

本文引用:黄永超,李慧君,安珍,等.新乡市大气细颗粒物中细菌种群多样性及分布特征[J].新乡医学院学报,2019,36(7):615-618. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.07.004.

【基础研究】

新乡市大气细颗粒物中细菌种群多样性及分布特征

黄永超,李慧君,安珍,徐光翠,范威,单怡凡,姜静,张丰泉,李海斌,吴辉,吴卫东
(新乡医学院公共卫生学院,河南省国际联合实验室,河南新乡453003)

摘要: **目的** 研究新乡市大气细颗粒物($PM_{2.5}$)中细菌种群多样性及分布特征。**方法** 采集4个季节 $PM_{2.5}$ 样品,利用高通量测序技术分析种群结构及其多样性。**结果** 冬季大气中 $PM_{2.5}$ 浓度最高,其次为春季、秋季和夏季。在细菌门的水平上,4个季节相对丰度最高的是变形菌门。春季和夏季丰度相对较高的菌属均为乳杆菌属,秋、冬季丰度相对较高的菌属分别为未鉴定线粒体、未鉴定叶绿体。4个季节大气 $PM_{2.5}$ 中细菌群落相对丰度依次为春季>冬季>夏季>秋季,4个季节大气 $PM_{2.5}$ 中群落多样性依次为夏季>春季>冬季>秋季。春季、夏季、秋季大气 $PM_{2.5}$ 中细菌群落Beta多样性指数两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),春季和冬季大气 $PM_{2.5}$ 中细菌群落Beta多样性指数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 新乡市大气 $PM_{2.5}$ 中细菌种群具有显著的季节变化特征,春季和冬季 $PM_{2.5}$ 中细菌丰度也相对高于夏季和秋季。

关键词: 大气污染;细颗粒物;细菌种群;高通量测序

中图分类号: R122 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2019)07-0615-04

Biodiversity and distribution characteristics of bacteria in atmospheric particulate matter in Xinxiang city

HUANG Yong-chao, LI Hui-jun, AN Zhen, XU Guang-cui, FAN Wei, SHAN Yi-fan, CHAO Ling, ZHANG Feng-quan, LI Hai-bin, WU Hui, WU Wei-dong

(School of Public Health, Xinxiang Medical University, Henan International Collaborative Laboratory for Health Effects and Intervention of Air Pollution, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To study the biodiversity and distribution characteristics of bacteria in atmospheric particulate matter ($PM_{2.5}$) in Xinxiang. **Methods** $PM_{2.5}$ samples in four seasons were collected and its bacterial biodiversity and community structure were analyzed by using high throughput sequencing technology. **Results** $PM_{2.5}$ concentration was highest in the winter, followed by the spring, autumn and summer. At bacteriophyta level, *Proteobacteria* was the most abundant phylum in $PM_{2.5}$ samples in the four seasons. *Lactobacillus* was higher in relative abundant in $PM_{2.5}$ samples in the spring and summer, and unidentified mitochondria, unidentified chloroplast were relatively higher in abundance in the autumn and winter. The order of bacterial abundance of $PM_{2.5}$ in the four seasons were spring > winter > summer > autumn, while the bacterial biodiversity of $PM_{2.5}$ in the four seasons were summer > spring > autumn > winter. There was statistic difference in the Beta diversity index of bacterial community in $PM_{2.5}$ among spring, summer and autumn ($P < 0.05$); there was no statistic difference in the Beta diversity index of bacterial community in $PM_{2.5}$ between the spring and winter ($P > 0.05$). **Conclusion** The bacterial biodiversity of the $PM_{2.5}$ samples significantly varies with season. The bacterial abundance in spring and winter are relatively higher than summer and autumn.

Key words: air pollution; particulate matter; bacteria community; high-throughput sequencing technology

细颗粒物(particulate matter, $PM_{2.5}$)极易被人体吸入并进入全身血液循环,对人体健康造成较大危

害^[1-2]。已有较多研究关注 $PM_{2.5}$ 化学组分对健康的影响^[3-4]。细菌在近地面空气中普遍存在^[5],且 $PM_{2.5}$ 中的微生物具有引发组织炎症并传播人类、植物和家畜病原菌等危害^[6],也是反映环境空气质量的重要指标。王步英等^[7]分析了北京市冬季重度霾污染期间 $PM_{2.5}$ 和 PM_{10} 中细菌群落特征,结果显示,细菌种属多样性较高且检测到致病菌属的存在。大气中细菌菌属对营养及生长因子的需求比较多,这就导致了培养基选择上的困难^[8],基于培养

