

应用Illumina MiSeq高通量测序技术研究 白鹤梁水下题刻表面淤泥的微生物组成

唐欢^{1,2} 范文奇^{1,2} 何纳^{1,2} 周理坤^{1,2} 曾檀^{1,2}

(1. 重庆市文化遗产保护科研基地, 重庆, 400015; 2. 重庆中国三峡博物馆馆藏文物有害生物控制研究中心, 重庆, 400015)

摘要 白鹤梁水下题刻是保存于长江水下的重要石质文物, 由于长期位于水下, 所以其表面的微生物病害不同于地面石质文物。本文利用Illumina MiSeq高通量测序技术对附着于白鹤梁水下题刻表面的淤泥进行了微生物群落多样性及组成的分析, 细菌上的相对优势菌门(大于1%) 11个, 其中变形菌门和硬壁菌门细菌种类最多, 分别占比63.66%和67.74%, 在属的水平上, 占比最大的为未知菌(17%), 其次为微小杆菌属细菌(12%)。真菌中, 相对优势菌门仅有2个, 其中未知菌占比达到59%, 其次是子囊菌门(40%)。在属的水平上, 未知菌占比更是达到85%, 其次是镰刀菌属(7%)、座囊菌(2%)和海卷孢属(1%)。霉变文物常检出的青霉属和曲霉属占比分别仅为0.3%和0.2%, 并不是水下题刻表面的主要真菌菌属。由此可见, 水下石质文物表面的微生物群落构成相对简单, 与地面文物存在较大差异, 并且测试样品中存在大量的未知菌, 这些未知菌对于石质文物的影响尚不明确。以上结果为水下石质文物保护提供了新的值得关注的研究方向。

关键词 高通量 水下文物 石质文物 白鹤梁 微生物多样性

引言

石质文物表面的微生物病害是指微生物菌群在石质文物表面及其裂隙中繁衍生长, 导致石质文物表面变色及表层风化的现象^[1]。石质文物多数为不可移动文物, 在户外, 对其保存环境的控制存在较大难度, 因此, 从某种程度上看, 对石质文物开展生物腐蚀防治比可移动文物困难; 同时, 对于石质文物而言, 微生物的侵蚀、破坏作用过程十分缓慢, 不易察觉, 因而更容易被忽视。因此, 与有机质文物的微生物病害调查和防治相比, 石质文物表面的微生物群落调查及其对石质文物的腐蚀机理机制的研究极其有限。

白鹤梁水下题刻是保存于长江水下的重要石质文物, 由于长期位于水下, 文物经年累月的保存环境是江水水环境, 与地面石质文物长期接触的空气环境明显不同。水下题刻表面覆盖一层轻薄的淤泥层, 本文拟对与石质文物表面直接接触的淤泥层内的微生物群落进行分析, 以期对水下

石质文物表面的微生物附着情况进行详细调查,进而为其下一步的保护方案积累微生物病害防治的基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

白鹤梁水下题刻表面由潜水员定期进行清淤工作,因此本实验样品由潜水员在潜入水体开始工作前进行采集。1号样品由水下题刻中央位置获得,2号样品由水下题刻边缘位置获得。

1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒采用E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit (OMEGA, D5625-01), DNA定量使用Qubit 2.0 DNA检测试剂盒 (Life, Q10212), Taq DNA Polymerase (Thermo, Ep0406), Agencourt AMPure XP (Beckman, A63882)。

1.3 主要仪器

本实验使用的主要仪器:台式离心机 (Thermo Fisher, Pico-21), 凝胶成像系统 (美国UVP), Qubit[®] 2.0荧光计 (Invitrogen, Q32866), PCR仪 (BIO-RAD, T100TM Thermal Cycler)。

1.4 DNA提取

具体提取步骤参照OMEGA试剂盒E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit的试剂盒使用说明书 (网址链接: <http://www.omegabiotek.com.cn/Product/109.html>)。

1.5 Illumina Miseq测序、数据处理与统计分析

DNA样品送至上海生工生物工程有限公司进行Illumina MiSeq高通量测序,细菌测序结果与RDP及NCBI数据库进行比对,真菌ITS测序结果与RDP数据库进行比对,分别将样本序列按照序列间的距离进行聚类,然后根据序列之间的相似性将序列分成不同的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU),取97%的相似水平以上的OTU进行生物信息统计分析。

