

## 史前洞窟阿尔塔米拉(Altamira Cave) 壁画微生物群落研究进展

马燕天<sup>1</sup> 武发思<sup>2,3</sup> 马旭<sup>1</sup> 汪万福<sup>1,2,3</sup> 马晓军<sup>1</sup> 安黎哲<sup>1</sup> 冯虎元<sup>1</sup>

(1. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 敦煌研究院 保护研究所, 甘肃 敦煌 736200;

3. 国家古代壁画保护工程技术研究中心, 甘肃 敦煌 736200)

**内容摘要:**在世界各地广泛分布着人类各个发展时期的历史遗迹,这些遗迹是全人类共同的宝贵财富。然而,这些文化遗产自发现以来,遭受了严重的破坏。造成破坏的因素很多,微生物因素是其中一个重要的方面,对这种损害方式的研究正受到越来越多的关注。本文以西班牙的阿尔塔米拉(Altamira cave)洞窟壁画为例,综述其自发现以来的研究历程和主要成果,为我国的文物保护工作提供参考。

**关键词:**阿尔塔米拉洞窟;壁画微生物;文化遗产;文物保护

**中图分类号:**K854.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-4106(2011)06-0115-06

## A Review on a Microbial Community in Prehistoric Altamira Cave Paintings

MA Yantian<sup>1</sup> WU Fasi<sup>2,3</sup> MA Xu<sup>1</sup> WANG Wanfu<sup>1,2,3</sup>

MA Xiaojun<sup>1</sup> AN Lizhe<sup>1</sup> FENG Huyuan<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000;

2. Conservation Institute, Dunhuang Academy, Dunhuang, Gansu 736200;

3. National Research Centre for Conservation of Ancient Wall Paintings, Dunhuang, Gansu 736200)

**Abstract:** Many heritage sites created during the spread of human evolution all over the world are precious to mankind. However, many have been damaged since their discovery. This biological factor was one of the most vital elements that caused damage. Thus, research on microbiological damage to cultural heritage sites has attracted more and more attention. This paper focuses on the research history and main achievements on Altamira Cave in Spain, and provides an example for heritage conservation in China.

**Keywords:** Altamira Cave; Mural; Microbial community; Cultural heritage; Heritage conservation

收稿日期:2010-11-25

基金项目:国家自然科学基金项目(30870438,31070344);国家文物局文物保护科学与技术研究重点课题(20110208)

作者简介:马燕天(1985—),男,甘肃省庄浪县人,兰州大学生命科学学院博士研究生,主要从事微生物生态学研究。

洞窟文物是人类文化遗产的重要组成部分,在世界遗产保护名录中占据了很大的比例。这些洞窟由于其地点的隐蔽性和内部环境的稳定性,其中的文物往往保存了很长的年代,保存状况较好,具有极其重要的保护价值。自这些洞窟发现以来,其中的文物受到了不同程度的破坏。造成破坏的因素很多,包括非生物的(光照、温度、湿度、二氧化碳浓度、降雨等)和生物的(微生物、昆虫等)因素<sup>[1, 2]</sup>。但从根本上说是由于人类的介入引起了洞窟内环境条件的变化,进而加快了洞窟内文物的破坏过程。在大多数洞窟中,生物因素造成的破坏最为严重。微生物的快速生长繁殖和许多穴居昆虫的大量活动往往对文物造成永久性的破坏,而且破坏速度快,影响范围大。如在文物表面的霉变,文物材料的颜色变化<sup>[3]</sup>,昆虫的排泄物和尸体造成的污染等<sup>[4]</sup>。面对这种境况,许多文物保护工作者和微生物学家开始致力于研究洞窟中微生物的群落结构及微生物在文物破坏过程中的详细机制。与此同时,许多珍贵的洞窟已经禁止参观并被完全封闭,以期恢复洞窟中原有的微环境<sup>[5]</sup>。在诸多的洞窟中,数西班牙的阿尔塔米拉洞窟和法国的拉斯考克斯洞窟研究最为详细,已有许多研究结果见诸报道<sup>[6, 7]</sup>。本文以西班牙阿尔塔米拉洞窟的微生物生态研究为例,综述该洞窟壁画微生物的群落结构与环境因子之间的关系,以及洞窟岩画保护措施等方面的研究进展,为我国的文物保护工作提供借鉴和参考。

