结果输入 GenBank 中进行同源序列搜索, 利用 CystalX 软件对扩增的 ITS 序列进行对比。然后用 MEGA5.0 软件构建 Neighbor-Joining 分子系统进化树, 并进行 1000 次 Bootstrap 统计学检验。

2.8. 培养条件优化——单因素试验

将已纯化菌落的孢子接种到 PDA 液体培养基中, 28℃, 125 r/min, 摇床培养过夜, 次日扩大培养。未接种的马铃薯液体培养基作对照, 测定 570 nm 波长处不同培养条件下每 4 小时菌液平均 OD 值, 每种条件设 5 个平行实验组。

2.8.1. 温度因素

接种量为 0.5 mL, pH 为 6.5, 摇床频率为 125 r/min, 温度分别为 25℃、28℃、30℃、32℃, 具体操作步骤如上文所述。

2.8.2. PH 因素

接种量为 0.5 mL, 摇床频率为 125 r/min, 温度为 28℃, pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5。具体操作步骤如上文所述。

2.8.3. 震荡频率因素

接种量为 0.5 mL, 温度为 28℃, pH 6.5, 摇床频率分别为 100 r/min、125 r/min、150 r/min、175 r/min。

2.9. 正交试验

根据单因素试验结果, 确定选取采用 3 因素 4 水平的 L16(4³) 正交表进行正交试验[2]-[4]。试验因素见表 2, 所做的 16 组实验中, 每组实验都每隔 4 小时测一次值, 求其 8~36 h 内 OD 值的平均值作为菌体生长的速率标志。根据正交试验极差分析得出该菌的最适培养条件。

3. 结果

3.1. 菌落特征及镜检结果

该菌株在 PDA 固体培养基上气生菌丝发达, 生长迅速, 培养 2 天时, 菌落直径较小, 颜色呈灰黄色, 且边缘长有一圈白色菌丝, 6 天后直径达到 2.5 cm, 菌落呈黑色或墨绿色的绒状或带粉状, 伴随培养时间延长, 边缘白色菌丝消失最终为全黑色。

镜检特征, 菌丝灰色至黑色, 扩散较快, 形状呈倒棒状, 中褐色, 具横隔, 分生孢子常数个成链。具体见图 1, 据以上结果结合手册及文献初步鉴定为交链孢霉目, 黑霉科, 半知菌纲, 交链孢霉属[5] [6]。

Table 2. The test level of factors
表 2. 试验因素水平表

编号 NO.	温度 Temperature (℃)	酸度值 pH	震荡频率 Rotation rate (r/min)	接种量 Medium capacity (mL)
1	25	5.5	100	0.5
2	28	6.0	125	0.5
3	30	6.5	150	0.5
4	32	7.0	175	0.5

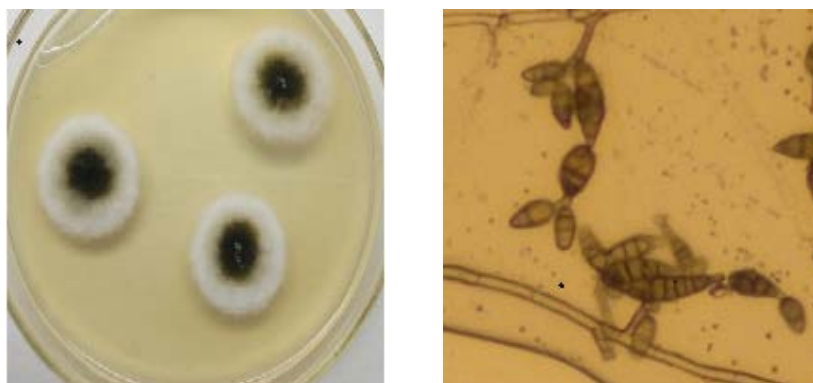


Figure 1. Colony shape of *Alternaria* on PDA and microscopic morphology ($\times 400$)
图 1. PDA 培养基上的 *Alternaria* 的形态及显微结构图($\times 400$)

