

辐射污染区土壤中放线菌的分离及多样性

张志东* 茆 军 唐琦勇 王 玮 谢玉清 石玉瑚

(新疆农业科学院微生物研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要: 从辐射污染区采集 42 份土样, 分别采用 6 种分离培养基进行放线菌的分离, 共获得 152 株放线菌。经形态、核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶(Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)分析比较, 选取其中的 60 株进行 16S rRNA 基因测序。通过序列比对、聚类分析, 60 株菌分布在放线菌纲中的 12 个属, 链霉菌属占大多数, 有大量稀有放线菌, 这表明辐射污染区具有较丰富的放线菌属种多样性。

关键词: 辐射污染土壤, 放线菌, 多样性

Diversity Investigation of Actinomycetes Isolated from Radiation-polluted Soil

ZHANG Zhi-Dong* MAO Jun TANG Qi-Yong WANG Wei XIE Yu-Qing SHI Yu-Hu

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urmqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: One hundred and fifty two actinomycetes were isolated from forty two radiation-polluted soil samples, using six different isolation media. Sixty cultures were chosen for 16S rRNA gene sequence and systematic analysis, which based on their morphology and ARDRA. Results of 16S rRNA gene sequences blasting showed that the strains were assigned to 12 recognized genera of actinomycetes, most of them fall within *Streptomyces* genus and a great deal of strains belonged to rare actinomycetes, which indicated a rich diversity of actinomycetes in the radiation-polluted soil.

Keywords: Radiation-polluted soil, Actinomycete, Diversity

放线菌能产生多种生物活性物质, 是一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的微生物资源, 受到了微生物学家的普遍关注和广泛研究^[1]。随着微生物研究方法和技术的日益成熟, 普通环境下微生物资源已开发殆尽, 很难满足未来科学研究的需要。随着特殊环境和嗜极环境微生物研究的深入开展, 嗜热、嗜冷、嗜酸、嗜碱、耐辐射等微生物及特殊功能产物的相继发现, 科学家相信一切极端环境都可能是一个潜在的微生物资源宝库^[2-4]。

辐射污染区一度被认为是生命的禁区, 国内外对该周围环境中的微生物研究甚少。随着耐辐射球菌(*Deinococcus radiodurans*)具有极强的电离辐射、紫外线辐射、过氧化物、重金属离子等抗性的研究发现, 以及相关耐辐射微生物的发现, 研究者相信辐射污染区虽然存在着一定的放射物质及放射线, 但仍可能存在着相应的耐辐射微生物物种^[5-7]。

自 2007 年在辐射污染区土样中分离出 2 株放线菌新种 *Streptomyces radiopugnans* 和 *Lechevalieria*

xinjiangensis 后^[8,9], 本研究组对辐射污染区的放线菌又进行了大量的相关工作。本文着重介绍了辐射污染区土样中的放线菌的分离和多样性分析的研究。

1 材料和方法

1.1 土样

土壤样品采自辐射污染区不同方位地下 5 cm~10 cm 土壤, 并放置在铅板盒里 4°C 保存。

1.2 培养基^[10-12]

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, NaCl 0.5 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, Fe₂SO₄ 10 mg, 去离子水 1 L, 琼脂 20 g, pH 为 7.0 左右。

淀粉-酪素琼脂培养基: 可溶性淀粉 10 g, 干酪素 0.3 g, KNO₃ 2 g, NaCl 2 g, MgSO₄ 0.05 g, K₂HPO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.02 g, Fe₂SO₄ 10 mg, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L, pH 为 7.2~7.4。

P 培养基: 蛋白胨 0.01 g, 酵母浸粉 0.05 g, 葡萄糖 0.001 g, NaCl 0.05 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, Fe₂SO₄ 10 mg, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L, pH 为 7.2。

土壤浸汁培养基: 1 L 去离子水中加入 100 g 土壤样品充分混匀, 过滤取滤液。葡萄糖 2 g, NaCl 5 g, 蛋白胨 2 g, 琼脂 20 g, 加去离子水补至 1 L, 自然 pH。

HVA 培养基: 腐殖酸 1.0 g, KCl 1.7 g, MgSO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.02 g, 放线菌酮 50 mg, 过滤除菌的微量元素 1 mL, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L, pH 为 7.2~7.4。

LSV-SE 培养基: 木质素 1.0 g, 豆饼粉 0.2 g, KCl 1.7 g, MgSO₄ 0.5 g, Na₂HPO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.02 g, 过滤除菌的微量元素 1 mL, 琼脂 20 g, 去离子水 1 L, pH 为 7.2~7.4。