2 结果与分析

2.1 样品细菌群落的组成分析

2.1.1 门水平上的组成分析

由图1可见,两个样品中,优势细菌在门水平上具有一定的相似性,变形菌门和硬壁菌门是水

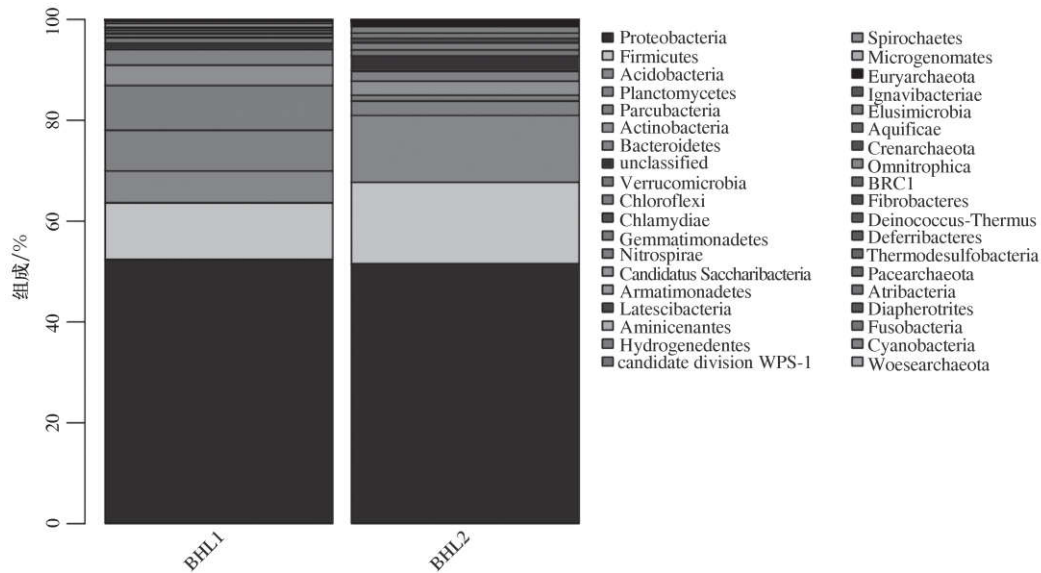


图1 细菌在门水平上的组成分析

下题刻表面淤泥中的主要优势菌，二者分别占两个样品细菌总数的63.66%和67.74%。

1号样品中优势菌门（相对丰度大于1%）有9个，分别是变形菌门（52.42%）、硬壁菌门（11.24%）、Parcubacteria（8.85%）、浮霉菌门（8.12%）、酸杆菌门（6.29%）、放线菌门（4.01%）、拟杆菌门（3.12%）、未经分类（1.26%）、疣微菌门（1.14%），占到1号样品所有细菌比例的96.45%；2号样品中的优势菌门有10个，较1号样品多一类优势菌——绿弯菌门。其中各优势菌门所占比例分别为变形菌门（51.56%）、硬壁菌门（16.18%）、酸杆菌门（13.23%）、未经分类（2.99%）、浮霉菌门（2.85%）、放线菌门（2.79%）、拟杆菌门（2.02%）、绿弯菌门（1.45%）、疣微菌门（1.2%）、Parcubacteria（1.16%）。以上10个门的细菌占到2号样品所有细菌比例的95.43%。

考虑到石刻表面淤泥内的微生物来源主要是水体本身携带及动物代谢产物，因此我们重点比较了本文与一些水环境微生物高通量测序的结果。王绍祥等^[2]对春季水库水样进行16S测序在门水平上的结果显示，优势物种分别是蓝藻门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、No rank、浮霉菌门、绿弯菌门、硬壁菌门、疣微菌门和酸杆菌门。除蓝藻门外，该结果与本文样品的吻合程度极高。这可能是由于白鹤梁的水环境是江水经过净化后流入的，同时参观体内的水与江水相通，始终保持了一定的流动性，因此蓝藻门不是白鹤梁水下题刻表面淤泥的优势菌。

李军^[3]利用高通量测序技术对地下水污染的研究中发现，中度污染区门水平菌群主要包括变形菌门、硬壁菌门、拟杆菌门、Omnitrophica和放线菌门，而与水体溶解氧相关的Omnitrophica在本文中未被检出。

另外，本文检出的优势菌门Parcubacteria已被报道在多种缺氧环境中采集到。而这个门的细菌在1号样品中的相对丰度为8.85%，在2号样品中的相对丰度1.16%，优势地位也较为显著。据Nelson等的研究表明，这类细菌可能是其他生物的共生菌或寄生物^[4]。