3.2. PCR 扩增结果

以提取的霉菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳检验结果,由图 2 可知,电泳检测该 DNA 片断大小为 550 bp 左右。

经上海生物工程有限公司测序,其 ITS 序列为 556 bp,所得序列为:

```
CCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTT
ACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTTCGTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACC
ACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGC
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTT
GCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGC
ACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTA
GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC.
```

将所得基因序列提交到 NCBI 数据库中获得登陆号为(Accession number) KT031402,进行同源序列搜索,利用 CUSTALX 软件对扩增的 ITS 序列进行对比。最后用 MEGA5.0 软件构建进化树,并进行统计学检验,所建系统发育树如图 3 所示。结果表明该菌种与 *Alternaria eichhorniae* (KC146356) 聚于同一分支中,其同源性达到 97%,结合形态特征,镜检结果和基于 18S rRNA 基因序列分析结果,可将该菌株确定至属的水平,即确定该霉菌为交链孢霉属。

3.3. 培养条件的优化结果

分别将温度、pH、摇床震荡频率做为变量,在其它因素相同的培养条件下,用 570 nm 波长的分光光度计测定每 4 h 五组菌液的平均 OD 值。

3.3.1. 不同温度对霉菌生长的影响

在 pH 为 6.5,摇床频率为 125 r/min,温度分别为 25℃、28℃、30℃、32℃条件下,霉菌 40 h 内 5 组平行实验的平均 OD 值及相应的生长曲线分别见表 3,图 4。

温度是影响霉菌生长与存活的显著因素之一,从图中可能明显看出,28℃与 32℃前期生长状况相同,但 12 h 之后 28℃明显较 32℃生长较快。其而 30℃前期生长最慢,24 h 后呈上升趋势较明显,综合来看,8 h 到 36 h,28℃生长状况较好。

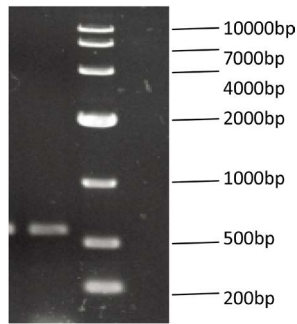
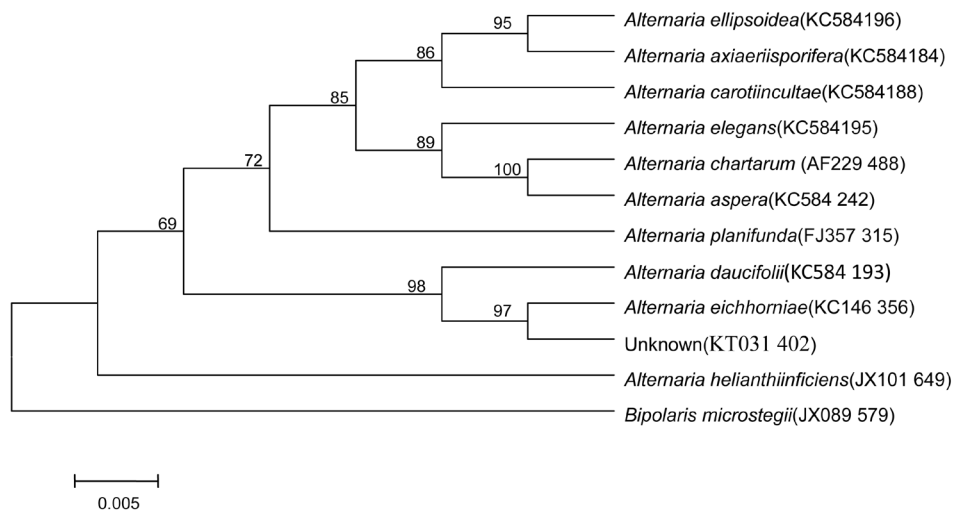


Figure 2. The electrophoresis of *Alternaria*' PCR
图 2. PCR 扩增电泳图



注：括号内为 GenBank 登录号；分支点上的数字为自展值百分比；线段 0.005 为核苷酸替换率。
Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.005 substitutions per nucleotide position.

