

研究报告

汉阳陵陶俑表面微生物群落结构与种群多样性分析

孔琳¹, 程蓓¹, 赵静¹, 刘文静², 王丽², 孙艳梅², 王世伟^{*2}

1 汉景帝阳陵博物院, 陕西 西安 712038

2 西北大学生命科学学院 西部资源生物与生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069

孔琳, 程蓓, 赵静, 刘文静, 王丽, 孙艳梅, 王世伟. 汉阳陵陶俑表面微生物群落结构与种群多样性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2812-2825.

KONG Lin, CHENG Bei, ZHAO Jing, LIU Wenjing, WANG Li, SUN Yanmei, WANG Shiwei. Structure and diversity of microbial community on the surface of pottery figurines in the Hanyang Mausoleum[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2812-2825.

摘要:【背景】汉阳陵是我国截至目前发现的规模最大、陪葬级别最高的汉代陶俑群，出土了大量形神毕肖的裸体俑群，考古学家认为这种裸体陶俑原本“着衣、装木臂”，称为“着衣式陶俑”，为皇室独有，异常珍贵。然而这些推测尚无科学依据，而且陶俑表面附着微生物可能会腐蚀俑体。

【目的】通过比较研究汉陶俑表面微生物的组成差异，为汉裸体陶俑着有衣物且装有断臂的推测提供一定的科学佐证，同时为汉陶俑微生物腐蚀的防控提供靶标。【方法】应用微生物高通量测序与纯培养相结合的方法，对着衣式陶俑不同部位微生物进行测定。【结果】高通量测序结果显示女俑头部微生物多样性较高；男俑上半身微生物多样性最高，腿部居中，头部较低。汉陶俑表面微生物组成按俑的类别及不同部位聚集在一起，其优势菌为放线菌门的克洛斯氏菌属、糖多孢菌属、假诺卡氏菌属及链霉菌科，其他各部位优势类群相对丰度存在差异，断臂处与碳循环相关功能微生物的相对丰度最高。纯培养结果显示女俑头部的可培养细菌数量高于男俑头部可培养的细菌数量；男俑上身与腿部可培养的微生物数量高于男俑头部，表明上半身与腿部可能有衣物覆盖，导致其营养差异。【结论】汉陶俑头部与身体表面部位微生物多样性与组成存在明显的差异，暗示汉陶俑各部位的营养成分存在差异，可能与汉陶俑有衣物覆盖或染料涂色相关。

关键词: 汉阳陵；着衣式陶俑；高通量测序；微生物组成

*Corresponding author. E-mail: wangsw@nwu.edu.cn

Received: 2023-03-03; Accepted: 2023-03-23; Published online: 2023-04-20

Structure and diversity of microbial community on the surface of pottery figurines in the Hanyang Mausoleum

KONG Lin¹, CHENG Bei¹, ZHAO Jing¹, LIU Wenjing², WANG Li², SUN Yanmei², WANG Shiwei^{*2}

1 Han Yangling Museum, Xi'an 712038, Shaanxi, China

2 Key Laboratory of Resources Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

Abstract: **[Background]** Han Yangling Museum has been the largest group of pottery figurines of the Han Dynasty so far found in China. A large number of nude figurines have been unearthed. Archaeologists believe that these nude pottery figurines were originally dressed and equipped with wooden arms, which are unique to the royal family and extremely precious. However, there is no scientific support for these conjectures. In addition, the microorganisms attached to the surface may corrode the pottery figurines. **[Objective]** To provide scientific evidence for the speculation that clothes and broken arms exist by comparing the structure of microbial community on the surface of the pottery figurines, and to provide targets for the prevention and control of the microbial corrosion of pottery figurines in the Han Dynasty. **[Methods]** The microorganisms on different parts of the pottery figurines were identified by high-throughput sequencing and pure culture method. **[Results]** The high-throughput sequencing results showed that the microbial diversity in female figurines was higher on the head. In male figurines, the microbial diversity was high on the upper body, moderate on the legs, and low on the head. The microbial taxa on the surface of the pottery figurines were clustered according to the types and different parts of the figurines. The dominant groups were *Clostridia*, *Saccharopolyspora*, *Pseudonocardia*, and *Streptomycetaceae* of *Actinomycetes*. The relative abundance of dominant groups varied in different parts, and the relative abundance of the functional microorganisms involved in the carbon cycle on broken arms was the highest. The culturable bacteria on the head of female figurines were more than those on the head of male figurines. The culturable microorganisms on the upper body and legs were more than those on the head in male figurines. The upper body and legs may have been covered by clothing, which provided the habitats with different nutrients for microorganisms. **[Conclusion]** There were significant differences in microbial diversity and composition between the head and the body of the pottery figurines in the Han Dynasty, which suggested that the nutrient composition varied in different parts of the pottery figurines. Such differences might be related to the covering of the pottery figurines with clothes or dye.

Keywords: Hanyang Mausoleum; dressed figurines; high-throughput sequencing; microbial composition

汉阳陵是汉景帝刘启及其皇后王氏同茔异穴的合葬陵园,位于陕西省咸阳市渭城区正阳镇张家湾后沟村北的咸阳塬上,汉阳陵环绕帝陵四周有86座外藏坑,距今已有2 000多年的历史^[1]。自1991年起,考古人员开始对陵园丛葬坑正式发掘,随着阳陵考古工作的陆续进行,出土了大量的陶俑、编磬、陶质生活器具、车马器等大量陪葬品^[2],是我国截至目前发现的规模最大、陪葬级别最高的汉代陶俑群。

汉阳陵出土的陶俑大多是彩色的,主要分两类:一类是“塑衣式陶俑”,其衣服通过陶塑上身^[3];另一类最引人注意的是一批俗称“裸体俑”的墓俑,这一类型的墓俑陶质裸身、断臂,独特且罕见,考古学界称之为“着衣式俑”^[4]。着衣式俑的数量庞大,类型多样包括武士俑、侍女俑、男立俑、女立俑和骑马俑等。研究发现着衣式俑多由泥质灰陶烧制而成,俑表面饰有彩绘,如男立俑面部及躯体施橙红色彩,头发、眼睛施黑彩;女立俑面部及躯体饰粉白彩,头发、眼睛施黑彩^[2]。考古学界推测着衣式俑最初可能装有木质手臂、身着丝麻或者皮革之类有机衣物^[5],因时间久远,陶俑所着衣物腐化脱落,未能保存。

汉陶俑中的“着衣式俑”若着有衣物且装有木质手臂,衣物中存在一些元素,如麻主要成分为纤维素,含碳、氢和氧的物质^[6];毛和丝绸主要成分为蛋白质类,含碳、氮、氢和氧的物质^[7];木质手臂中含大量的木质素、纤维素等,这些元素可为土壤微生物成长提供营养^[8]。土壤微生物作为生态系统三大组分之一,在整个生态系统中发挥着重要作用,其对外源养分的差异较为敏感,如对有机质、碳、氮、磷、微量元素、土壤水分和酸碱度等的变化均有明显的响应^[9]。微生物群落通过改变群落的多样性及组成以适应生长环境的理化特性的差异。因此,汉陶俑着有衣

物的部位(上半身与腿部)、装有木质手臂部位(断臂处)与无衣物覆盖的部位(头部)在腐化的过程中产生的微生态环境可能存在差异,由此而衍生出的微生物组成及功能也可能不一样。此外,已有研究表明,彩绘文物表面滋生的微生物会改变文物的颜色与外貌,破坏彩绘层整体的稳定性,且不同颜料富集的微生物类群存在差异^[10]。汉阳陵男俑与女俑头部,以及不同类别俑的躯体彩绘存在差异,这也可能导致不同汉俑表面滋生的微生物存在差异。