## 1 阿尔塔米拉洞窟(Altamira Cave)的发现、研究历史

阿尔塔米拉洞窟(Altamira Cave)位于西班牙北部桑坦德省,距离大西洋海岸仅有5公里,洞窟距海平面的平均高度为156米。该洞窟首次发现是在1868年,但其中的壁画却是在1879年由考古学家马塞利诺·德桑图奥拉和他的次女玛丽亚发现。洞窟全长约270米,其中完整地保存着15000年前欧洲旧石器时代晚期的古老岩画,它被认为是史前原绘画的代表和最早的艺术品<sup>[8]</sup>。洞里保持着久远的石器时代面貌,有石斧、石针等工具,还有雕凿平坦的巨大石榻。150余幅壁画集中在长18米、宽9米的入口处的顶壁上,是公元前3万年至公元前1万年左右的旧石器时代晚期的古人绘画遗迹。其中有简单的风景草图,也有红、黑、黄褐等色彩浓重的动物画像:野马、野猪、赤鹿、山羊、野牛和猛犸等。

据考证,壁画颜料取于矿物质、炭灰、动物血和土壤,再掺和动物油脂而成,色彩至今仍鲜艳夺目,达到了史前艺术高峰,具有很高的历史和艺术价值。

阿尔塔米拉洞窟于1917年正式向公众开放,1985年被列入世界遗产名录。洞窟自开放以来,一直受到管理机构的严格保护。早在1950年,一些文物保护专家观察到了洞窟中的环境因素受游客影响巨大,建议限制游客数量,但一直没有得到重视。直到1976年,洞窟内的壁画已经受到了严重的生物侵蚀和破坏,政府为此建立了专门的阿尔塔米拉洞窟保护研究机构展开正式的保护研究,并于1977年关闭了洞窟。调查显示,洞窟参观人数的激增是造成壁画破坏的重要原因。1952年的全年参观人数为30000人,到1957年为60000人,1967年增长到155000人,1973年达到175000人。大量游客的涌入改变了洞窟中的环境条件,破坏了阿尔塔米拉洞窟本来的生态环境。于是在1982年洞窟重新开放时,规定了每年9440人次的参观人数限制。近年来开展了针对洞窟中壁画保护、环境变化等方面的一系列研究,积累了许多宝贵的经验。阿尔塔米拉洞窟壁画是世界学者们重要的研究对象,受到人们的高度重视。

## 2 洞窟微生物的群落结构

许多微生物学家都对阿尔塔米拉洞窟中的微生物群落进行了研究<sup>[9-12]</sup>。Portillo等人(2009)<sup>[13]</sup>利用RNA技术和DGGE相结合,研究了洞窟内岩画上的一些肉眼可见的呈白色的菌斑,结果发现菌落中有代谢活性的主要细菌种类为 $\alpha$ -变形菌(Alfa-proteobacteria),代表性种属为鞘氨醇单胞属相关细菌(Sphingomonas-related bacteria,SRB)。其他优势种类有酸杆菌(Acidobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、 $\beta$ -变形菌(Beta-proteobacteria)、假单胞菌属( $\gamma$ -变形菌)(Pseudomonas)。在整个洞窟内的不同位置采集的白色菌落,其所包含的细菌群落结构非常相似,这可能归功于相同或相似的环境条件。

Portillo等人(2008)<sup>[10]</sup>研究发现了洞窟内两种菌斑中的主要微生物种类属于变形菌门(Proteobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)。在黄色和灰色的菌落中,具有代谢活性的细菌种类分别占总种类数的33%和29%。基于16s rDNA基因文库的研究表明,变形菌门(Proteobacteria)为其中优势

菌属,在黄色菌落中占 68.2%,在灰色菌落中占 78.4%。其中的主要代表性菌为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -变形菌 (Alfa-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria, Delta-proteobacteria) 以及酸杆菌 (Acidobacteria)。基于 RNA 技术的研究在黄色菌落中发现的其他一些细菌种类有厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)。