Figure 3. The construction of Phylogenetic tree
图 3. 系统发育树构建

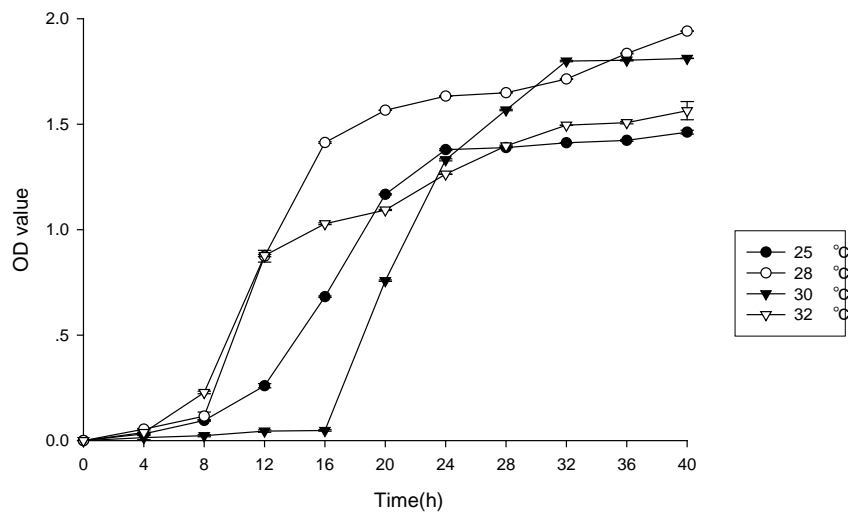


Figure 4. The effect of different temperature on the OD of *Alternaria*
图 4. 霉菌在不同温度下的生长曲线

Table 3. The OD of *Alternaria* under different temperatures
表 3. 霉菌在不同温度下的 OD 值

Test number	Culture times (h)	Average OD			
		25℃	28℃	30℃	32℃
1	4	0.032	0.054	0.014	0.038
2	8	0.095	0.116	0.023	0.228
3	12	0.26	0.874	0.045	0.877
4	16	0.682	1.413	0.048	1.028
5	20	1.167	1.566	0.758	1.093
6	24	1.379	1.633	1.331	1.263
7	28	1.389	1.649	1.567	1.397
8	32	1.412	1.714	1.799	1.495
9	36	1.423	1.835	1.803	1.507
10	40	1.462	1.941	1.812	1.564

3.3.2. 不同 PH 对霉菌生长的影响

在温度为 28℃，摇床频率为 125 r/min，培养基 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 条件下，霉菌 40 h 内的 OD 值及相应的生长曲线分别见表 4，图 5。

众所周知培养基 pH 可引起细胞膜电荷的变化，进而影响微生物对营养物质的吸收，影响代谢过程中酶的活性，改变营养物质的可给性和有害物质的毒性。介质的 pH 不仅影响微生物的生长，甚至影响微生物的形态。为了得到更好的菌斑形态，对菌的 PH 进行优化是非常有必要的。从图 5 可见，pH 在 6.0 时最有利于菌体生长，而 5.5 生长状态也较好，其它三种条件都不利于霉菌的生长。

3.3.3. 不同震荡频率对霉菌生长的影响

在温度为 28℃，pH 为 5.5，摇床震荡频率分别为 100 r/min、125 r/min、150 r/min、175 r/min 条件下，霉菌 40 h 内的 OD 值相应的生长曲线分别见表 5 和图 6。