本文通过微生物高通量测序与可培养微生物的分析方法,综合研究汉陶俑“着衣式俑”头部正面与背面、断臂处、上半身和腿部不同部位的微生物多样性与物种组成,以掌握汉陶俑表面微生物的分布特征;同时揭示头部与上身、腿部微生物组成是否存在差异,进一步从生物的角度分析汉陶俑上身及腿部是否有衣物覆盖;并依据微生物系统发育数据,对不同部位微生物功能进行解析,研究汉陶俑断臂处与碳代谢相关功能微生物的相对丰度是否上调,从而为判断汉陶俑断臂处是否装有木质胳膊提供生物学佐证。此外,通过对可培养微生物的分析,可以让我们获得汉陶俑表面较为活跃的微生物种类,为防止文物腐蚀、提高后续文物保护提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 汉陶俑样品

为比较汉陶俑不同部位微生物组成的差异,对汉陶俑头部包括女俑与武士俑头部的正面与后面进行表面样品采集,目的是以其作为对照,比较头部与其他部位样品的微生物组成差异;同时采集武士俑与骑兵俑上半身正面、背面样本、断臂处样本及腿部样本;采集直立俑腿部样本,以增加腿部样本的数量(表1)。

表 1 用于高通量测序分析微生物组成的汉陶俑样品信息

Table 1 Samples of Han Dynasty pottery figurines for high-throughput microbial composition analysis

序号	样品名称	简称
No.	Sample name	Abbreviation
1	女俑头正面 Front of female figurine head	NTZ
2	女俑头后面 Back of female figurine head	NTH
3	武士俑头正面 1 Front of warrior figurine head 1	WTZ1
4	武士俑头后面 1 Back of warrior figurine head 1	WTH1
5	武士俑头正面 2 Front of warrior figurine head 2	WTZ2
6	武士俑头后面 2 Back of warrior figurine head 2	WTH2
7	武士俑头正面 3 Front of warrior figurine head 3	WTZ3
8	武士俑头后面 3 Back of warrior figurine head 3	WTH3
9	武士俑上半身 Upper-body of warrior figurine head	WSB
10	武士俑断臂 Broken arm of warrior figurine head	WDB
11	骑兵俑上身正面 Front of cavalry figurine upper-body	QSBZ
12	骑兵俑上身后面 Back of cavalry figurine upper-body	QSBH
13	骑兵俑断臂 Broken arm of cavalry figurine	QDB
14	骑兵俑腿部 Leg of cavalry figurine	QTB
15	直立腿 Upright leg	ZTB
16	武士俑腿部 Leg of warrior figurine head	WTB

1.1.2 主要试剂和仪器

样品基因组 DNA 的提取采用土壤 DNA 提取试剂盒(PowerSoil DNA Isolation Kit), Mo Bio Laboratories 公司。核酸浓度的检测使用

QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统, Promega 公司。

1.1.3 培养基

可培养微生物分别采用 LB 培养基(酵母浸膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, 调 pH 值至 7.0–7.2, 添加 15 g/L 的琼脂粉)和 R2A 培养基(酵母粉 0.5 g/L, 胰蛋白胨 0.5 g/L, 酪蛋白酸水解物 0.5 g/L, 可溶性淀粉 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/L, $C_6H_{12}O_6$ 0.5 g/L, 丙酮酸钠 0.3 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, 调 pH 值至 7.0–7.2, 添加 15 g/L 的琼脂粉)。

1.2 汉陶俑表面微生物的分析方法

1.2.1 汉陶俑样品微生物组成测序

为完成汉陶俑样本的微生物组成分析,对表 1 中的每个样品称取 0.25 g, 提取汉陶俑表面附着土壤的微生物基因组 DNA, 并利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 的完整性。鉴于汉陶俑的存在环境中除存在细菌外,也可能存在抗逆性较强的古菌等,因此选择细菌与古菌的通用引物 505F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTA A-3')与 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAA T-3')对样品进行细菌与古菌的测定,依据参考文献的程序进行 PCR 扩增^[11]。将 PCR 产物进行检测定量后,按照每个样本的测序量要求进行相应比例的混合。随后通过 PCR 将 Illumina 接头序列添加至目标区域外端,纯化 PCR 产物,利用氢氧化钠将 PCR 产物变性,以产生单链 DNA 片段,从而完成 MiSeq 文库的构建。最后进行 Illumina 高通量测序。

1.2.2 汉陶俑样品微生物组成分析

MiSeq 测序得到的 PE reads 首先利用 Flash (V1.2.11)根据 overlap 关系进行 pair-end 双端序列拼接,同时应用 Fastp (V0.19.6)对序列质量进行质控和过滤,去除低质量的序列,分别使用 USEARCH (V8.1.1831)和 Uchime (V4.2)软件进一步去除非特异性扩增区域序列和嵌合体序列。

区分样本后,应用USEARCH (V8.1.1831)与RDP Classifier (V2.11)分别进行OTU统计和序列分类注释。计算覆盖率与积累曲线估计测序深度是否足够,基于OTU结果,利用Mothur进行 α 多样性指数分析,包括Simpson指数与Shannon指数分析。基于分类学信息,在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。在上述分析的基础上,对多样本的群落组成和系统发育信息进行多元分析和差异显著性检验等一系列深入的统计学和可视化分析。主要包括使用R VennDiagram包的Venn方法分析样本之间共同和独特的OTU数目。通过层级聚类分析与主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA),研究汉陶俑不同样本上微生物群落组成的差异。利用R语言heatmap软件包,对不同汉陶俑样本中的优势微生物类群进行分析。除了评估微生物多样性和组成外,应用生物信息学通道PICRUSt (V2.2.0)来分析不同样本中的微生物功能潜力(COGG分析)。采用R语言TukeyHSD方法对汉陶俑不同样本中微生物多样性与均度是否存在差异进行统计分析。应用Origin绘图软件进行柱形堆叠图与箱线图的绘制。

1.2.3 分离汉陶俑表面可培养微生物的方法

分析LB培养基与R2A培养基对汉陶俑表面微生物的分离情况,发现LB平板上长出的菌落数较多,确定LB培养基为分离培养基,采用稀释涂布平板法进行分离纯化,将分离得到的可培养的微生物先计数,再挑取大小、形态、颜色不同的菌落划线到新的培养基上,37℃培养过夜,待长出单菌落后,转接至5 mL液体LB培养基中,150 r/min、37℃培养12 h左右,吸取菌液进行菌落PCR,引物选择27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGCTACCTTACGACTT-3'),PCR反应体系及条件参照已有文献[12]。将PCR扩增产物送至北京擎科

生物科技有限公司(西安)进行16S rRNA基因测序,测序结果提交GenBank进行BLAST比对,获得可培养微生物的种属信息。

2 结果与讨论

2.1 汉陶俑表面微生物的多样性

汉陶俑各样本中微生物的测序数目在35 532–74 177范围内,测序长度在201–334 bp之间,平均测序长度为252 bp,样本分析前按照样本中最小的测序数进行抽平。汉陶俑不同部位各样本的测序覆盖率均达到99%以上(图1A),随着测序数量的增加,各样本中OTU数目趋平(图1B),表明样本的高通量测序数据可以表征汉陶俑样本的微生物组成。