$\alpha$ -变形菌 (Alfa-proteobacteria) 在两种菌落中存在的主要代表性菌株均为根瘤菌目 (Rhizobiales) 和鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales)。 $\beta$ -变形菌 (Beta-proteobacteria) 在黄色菌落中的代表性菌株为亚硝化单胞菌目 (Nitrosomonadales) 和伯克氏菌目 (Burkholderiales),而在灰色菌落中为陶厄氏菌属 (Thauera)。 $\gamma$ -变形菌 (Gamma-proteobacteria) 在黄色菌落中的代表性菌株为假单胞菌目 (Pseudomonadales),在灰色菌落中为肠杆菌目 (Enterobacteriales)。黄色菌落中还存在  $\gamma$ -变形菌中的着色菌目 (Chromatiales) 和黄单胞菌目 (Xanthomonadales),而在灰色菌落中没有检测到,这两个目的细菌都可以产生色素,这可能与黄色菌落的黄色色变有关<sup>[14]</sup>。在黄色菌落中的有代谢活性的  $\delta$ -变形菌 (Delta-proteobacteria) 的代表性菌株为脱硫弧菌属 (Desulfovibrio),在灰色菌落中为黏细菌目 (Myxococcales)。陶厄氏菌属和脱硫弧菌属均为厌氧菌。这些厌氧菌和其他一些细菌活跃的参与了壁画的损害过程,其他的细菌可能为这些厌氧菌提供了厌氧的微环境,使这些厌氧菌处于岩画的较深层的位置。

为了重现微生物对于石质岩画的侵蚀过程, Jurado 等人 (2009)<sup>[15]</sup> 通过模拟壁画材料的研究分离出了一些真菌,这些真菌主要种属为直立顶孢霉 (Acremonium strictum)、淡色生赤壳菌 (Bionectria ochroleuca)、支孢样支孢霉 (Cladosporium cladosporioides)、刀孢轮枝菌 (Lecanicillium psalliotae) 和马昆德拟青霉 (Paecilomyces marquandii)。这些真菌广泛存在于洞窟的各个地方,各个地点之间并没有发现特殊的种属。

值得注意的是,在阿尔塔米拉洞窟中发现的一些放线菌具有拮抗真菌的特性,如马杜拉放线菌属 (Actinomadura)、拟无枝菌酸菌属 (Amycolatopsis)、诺卡氏菌属 (Nocardia)、小单孢子菌属

(Micromonospora)、红球菌属 (Rhodococcus)、链霉菌属 (Streptomyces) 等,还有一些细菌包括芽孢杆菌属 (Bacillus spp.)、黏球菌属 (Myxococcus spp.)、假单胞菌属 (Pseudomonas spp.)、嗜麦芽寡养单胞菌 (Stenotrophomonas maltophilia) 等,可以产生一些具有生物活性的复合物,这些复合物也可以阻碍真菌的生长<sup>[10,13]</sup>。这些细菌的菌落在阿尔塔米拉洞窟的岩画上及其他沉积物中广泛存在,并且在整个洞窟的生态系统中起着重要的作用。由于这些细菌的拮抗真菌的特点,在一定程度上起到了保护岩画免受真菌侵蚀的作用。在其他的研究中也发现,岩画上长有一些细菌菌落的区域没有真菌的生长,而且在这些细菌菌落样品中检测不到真菌 DNA 的存在。

在 2005 年的研究中,在洞窟墙壁和库顶的样品中发现了代谢活性的古菌,优势种为低温泉古菌 (Low-temperature Crenarchaeota)<sup>[9,16]</sup>。低温泉古菌广泛存在于各种环境中(如洞穴、土壤、海底环境以及淡水系统),表明该菌活跃的参与了生物地理循环。也有研究推测地温泉古菌可能是氨的氧化者,但需要培养及生理性质研究结果的确认<sup>[17]</sup>。该古菌活跃的代谢也说明积极地参与了洞窟岩画的生物侵害过程。详细地研究其在生物侵害中发挥的作用,以及和其他参与侵害的微生物之间的关系,对于文物保护工作者制订合适的文物保护方案和实施文物修复具有重要参考价值。

近年来关于真菌与真菌的昆虫载体之间的关系研究正引起了越来越多人们的关注,成为洞窟文物保护研究的一个重要的研究方向<sup>[18,19]</sup>。一些穴居的昆虫,如石蛾等,它们经常在洞窟中度过夏眠。这些昆虫在进入洞窟的同时带来了外来的真菌。在阿尔塔米拉洞窟深处的走廊里发现了 Stenophylax fissus (一种在西班牙洞窟中常见的石蚕蛾) 的尸体,上边覆盖了一层黄僵菌菌丝束 (Isaria arinosa synnemata)。同时还发现了一些甲虫类昆虫,这些昆虫感染了单端孢菌 (Trichotecium asperum)。

