Sekwencjonowanie metagenomowe w identyfikacji mikroorganizmów zasiedlających eksponaty zabytkowe

Magdalena Dyda[1*], Agnieszka Laudy[2], Łukasz Dziewit[3], Przemysław Decewicz[3], Krzysztof Romaniuk[3], Martyna Ciężkowska[4], Łukasz Drewniak[4]

1 - RDLS sp. z o.o., Warszawa; ***magdalena.dyda@rdls.pl***
2 - Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie, Laboratorium Badań Środowiska, Warszawa; *alaudy@muzeum-wilanow.pl*
3 - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Genetyki Bakterii; *ldziewit@biol.uw.edu.pl*
4 - Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Warszawa; *ldrewniak@biol.uw.edu.pl*

Wstęp

Identyfikację mikroorganizmów zasiedlających obiekty zabytkowe od dziesięcioleci przeprowadza się w oparciu o techniki klasycznej mikrobiologii, w których wykorzystuje się różnego typu podłoża zapewniające optymalne warunki do wzrostu kolonii bakterii i grzybów. Ze względu na trudności związane z określeniem wymagań wzrostowych poszczególnych gatunków w.w. metody w ograniczonym stopniu sprawdzają się w analizie bioróżnorodności mikrobiologicznej. W laboratoriach Wydziału Biologii UW wykorzystano metodę sekwencjonowania metagenomowego do analizy różnorodności bakterii zasiedlających zabytkową Pergolę Północną przy Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie.

Cel pracy

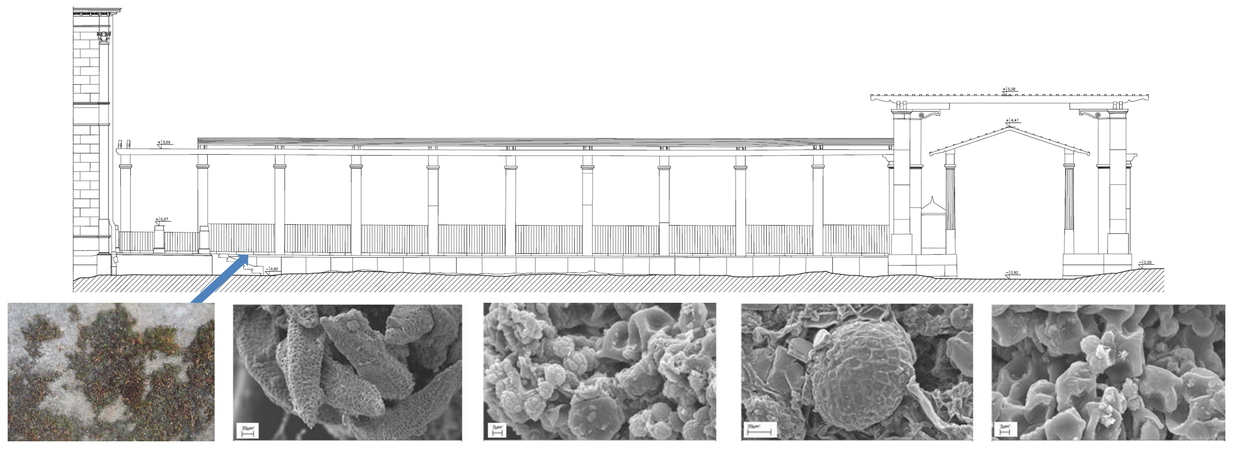
Celem niniejszej pracy było porównanie różnorodności i udziału poszczególnych grup bakterii w próbkach pobranych bezpośrednio z biofilmów porastających powierzchnie Pergoli Północnej oraz w próbkach wysianych na podłoża mikrobiologiczne.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Do analiz mikroskopowych ostrożnie pobierano próbki biofilmów porastających Pergolę Północną (ok. 2cm^2). Preparaty utrwalano w eksykatorze w parach formaldehydu przez 3 tygodnie w obecności żelu suszącego, a następnie napylano złotem. Preparaty oglądano w skaningowym mikroskopie elektronowym LEO 1430VP (LEO Electron Microscopy).