微生物的多样性及组成可以反映微生物生长环境理化特性(营养成分等)的差异。为汉陶俑表面是否着有衣物提供生物学佐证,首先对汉陶俑表面不同部位包括头部、断臂处、上半身及腿部样本表面微生物的多样性进行了比较分析。汉陶俑样本的丰富度指数(Sobs)显示女俑头部微生物数目较多,正面与后面分别为510个与524个OTU;女俑头部OTU数目大于武士俑头部,且头部正面微生物数目小于后面微生物数目;陶俑上半身微生物数目为480–643个OTU,显著大于腿部的305–398个OTU(图2)。

香农多样性指数(Shannon index)与统计分析也表明汉陶俑表面不同部位微生物多样性存在显著差异,与Sobs指数趋势一致,除女俑头部微生物多样性较高外,男俑上半身微生物多样性最高,腿部居中,头部较低(图3A)。辛普森指数(Simpson index)分析均度的结果与香农多样性指数的结果刚好相反,汉陶俑头部样本中微生物种类的均匀度最高,其次为腿部,断臂处与上半身样本中微生物的均度最低

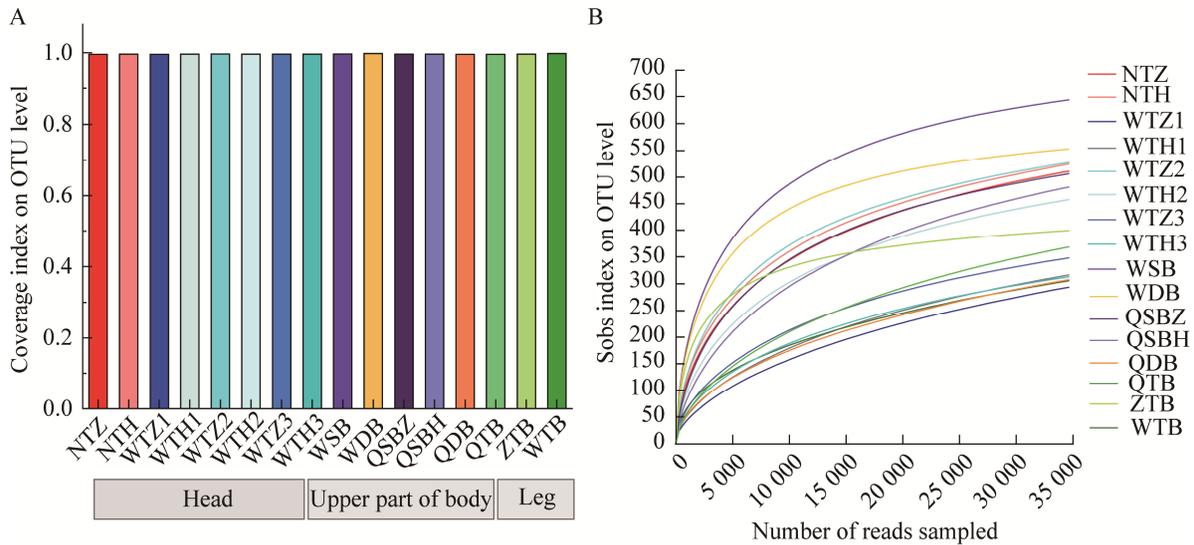


图 1 陶俑样品微生物高通量测序分析评估 A: 覆盖率. B: 积累曲线

Figure 1 High-throughput sequencing analysis and evaluation of microorganisms in pottery figurine samples. A: Coverage. B: Accumulation curve.

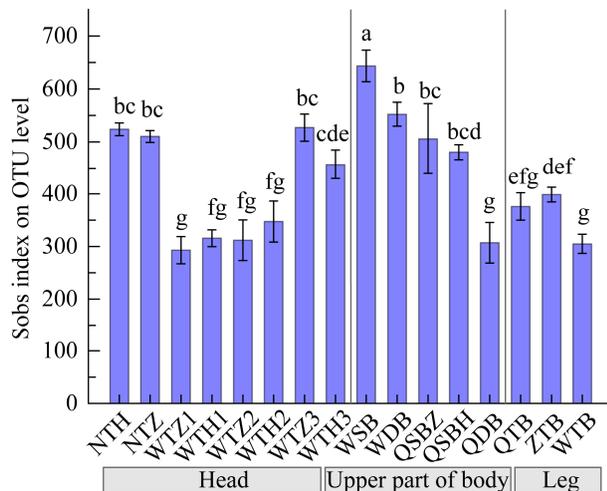


图 2 Sobs 指数揭示汉陶俑各样本中微生物的种类数 不同的小写字母表示样本间存在显著差异, $P < 0.05$

Figure 2 Sobs index reveals the number of microbial species in each sample of the Han Dynasty pottery figurines. Different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

(图 3)。综上结果表明, 汉陶俑上半身与断臂处样本中的微生物多样性高, 且存在明显的优势菌

群; 汉陶俑头的面部与后部的微生物种类少, 各种微生物数量分布均匀; 腿部样本的微生物多样性及均匀度均居中。汉陶俑不同部位微生物多样性存在显著差异, 表明不同部位的营养成分存在差异, 推测可能与汉陶俑制作过程中头部与身体部位用料成分不同或上半身及腿部着有衣物或涂有染料相关, 衣物或染料中存在的碳水化合物或氮元素在腐蚀过程中可为微生物提供养分, 可能富集了一些微生物。

2.2 汉陶俑不同部位表面微生物组成的差异

深入分析样本中共有与特异性微生物种类的结果显示(图 4), 汉陶俑表面不同部位共同具有的微生物 OTU 数目为 74, 女俑与男俑头部共有微生物 OTU 数目为 187, 大于所有样本中共有的, 表明与上半身、腿部等不同部位相比, 男女俑头部样本更为相似; 此外, 各样本中特异性微生物数目较少, 表明样本之间有相同的微生物。

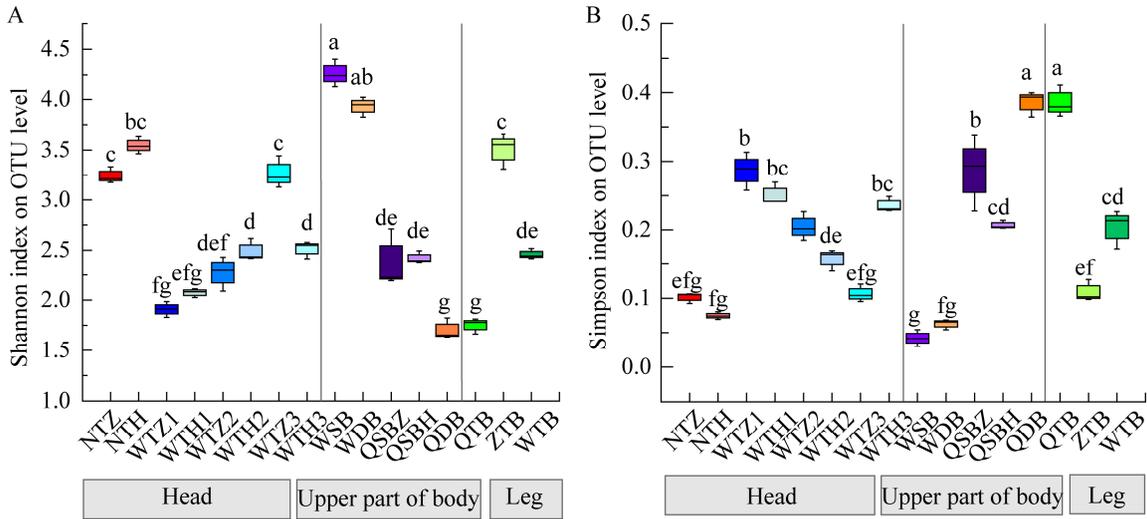


图 3 汉陶俑表面不同部位微生物多样性比较 A: 香农多样性. B: 辛普森多样性. 不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$

