

研究报告

出土竹简饱水期间放线菌群落结构与功能

张潇月¹ 杨弢^{2,3} 吴昊^{3,4} 黄鑫¹ 李静¹ 周潇^{2,3} 肖麟^{2,3} 赵珂^{1*}

(1. 四川农业大学资源学院应用微生物学系 四川 成都 611130)

(2. 成都文物考古研究院 四川 成都 610072)

(3. 出土木漆器保护国家文物局重点科研基地成都工作站 四川 成都 610072)

(4. 荆州文物保护中心 湖北 荆州 434020)

摘要:【背景】出土竹简需经历一个较长时间的饱水保存后才进行脱水处理,在此期间微生物的滋生和蔓延威胁竹简的安全保存。【目的】研究分析成都老官山汉墓出土竹简浸泡液中的放线菌群落结构与功能,为科学有效保存竹简提供理论依据。【方法】采用 PCR-DGGE (变性梯度凝胶电泳)技术与传统可培养方法相结合的方式对成都老官山汉墓出土竹简夏季浸泡液中的放线菌群落结构和功能进行了初探。【结果】DGGE 图谱显示,各样品间放线菌多样性指数(H')、优势度指数(C)、辛普森指数(D)和均匀度指数(J)均有所不同,主成分分析结果反映出竹简浸泡液中放线菌种群结构存在较大差异; DGGE 条带回收测序显示 15 条序列归于 10 个属,其中检出率较高的有原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*),而原小单胞属(*Promicromonospora*)在各个样品中均有检出;可培养方法获得 12 株放线菌,分属于链霉菌属(*Streptomyces*)和原小单胞属(*Promicromonospora*);通过刚果红实验对分离获得的菌株进行初步筛选,得到 5 株具有纤维素降解能力的菌株。【结论】竹简浸泡液中的放线菌不仅种群丰富,而且存在降解竹简的潜在可能。

关键词: 竹简浸泡液, 变性梯度凝胶电泳, 可培养方法, 放线菌群落结构, 纤维素降解

Foundation items: Technological and Development Project of Science and Technology Benefit the People of Chengdu City (2015-HM01-00609-SF); Students' Innovative Experiment Plan of Sichuan Province (201610626074)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86290982; E-mail: zhaoke82@126.com

Received: August 07, 2017; **Accepted:** November 07, 2017; **Published online** (www.cnki.net): December 04, 2017

基金项目: 成都市科技惠民技术研发项目(2015-HM01-00609-SF); 四川省大学生创新性实验计划项目(201610626074)

*通信作者: Tel: 86-28-86290982; E-mail: zhaoke82@126.com

收稿日期: 2017-08-07; **接受日期:** 2017-11-07; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-12-04

Analysis of actinobacterial community structure and function of waterlogged bamboo slips

ZHANG Xiao-Yue¹ YANG Tao^{2,3} WU Hao^{3,4} HUANG Xin¹ LI Jing¹
ZHOU Xiao^{2,3} XIAO Lin^{2,3} ZHAO Ke^{1*}

(1. Department of Microbiology, College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Chengdu Institute of Cultural Relics and Archaeology, Chengdu, Sichuan 610072, China)

(3. Key Scientific Research Base of Excavated Wood and Lacquerware Conservation, State Administration for Cultural Heritage (Chengdu Workstation), Chengdu, Sichuan 610072, China)

(4. Cultural Relic Protection Center of Jingzhou, Jingzhou, Hubei 434020, China)