微量元素(mg/mL): 硫胺素 0.5 mg, 烟酸 0.5 mg, 泛酸 0.5 mg, 核黄素 0.5 mg, VB₆ 0.5 mg, 肌醇 0.5 mg, 生物素 0.5 mg, 水 1 mL, 过滤除菌, 4°C 冰箱保存。

1.3 菌种分离

1.3.1 放线菌的分离: 称取 0.5 g 样品加至装有 20 mL 无菌生理盐水的三角瓶中, 室温振荡混匀 10 min 后, 悬液做 10³ 倍稀释后, 吸取 200 μL 稀释液分别涂布于各分离培养基平皿上, 在 30°C 的温箱中培养 1 d~7 d, 根据菌落大小、形态、颜色单菌落, 并在相

应的分离培养基上进行纯化。

1.3.2 耐辐射菌的筛选: 将分离纯化的菌株液体培养至指数生长期, 1500 r/min 离心收集菌体, 用 0.05 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2)悬浮菌体, 并调至同一浓度, 对菌液进行 10 kGy 和 20 kGy 剂量的 Co⁶⁰γ 射线照射处理, 并分别以大肠杆菌和 *Deinococcus radiodurans* 为阴、阳对照。处理后的悬浮液经 10⁴ 倍稀释后, 取稀释液 200 μL 涂布于对应的琼脂培养基平板上, 置 30°C 温箱培养, 观察并记录菌落数至 15 d, 有菌落者为耐辐射菌株。

1.4 总 DNA 的小量提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增
采用上海华舜生物工程有限公司的细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取经形态观察合并后的放线菌总 DNA, 16S rRNA 基因扩增引物为通用引物 27F 和 1495R, 扩增条件为 95°C 5 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经切胶纯化(上海华舜生物技术公司胶回收试剂盒)回收, 加去离子水溶解, -20°C 保存备用。

1.5 ARDRA 分析^[12,13]

取 15 μL 上述纯化回收的 16S rRNA 基因 PCR 产物溶液, 分别用限制性内切酶 *Sau3A I* 进行酶切。酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 对经形态观察合并后的实验菌株电泳条带进行聚类分群, 从各群选代表性的 PCR 产物将送出测序。

1.6 系统发育树的构建及分析

将所得 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 Blast 比较, 确定与实验菌株亲缘关系最近的种属。并从数据库获得相关种属中最近模式菌株的 16S rRNA 基因序列, 使用 Mega 3.1 进行比对, 用 NJ 法构建系统发育树^[14]。

2 结果

2.1 菌株分离

从 30 份土壤样品中共分离到放线菌 152 株, 其中有 20 株在 20 kGy Co⁶⁰γ 射线照射存活, 46 株在 10 kGy 以上存活。它们的形态特征丰富多样, 根据基丝、气丝和可溶性色素的颜色, 将它们归为 25 个类群。从 25 个类群中挑选出代表菌株 102 株, 插片观察形态表明, 其中 61 株具有气丝、柔曲或螺旋的孢子链, 基内菌丝分枝发达、无横隔、不断裂, 与链霉菌形态特征相似; 另外 41 株或基丝断裂, 或气丝

稀薄、无孢子链, 或无明显分枝菌丝体, 与链霉菌形态明显不同。

2.2 ARDRA 分析

提取代表性的 102 株菌株菌体 DNA, 扩增 16S rRNA 基因, 分别用限制性内切酶 *Sau3A I* 进行酶切, 分析 ARDRA 多态性发现, 102 株菌共呈现出 40 种不同的图谱(图 1 为部分菌株的 ARDRA 图谱), 考虑到仅采用一种酶进行酶切和 ARDRA 在种和株的水平分辨率比较低等因素, 为保证充分呈现菌种的多样性, 选出 60 株送去测序。

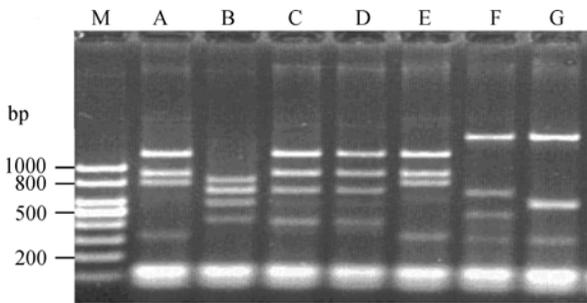


图 1 部分链霉菌菌株 16S rRNA 基因的 *Sau3A I* 限制性酶切图谱

Fig. 1 Restriction patterns of 16S rRNA of partial tested *Streptomyces* strains digested with *Sau3A I*

M: 100 bp ladder; A: Strain407; B: Strain291 C: Strain191; D: Strain264; E: Strain507; F: Strain179; G: Strain81.