Figure 3 Comparison of microbial diversity in different position of the Han Dynasty pottery figurines. A: Shannon diversity. B: Simpson diversity. Different lowercase letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

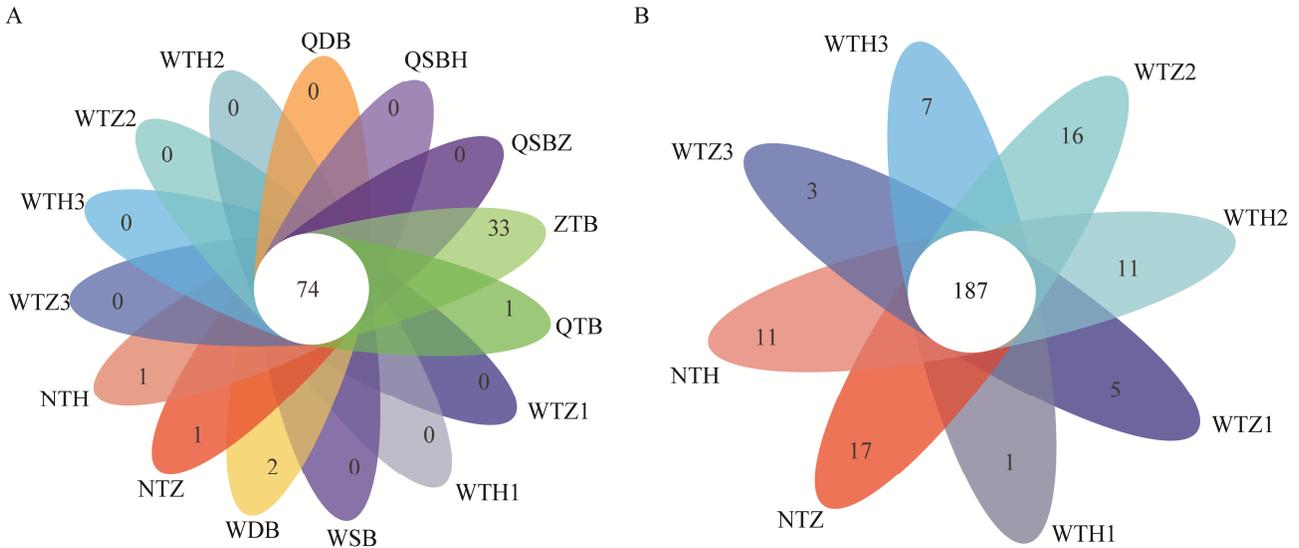


图 4 汉陶俑表面不同部位微生物 Venn 分析 A: 头部、上半身、断臂和腿部样本. B: 头部样本
Figure 4 Venn analysis revealed the number of common and specific microorganisms in different position of the pottery figurines. A: Head samples, upper body samples, broken arm samples and leg samples. B: Head samples.

进一步研究汉陶俑不同部位微生物组成的相似性与差异, 分别采用微生物层级聚类分析与主坐标分析汉陶俑各样本中微生物组成的相似

性与差异. 汉陶俑表面微生物层级聚类分析表明武士俑的上半身与断臂聚集在一起; 直立俑腿与武士俑腿聚集在一起; 女俑头部聚集在一起, 男

俑头部聚在一起, 骑兵俑不同部位聚在一起(图 5)。汉陶俑不同部位样本微生物组成 PCoA 分析显示汉陶俑女俑头部、武士俑头部、骑兵俑、武士俑上半身及断臂的微生物分别聚在一起(图 6)。汉陶俑表面微生物组成按不同部位及俑的类别聚集在一起, 暗示汉陶俑按照不同俑的类别及同一俑不同的部位可能因身着衣物存在差异而导致其营养组分不同, 从而富集了差异的微生物。

2.3 汉陶俑不同部位表面微生物的具体种类比较分析

微生物定殖造成的腐蚀是影响文物保护的因素之一, 评估微生物群落的组成是理解和控制

这些定殖的第一阶段^[13]。为揭示汉陶俑表面微生物特征, 分析汉陶俑表面存在哪些微生物, 属于何种门类, 汉陶俑不同部位表面微生物种类及功能之间有何异同, 本研究分别在微生物门及属水平对汉陶俑表面微生物及功能进行了深入分析。汉陶俑表面微生物主要为细菌, 存在微量的古菌, 汉陶俑上半身及断臂处古菌的相对丰度分别为 0.77%和 0.59%, 高于汉陶俑腿部(0.39%)及头部古菌的相对丰度(0.05%)。汉陶俑表面优势菌门均为放线菌门(36.9%–98.4%); 头部与上半身厚壁菌门与泉古菌门相对丰度较高; 直立腿部浮霉菌门的相对丰度较高(图 7)。