Abstract: [Background] The bamboo slips should be kept in water for a long time before dehydration treatment, while the microbe might decompose it during this period. [Objective] In order to preserve bamboo slips effectively, the actinobacterial community structure features and function of soak solution which were collected from Han dynasty tomb located in Laoguanshan of Chengdu were studied. [Methods] The PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) and culture-dependent methods were employed to reveal the diversity and function of actinobacteria in soak solution. [Results] The PCR-DGGE and culture-dependent results were showing a certain degree of consistency. The PCR-DGGE result revealed that Richness (S), Shannon-Wiener index (H') and Simpson index (D) of actinobacteria of soaking bamboo slips were different. 15 DGGE bands were excised and sequenced, the major community of actinobacteria in soak solution were belonged to 10 genera. The genera *Promicromonospora*, *Cellulosimicrobium*, *Blastococcus* and *Streptomyces* widely distributed in soak solution, furthermore genus *Promicromonospora* was detected in each samples. 12 strains were isolated by culture-dependent method and belonged to *Streptomyces* and *Promicromonospora*. Congo red medium was employed to evaluate their carboxymethyl cellulase activity. The results showed five strains possessed cellulolytic ability. [Conclusion] The analysis of the actinobacterial community and function revealed the potential actinobacteria species may decompose bamboo slips during waterlogged period.

Keywords: Bamboo slips soak solution, DGGE, Culture-dependent method, Actinobacterial community, Cellulose decomposition

竹简是我国历史上使用时间最长的书籍形式, 为研究我国历史文化提供了重要资料, 而目前存世的大多数竹简都是来自于地下埋藏环境, 刚出土的竹简经过清洗后, 常存放于去离子水中进行饱水保存。由于竹简属于有机质文物, 其主要成分纤维素和木质素易被微生物利用, 随着浸泡时间的推移, 竹简长期安全的保存受到严重威胁。

放线菌是一类壁厚、G+C%含量高的革兰氏阳性细菌, 能够产生各类胞外水解酶, 降解环境中各种不溶性有机物质以获得细胞代谢所需的各种营养, 是公认的降解能力较强的微生物^[1]。在竹简饱水保存期间, 竹简上附着的放线菌极有可能对竹简有

潜在的破坏作用, 影响竹简的长期保存。由于环境中可培养的微生物数量不及总量的1%^[2], 本研究结合可培养与免培养的方式, 综合分析成都老官山汉墓出土竹简夏季浸泡液中的放线菌种群结构, 并对可培养微生物进行功能研究, 为饱水保存期间竹简的微生物病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

根据竹简的完残情况, 从成都文物考古研究院采集6种竹简浸泡液样品于15 mL无菌EP管中, 并编号(1[#]、15[#]、98[#]、121[#]、164[#]、176[#]), 同时采集用于保存竹简的去离子水作为对照, 即0[#](CK),

每种样品采集 3 管, 于 4 °C 保存。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

1.2.1 主要试剂和仪器

FastDNA[®] SPIN Kit for Soil, 美国 MPBIO 公司; PCR 引物、凝胶回收试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR mix, 天根生化科技有限公司; pMD19-T 载体, 宝生物工程(大连)有限公司。5804R 冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; PCR 仪、凝胶成像仪、DCode DGGE system, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2.2 培养基(g/L)

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂 20.0; ISP₄ 培养基: (NH₄)₂SO₄ 4.0, CaCO₃ 2.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄ 2.0, 可溶性淀粉 10.0, 琼脂 20.0; 刚果红培养基: 羧甲基纤维素钠 2.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄ 0.25, (NH₄)₂SO₄ 1.0, 刚果红 0.2, 琼脂 20.0; 木质素磺酸钠培养基: 参考陈跃辉^[3]的方法配制。

1.3 DGGE (变性梯度凝胶电泳)免培养方法分析竹筒浸泡液中放线菌多样性

1.3.1 水样的细胞收集和总 DNA 提取

采用过滤的方法进行细胞收集^[4], 按照 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 说明书进行总 DNA 提取, 获得的 DNA 于 -20 °C 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增