在洞窟环境中,细菌、真菌和节肢动物之间处于一种极为脆弱的平衡关系,通过捕食者和被捕食者之间的营养关系相互发生作用,这种作用经常被大量游客的介入而打乱。外界的一些有机物或无机物,通过各种方式进入洞窟,导致了整个洞窟内生态食物链的失衡甚至崩溃。

### 3 洞窟环境因素对其中微生物群落的影响

微生物菌落在阿尔塔米拉洞窟中的分布受到诸多环境因素的控制,特别是洞窟内部的微环境,其中水分和营养物质最为关键<sup>[20]</sup>。阿尔塔米拉洞窟内部的环境比较稳定,与外界环境之间的能量交换很少,全年的空气温度和相对湿度都比较稳定。在洞窟的入口处,由于受到洞窟外的气候的影响,空气温度变化较大,处于 13.15—17.85℃ 范围内。而在洞窟的内部,空气温度的变化很小,处于 13.25—14.85℃ 的范围内。即使这种轻微的温度变化也在很大程度上是受到了游客参观活动的影响,研究表明在游客进入洞窟后,洞窟内部的温度很快上升至至少 0.25℃,同时洞窟内的二氧化碳浓度至少上升 500ppmv。在 6 月至 9 月这段时间,洞窟内外环境的温度差别较大,外界的温湿空气进入洞窟,使洞窟内的空气更加潮湿,进而在洞窟空气中形成微小的水珠,出现大片的水汽,在洞窟的墙壁上凝结下来。这种空气的交换带来的不仅是大量的水分,还有包含在其中的一些有机物质。

一般将每升的材料中总有机碳(TOC)含量少于 2mg 的环境称为寡营养环境<sup>[21]</sup>。而在阿尔塔米拉洞窟中营养并非限制性因素。在洞窟顶部的表层土中有大量的植物残体,许多的微生物参与了这些残体的降解,这些降解产物随着地表降水逐渐渗透到了洞窟的顶部。这些降解产物主要以脂肪酸和木质素等物质的形式存在,可以为真菌、放线菌和一些异养细菌提供营养<sup>[22,23]</sup>。

在阿尔塔米拉洞窟,游客参观引起的洞窟内部温度和二氧化碳浓度的升高,以及游客携带进去的微生物对洞窟内岩画的影响最大。这些因素对于岩画的损害是一个协同的过程,只有将洞窟内的各种生物和非生物因素结合起来研究,才能全面了解洞窟内的微环境生态,借此制订科学可行的保护方案。

### 4 洞窟壁画微生物研究技术

对于珍贵文化遗产的保护引起来越来越多人的注意,许多针对洞窟岩画的研究随即开展起来。近年来的研究主要采用培养方法和基于 DNA 分子检测技术的方法,但研究的结果表明这两种技术手段得到的结果大相径庭<sup>[24]</sup>。在阿尔塔米拉洞窟

中,基于培养的研究发现岩画中的优势细菌类群为放线菌门(Actinobacteria)<sup>[25,26]</sup>,而基于 16S r DNA 的研究却表明岩画中的主要细菌为变形菌门(Proteobacteria)<sup>[11,27,28]</sup>。在阿尔塔米拉洞窟以前类似的研究也发现培养分离得到的菌株中 70%为放线菌门和厚壁菌门,但这两类细菌在基于 DNA 的试验结果中所占的比例很小。在 Schabereiter-Gurtner 等人(2002)<sup>[28]</sup>的研究中发现洞窟岩画中的优势菌属为变形菌门(52%)和酸杆菌门(24%)。在其他一些有史前壁画的洞窟研究中,这两类细菌也是最主要的种类。