Materiały i metody

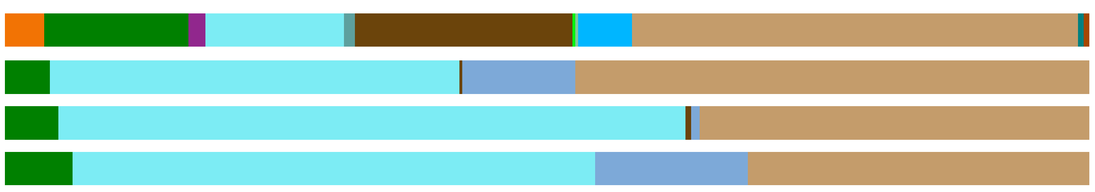
Morfologia biofilmów porastających Pergolę Północną



Analiza molekularna mikroflory zasiedlającej Pergolę Północną

Do analiz genetycznych pobrano 0,2g materiału biologicznego bezpośrednio z powierzchni Pergoli oraz po 0,1g materiału z 12 różnych miejsc, z którego wykonano rozcieńczenia i wysiano na podłoża mikrobiologiczne: agar odżywczy, podłoże Blickfeldta i podłoże Fraziera. Izolację całkowitego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Otrzymany DNA oczyszczano i wykorzystywano jako matrycę do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA bakterii (region zmienny V3 i V4, około 500 p.z.) z wykorzystaniem wiernej polimerazy KAPA HiFi (Kapa Biosystems). Następnie wykonano sekwencjonowanie metagenomowe poszczególnych amplikonów z wykorzystaniem technologii Illumina i sekwenatora MiSeq. Uzyskane w wyniku sekwencjonowania dane zostały przeanalizowane z wykorzystaniem programów: MOTHUR,QIIME, R.

Wyniki



Udział poszczególnych *typów* bakterii w analizowanych amplikonach (%)

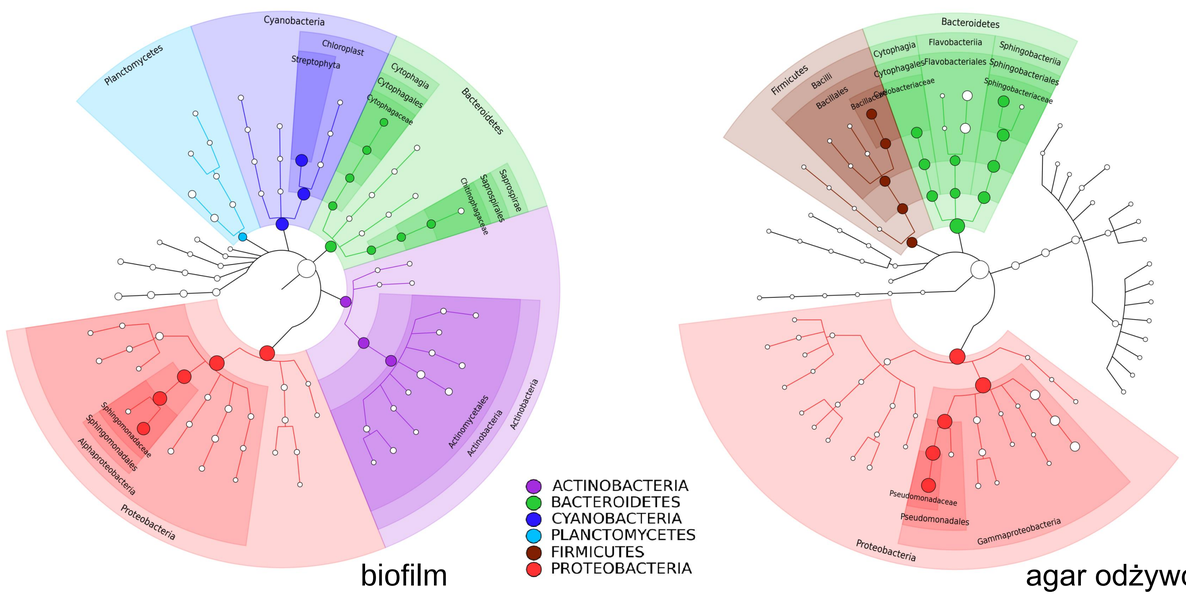
typ	biofilm	agar odżywczy	podłoże Blickfeldta	podłoże Fraziera
Acidobacteria	3.6	0	0	0
Actinobacteria	13.4	4.0	4.9	6.1
Armatimonadetes	1.4	0	0	0
Bacteroidetes	13.0	37.9	57.8	48.3
Chloroflexi	0.9	0	0	0
Cyanobacteria	20.1	0.2	0.5	0.1
FBP	0.2	0	0	0
Firmicutes	0.1	10.5	0.7	13.9
Gemmatimonadetes	0.1	0	0	0
Planctomycetes	5.1	0	0	0
Proteobacteria	40.9	47.3	36.0	31.6
TM7	0.7	0	0	0
Verrucomicrobia	0.4	0	0	0
[Thermi]	0.1	0	0	0

Ryc. 1. Różnorodność bakterii analizowana na poziomie *typów* z próbek biofilmów zasiedlających Pergolę Północną przy Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie.