采用巢氏 PCR 对目标基因片段进行扩增^[5], 第 1 轮 PCR 引物为 F243 (5'-GGATGAGCCCGCGG CCTA-3') 和 R1186 (5'-CTTCCTCCGAGTTGACC C-3'), 第 2 轮 PCR 引物为 F907-GC (5'-AAACTCAA AGGAATTGACGGGCCCGCCGCGCGCGGC GGGCGGGCGGGGCACGGGGGG-3') 和 R1186 (5'-CTTCCTCCGAGTTGACCC-3')。PCR 反应体系与条件参照李静等^[6]的方法进行。

1.3.3 PCR-DGGE 产物检测与指纹图谱分析

DGGE 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8% (质量体积比)(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1, 质量比), 变性剂

浓度范围为 40%–70%。取第 2 轮扩增的 PCR 产物 20 μL 进行 DGGE 电泳分析, 在 1×TAE 缓冲液中, 50 V 预电泳 30 min, 然后在 60 °C、180 V 下恒温稳压电泳 6 h。电泳完毕后将胶取出使用银染法进行染色、拍照。采用 Quantity One 4.2.6 分析 DGGE 图谱, 通过条带识别和匹配, 扣除背景强度, 对目标条带进行标注, 利用 DGGE 图谱的数字化结果计算竹筒浸泡液中放线菌群落多样性指数(H')、辛普森指数(D)、优势度指数(C)及均匀度(J)^[6]。采用 CANOCO 5.0 软件进行主成分分析^[7], 了解不同竹筒浸泡液中放线菌的群落结构。

1.3.4 DGGE 条带测序及系统发育分析

用无菌刀片将可见条带切割后, 无菌去离子水清洗 2–3 次, 加入 20 μL 无菌去离子水于 4 °C 浸泡过夜。吸取 1 μL 浸泡液作 DNA 模板, 用此前 PCR 第 2 轮扩增时的引物(不带 GC 发夹)、相同体系和条件进行 PCR 扩增。PCR 产物用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行纯化, 然后与 pMD19-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 挑取白色克隆子用 pMD19-T 载体通用引物 M13 进行菌落 PCR, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测分析获得阳性克隆后, 送苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。将所测序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 在 GenBank 获取相似度较高的序列, 然后使用 MEGA 6.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树^[8], 菌株序列在 GenBank 提交后获取登录号 MF465204–MF465218。

1.4 可培养方法分析放线菌多样性及功能

1.4.1 菌株的分离纯化

将样品进行梯度稀释至 10⁻¹ 和 10⁻², 涂布于高氏一号培养基上, 于 28 °C 培养 7 d, 分离得到的菌株于 ISP₄ 培养基上进行纯化和斜面保存菌种。

1.4.2 菌株 DNA 的提取

采用 Cui 等^[9]的方法提取菌株 DNA。采用 25 μL 反应体系, 用细菌的 16S rRNA 基因通用引物 8–27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAA CGCT-3') 和 1492–1523R (5'-TACGGCTACCTTGT

TACGACTTCATCACCC-3')对菌株 16S rRNA 基因进行扩增, PCR 产物送苏州金唯智生物科技有限公司完成测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 菌株序列在 GenBank 中提交后获取登录号 MF461030–MF461041。

1.4.3 纤维素与木质素降解菌的筛选

参考李静等^[10]的方法, 接种直径为 5 mm 的菌饼于刚果红培养基上, 28 °C 培养 3 d, 根据是否出现水解圈判断菌株是否具有降解纤维素的能力; 参照陈跃辉^[3]的方法, 将分离获得的放线菌接种在以木质素磺酸钠为唯一碳源的固体培养基上, 筛选具有木质素降解潜力的菌株。

2 结果与分析

2.1 免培养结果分析

2.1.1 竹筒浸泡液中放线菌的 DGGE 图谱分析

各样品经 DGGE 图谱分析后分离出数目不等的条带, 不同样品的条带强度和迁移率差异较大, 而同一样品的 3 个重复相似度较高, 98[#] 竹筒浸泡液中放线菌群落结构最为复杂、条带数目最多, 0[#](CK)、164[#]、176[#] 样品中条带数目较少, 结果显示各样品 DGGE 条带的分布及数量具有较大差异(图 1)。