震荡频率主要是通过增加瓶内气液接触面积、增加液体的湍动程度、增加泡在液体中的停留时间(即增加接触时间)来增加培养瓶内溶解氧的浓度[7] [8]。氧的溶解度对菌体的分散程度，营养物质的吸收都产生很大的影响，与此同时，对微生物的生长代谢，产物活性都有很大关系。因而对震荡频率的控制也很重要。

从图 6 可以看出最有利菌的生长的震荡频率为 125 r/min，其次为 150 r/min。

3.3.4. 正交试验结果

根据单因素结果，进行 L16(4⁵)正交试验，正交试验结果是以 8 h 到 36 h 之间的 OD 值的平均值作为菌种生长的速率。

由表 6 均值极差分析可知，三种因素均对 OD 值产生显著影响。其中温度影响最大，其次为摇床震荡频率、酸度值。温度最优水平为 28℃，pH 最优水平为 5.5，摇床震荡频率最优水平为 125 r/min，最佳组合方法为，温度 28℃，pH5.5，摇床震荡频率 125 r/min。从图 7 正交试验效应曲线图知最佳组合是温度为 28℃，pH5.5，摇床震荡频率 125 r/min，与正交试验结果相符合。

Table 4. The OD of *Alternaria* under different pH
表 4. 霉菌在不同 pH 下的 OD 值

Test number	Culture times (h)	Average OD				
		5.5	6.0	6.5	7.0	7.5
1	4	0.016	0.034	0.065	0.012	0.015
2	8	0.17	0.185	0.078	0.035	0.062
3	12	0.205	0.331	0.109	0.092	0.081
4	16	0.793	1.022	0.107	0.169	0.069
5	20	1.314	1.549	0.901	0.202	0.123
6	24	1.67	1.645	1.611	0.758	0.934
7	28	1.699	1.725	1.558	0.641	1.442
8	32	1.711	1.796	1.642	0.747	1.724
9	36	1.831	1.915	1.714	0.644	1.742
10	40	1.835	1.975	1.723	0.673	1.756

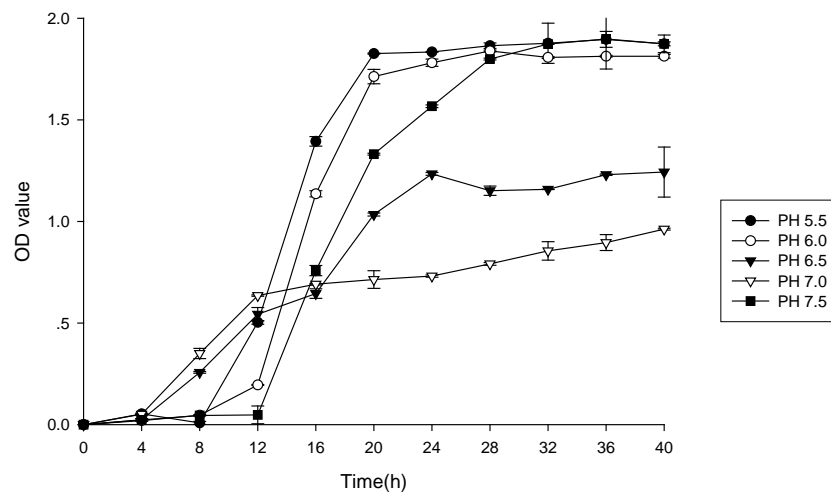


Figure 5. The effect of different pH on the OD of *Alternaria*
图 5. 霉菌在不同 PH 条件下的生长曲线

Table 5. The OD of *Alternaria* under different rotations
表 5. 霉菌在不同摇床震荡频率下的 OD 值

Test number	Culture times (h)	Average OD			
		100 r/min	125 r/min	150 r/min	175 r/min
1	4	0.01	0.02	0.023	0.035
2	8	0.011	0.075	0.045	0.254
3	12	0.024	0.926	0.048	0.305
4	16	0.099	1.571	0.758	0.457
5	20	0.785	1.879	1.331	0.984
6	24	1.319	2.11	1.567	1.264
7	28	1.86	2.113	1.799	1.284
8	32	1.883	2.181	1.873	1.327
9	36	1.89	2.259	1.898	1.541
10	40	1.904	2.264	1.897	1.587