Zidentyfikowane *rodziny* bakterii w poszczególnych amplikonach

Acidobacteria-6; iii1-15, *Acidobacteriaceae*, *Solibacterales*, *Chloracidobacteria; RB41; Ellin6075*, *Acidimicrobiales; C111*, *Actinomycetales*, *Frankiaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Kineosporiaceae*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Micromonosporaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nakamurellaceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardioidaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Sporichthyaceae*, *Patulibacteraceae*, *Solirubrobacteraceae*, *Armatimonadaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Cyanobacteria; 4C0d-2; MLE1-12*, *Chlorophyta*, *Trebouxiophyceae*, *Stramenopiles*, *Streptophyta*, *Nostocaceae*, *Pseudanabaenaceae*, *FBP*, *Bacillales*, *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Planococcaceae*, *Gemmatimonadales*, *Phycisphaerae; WD2101*, *Gemmataceae*, *Isosphaeraceae*, *Pirellulaceae*, *Caulobacteraceae*, *Rhizobiales*, *Aurantimonadaceae*, *Weeksellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Chitinophagaceae*, *Anaerolineae; SBR1031; A4b*, *Thermomicrobia*, *Thermomicrobia; JG30-KF-CM45*, *Hyphomonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Acetobacteraceae*, *Rhodospirillaceae*, *Rickettsiales; mitochondria*, *Sphingomonadales*, *Sphingomonadaceae*, *Burkholderiales*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Myxococcales*, *Haliangiaceae*, *Nannocystaceae*, *Halomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *TM7*, *Chthoniobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*

Ryc. 2. Różnorodność bakterii analizowana na poziomie *rodzin* z próbek biofilmów zasiedlających Pergolę Północną przy Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie.



Ryc. 3. Analizy filogenetyczne bakterii zasiedlających biofilmy porastające powierzchnie Pergoli Północnej przy Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie.

Podsumowanie

- Sekwencjonowanie metagenomowe wykazało większą różnorodność i inny udział poszczególnych grup bakterii w próbce pobranej bezpośrednio z powierzchni Pergoli Północnej w porównaniu do analiz mikroorganizmów wyrosłych po wysianiu materiału z 12 próbek na różne podłoża mikrobiologiczne (zidentyfikowano bakterie należące do: 130 *rodzajów* - agar odżywczy, 118 *rodzajów* - podłoże Fraziera i 163 *rodzajów* - podłoże Blickfeldta vs. **419 *rodzajów*** w 1 próbce biofilmu).
- W wyniku analiz genetycznych zidentyfikowano grupy bakterii, które odpowiedzialne są za niszczenie obiektów kamiennych: rodzaje *Sphingomonas*, *Hymenobacter* i *Pedobacter* (czynniki biodeterioracyjne dla zabytków kamiennych), rząd *Actinomycetales* (promieniowce), rodzaj *Rubellimicrobium*, rodzina *Geodermatophilaceae* (uważana za przyczynę degradacji skał węglanowych), rodzina *Cytophagaceae* (uznawana za wskaźnik postępującej deterioracji kamiennych zabytków), rodziny: *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* i *Chitinophagaceae* (bakterie niszczące skały i kamienne monumenty), rodzina *Acetobacteraceae* (produkowane przez te bakterie kwasy organiczne mogą wpływać na niszczenie skał), rodzina *Aurantimonadaceae* (rodzina głównie morskich bakterii, które odpowiadają za niszczenie koralowców), rodzina *Acidobacteriaceae* (głównie kwasolubne bakterie glebowe).

Wnioski

Sekwencjonowanie metagenomowe pozwala na pełną analizę składu i udziału poszczególnych grup mikroorganizmów, w próbkach pobranych bezpośrednio z obiektu zabytkowego. Metoda umożliwia również identyfikację i określenie udziału grup bakterii stanowiących potencjalne zagrożenie biodeterioracyjne.

Badania przeprowadzono w ramach projektu: „Rewitalizacja i digitalizacja jedynej w Polsce barokowej rezydencji królewskiej w Wilanowie" sfinansowanego ze środków Unii Europejskiej i Ministerstwa Kultury i Dziedzictwa Narodowego w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko 2007-2013, Priorytet XI „Kultura i dziedzictwo kulturowe", Działania 11.1: Ochrona i zachowanie dziedzictwa kulturowego o znaczeniu ponadregionalnym.