Quantity One 软件分析放线菌的 DGGE 图谱, 对各样品中放线菌多样性指数(*H'*)、优势度指数(*C*)、辛普森指数(*D*)和均匀度指数(*J*)进行了综合分析(表 1)。结果表明, 各样品间放线菌多样性指数(*H'*)、优势度指数(*C*)、辛普森指数(*D*)和均匀度指数(*J*)均

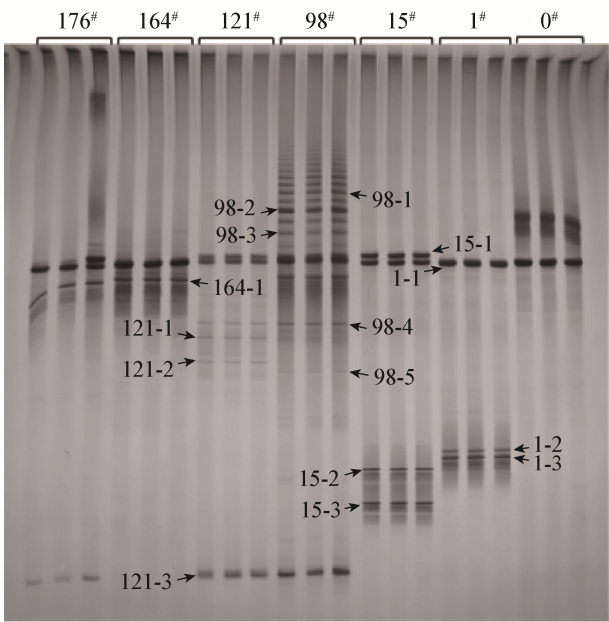


图 1 竹筒浸泡液中放线菌的 PCR-DGGE 图谱
Figure 1 PCR-DGGE map of actinobacteria communities in the soak solution of bamboo slips

有所不同。其中, 0[#]样品(CK)的放线菌多样性指数(*H'*)、辛普森指数(*D*)、均匀度指数(*J*)均显著低于竹筒样品液, 说明用于保存竹筒的去离子水中所含放线菌的种类较为单一; 98[#]样品中的放线菌多样性指数(*H'*)、辛普森指数(*D*)、均匀度指数(*J*)均高于其它样品, 其中多样性指数(*H'*)显著大于其它竹筒饱水样品, 表明 98[#] 样品的放线菌群落结构多样性高于其它样品。运用 CANOCO 软件对不同竹筒浸泡液的放线菌群落结构进行主成分分析, 结果如图 2 所示,

表 1 水样中放线菌的 DGGE 条带多样性指数、辛普森指数、优势度指数和均匀度指数

Table 1 Actinobacteria DGGE band diversity index, Simpson index, dominance index and evenness in water samples

样品编号 Sample No.	多样性指数 Shannon (<i>H'</i>)	优势度指数 Dominance (<i>C</i>)	辛普森指数 Simpson (<i>D</i>)	均匀度指数 Evenness (<i>J</i>)
0 [#]	1.097±0.000 93e	0.334±0.000 62a	0.666±0.000 62e	0.215±0.000 21e
1 [#]	1.789±0.000 36c	0.168±0.000 12c	0.833±0.000 12c	0.358±0.000 37c
15 [#]	2.075±0.000 52b	0.126±0.000 13d	0.874±0.000 13b	0.413±0.000 85b
98 [#]	2.884±0.000 29a	0.056±0.000 02e	0.944±0.000 02a	0.576±0.002 38a
121 [#]	2.066±0.000 82b	0.128±0.000 24d	0.872±0.000 24b	0.425±0.001 33b
164 [#]	1.456±0.125 82d	0.235±0.027 89b	0.765±0.027 89d	0.284±0.028 18d
176 [#]	1.711±0.195 21c	0.185±0.033 98c	0.815±0.033 98c	0.340±0.036 92c

注: 同一列中相同字母代表无显著性差异, 数据为 3 次重复平均值。

Note: The same letter in the same column indicated no significant difference (*P*=0.05) by LSD's multiple range test. Values were means ± SD (*n*=3).