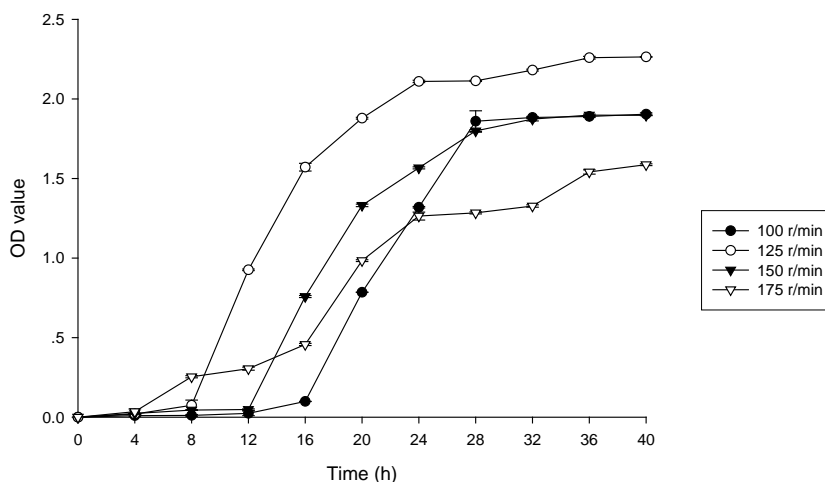


Figure 6. The effect of different rotation rates on the OD of *Alternaria*
 图 6. 霉菌在不同震荡频率下的生长曲线图

Table 6. The orthogonal experiment intuitive results analysis
 表 6. 正交试验直观结果分析表

Test number	影响因素 Factors			OD 均值 Mean
	温度 Temperature (°C)	酸度值 pH	震荡频率 Rotation rate (r/min)	
1	25	5.5	100	0.782
2	25	6.0	125	0.732
3	25	6.5	150	0.824
4	25	7.0	175	1.029
5	28	5.5	125	1.537
6	28	6.0	100	1.762
7	28	6.5	175	0.929
8	28	7.0	150	1.07
9	30	5.5	150	0.723
10	30	6.0	175	1.226
11	30	6.5	100	0.772
12	30	7.0	125	1.762
13	32	5.5	175	1.697
14	32	6.0	150	0.756
15	32	6.5	125	1.078
16	32	7.0	100	0.565
K1	0.842	1.185	0.970	---
K2	1.325	1.119	1.277	---
K3	1.121	0.901	0.843	---
K4	0.483	1.107	1.220	---
R	0.483	0.284	0.434	---
Important order			A > C > B	
Excellent level	A2	B1	C2	
Excellent combination			A2B1C2	