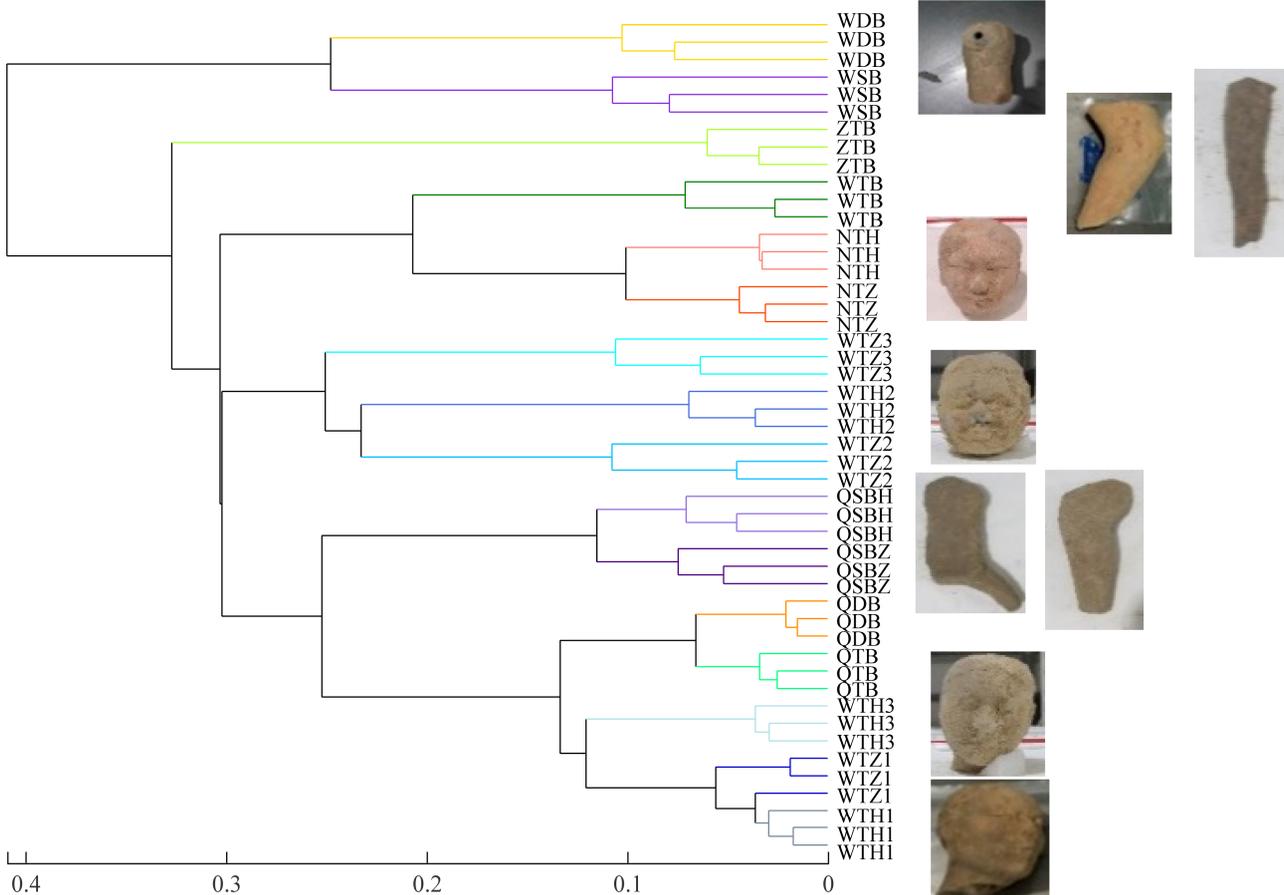


图 5 不同汉陶俑样本表面微生物的聚类分析 标尺代表样本间的距离

Figure 5 Cluster analysis of surface microorganisms of different Han Dynasty pottery figurines. The numbers at the bottom indicate the distance between samples.

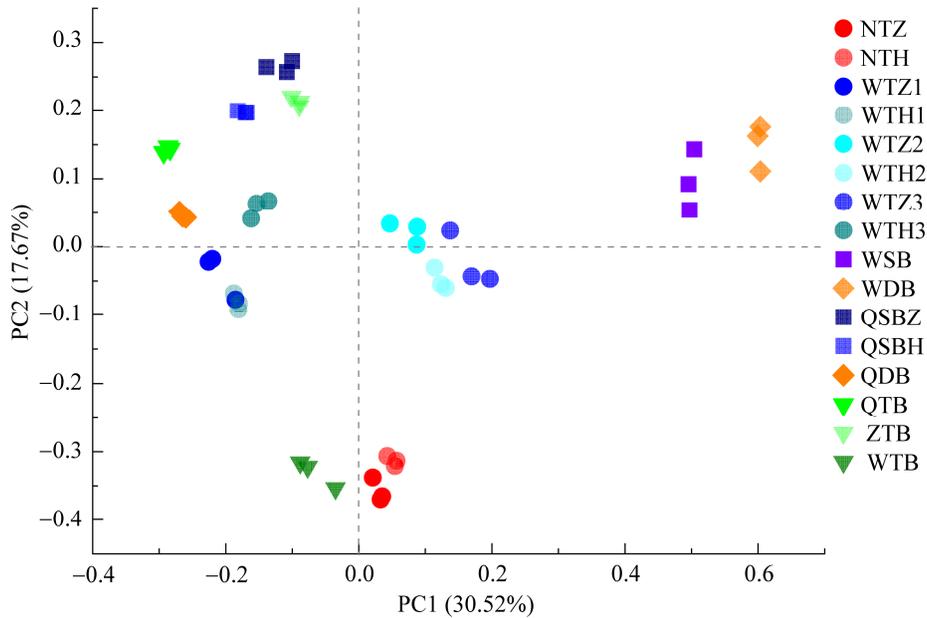


图 6 不同汉陶俑样本表面微生物组成的差异主坐标分析

Figure 6 Principal coordinate analysis (PCoA) of microbial composition on the surface of different pottery figurines.

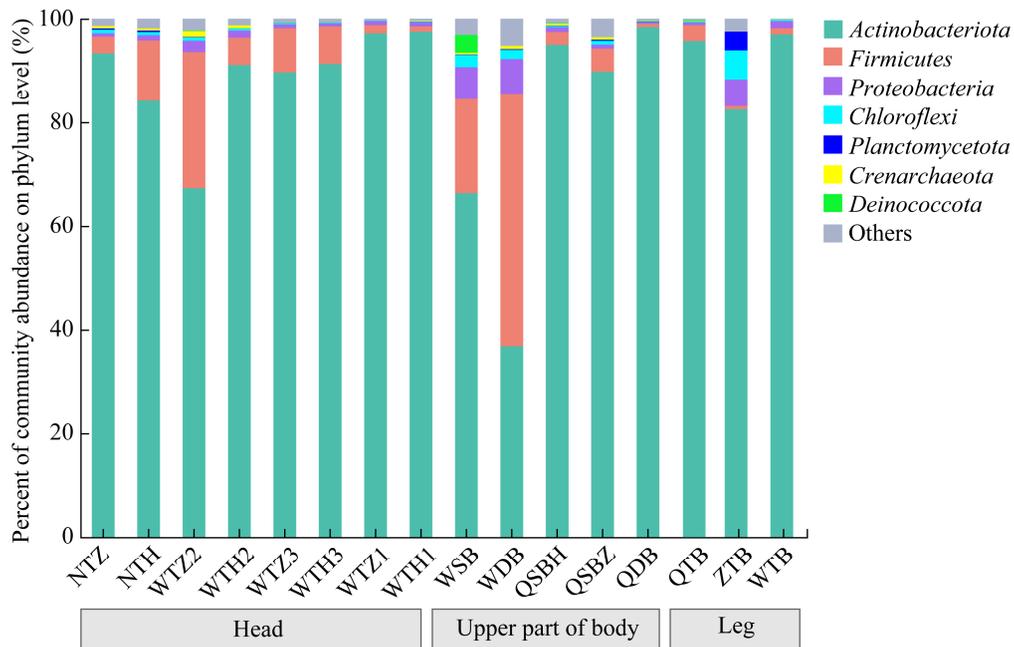


图 7 门水平上汉陶俑表面不同部位特征微生物

Figure 7 Characteristic microbial phylum in different positions of Han Dynasty pottery figurines.

为深入揭示汉陶俑不同部位表面微生物的差异,采用热图法对汉陶俑表面不同部位的优势微生物类群进行了深入分析。结果显示汉陶俑表

面不同部位的微生物类群存在明显区别,其中共有的优势微生物类群为克罗斯氏菌属(*Crossiella*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、

类芽孢杆菌属 (*Paeibacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)及链霉菌科 (*Streptomycetaceae*)的微生物(图 8)。

女俑头部 *Microtrichales*、*Solirubrobacterales*、*Gaiella* 和 *Cohnella* 的相对丰度较高, 陶俑上半身柯恩氏菌属 (*Cohnella*)与氨氧化古菌科 (*Nitrososphaeraceae*)占优势地位。陶俑腿部的优势类群为诺卡氏菌属 (*Nocardioidea*), 芽孢杆菌属为武士俑与骑兵俑腿部断臂处的优势类群, 节杆菌属 (*Arthrobacter*)与阿菲波菌属 (*Afipia*)也是武士俑腿部的优势类群, 与其他部位相比, 直立俑腿部 *Solirubrobacterales* 与 *Microtrichales* 的相对丰度较高(图 8)。以上结果表明, 陶俑表面存在

一些共有的微生物类群, 陶俑的面部、上半身及腿部的优势微生物不同, 俑的类别也影响微生物的定殖, 暗示不同类别陶俑及俑的不同部位微环境存在差异。陶俑的面部一般有妆容但无衣物覆盖, 这可能是面部微生物与其他部位微生物存在差异的原因。另一方面, 陶俑若着有衣物, 断臂处装有木质手臂, 在衣物和木制手臂腐解的过程中, 陶俑尤其是其上半身与断臂处会富集一些与碳水化合物等元素降解相关的微生物, 这可能是导致陶俑上半身与腿部微生物差异的原因。此外, 不同俑的类型与级别存在差异, 如直立俑与武士俑, 其着有衣物材质的差别可能导致其腿部优势微生物的差异。