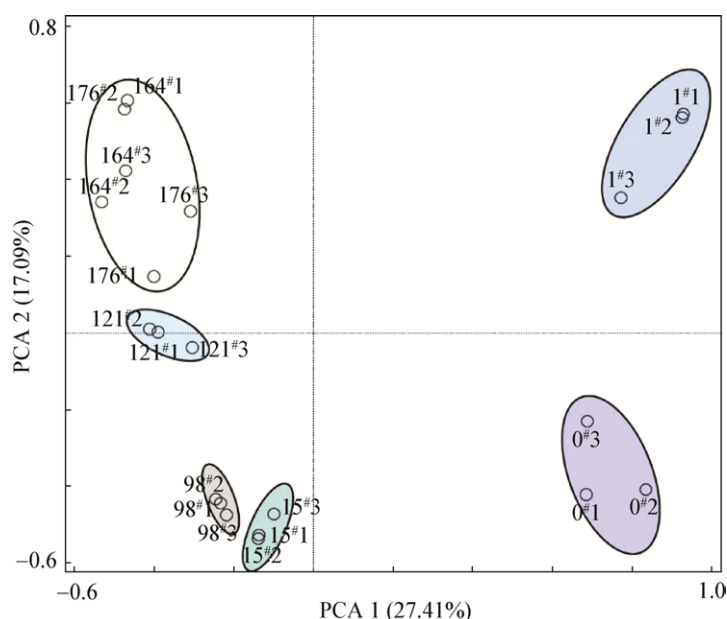


图2 竹筒浸泡液中放线菌群落的主成分分析

Figure 2 Principal component analysis (PCA) of actinobacteria communities in the soak solution of bamboo slips

各样品明显分散在不同的区域。0[#]和1[#]样品分别单独聚集且与其他样品距离较远；15[#]和98[#]样品分别单独聚集且距离较近；164[#]和176[#]样品聚集在一起且与单独聚集的121[#]样品距离较近。主成分分析结果反映出竹筒浸泡液中放线菌种群结构存在较大差异，去离子水对竹筒浸泡液中放线菌种群组成有一定的影响，但竹筒本身的保存状况可能是影响浸泡液中放线菌种群结构最主要的因素。

2.1.2 DGGE 条带测序及系统发育分析

DGGE 电泳后，对主条带进行切胶回收，克隆测序后，共获得 15 条序列，它们与 NCBI 数据库中已知序列的相似性为 96%–100% (表 2)。结果如表 2 所示，原小单孢菌属(*Promicromonospora*)在所有供试样品中均有分布，而其它放线菌属在不同样品中的分布差异较大。纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)在 176[#]、121[#]、98[#]和 15[#]样品中被检出；芽球菌属(*Blastococcus*)在 176[#]、164[#]、98[#]和 1[#]样品中被检出；链霉菌属(*Streptomyces*)在 176[#]、121[#]、98[#]和 0[#]样品中被检出；棒杆菌属(*Corynebacterium*)和大理石菌属(*Marmoricola*)仅在 121[#]样品中被检出；利夫森氏属(*Leifsonia*)和微杆菌属(*Microbacterium*)分别仅