DOI:10.7683/xyxyxb.2019.07.004

收稿日期:2018-11-22

基金项目:国家重点研发计划资助项目(编号:2016YFC0900803,

2017YFD0400301);国家自然科学基金面上项目(编号:81573112);

国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201610472056)。

作者简介:黄永超(1993-),男,河南周口人,学士,研究方向:卫生检验与检疫。

通信作者:吴卫东(1963-),男,河南商丘人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:空气污染与健康;E-mail:wdwu2013@126.com。

方法获得的微生物信息可能会遗漏一些重要的致病细菌或过敏源^[9]。高通量测序技术相比传统的培养方法有着巨大的优势,利用高通量测序分析技术对细菌基因组中高度保守又特异性变化的16S区进行测序分析,能检测到大量不可培养的菌种,尤其是低丰度菌种,高通量测序技术已成为微生物生态学研究的一个有效的技术工具^[10]。本研究以PM_{2.5}中细菌种群为研究对象,采集新乡市4个季节大气PM_{2.5}样品,利用高通量测序术对PM_{2.5}中的细菌种群结构进行检测分析,讨论4个季节大气PM_{2.5}中细菌种群分布特征和季节变化差异,旨在了解该地区大气环境的质量状况,为从微生物角度阐明PM_{2.5}对人体健康的影响提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器 TE-6070 大流量颗粒物采样器(美国 Tisch 公司),高纯玻璃纤维滤膜(北京赛福莱博科技有限公司),二氧化硫分析仪、43i 氮氧化物分析仪、48i 一氧化碳分析仪、49i 臭氧分析仪、1405-BEF PM₁₀颗粒物监测仪、1405F-BVF PM_{2.5}颗粒物监测仪、146i-DT3BEAA 多元动态校准仪、111-B2R 零气发生器、WS500-umb 气象五参数(丹麦 HernoScientific 公司),810H 数据采集仪(深圳研祥智能科技),YQTS-711 减压阀(上海减压阀厂)。

1.2 PM_{2.5}样品采集 采样地点在新乡医学院院系楼楼顶(采样口距离地面约22 m)。采样时间选择春、夏、秋、冬4个季节任意时间,每个季节采样3 d,春季、夏季、秋季、冬季采样时间分别为2017年4月、2017年9月、2017年11月、2018年1月。每天采样24 h(当日10:00至次日10:00)。每天采样结束后的滤膜置于-20℃下保存,每个季节采样结束后统一提取PM_{2.5}样品细菌基因组DNA。

1.3 4个季节空气质量和气象指标测定 分别于取样结束后记录由1.1所列仪器自动测定的空气质量指标(PM_{2.5}、PM₁₀、SO₂、CO、NO₂、O₃)和气象指标温度(temperature, T)和相对湿度(relative humidity, RH),取24 h平均值。

1.4 PM_{2.5}样品细菌基因组DNA提取和高通量测序 采用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)对PM_{2.5}中细菌基因组DNA进行提取,质量分数1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA纯度。利用16S V4区特异引物515F(5'-GTTTCGGTCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5'-GCCAATGGACTACHVGGGTWTCTAAT-5')进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,反应条件为98℃预变性1 min;98℃变性10 s,50℃退火30 s,72℃延伸30 s,共30个循环;72℃

延伸5 min。使用TruSeq™ DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒对PCR产物进行文库构建,经过Qubit和实时定量PCR(real-time quantitative PCR, Q-PCR)定量,文库合格后使用Illumina HiSeq 2500 PE250进行高通量测序,由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.5 数据分析 利用Qiime对序列进行过滤并与Gold数据库比对去除嵌合体序列,再利用Uparse软件对有效数据进行聚类,按照97%的标准将序列聚类为一个可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),同时将OTUs中出现频数最高的序列作为该OTUs的代表序列,并对其进行物种注释。再应用Qiime软件计算Alpha多样性(Chao1指数、ACE指数、Shannon指数、Simpson指数),Chao1和ACE表示细菌群落丰度,其值与细菌种群的丰度成正比关系,Shannon和Simpson指数与细菌群落多样性程度成正比。使用R软件绘制稀释曲线,稀释曲线可说明测序数据量的合理性,并可反映物种丰富度。当曲线变化趋向平缓时,说明更多的测序量只会产生少量新物种,测序数据量比较合理,通过横坐标OTUs的数量比较可反映样品中物种的丰富程度。Beta多样性分析是计算组间群落结构差异的统计分析方法,从而对不同季节PM_{2.5}样品中的细菌群落差异进行比较分析。应用SPSS22.0软件计算空气质量指标和气象指标等描述性统计参数,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过wilcoxon秩和检验分析4个季节PM_{2.5}中细菌群落Beta多样性是否有差异,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 4个季节空气质量和气象资料 结果见表1。4个季节的PM_{2.5}浓度,冬季最高,其次为春季、秋季和夏季;PM_{2.5}污染在冬季和春季最为严重。夏季O₃浓度最高,其余依次为春季、冬季和秋季;O₃污染在夏季最为严重。春季、夏季和秋季的相对湿度差别不大,冬季相对湿度最低。