2.3 16S rRNA 基因序列分析

通过测序获得 16S rRNA 基因全序列, 与 GenBank 中序列比对并进行聚类分析, 所得到的 60 株放线菌分离株分布于放线菌纲中的 12 个属: 链霉菌属 (*Streptomyces*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、糖丝菌属 (*Saccharothrix*)、拟无枝菌酸菌属 (*Amycolatopsis*)、马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、*Deinococcus* 属、*Cupriavidus* 属、*Kribbella* 属、*Ornithinimicrobium* 属、*Lechevalieria* 属, 其中, 以链霉菌数量最多, 占有所有测序株的 60%以上(表 1)。图 2 为部分链霉菌属实验株的 16S rRNA 基因序列聚类分析结果, 分属于链霉菌属的 11 个种, 其中 *Streptomyces radiopugnans* R97^T 与外围菌株 *Lechevalieria xinjiangensis* R24^T 为本研究中已发表的 2 个新种。

3 讨论

辐射污染区由于存在着一定的放射物质及放射

表 1 根据 16S rRNA 基因的序列比对的放线菌分离株的鉴定

Table 1 Identification of the actinomycete isolates based on sequences analysis of the 16S rRNA gene sequences

Identification (Nearest genus)	Similarity (%)	No. of isolates
<i>Streptomyces</i>	97~100	37
<i>Pseudonocardia</i>	97~100	4
<i>Nocardioides</i>	97~99	2
<i>Saccharopolyspora</i>	98	2
<i>Saccharothrix</i>	97~99	3
<i>Amycolatopsis</i>	96~100	3
<i>Actinomadura</i>	97~100	2
<i>Rhodococcus</i>	99	2
<i>Deinococcus</i>	97	2
<i>Cupriavidus</i>	98	1
<i>Ornithinimicrobium</i>	97	1
<i>Lechevalieria</i>	97	1

线, 一直被认为生命的禁区, 国内外对其周围环境中微生物研究甚少。我国辐射污染区属于典型荒漠地区, 植被覆盖极少, 一般情况此类地区微生物种类相对单一。本项目组自 2004 年以来对该区域放线菌及耐辐射微生物进行分离鉴定研究, 现已分离出 152 株放线菌, 其中有 20 株在 20 kGy Co⁶⁰γ 射线照射存活, 属于较耐辐射的菌株; 菌株经归类合并、16S rRNA 基因测序、比对分析发现, 分离菌株分别属于放线菌中的 12 个属, 并有大量的稀有放线菌被发现, 证明该地区存在着较为丰富的放线菌种属多样性, 研究结果远远超出研究预期。

一般认为可培养微生物仅占有所有微生物的 1%~10%左右, 而本研究仅使用了 6 种培养基筛选, 并未对该地区土壤的盐离子、重金属含量等重要因素依次考虑在培养基设计之内, 就分离出 152 株放线菌, 其中两株为新种, 研究结果预示着该地区可能存在着一定量的未知放线菌种属。同时本研究使用的方法、手段的仍较单一, 不可能完全反映出该地区放线菌多样性的全貌; 随着分子技术与可培养培养手段的结合, 尤其是基于 16S rRNA 基因 PCR 技术的 DGGE、RFLP、SSCP 等方法在本研究的相继运用, 必将有更多的未知微生物会被发现, 同时也将进一步的揭示辐射污染区微生物的多样性。