由于微生物细胞中的 RNA 含量与细胞代谢活性成正比,并且 RNA 分子极不稳定,使得 RNA 检测技术可以成功地分辨出“死”、“活”细胞。RNA 分子检测技术是近年来应用较多的技术,其优势在于检测环境中具有代谢活性的微生物<sup>[29]</sup>。和 DNA 技术得到的结果相比较,大约有 20%的细菌类群在 RNA 试验结果中未能检测到,这表明有很大一部分的微生物不具有或具有不可检测的代谢活性。但当洞窟内的微环境发生改变时(如游客的影响),这些没有代谢活性的微生物可能会迅速生长起来,对壁画造成严重的威胁<sup>[30]</sup>。

在环境微生物的监测中,各种技术方法各有利弊,将现代分子技术和传统技术相结合,我们可以获得更加详尽的结果,这样将更有利于文物保护研究<sup>[31]</sup>。一些特别的微生物只有在培养的基础上,我们才能详细了解其生理特点以及对于文物材料的损害机制。DNA 技术可以全面地检测到存在于环境中的各种微生物,而 RNA 技术则可以发现具有代谢活性的菌群。

## 5 展 望

要探索微生物对于洞窟文物的破坏过程,首先就要了解洞窟中微生物的群落结构。以前许多的研究都是针对某一类的微生物(如细菌、真菌或古菌)独立进行的,在经过多次的采样和试验之后才能大概了解洞窟中的微生物群落结构。这些研究的样品往往直接或间接地采自洞窟文物的一部分,多次的采样会不可避免地损害文物。因此,在研究工作的初始阶段就要统筹安排好研究方案,将对文物的损伤程度降到最低。另外,洞窟环境中任何一种生物的存在都不是孤立的,对于其中微生物群落的分析不能局限在对各种微生物存在与否的检测上,而且

要了解它们在整个洞窟生态系统中的位置及它们之间的相互关系。

微生物对于洞窟中文物的损害要受到诸多因素的影响。如洞窟内温、湿度的变化,会导致一部分微生物的大量生长,同时也有一些微生物会因为温、湿度不适宜而停止生长。由于不同微生物其代谢类型的差异,这种微生物群落结构的变化会对洞窟文物产生深远的影响。在像阿尔塔米拉这种喀斯特地貌形成的岩洞中,温、湿度的变化也会引起洞窟岩体中碳酸钙的溶解与脱溶解,进而对洞窟内的岩画造成损害。因此开展洞窟中的微环境条件的监测和控制研究,将有利于维持洞窟中生态系统的稳定。

现代生物技术的发展,使得文物保护研究的手段不断增多。然而,没有任何一种技术可以完全替代传统的方法,在研究工作中需要将不同的技术有机地结合起来。由于文物材料本身非常珍贵,如何使用尽可能少的材料获取最多的信息就成为文物保护研究中需要优先考虑的问题。目前,基于 DNA 和 RNA 的技术已经可以将试验所需的样品降低到毫克的数量级,而一些最新的技术如微阵列技术(Microarray),由于其极度灵敏的检测能力,可以将所需材料减少更多。我们期待更多的新技术可以在文物保护领域发挥作用。

世界范围内众多的文化遗产由于其所在环境条件的不同,保存状态差别很大。适当学习和借鉴其他地区文物保护研究的技术方法,制定适合于当地条件的文物保护研究策略或预防方案,有利于保护人类共同的珍贵遗产。西班牙的阿尔塔米拉洞窟,自发现即受到政府的严格保护,当洞窟出现微生物损害时,管理部门在第一时间封闭洞窟并展开研究,制定保护方案,限制游客数量。在 2001 年人工复制的阿尔塔米拉 II 号洞窟建成,向公众开放。在制定阿尔塔米拉洞窟保护方案的过程中,针对洞窟岩画的研究起到了关键作用,成功地指导了保护方案的实施,具有重要的借鉴意义。

#### 参考文献:

[1]Griffin, P.S., Indictor, N., Koestler, R.J.. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment [J]. *International Biodeterioration &*