表1 4个季节空气质量和气象资料

Tab.1 Air quality and meteorological information in the four seasons ($\bar{x} \pm s$)

指标	春季	夏季	秋季	冬季
T/℃	17.5±0.5	28.5±3.5	10.2±4.6	-0.1±3.8
RH/%	58.0±9.0	52.3±17.1	57.0±9.0	44.2±14.4
PM _{2.5} /(μg·m ⁻³)	83.7±21.5	50.0±15.9	80.3±46.7	86.7±84.1
PM ₁₀ /(μg·m ⁻³)	156.0±25.6	89.0±26.2	155.3±67.4	128.0±106.2
SO ₂ /(μg·m ⁻³)	61.7±7.8	54.3±11.0	74.7±18.5	60.0±35.9
CO/(μg·m ⁻³)	1.9±0.2	1.0±0.5	1.3±0.3	1.6±1.1
NO ₂ /(μg·m ⁻³)	32.7±4.9	21.3±11.2	29.3±6.7	28.3±24.1
O ₃ /(μg·m ⁻³)	65.7±8.5	176.0±25.7	23.0±14.7	40.0±15.7

2.2 4个季节 PM_{2.5} 样品稀释曲线 结果见图1。4个季节 PM_{2.5} 样品的稀释曲线均逐渐趋向平缓,说明测序量能够真实反映4个季节 PM_{2.5} 样品中的细菌群落组成,4个季节 PM_{2.5} 中细菌丰度依次为春季 > 冬季 > 夏季 > 秋季。

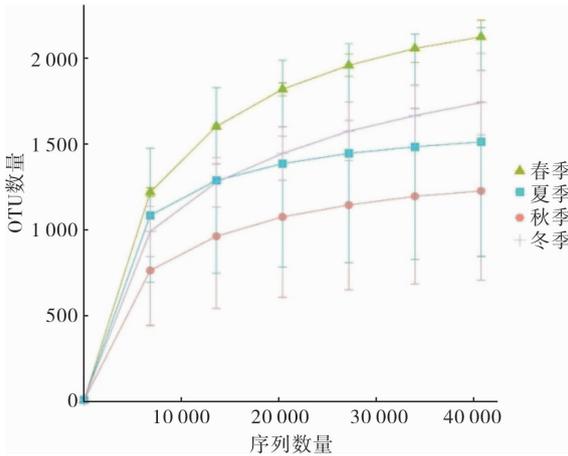


图1 4个季节 PM_{2.5} 样品稀释曲线

Fig.1 Rarefaction curves of PM_{2.5} samples in four seasons

2.3 4个季节 PM_{2.5} 中细菌群落组成 4个季节大气 PM_{2.5} 中共检测到51个细菌门,相对丰度居前10位的分别为变形菌门、放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、蓝藻门、酸杆菌门、疣微菌门、芽单胞菌门、绿弯菌门及浮霉菌门(表2),其中,前4个细菌门相对丰度均在5.24%以上。

在菌属水平上,共检测到941个菌属,相对丰度居前10位的菌属分别为未鉴定叶绿体、水栖菌属、假单胞菌属、副拟杆菌属、未鉴定线粒体、大肠埃希菌·志贺菌属、双歧杆菌属、乳杆菌属、副球菌属、阿克曼菌属(表3)。春、夏、秋、冬季节相对丰度较高的菌属分别为乳杆菌属、乳杆菌属、未鉴定线粒体、未鉴定叶绿体。菌属水平未知菌属所占比例较高,春、夏、秋、冬4个季节分别为28.90%、42.78%、26.97%、29.49%。