2.1.2 纲水平上的组成分析

饼图（图2）显示了两个样品中主要细菌在纲水平上的组成。二者之间的相似性是显而易见的， γ -变形菌（Gamma-proteobacteria）在两个样品中所含比例均超过20%，是最优势的细菌。其次， α -变形菌纲（Alpha-proteobacteria）、 β -变形菌纲（Beta-proteobacteria）以及芽孢杆菌纲（Bacilli）是次优势菌纲。

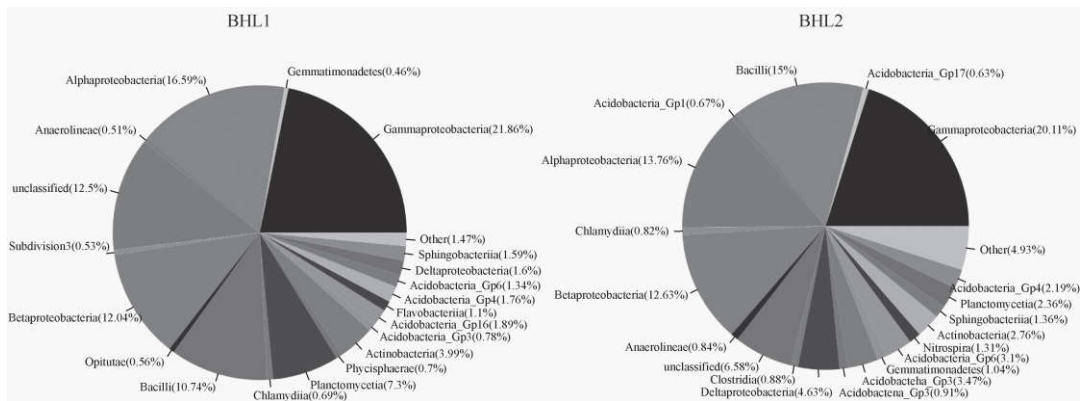


图2 细菌在纲水平上的组成分析

对于地面石质文物表面的微生物组成分析，颜菲等于2012年利用PCR-DGGE（变性梯度凝胶电泳）的方法对云冈石窟石质文物表面及周边岩石样品进行了微生物组成分析^[5]，其结果显示， γ -变形菌纲、鞘脂杆菌门（Sphingobacteria）、 α -变形菌纲和放线菌纲（Actinobacteria）是其主要类群。对比本文的优势菌（门和纲水平上）， γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、芽孢杆菌纲、未经分类、Planctomycetia、 Δ -变形菌纲、酸杆菌门、鞘脂杆菌纲，存在一定的相似性。从两个结果的比较也可以看出，水下石质文物表面的微生物组成较地面文物多样性高，检出物种更为丰富，但由于DGGE能够获得的微生物信息与高通量测序相比本身较为有限，这种结果是由于环境因素、样品本身还是检测技术的不同而呈现差异尚需要进一步研究。但综合两项研究可以得出的一致结果是，石质文物表面的细菌主要群落应包含变形菌、鞘脂杆菌等。

白娜^[6]对黑臭水体内的微生物进行16S rDNA高通量测序得出：水体微生物在纲水平下，优势群落包括 β -变形菌纲（13.3%~31.9%）、 γ -变形菌纲（5.6%~53.4%）、 α -变形菌纲（5.2%~18.3%）、蓝藻纲（0.3%~21.7%）、梭菌纲（0.2%~15.15%）、拟杆菌纲（0~10.2%）、 Δ -变形菌纲（0.1%~10.2%），该结果与李军对污染水体的研究相比具有一定的一致性，蓝藻纲应是水体污染的典型微生物代表，而本文在水下题刻表面淤泥中未检出。

章高森等对故宫石雕房山汉白玉石内生微生物进行了研究，发现石内生微生物群落的初级生存者以蓝藻为主体，而蓝藻会加速石质文物表层的疏松和孔隙形成，引起石质文物变色或生物退化。

白鹤梁水下题刻保存的水环境净化在一定程度上预防了水体污染，对水下题刻具有保护作用。

2.1.3 属水平上的组成分析

热图 (图3) 显示了两个石质文物表面淤泥中细菌在属水平上的组成分析结果。热图用颜色变化来反映群落分布的丰度信息,可以直观地将群落分布丰度值用定义的颜色深浅表示出来。颜色块代表相对物种丰度值,颜色越红表示相对丰富越高,颜色越蓝则反之。同时,热图将样品以及群落分布信息进行聚类并重新排布,将聚类后的结果显示在热图中,因此,可以很好地反映各分类水平上群落分布组成的异同。