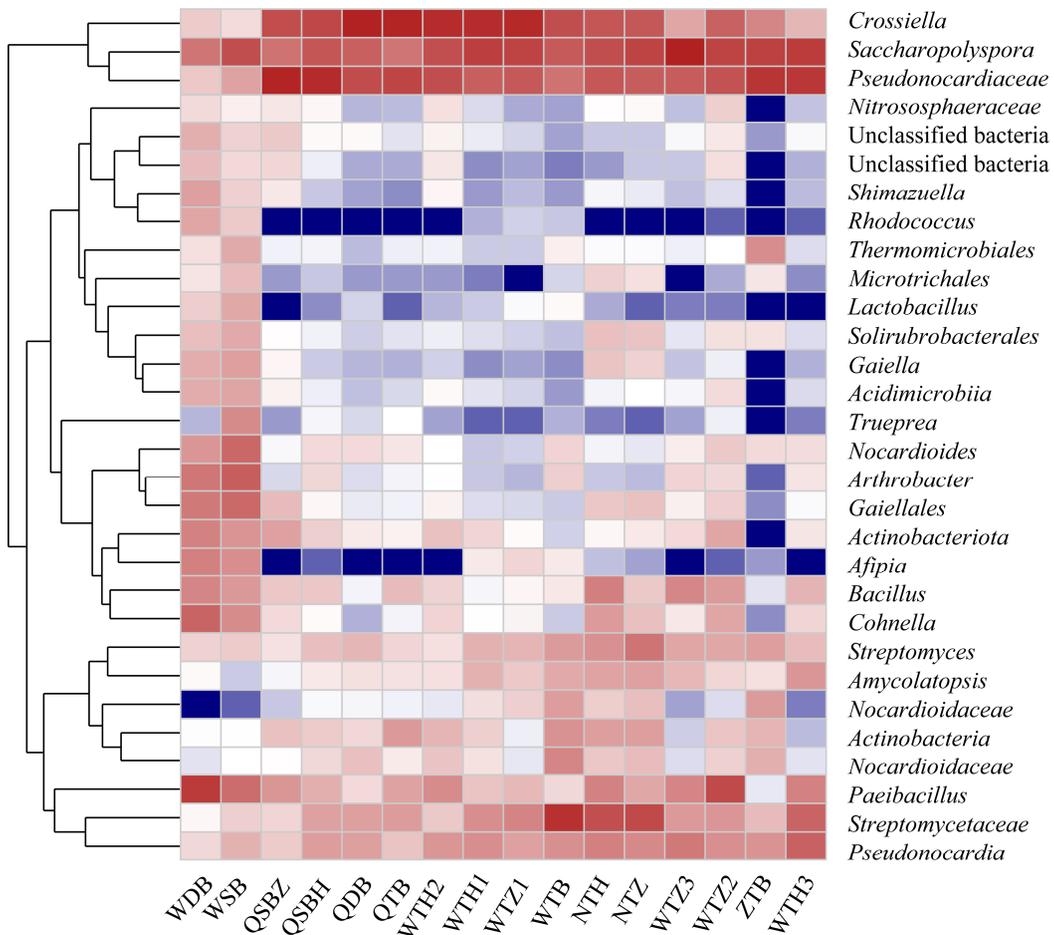


图 8 汉陶俑表面不同部位特征微生物

Figure 8 Characteristic microorganisms in different positions of Han Dynasty pottery figurines.

为进一步解析汉陶俑表面是否有衣服覆盖,对汉陶俑不同部位表面微生物的碳、氮运输与代谢功能进行比较分析。汉陶俑断臂处与碳运输及代谢相关的功能微生物丰度最高,显著高于汉陶俑的头部、上身及腿部($P<0.05$),氨基酸运输代谢相关的功能微生物丰度最低,显著低于汉陶俑的其他部位($P<0.05$) (图 9),由此可初步推测断臂处可能存在木质结构。木质结构的主要成分为碳水化合物,因此在断臂处富集了与碳代谢相关的功能微生物。

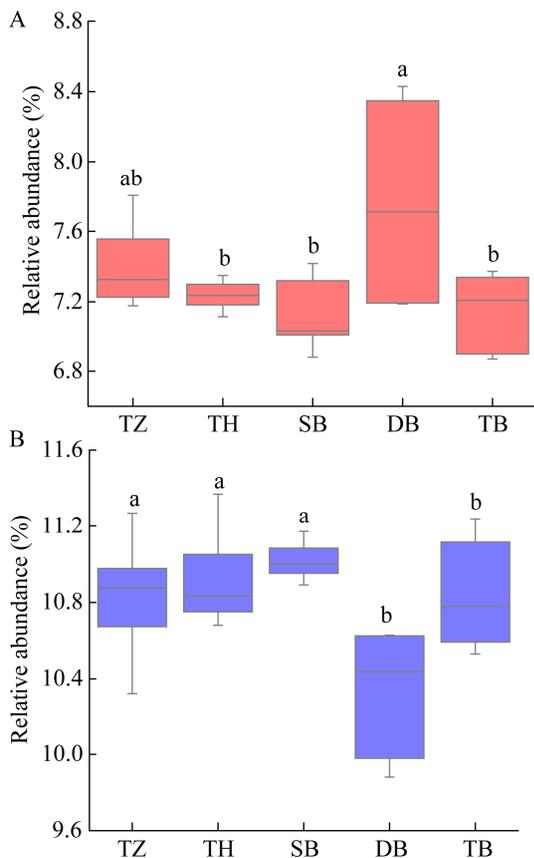


图 9 汉陶俑表面不同部位微生物的碳、氮运输与代谢功能分析 A: 碳水化合物运输与代谢. B: 氨基酸运输与代谢. 不同字母暗示存在显著差异, $P<0.05$

Figure 9 Microbial carbon and nitrogen transport and metabolism functions of different positions of Han Dynasty pottery figurines. A: Carbohydrate transport and metabolism. B: Amino acid transport and metabolism. Different letters imply significant differences, $P<0.05$.

在前面对汉陶俑样本高通量测序研究微生物组成的基础上,应用可培养的方法培养分离汉陶俑样本的可培养微生物,一方面可与高通量测序的结果互相印证;另一方面对可培养微生物的分离培养可反映汉陶俑表面较为活跃的微生物种类,为后续的汉陶俑文物的保护工作提高基础数据和理论指导。女俑头部可培养的细菌数目较多,女俑头部正面与后面可培养的细菌数量分别为 8×10^4 CFU/g 与 5.2×10^5 CFU/g。相较而言,男俑头部可培养的细菌数目少 1-2 个数量级,2 号武士俑头部正面与后面可培养的细菌数目接近,均为 2×10^2 CFU/g; 3 号武士俑头部正面与后面可培养的细菌数目分别为 1.5×10^3 CFU/g 与 3.0×10^3 CFU/g。男俑上半身与腿部可培养的细菌数目接近,高于男俑头部; 骑兵俑上半身正面、骑兵俑上半身背面、骑兵陶俑腿部、直立俑腿部可培养细菌数目分别为 7.6×10^3 、 4.5×10^4 、 8.5×10^3 和 5.5×10^4 CFU/g; 骑兵俑断臂处可培养的细菌数目为 1.3×10^3 CFU/g (图 10)。从汉陶俑的不同部位选择部分纯化的菌株进行 16S rRNA 基因测序。测序结果显示汉陶俑表面可培养的微生物主要属于芽孢杆菌属(表 2)。