- Biodegradation*, 1991, 28(1-4):187-207.
- [2]Warscheid, T., Braams, J.. Biodeterioration of stone: a review[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46(4):343-368.
- [3]冯清平, 马晓军, 张晓君, 李最雄, 李实. 敦煌壁画色变中微生物因素的研究 -I 色变壁画的微生物类群及优势菌的检测[J]. *微生物学报*, 1998, 38(1):52-56.
- [4]汪万福, 马赞峰, 蔺创业, 徐淑青, 刘复玳. 昆虫对石窟壁画的危害与防治研究[J]. *敦煌研究*, 2002(4):84-112.
- [5]Allemand, L., Bahn, P.G.. Best way to protect rock art is to leave it alone[J]. *Nature*, 2005, 433(7028):800.
- [6]Clone, II, Models, A.R.. Cave paintings in jeopardy[J]. *Science*, 2002, 297(5578):47.
- [7]Holden, C.. Wanted: solution for cave mold [J]. *Science*, 2003, 300(5617):245.
- [8]Valladas, H., et al. Direct radiocarbon dates for prehistoric paintings at the Altamira, El Castillo and Niaux caves[J]. *Nature*, 1992, 357: 68-70.
- [9]Gonzalez, J.M., Portillo, M.C., Saiz-Jimenez, C.. Metabolically active crenarchaeota in Altamira Cave[J]. *Naturwissenschaften*, 2006, 93(1):42-45.
- [10]Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C.. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(3):681-691.
- [11]Schabereiter-Gurtner, C., et al. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings [J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(7):392-400.
- [12]Zimmermann, J., et al. Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in altamira cave using 23S rRNA sequence analyses [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2005, 22(7-8):379-388.
- [13]Portillo, M.C., Saiz-Jimenez, C., Gonzalez, J.M.. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of "white colonizations" in the Altamira Cave, Spain [J]. *Res Microbiol*, 2009, 160(1): 41-47.
- [14]Starr, M.P., Stephens, W.L.. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1964, 87(2):293-302.
- [15]Jurado, V., et al. The fungal colonisation of rock-art caves: experimental evidence[J]. *Natur-*

- wissenschaften, 2009, 96(9):1027-1034.
- [16]Hershberger, K.L., et al. Wide diversity of Cre-narchaeota[J]. *Nature*, 1996,384(6608):420.
- [17]Schleper, C., Jurgens, G., Jonuscheit, M. Ge-nomic studies of uncultivated archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005,3(6):479-488.
- [18]Valme, J., Sergio, S.M, Cesareo, S.J.. Ento-mogenous fungi and the conservation of the cul-tural heritage: A review[J]. *International Biode-terioration & Biodegradation*, 2008,62(4):325-330.
- [19]Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009,106(5):1456-1462.
- [20]Sanchez-Moral, S., et al. Inorganic deteriora-tion affecting the Altamira Cave, N Spain: quan-titative approach to wall-corrosion (solutional etching) processes induced by visitors [J]. *Sci Total Environ*, 1999,243-244:67-84.
- [21]Barton, H.A., Jurado, V., Oligotrophy, S.. What's up down there · microbial diversity in Caves[J]. *Microbe*, 2007,2(3):132-138.
- [22]Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B.. The nature of the organic matter present in dripping waters from Altamira Cave[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1999,49:337-347.
- [23]Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B.. Thermally as-sisted hydrolysis and methylation of dissolved organic matter in dripping waters from the Al-tamira Cave [J]. *Journal of Analytical and Ap-plied Pyrolysis*, 1999, 49(1-2):337-347.
- [24]Hugenholtz, P., Goebel, B.M, Pace, N.R.. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998,180(18):4765-4774.
- [25]Groth, I., et al. Actinomycetes in karstic caves of Northern Spain (Altamira and Tito Bustillo)[J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 36:115-122.
- [26]Laiz, L., et al. Microbial communities in caves: Ecology, physiology, and effects on paleolithic paintings [M]// *Art, biology, and conservation: Biodeterioration of works of art*. 2003: 210-225.
- [27]Schabereiter-Gurtner, C., et al. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bac-terial communities[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 211(1):7-11.
- [28]Schabereiter-Gurtner, C., et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolith-ic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma)[J]. *FEMS Mi-crobiology Ecology*, 2004, 47(2):235-247.
- [29]Molin, S., Givskov, M. Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity [J]. *Environmental Microbiology*, 1999,1 (5):383-391.
- [30]Sanchez-Moral, S., et al. Inorganic deteriora-tion affecting the Altamira Cave,NSpain: quanti-tative approach to wall-corrosion (solution etching) processes induced by visitors [J]. *Sci Total Environ*, 1999, 243:67-84.
- [31]Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.. Phylo-genetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995,59(1):143-169.