就本实验结果看, BHL1和BHL2两个样品的细菌在属的分类水平上大致相似,但也存在一定差异。相同的趋势是2个受试样品中未经分类和微小杆菌属是明显的优势属;差异表现在2号样品中的未经分类和微小杆菌属颜色较1号样品更红,说明2号样品中这两个属的细菌相对丰度较1号样品高。同时,结合热图和数据列表 (表1) 可见,在1号样品中相对丰度较高的紫色杆菌属 (2.96%) 在2号样品中完全没有检出 (0),类似地,2号样品中相对丰度为2.14%的*Dechloromonas*,在1号样品中则并不占优势 (0.54%)。这种情况还见于2个样品中*Parcubacteria_genera_incertae_sedis*、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、*Thermogutta*。总体而言,1号样品的细菌在属的水平上,相对丰度较2号样品高。

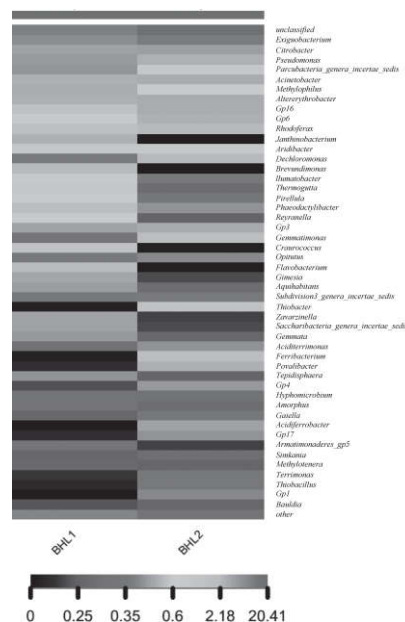


图3 细菌在属水平上的组成分析

表1 样品中细菌在属水平上的占比比较

序号	细菌	在BHL1中的占比/%	在BHL2中的占比/%
1	unclassified (未经分类)	13.53	20.41
2	<i>Exiguobacterium</i> (微小杆菌属)	10.39	14.46
3	<i>Citrobacter</i> (柠檬酸杆菌属)	5.78	6.99
4	<i>Pseudomonas</i> (假单胞菌)	7.82	2.58
5	<i>Parcubacteria_genera_incertae_sedis</i>	8.85	1.16
6	<i>Acinetobacter</i> (不动杆菌属)	2.76	3.52
7	<i>Methylophilus</i> (嗜甲基菌属)	4.17	1.23
8	<i>Altererythrobacter</i> (交替赤杆菌属)	2.29	3.34
9	<i>Gp16</i>	1.89	3.47
10	<i>Gp6</i>	1.34	3.1
11	<i>Rhodospirillum</i> (红育菌属)	1.95	2.18
12	<i>Janthinobacterium</i> (紫色杆菌属)	2.96	0
13	<i>Aridibacter</i>	1.49	1.46
14	<i>Dechloromonas</i>	0.54	2.14
15	<i>Brevundimonas</i> (短波单胞菌属)	2.16	0.02

续表

序号	细菌	在BHL1中的占比/%	在BHL2中的占比/%
16	<i>Ilumatobacter</i>	1.43	0.55
17	<i>Thermogutta</i>	1.55	0.36
18	<i>Pirellula</i> (小梨形菌属)	1.29	0.5
19	<i>Phaeodactylibacter</i>	1.04	0.63
20	<i>Reyranelia</i>	1.25	0.29

颜菲等的研究发现，假单胞菌属细菌在云冈石窟38号窟样品中也是优势种群。假单胞菌是兼性厌氧菌，属于异养微生物，必须利用有机质作为碳源、无机物或有机物作为氮源获得能量而生长^[5]。白鹤梁水下题刻保护体内部的水环境，虽然由江水过滤后获得，但存在大量的河虾和少量的鱼类，这些生物的活动和繁殖无疑为细菌的生长提供了不间断且充足的有机质成分。

2.1.4 样品间的两两比较

图4和图5是差异比较的误差线图，所示为不同物种分类在两个样品中的丰度比例，中间所示为95%置信区间内，物种分类丰度的差异比例， $p < 0.05$ 表示差异显著。

首先看2个样品在门水平上的两两比较（图4），除了Candidate division WPS-1、Parcubacteria、Omnitrophica之外，其余门的丰度在2个样品中存在显著性差异。而且，BHL2中的大部分细菌在门