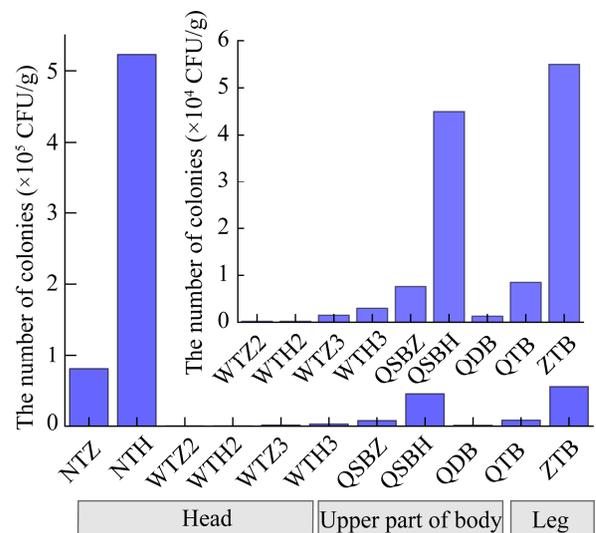


图 10 汉陶俑不同部位可培养细菌数量比较分析 Figure 10 The number of culturable bacteria on different positions of the Han Dynasty pottery figurines.

表 2 汉陶俑表面不同部位代表菌株测序
Table 2 The representative strains in different positions of Han Dynasty pottery figurines

菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain name
NTZ-1	<i>Bacillus</i> sp.
NTZ-2	<i>Bacillus simplex</i>
WTZ2-1	<i>Terribacillus aidingensis</i>
WTH3-2	<i>Bacillus licheniformis</i>
WTH2-2	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>
QSBZ -1	<i>Bacillus muralis</i>
QSBH-1	<i>Bacillus subtilis</i>
QSBH-2	<i>Bacillus megaterium</i>
QSBH-5	<i>Bacillus cereus</i>
QSBH-3	<i>Escherichia coli</i>
QTB-1	<i>Bacillus oryzaecorticis</i>

对西班牙洞穴旧石器时代壁画的研究显示假诺卡氏放线菌属(*Pseudonocardia*)的代谢活性较高,其在地下环境生物恶化中起着重要作用^[14]。Li 等^[15]通过高通量测序分析中国杭州古代佛像浮雕上定殖细菌和真菌的分布和多样性,揭示克洛斯氏菌属(*Crossiella*)在一些雕像上占有优势地位,暗示其对雕像腐化起作用,并通过纯培养的手段分离了一些 *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Pantoea* 和 *Erwinia* 的菌株,发现大部分分离的菌株对雕像的合成材料有降解作用。在其他一些地下环境,如罗马地下墓穴等类似栖息地,也大量检测和分离到一些链霉菌科(*Streptomycetaceae*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、窄单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和叶状杆菌属(*Phyllobacterium*)等微生物^[16]。新近研究显示,链霉菌属(*Streptomyces*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)的菌株能够从空气中捕获 CO₂ (在水下环境中含量丰富)并形成碳酸钙多晶型物,这导致岩石基质溶解并产生 CaCO₃ 晶体^[17]。综上所述,上述几类微生物可能对地上及地下文物腐蚀起着主要的作用。

陶俑上半身柯恩氏菌属(*Cohnella*)与氨氧化古菌科(*Nitrososphaeraceae*)占优势地位,柯恩氏菌属为类芽孢杆菌科内的一类革兰氏阳性内生孢子形成细菌,其主要功能为木聚糖分解,含有木聚糖酶的基因,可有效水解源自农业、工业的木聚糖^[18]。木聚糖为植物细胞壁的主要成分,分为硬木与软木木聚糖两种,占植物碳水化合物的三分之一,含量仅次于纤维素。柯恩氏菌属较多,可能与上半身断臂处木质胳膊存在有关系,木质胳膊的成分中含木聚糖,在其腐化降解中富集了柯恩氏菌属。此外,陶俑上半身氨氧化古菌科(*Nitrososphaeraceae*)相对丰度较高,细胞具有不规则的球形,通过氨氧化和 CO₂ 固定进行化能自养生长。氨氧化古菌科(*Nitrososphaeraceae*)是在以四合木为主的荒漠植物群落类型中土壤古菌的核心微生物类群。氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)一直被认为是富营养的环境中主导的氨氧化菌,而氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)则主要分布在低氮寡营养的生态系统中^[19],暗示汉阳陵地下环境的营养相对贫乏。

芽孢杆菌属是一类能产生内生孢子的革兰氏阳性菌,细胞呈杆状且外层覆盖大量的吡啶二羧酸钙,此特性有利于芽孢杆菌属在地下等环境中存活。已有研究显示芽孢杆菌属中可表达糖苷水解酶、果胶酶,存在碳水化合物结合模块,对含碳类有机化合物的代谢降解以及利用转化起着重要作用^[20,21]。节杆菌属是严格需氧的革兰氏阳性菌,隶属于放线菌门,从污染环境到农田中广泛分布,存在于各种温度和海拔高度,抗逆性较强,能够抵抗恶劣的气候,可利用外源性物质如纤维素降解产物葡萄糖和乳酸等碳源并抵抗重金属^[22]。阿菲波菌属(*Afipia*)可利用一种含硫有机化合物二甲基砷为碳源,二甲基砷是植物中的元素,一些制造纸浆的副产物中也含有二甲基

颞。由此可见,节杆菌属与阿菲波菌属对于碳水化合物化合物的降解转化具有一定的作用。与其他部位相比,直立俑腿 *Solirubrobacterales* 与 *Microtrichales* 的相对丰度较高,研究数据表明营养贫乏的培养基可有效分离 *Solirubrobacterales* 菌株,而且在水边环境适宜 *Solirubrobacterales* 生长,可能与这些菌株具有运动性有关。在温带和极地沿海沙地细菌群落季节性稳定的研究中, *Microtrichales* 的活性较高,是碳矿化的关键异养生物^[23]。据考古学家推测汉陶俑为着衣俑且装有木质手臂,这些碳循环相关微生物的活跃从侧面印证了其可能在衣物腐化及木质手臂降解的过程中起作用,此外这些湿生性微生物的存在与汉陶俑潮湿的地下环境相吻合。

综上所述,汉陶俑不同部位的表面微生物在门、纲、科及属的水平均存在较大的差异,暗示汉陶俑头部、腿部与上半身及断臂处的营养等理化特性存在差异,从而导致富集了不同的微生物区系。由此推测汉陶俑上半身、断臂及腿部可能有涂料染色或衣物覆盖,一方面可能是汉陶俑衣物或染色过程中人为带进去的微生物;另一方面衣物腐蚀过程释放的营养成分相对丰富,有利于培养较为丰富的微生物群落。

3 结论

通过对汉陶俑表面微生物进行免培养和纯培养技术分析,本文可得出5个结论:(1)汉陶俑表面不同部位微生物多样性存在显著差异,女俑头部微生物多样性较高;男俑上半身微生物多样性最高,腿部居中,头部较低;汉陶俑表面微生物组成按俑的类别及不同部位聚集在一起。(2)汉陶俑表面优势菌门均为放线菌门,头部与上半身的厚壁菌门与泉古菌门相对丰度较高,直立腿部的浮霉菌门相对丰度较高。汉陶俑表面各部位共有优势类群主要为克洛斯氏菌属、糖多孢