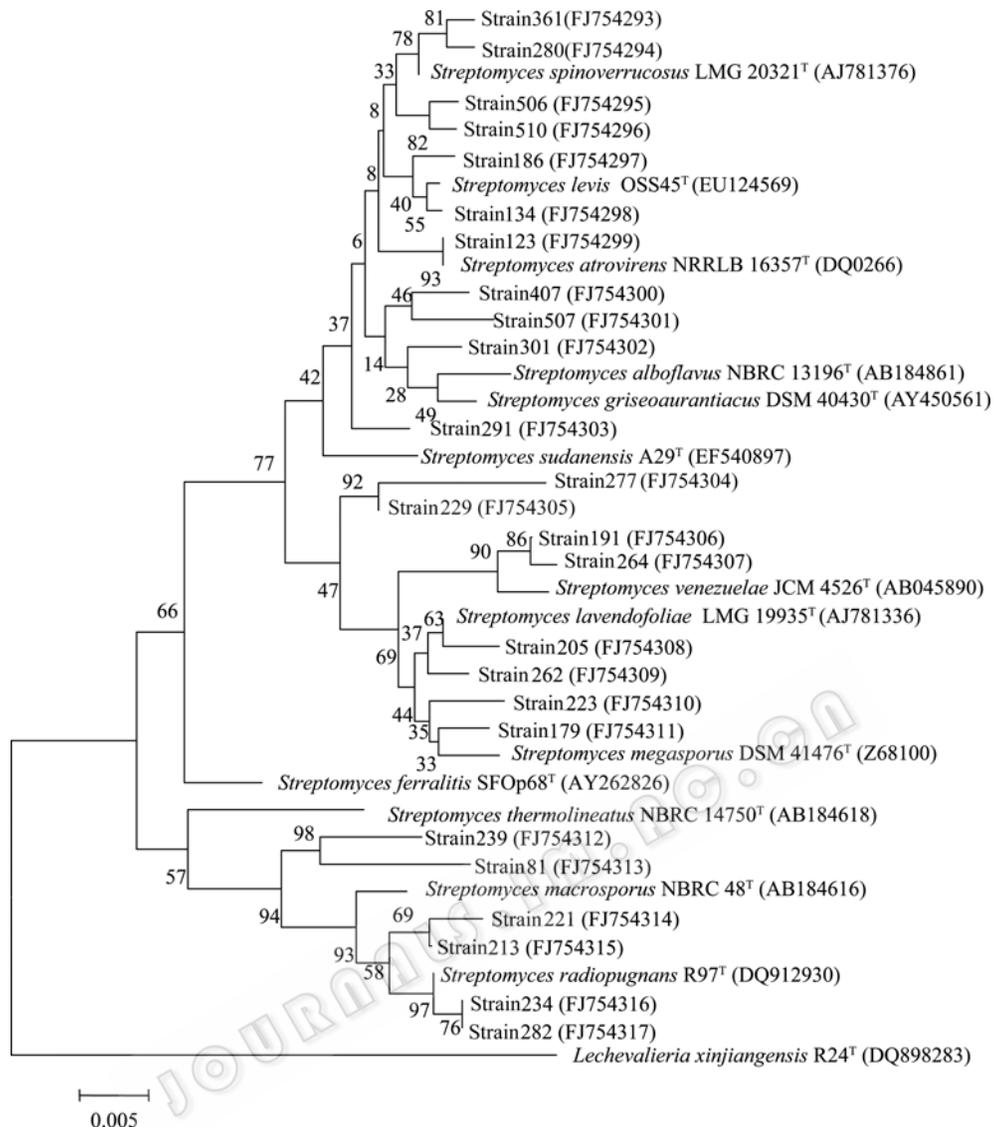


图 2 依据 16S rDNA 序列 N-J 法构建的链霉菌属实验菌株及相关种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the positions of tested *Streptomyces* strains based on partial 16S rDNA gene partial sequences by the neighbour-joining method of Mega

Note: Numerals on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). The sequence of *Lechevalieria xinjiangensis* R24^T (DQ898283) was used as outgroup. The scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position.

参 考 文 献

- [1] 刘志恒. 放线菌-微生物药物的重要资源. 微生物学通报, 2005, 32(6): 143-145.
- [2] 李文均, 徐平, 徐丽华, 等. 极端环境中的放线菌资源. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
- [3] Phoebe CH, Combie J, Albert FG, et al. Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compound. *J Antibiot*, 2001, 54(1): 56-65.
- [4] 顾觉奋, 罗学刚. 极端微生物活性物质的研究进展. 中国天然药物, 2003, 11(4): 252-256.
- [5] Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, et al. Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science*, 2004, 306(5698): 1025-1028.
- [6] 田兵, 徐步进, 华跃进. 耐辐射球菌清除活性氧自由基及对 DNA 的保护作用. 核农学报, 2004, 18(5): 376-380.
- [7] Chen, MY, Wu SH, Lin GH, et al. *Rubrobacter taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, radiation-resistant species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol*,

- 2004, **54**: 1849–1855.
- [8] Wei Wang, Zhidong Zhang, Qiyong Tang, *et al.* *Lechevalieria xinjiangensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 2819–2822.
- [9] Jun Mao, Qiyong Tang, Zhidong Zhang, *et al.* *Streptomyces radiopugnans* sp. nov., a radiation-resistant actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**: 2578–2582.
- [10] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1989, pp.51–70.
- [11] 李钟庆. 微生物菌种保藏技术. 北京: 科学出版社, 1989, pp.40–51.
- [12] 崔庆峰, 王黎明, 黄英, 等. 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究. *微生物学报*, 2004, **44**(5): 571–575.
- [13] Tabacchioni S, Chiarini A. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbial Ecol*, 2000, **40**: 169–176.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406–425.

(上接 p.1298)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖沓模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>