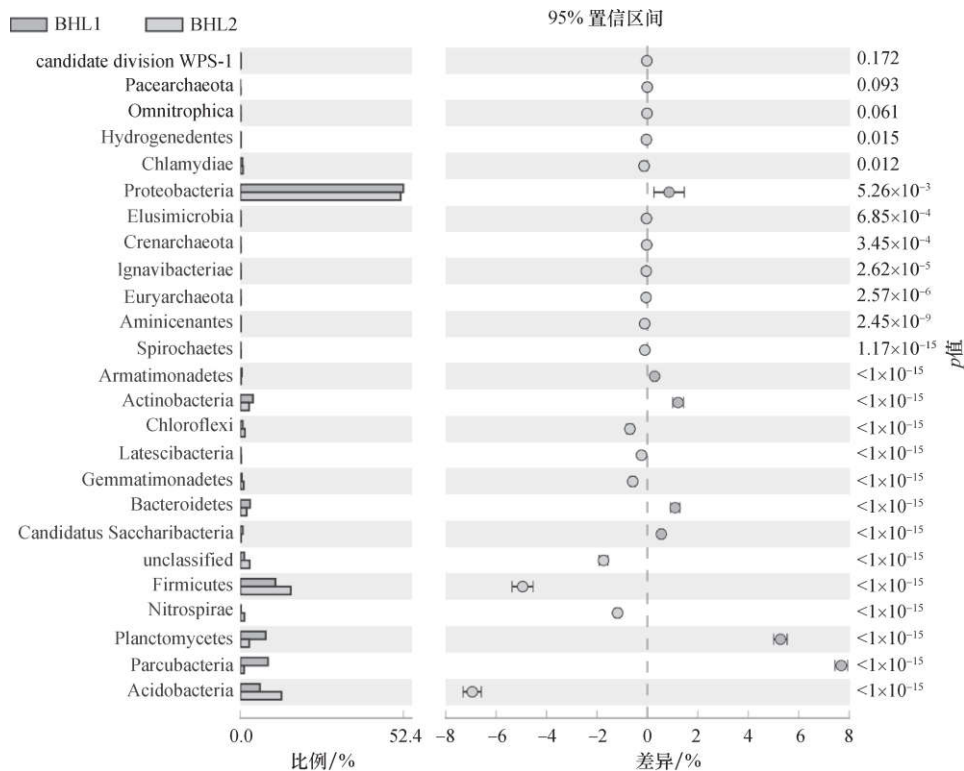


图4 样品中细菌丰度在门水平上的差异比较

水平上相对丰度高于BHL1。2个样品中细菌在属之间的比较结果可见图5，在优势菌属中，未经分类、微小杆菌属、Gp6（酸杆菌属）、Gp16（酸杆菌属）等在2号样品中的相对丰度显著大于1号样品（ $p < 0.05$ ）；*Parcubacteria_genera_incertae_sedis*、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、紫色杆菌属（*Janthinobacterium*）等在2号样品中的相对丰度显著小于1号样品（ $p < 0.05$ ）。