在 98[#]和 15[#]样品中被检出；98[#]和 121[#]样品中检测到的放线菌种类最丰富，各有 6 个不同属的放线菌被检测到。

在 NCBI 数据库中选取了与测序序列具有较高相似性的序列构建系统发育树(图 3)。竹筒浸泡液中的放线菌分属于 5 个亚目：丙酸杆菌亚目(*Propinibacterineae*)、地嗜皮菌亚目(*Geodermatophilales*)、微球菌亚目(*Micrococcales*)、棒杆菌亚目(*Corynebacteriales*)和链霉菌亚目(*Streptomycineae*)；5 个科：类诺卡氏菌科(*Nocardioideaceae*)、地嗜皮菌科(*Geodermatophilaceae*)、微杆菌科(*Microbacteriaceae*)、棒杆菌科(*Corynebacteriaceae*)和链霉菌科(*Streptomycetaceae*)；10 个属：原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、产丙酸单孢菌属(*Propionicimonas*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、利夫森氏属(*Leifsonia*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和大理石菌属(*Marmoricola*) (图 3)，表明竹筒浸泡液中的放线菌种群结构具有丰富的多样性。

表 2 DGGE 条带回收测序后的序列比对结果
Table 2 Phylogenetic identification and distribution of bacteria excised and sequenced from DGGE bands

条带编号 Bands No.	不同样品中出现的条带 Band appearance in different samples							归属类群(目) Phylogenetic group (Family)	基因库中比对出的最相似序列(属) Closest relative sequence in GenBank (Genus)	相似度 Similarity (%)
	0 [#]	1 [#]	15 [#]	98 [#]	121 [#]	164 [#]	176 [#]			
98-1	-	-	-	+	-	-	-	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces anulatus</i> (KT619156)	97.0
98-2	+	-	-	+	-	-	-		<i>Streptomyces anulatus</i> (KT619156)	99.5
121-3	-	-	-	+	+	-	+		<i>Streptomyces sampsonii</i> (KP970680)	99.5
98-3	-	-	-	+	-	-	-	Microbacterium	<i>Leifsonia kribbensis</i> (NR044240)	98.0
121-2	-	-	-	-	+	-	-		<i>Marmoricola antarctica</i> (KJ475136)	96.7
15-2	-	-	+	-	-	-	-		<i>Microbacterium hatanonis</i> (KR085807)	97.5
98-4	-	-	-	+	-	+	+	Geodermatophilaceae	<i>Blastococcus saxobsidens</i> (NR102872)	97.1
1-3	-	+	-	-	-	-	-		<i>Blastococcus saxobsidens</i> (KU258212)	99.5
164-1	-	-	-	+	+	-	-		<i>Geodermatophilus sabuli</i> (LN626269)	100.0
15-3	-	-	+	-	-	-	-	Promicromonospora	<i>Geodermatophilus sabuli</i> (LN626269)	98.0
15-1	-	-	+	+	+	-	+		<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (KT427908)	100.0
1-1	+	+	+	+	+	+	+		<i>Promicromonospora aerolata</i> (KR476463)	99.0
98-5	-	-	-	+	-	-	-	Propionicimonas	<i>Propionicimonas paludicola</i> (NR-104769)	96.8
1-2	-	+	-	-	-	-	-		<i>Propionicimonas paludicola</i> (NR-104769)	97.7
121-1	-	-	-	-	+	-	-	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium simulans</i> (AJ012837)	99.5

注: +: 有条带; -: 无条带。
Note: +: Detected; -: Not detected.