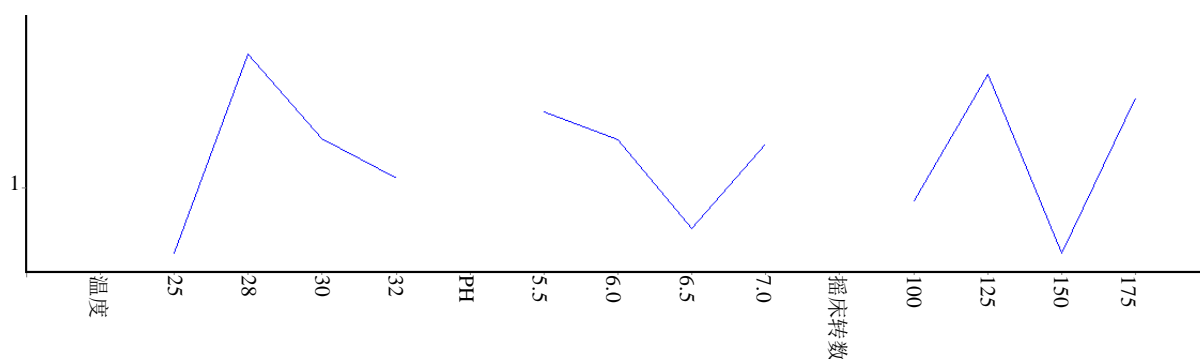


Figure 7. Orthogonal experiment effect graph

图 7. 正交试验效应曲线图

4. 讨论

我国历史悠久，孕育了巨大的文化底蕴。书画等纸质文物作为文化的载体以实物的形态留存并传承下来，在传承过程中不可避免地产生霉斑。霉斑是一种微生物危害，它分解纸张植物纤维作为自身生长所需养分，并代谢产生甲酸、乙酸乳酸等有机酸，造成纸张局部酸性增强、脆性提高，同时，孢子和菌落及其分泌物会在纸质文物上形成附着力较强的黄、红、绿、青、褐、黑等色斑，极不易去除，不但影响文物的原貌和信息的识读性，还大大降低了其历史与艺术价值，如何处理纸质文物的霉斑已成为文保工作的热点领域。

据不完全统计，现在仅有微生物总数的不到 1% 的已知的细菌，已知的真菌不到微生物总数的 5%，这表明还有成千上万的微生物种类有待进一步确认和开发[9]。不同的菌群会产生不同的次级代谢产物，因此，需要对文物上的菌株进行分离鉴定，确定其种属。我们对晚清纸质文物上“霉斑”菌株进行生物复苏、分离，并对其中一株菌进行鉴定，除了简单的形态鉴定外，引进 18srDNA 分子生物学技术，提高了鉴定的准确性。结果确定其为一株链格孢霉菌株(Accession numberKT031402)，与 *Alternaria eichhorniae* (KC146356) 聚于同一分支中，与 *Alternaria daucifolii* (KC584193) 亲缘关系较近，一种广泛存在于纸质文物上的菌株，可以作为“霉斑”的模拟、“霉斑”成份分析的研究对象。对此菌株培养条件进行优化，确定 28℃，pH5.5，摇床震荡频率 125 r/min 为最佳培养条件。该数据不仅为“霉斑”的模拟、成分分析以及清洗等后续工作提供了有利的科学依据，而且在以后文物保护过程中，针对其特性，除了药物防杀外，还可采取避免适宜温度与 pH 范围的环境进行物理防治，这样能尽量地减少霉菌类生物对文物的损害，延缓文物褪变，延长文物寿命，尽可能保存其科学、历史、艺术等价值。

基金项目

国家自然科学基金项目(31371085)；辽宁省教育厅资助项目(2009A310)；辽宁省科学技术计划项目(2010225036)；辽宁大学国家自然科学基金预资助和博士启动项目共同资助。

参考文献 (References)

- [1] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.
- [2] 陆鸿. 正交试验设计[J]. 河南预防医学杂志, 1999, 10(2): 124-126.
- [3] 刘瑞江, 张业旺, 闻崇炜, 汤建. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(9): 52-55.
- [4] 开泰, 长兴. 正交与均匀试验设计[M]. 科学出版社, 2001.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.

- [6] Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition.
- [7] Wang, Y.-H. and Zhang, X. (2007) Influence of Agitation and Aeration on Growth and Antibiotic Production by *Xenorhabdus nematophila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 221-227.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9217-2>
- [8] 洪文荣, 刘致新. 暗霉素产生菌 F-211 发酵工艺完善的研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 61-65.
- [9] Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J. and Proksch, P. (2010) Fungal Endophytes from Higher Plants: A Prolific Source of Phytochemicals and Other Bioactive Natural Products. *Fungal Diversity*, **41**, 1-16.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0034-4>