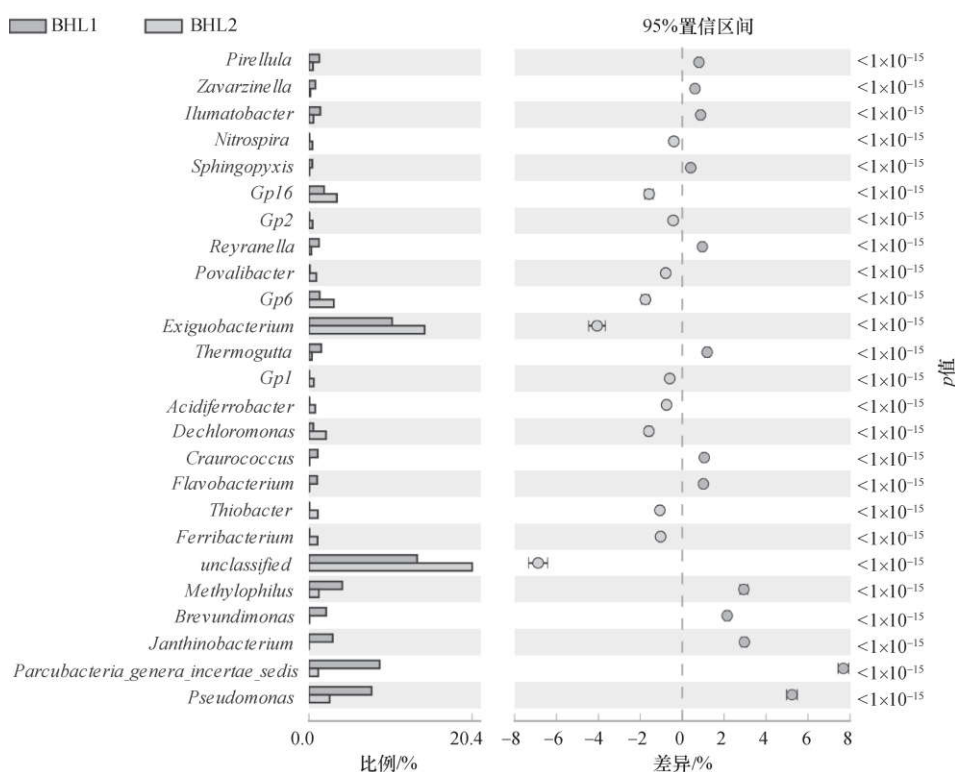


图5 样品中细菌丰度在属水平的差异比较

2.2 样品真菌菌落的组成分析

2.2.1 门水平上的组成分析

与细菌热图的复杂相比较，真菌组成的热图色块很少，该结果直观表明水下题刻表面淤泥中的微生物组成上，真菌的多样性远远低于细菌（图6）。两个样本中，相对丰度大于1%的优势菌菌门主要包括未知菌和子囊菌门（*Ascomycota*），仅这两类即分别占到两个样品中真菌比例的99.46%、99.02%，是占有绝对优势的真菌类群。其余检出的真菌分属于担子菌门（*Basidiomycota*）、接合菌门（*Zygomycota*）、壶菌门（*Chytridiomycota*）、小孢子虫目（*Microsporidia*）。

2.2.2 纲水平上的组成分析

群落结构分布柱形图（图7）的结果可见，在纲的水平上，2号样品中的优势菌有5种，而1号样

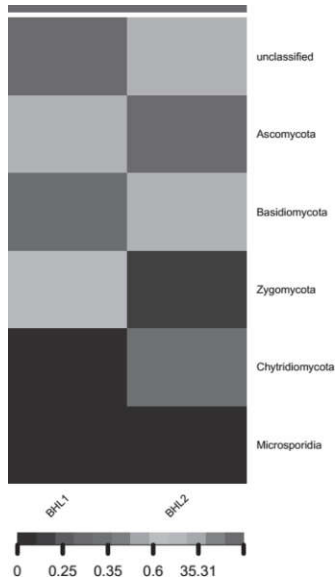


图6 真菌在门水平上的组成分析

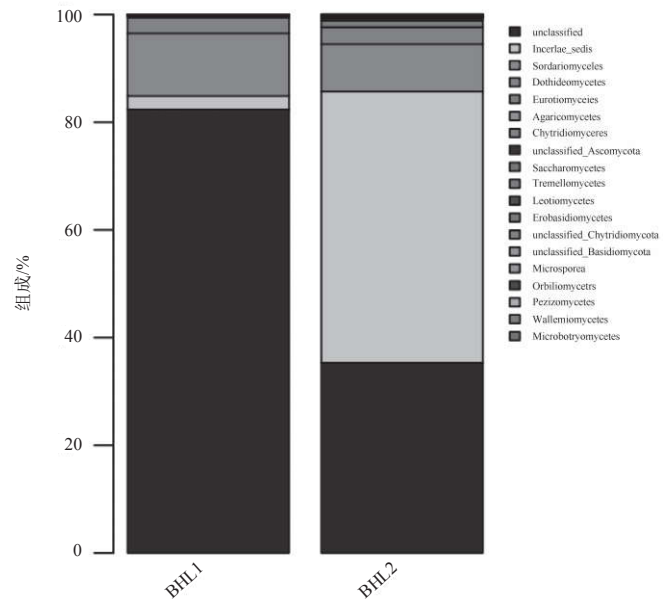


图7 真菌在纲水平上的组成分析

品有4种。这些优势菌包括未知菌、Incertae_sedis（分类地位未定）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、座囊菌纲（Dothideomycetes）、散囊菌纲（Eurotiomycetes）等。值得注意的是2个样品的差异较为明显，如Incertae_sedis是2号样品的优势菌（50.39%），在1号样品中却只占2.52%；未知菌在1号样品中占82.36%，在2号样品中只占35.31%。

2.2.3 属水平上的组成分析

在属的水平上，从图8和表2可见，2号样品的相对丰度高于1号样品，同时，在2个被测样品中，未知菌的真菌种属占比均较高，尤其是在1号样品中，占比超过80%。同时，分类地位尚不能确定的属在2号样品中比例最大，占比超过50%。