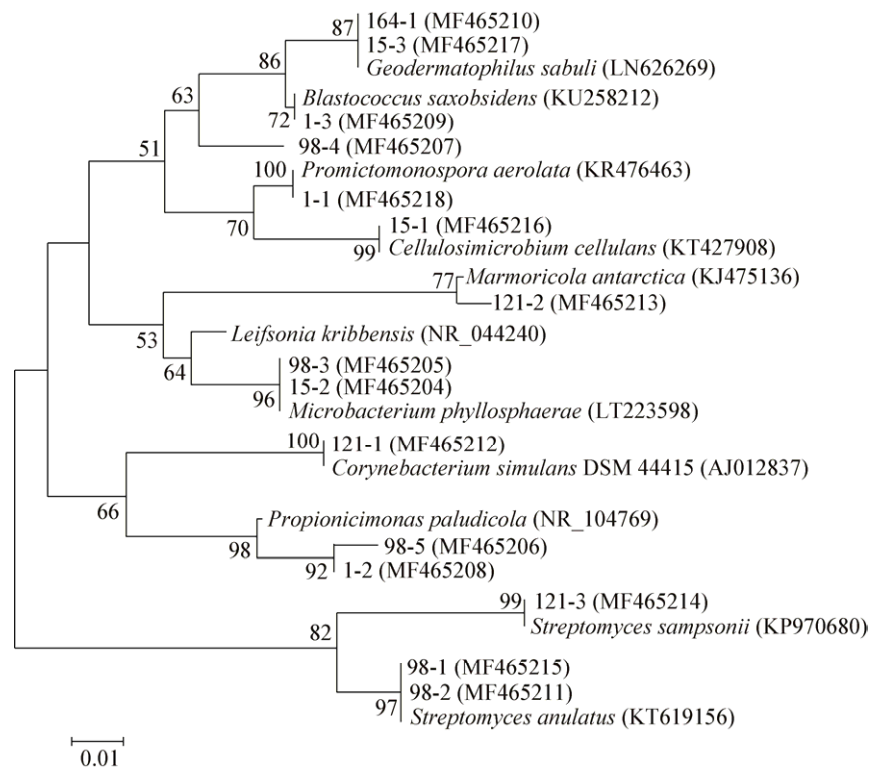


图 3 竹筒浸泡液中放线菌基于 DGGE 条带序列构建的系统发育树
Figure 3 Phylogenetic analysis of sequences of Actinobacteria of soak solution of bamboo slips from DGGE bands

2.2 可培养结果分析

2.2.1 竹筒浸泡液中放线菌的分离纯化及鉴定

共分离获得 12 株菌,主要来源于样品 1[#]、15[#]、98[#]、121[#]、164[#]。通过观察菌株菌丝、孢子形态,以及培养特征如气生菌丝的颜色、基内菌丝的颜色、色素产生情况等,对分离得到的菌株进行

形态学初步鉴定。结果如图 4 所示,菌株在固体培养基上的菌落形态以及在显微镜下表现出链状或螺旋状孢子链(图 4),确定所分离获得的 12 株菌均为放线菌。对菌株进行 16S rRNA 基因测序分析结果表明,12 株菌分属于链霉菌属(*Streptomyces*)和原小单孢菌属(*Promicromonospora*) 2 个属。

