

【基础研究】

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'-GTTTCGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-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 建库试剂盒对 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 wilcox 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

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。

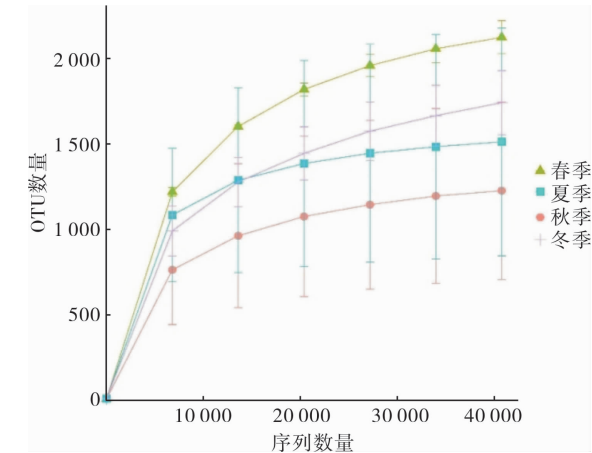


图 1 4 个季节 PM_{2.5} 样品稀释曲线
Fig.1 Rarefaction curves of PM_{2.5} samples in four seasons

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($P > 0.05$)。

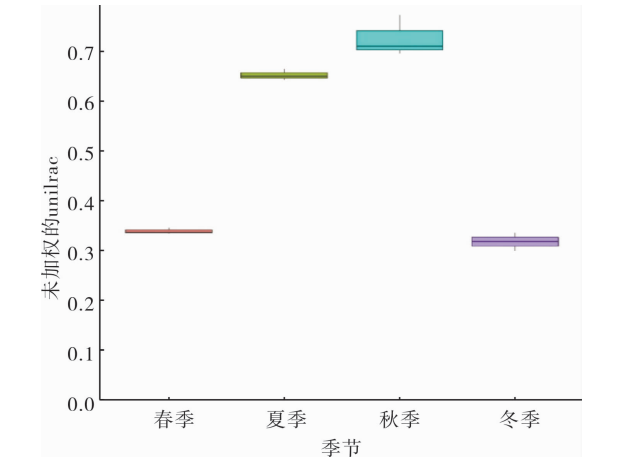


图 2 4 个季节 PM_{2.5} 样品 Beta 多样性组间差异箱形图
Fig.2 Box diagram of differences among groups in Beta diversity of PM_{2.5} samples in four seasons

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 有 163.1 人死亡与空气污染有关^[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 theatmosphere[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)