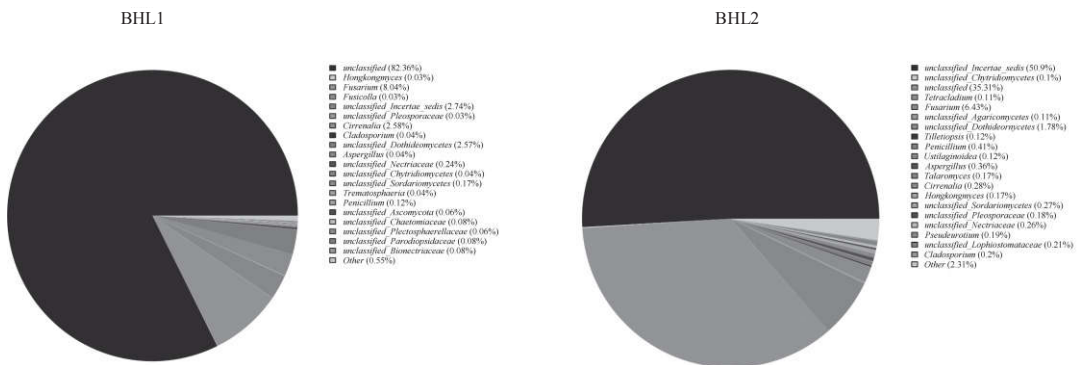


图8 真菌在属水平上的组成分析

表2 样品中真菌在属水平上的占比比较

序号	Genus	在BHL1中的占比/%	在BHL2中的占比/%
1	unclassified未经分类	82.36	35.31
2	unclassified-Incertae-sedis (未经分类 地位未定)	2.74	50.9
3	<i>Fusarium</i> (镰刀菌属)	8.04	6.43
4	unclassified Dothideomycetes (未经分类 座囊菌纲)	2.57	1.78
5	<i>Cirrenalia</i> (海卷孢属)	2.58	0.28
6	unclassified Nectriaceae (未经分类 丛赤壳科)	0.24	0.26
7	<i>Penicillium</i> (青霉菌属)	0.12	0.41
8	unclassified Sordariomycetes (未经分类 粪壳菌纲)	0.17	0.27
9	<i>Aspergillus</i> (曲霉属)	0.04	0.36
10	<i>Cladosporium</i>	0.04	0.2
11	unclassified Lophiostomataceae (未经分类 扁孔腔菌科)	0.02	0.21
12	unclassified Pleosporaceae (未经分类 假球壳科)	0.03	0.18
13	<i>Hongkongmyces</i>	0.03	0.17
14	<i>Talaromyces</i> (蓝状菌属)	0.03	0.17
15	<i>Pseudeurotium</i>	0	0.19
16	unclassified Ascomycota (未经分类 子囊菌门)	0.06	0.09
17	unclassified-Chytridiomycetes (未经分类 壶菌纲)	0.04	0.1
18	unclassified-Chaetomiaceae (未经分类 毛壳菌科)	0.08	0.04
19	unclassified Plectosphaerellaceae (未经分类 Plectosphaerellaceae)	0.06	0.05
20	<i>Tilletiopsis</i> (腥掷孢菌属)	0.01	0.12

可见, 2个样品的真菌多样性分析中存在大量未知信息。另外, 镰刀菌属、座囊菌和海卷孢属也是2个样品中的优势属。馆藏文物中常见的真菌污染主要为青霉菌属和曲霉属, 在样品1和样品2中分别也有少量检出, 但不是优势菌属。