菌属、假诺卡氏菌属和链霉菌科,其他各部位优势类群相对丰度存在差异。(3)与高通量测序结果相比,微生物多样性越大,可培养的微生物数目较大,女俑头部的可培养细菌数目大于男俑头部可培养的细菌数目,男俑上身与腿部可培养的微生物数目接近,大于男俑头部;可分离培养的优势细菌隶属于芽孢杆菌属。(4)汉陶俑断臂处与碳运输及代谢相关的功能微生物丰度最高,氨基酸运输代谢相关的功能微生物丰度最低,暗示断臂处可能存在木质结构。(5)汉陶俑头部与身体表面部位微生物多样性与组成存在明显的差异,暗示汉陶俑各部位的营养成分存在差异,可能与汉陶俑着有衣物、装有木质手臂或染料涂色相关。

REFERENCES

- [1] 李莎. 汉阳陵帝陵外藏坑土壤含水率的影响因子分析[J]. 文物鉴定与鉴赏, 2020(6): 60-63.
LI S. Analysis on influencing factors of soil moisture content in the pit outside Hanyang Mausoleum[J]. Identification and Appreciation to Cultural Relics, 2020(6): 60-63 (in Chinese).
- [2] 侯宁彬, 马永赢, 李库, 陈波, 石宁, 杨武站, 张生产, 齐增安, 郑朝阳, 孙征, 张琳, 闫华军. 汉阳陵东区陪葬墓 M3 之外藏坑考古发掘简报[J]. 考古与文物, 2021, 2021(1): 22-39.
HOU NB, MA YY, LI K, CHEN B, SHI N, YANG WZ, ZHANG SC, QI ZA, ZHENG ZY, SUN Z, ZHANG L, YAN HJ. A brief report on the archaeological excavation of the pit outside the M3 of the tomb in the eastern area of Hanyang Mausoleum[J]. Archaeology and Cultural Relics, 2021, 2021(1): 22-39 (in Chinese).
- [3] 张盼, 陈彬. 从汉阳陵塑衣式拱手跏坐女俑浅谈西汉服饰文化[J]. 纺织报告, 2020, 39(4): 97-98.
ZHANG P, CHEN B. Analysis of Western Han Dynasty's costume culture on the pottery figures from Yang Mausoleum of the Han Dynasty[J]. Textile Reports, 2020, 39(4): 97-98 (in Chinese).
- [4] 庄家会. 关于汉阳陵着衣式陶俑制作工艺的探讨[J]. 艺术设计研究, 2018(1): 114-118.
ZHUANG JH. Discussion on the production process of the dressed pottery figurine from Hanyangling Mausoleum[J]. Art & Design Research, 2018(1): 114-118 (in Chinese).

- [5] 张敏. 秦、汉陶俑: 取材现实的艺术创作[J]. 艺术品鉴, 2018(31): 86-92.
ZHANG M. Terracotta figurines of Qin and Han Dynasties—artistic creation based on reality[J]. Appreciation, 2018(31): 86-92 (in Chinese).
- [6] 颜振康. 纤维素原料的制备[J]. 化学世界, 1962, 3(4): 28-29.
YAN ZK. Preparation of cellulose raw materials[J]. Chemical World, 1962, 3(4): 28-29 (in Chinese).
- [7] 封云芳, 郭少骏, 吕建德. 桑蚕茧丝的热裂解气相色谱研究[J]. 浙江丝绸工学院学报, 1989, 6(4): 5-10.
FENG YF, GUO SJ, LÜ JD. Studies on pyrolytic gas chromatograph of *Bombyx-mori* bave[J]. Journal of Zhejiang Institute of Silk Textiles, 1989, 6(4): 5-10 (in Chinese).
- [8] HEUCK C, WEIG A, SPOHN M. Soil microbial biomass C:N:P stoichiometry and microbial use of organic phosphorus[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 85: 119-129.
- [9] LLADÓ S, LÓPEZ-MONDÉJAR R, BALDRIAN P. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2017, 81(2): e00063-e00016.
- [10] 王丽琴, 郭金沂, 马彦妮, 赵星. 古代常用颜料的微生物生长差异性研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2022, 52(3): 468-475.
WANG LQ, GUO JY, MA YN, ZHAO X. Study on the difference of microbial growth of pigments commonly used in ancient times[J]. Journal of Northwest University (Natural Science Edition), 2022, 52(3): 468-475 (in Chinese).
- [11] LIAO X, CHEN C, ZHANG J, DAI Y, ZHANG X, XIE S. Operational performance, biomass and microbial community structure: impacts of backwashing on drinking water biofilter[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(1): 546-554.
- [12] 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1344-1350.
LIU WQ, MAO ZC, YANG YH, XIE BY. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene library[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(10): 1344-1350 (in Chinese).
- [13] LIU XB, QIAN YF, WANG YL, WU FS, WANG WF, GU JD. Innovative approaches for the processes involved in microbial biodeterioration of cultural heritage materials[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 75: 102716.
- [14] STOMEIO F, PORTILLO MC, GONZALEZ JM, LAIZ L, SAIZ-JIMENEZ C. *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with paleolithic paintings[J]. International Biodeterioration & Biodegradation 62: 483-486.
- [15] LI Q, ZHANG BJ, WANG LY, GE QY. Distribution and diversity of bacteria and fungi colonizing ancient Buddhist statues analyzed by high-throughput sequencing[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, 117: 245-254.
- [16] KRAKOVA L, de LEO F, BRUNO L, PANGALLO D, URZÌ C. Complex bacterial diversity in the white biofilms of the Catacombs of St. Callixtus in Rome evidenced by different investigation strategies[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(5): 1738-1752.
- [17] CUEZVA S, FERNANDEZ-CORTES A, PORCA E, PAŠIĆ L, JURADO V, HERNANDEZ-MARINE M, SERRANO-ORTIZ P, HERMOSIN B, CAÑAVERAS JC, SANCHEZ-MORAL S, SAIZ-JIMENEZ C. The biogeochemical role of *Actinobacteria* in Altamira cave, Spain[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 81(1): 281-290.
- [18] HERO JS, PISA JH, ROMERO CM, KARLSSON EN, LINARES-PASTÉN JA. Endo-xylanases from *Cohnella* sp. AR92 aimed at xylan and arabinoxylan conversion into value-added products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6759-6778.
- [19] YANG YC, HERBOLD CW, JUNG MY, QIN W, CAI MW, DU H, LIN JG, LI XY, LI M, GU JD. Survival strategies of ammonia-oxidizing archaea (AOA) in a full-scale WWTP treating mixed landfill leachate containing copper ions and operating at low-intensity of aeration[J]. Water Research, 2021, 191: 116798.
- [20] MANZO N, D'APUZZO E, COUTINHO PM, CUTTING SM, HENRISSAT B, RICCA E. Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 198.
- [21] REHMAN HU, AMAN A, SILIPO A, QADER SA, MOLINARO A, ANSARI A. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 1081-1086.
- [22] FIELD EK, BLASKOVICH JP, PEYTON BM, GERLACH R. Carbon-dependent chromate toxicity mechanism in an environmental *Arthrobacter* isolate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 355: 162-169.
- [23] MIKSCH S, MEINERS M, MEYERDIERKS A, PROBANDT D, WEGENER G, TITSCHACK J, JENSEN MA, ELLROTT A, AMANN R, KNITTEL K. Bacterial communities in temperate and polar coastal sands are seasonally stable[J]. ISME Communications, 2021, 1(1): 29.