表2 4个季节 PM_{2.5} 样品中前10位细菌门类相对丰度

Tab.2 Relative abundance of the top 10 bacterial phyla in PM_{2.5} samples in four seasons

细菌门	春季	夏季	秋季	冬季
变形菌门	37.35%	34.23%	41.81%	28.65%
放线菌门	24.26%	16.91%	13.88%	9.86%
厚壁菌门	23.90%	17.76%	23.79%	26.63%
拟杆菌门	5.24%	7.49%	12.01%	15.84%
蓝藻门	3.44%	0.48%	2.96%	9.49%
酸杆菌门	1.71%	6.90%	0.66%	1.66%
疣微菌门	0.47%	3.86%	0.43%	2.46%
芽单胞菌门	0.82%	2.46%	0.24%	0.85%
绿弯菌门	0.89%	2.29%	0.35%	0.94%
浮霉菌门	0.39%	1.25%	0.22%	1.08%

表3 4个季节 PM_{2.5} 样品中前10位细菌属相对丰度

Tab.3 Relative abundance of the top 10 bacterial genera in PM_{2.5} samples in four seasons

细菌属	春季	夏季	秋季	冬季
未鉴定叶绿体	3.38%	0.33%	2.90%	9.27%
水栖菌属	0.02%	0.46%	4.13%	0.02%
假单胞菌属	0.49%	1.10%	2.22%	5.30%
副拟杆菌属	0.03%	0.10%	4.00%	0.20%
未鉴定线粒体	1.18%	0.22%	4.57%	1.53%
大肠埃希菌·志贺菌属	0.16%	0.97%	3.41%	2.01%
双歧杆菌属	0.05%	0.40%	3.11%	0.99%
乳杆菌属	7.01%	3.58%	2.74%	1.29%
副球菌属	2.89%	0.16%	0.73%	0.44%
阿克曼菌属	0.01%	0.25%	0.29%	2.22%
其他	84.80%	92.43%	71.88%	76.73%

2.4 4个季节 PM_{2.5} 样品 Alpha 多样性分析 结果见表4。春季和冬季 PM_{2.5} 样品细菌群落的 Chao1 指数和 ACE 指数高于夏季和秋季,4个季节 PM_{2.5} 样品中细菌群落丰度依次为春季 > 冬季 > 夏季 > 秋季,4个季节 PM_{2.5} 样品中细胞群落多样性依次为夏季 > 春季 > 冬季 > 秋季。

表4 4个季节 PM_{2.5} 样品细菌群落的 Alpha 多样性指数

Tab.4 Alpha diversity index of PM_{2.5} bacterial community in four seasons

季节	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
春季	2 256.746	2 310.121	8.638	0.989
夏季	1 624.657	1 618.569	9.191	0.996
秋季	1 320.045	1 330.172	7.067	0.939
冬季	2 090.029	2 080.831	7.914	0.967

2.5 4个季节 PM_{2.5} 中细菌群落 Beta 多样性指数比较 结果见图2。春季、夏季、秋季 PM_{2.5} 中细菌群落 Beta 多样性指数两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),春季和冬季 PM_{2.5} 中细菌群落 Beta 多样性比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

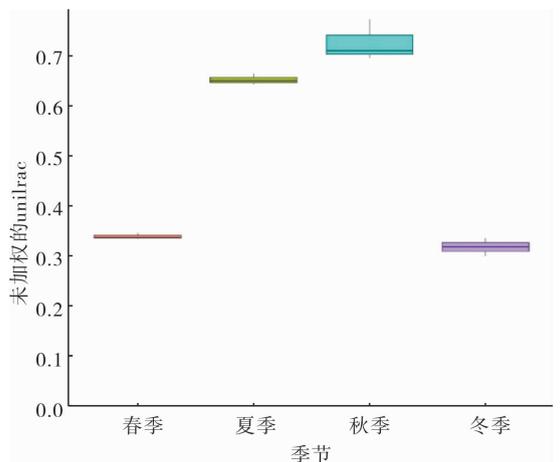


图2 4个季节 PM_{2.5} 样品 Beta 多样性组间差异箱形图

Fig.2 Box diagram of differences among groups in Beta diversity of PM_{2.5} samples in four seasons