2.2.4 样品间的两两比较

无论在门或属之间, 两个样品在优势真菌种类的比较中均存在显著性差异(图9和图10)。

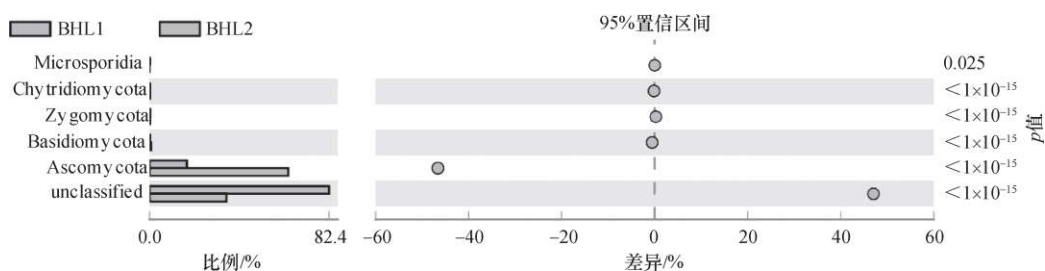


图9 样品中真菌丰度在门水平上的差异比较

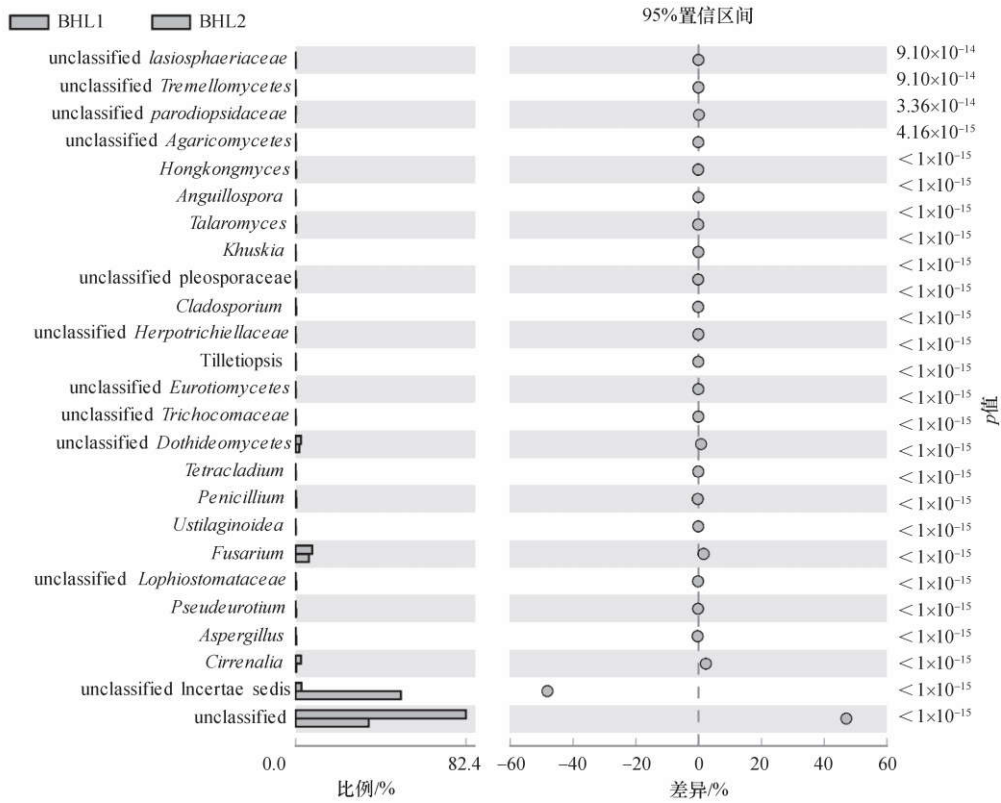


图10 样品中真菌丰度在属水平的差异比较

从整个真菌的高通量测序结果可见，真菌群落多样性分析较细菌分析获得的信息量少，这是因为真菌多样性分析本身的引物信息、数据库都有限，导致类似研究较少，故大部分研究仅仅止步于细菌的群落结构分析。本文获得的水下石刻表面淤泥内的真菌多样性结果，可丰富相关的数据库，为后续真菌群落多样性研究提供资料。

尽管结果有限，但是不难发现，与有机质文物表面霉变的真菌群落分析结果对比，霉变文物表面经常检出的青霉菌属、曲霉属、枝孢属、毛壳属等，都不是水下淤泥中的优势菌种属，取而代之的是镰刀菌属和海卷孢属，而青霉属和曲霉属虽也有检出，但相对丰度极小。

结 语

本文利用Illumina MiSeq高通量测序技术研究白鹤梁水下题刻表面淤泥内的微生物组成，发现水下石质文物表面的微生物群落构成相对简单，与地面文物表面存在较大差异，并且测试样品中存在大量的未知菌，这些未知菌对于石质文物的影响尚不明确。

值得指出的是，本文的两个样品中均未检测到蓝藻纲，而定期检测水体中的蓝藻可以作为白鹤梁水下题刻水体净化检测的指标，用于进一步判断微生物在石质文物表面产生侵蚀的发生风险。

参 考 文 献

- [1] 国家文物局. 石质文物病害分类与图示 [S]. 北京: 文物出版社, 2008.
- [2] 王绍祥, 杨洲祥, 孙真, 等. 高通量测序技术在水环境微生物群落多样性中的应用 [J]. 化学通报, 2017, 77 (3): 196-203.
- [3] 李军. 高通量测序技术及其在地下水污染研究中的应用 [D]. 北京: 中国地质科学院, 2018.
- [4] Nelson W C, Stegen J C. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6 (713): 713.
- [5] 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.
- [6] 白娜. 典型区域黑臭水体形成的微生物学过程探究 [D]. 北京: 首都经济贸易大学, 2018.