3 讨论

2015年全球疾病负担报告显示,颗粒物污染成为排名第7位的危险因素,在中国成为排名第6的危险因素,我国每10万死亡人群中死亡163.1人,与空气污染有关^[11]。李文静等^[12]探讨了2013~2015年北京市大气PM_{2.5}对医院儿科门诊量的影响,单污染物模型分析显示,PM_{2.5}对儿科总门诊量、儿科呼吸系统疾病门诊量和儿科其他疾病门诊量的影响均有统计学意义,且以当天的效应最强,PM_{2.5}浓度每升高10 μg·m⁻³,上述门诊量分别增加0.525%、0.589%、0.393%。多污染物模型分析结果显示,引入其他污染物后,PM_{2.5}对儿科总门诊量和呼吸系统疾病门诊量的影响仍有统计学意义,PM_{2.5}浓度每升高10 μg·m⁻³,上述门诊量分别增加0.570%、0.697%。PM_{2.5}中微生物浓度随PM_{2.5}浓度增加而相应升高,微生物和过敏原介导的呼吸道疾病也相应增加^[6]。春季和冬季是呼吸道疾病的高发季节,且PM_{2.5}的浓度也较高,根据本研究结果,春季和冬季样品细菌丰度高于夏季和秋季,与文献^[12]报道相一致。

王步英等^[7]检测了2013年北京市冬季连续7 d PM_{2.5}样品中细菌种群,在门的水平上,放线菌门所占比例最高,达62.34%,其次是厚壁菌门(14.64%)、变形菌门(11.47%)、蓝藻门(5.45%)和拟杆菌门(3.46%)。在属的水平上,主要菌属均为节杆菌属,其次为弗兰克菌属。本研究中,冬季PM_{2.5}样品中,在门的水平,相对丰度最高的是变形菌门(28.65%),其次是厚壁菌门(26.63%)、拟杆菌门(15.84%)、放线菌门(9.86%)和蓝藻门(9.49%)。在属的水平,相对丰度最高的是未鉴定叶绿体,其次是假单胞菌属。由此可见,不同地域PM_{2.5}中细菌种群差异较大。

本研究中,采样点是在校园内,每个季节仅采集3个样品,且环境因子对人体健康的影响有低剂量、长时间、多途径以及累积联合作用等特点,不能全面代表新乡市整体情况,需要增加采样时点,联合

PM_{2.5}中其他组分,结合门诊情况,深入探讨PM_{2.5}中细菌对人体健康的影响。

参考文献:

- [1] 冯建纯,孙红梅,杜月菊,等. 石家庄市PM_{2.5}浓度对居民死亡的急性影响分析[J]. 现代预防医学,2018,45(4):603-608.
- [2] BURNETT R T, POPE C A III, EZZATI M, et al. An integrated risk function for estimating the global burden of disease attributable to ambient ne particulate matter exposure [J]. *Environ Health Perspect*,2014,122(4):397-403.
- [3] BI J R, HUANG J P, HU Z Y, et al. Investigating the aerosoloptical and radiative characteristics of heavy haze episodes in Beijing during January of 2013[J]. *J Geophys Res Atmos*,2014,119(16):9884-9900.
- [4] 田大年,丁润梅,张鹏举,等. 银川市大气PM_{2.5}和PM₁₀中多环芳烃的污染特征[J]. 现代预防医学,2017,44(20):3672-3676.
- [5] JAENICKE R. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere[J]. *Science*,2005,308(5718):73.
- [6] 李慧君,李宏彬,王艳,等. 大气颗粒物中微生物群落多样性及危害研究进展[J]. 新乡医学院学报,2015,32(2):107-110.
- [7] 王步英,郎继东,张丽娜,等. 基于16S rRNA基因测序法分析北京霾污染过程中PM_{2.5}和PM₁₀细菌群落特征[J]. 环境科学,2015,36(8):2727-2734.
- [8] BOVALLIUS A, BUCHT B, ROFFEY R, et al. Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in sweden[J]. *Appl Environ Microbiol*,1978,35(5):847-852.
- [9] PECCIA J, HERNANDEZ M. Incorporating polymerase chain reactionbased identification, population characterization and quantification of microorganisms into aerosol science;a review[J]. *Atmospheric Environment*,2006,40(21):3941-3961.
- [10] LUNDBERG D, DEREK S, MIECZKOWSKI P, et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing [J]. *Nat Methods*,2013,10(10):999-1002.
- [11] WANG H, NAGHAVI M, ALLEN C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*,2016,388(10053):1459-1544.
- [12] 李文静,张美云,万博宇,等. 北京市大气PM_{2.5}污染对某医院儿科门诊量影响的时间序列研究[J]. 现代预防医学,2018,45(7):1184-1188.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)