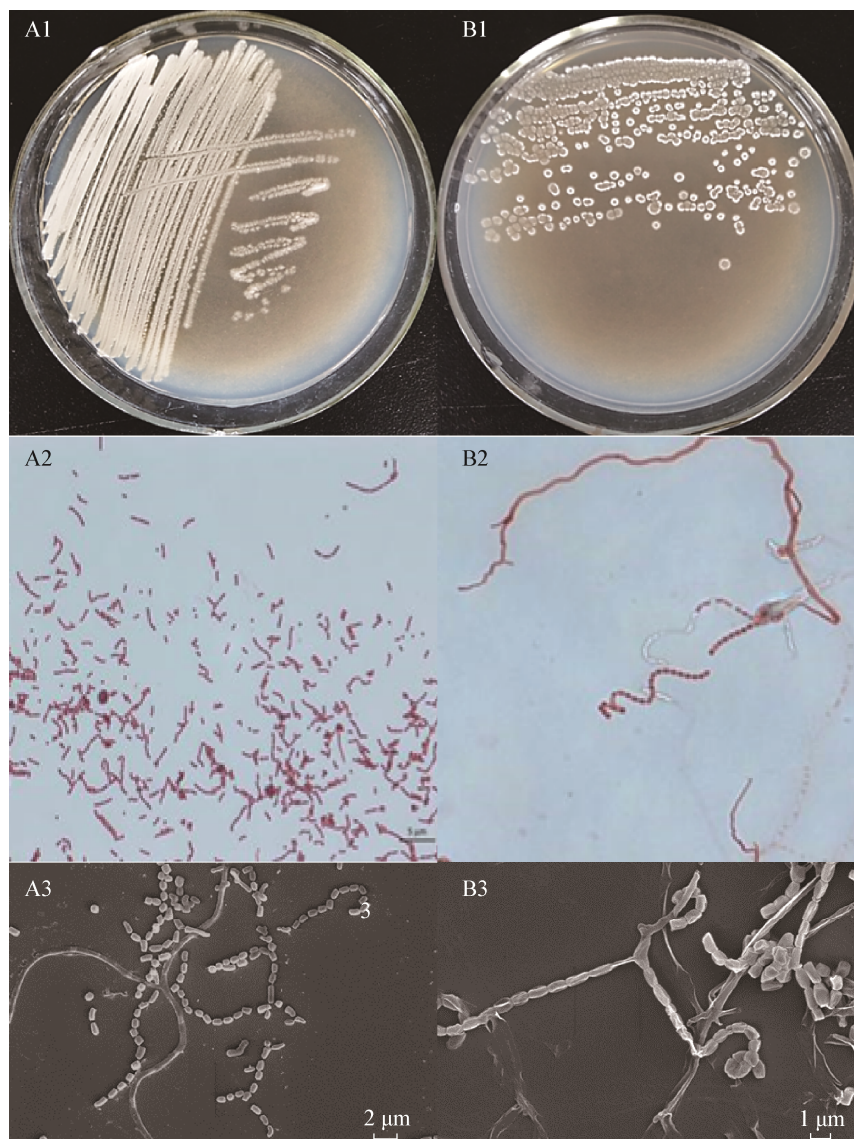


图 4 菌株的培养特征、光学及扫描显微形态

Figure 4 Microscopic morphology and the scanning electron micrograph of strains

注: A1、B1 分别为菌株 15-3-7、98-3-3 的培养形态; A2、B2 分别为菌株 15-3-7、98-3-3 的光学显微形态; A3、B3 分别为 15-3-7、98-3-3 的扫描显微形态。

Note: A1, B1: Cultural characteristics of 15-3-7 and 98-3-3; A2, B2: Microscopic morphology of 15-3-7 and 98-3-3; A3, B3: The scanning electron micrograph of 15-3-7 and 98-3-3.

2.2.2 纤维素与木质素降解菌的筛选

菌株功能的初步筛选如表 3 所示, 从竹筒浸泡液中分离获得的 12 株放线菌在以木质素磺酸钠为唯一碳源的固体培养基上均不能生长; 而分离自 15[#]、98[#]、164[#]样品的 6 株菌和 164-2-1 可在刚果红培养基上形成明显的水解圈, 初步判定它们具有降解纤维素的能力, 其中 98-3-2、98-3-3、98-2-7、15-3-5、15-3-7 菌株均分离自 15[#]、98[#]样品, 由此推测 15[#]和 98[#]竹筒样品存在被降解的潜在风险。

3 讨论与结论

由于出土竹筒的保存环境以及竹筒本身的保存状况^[11]影响着浸泡环境中微生物的生长代谢, 改变了微生物种群组成及其相关功能, 从而对饱水竹筒的长期保存产生重要影响。目前关于竹筒浸泡期

间可培养细菌及真菌的研究已有报道^[12], 但有关竹筒浸泡期间放线菌的种群组成尚未见相关报道。本研究采用 PCR-DGGE 方法对糟朽程度不同竹筒浸泡液中的放线菌种群结构进行分析, 结果表明, 不同竹筒样品中的放线菌种群组成存在一定差异, 其中 98[#]和 121[#]样品中检出的放线菌种属最丰富, 而 164[#]样品检测到的放线菌种属最少, 主要原因可能是竹筒本身个体的糟朽差异引起的。竹筒浸泡液中检出率较高的放线菌是原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、纤维微菌属 (*Cellulosimicrobium*)、芽球菌属(*Blastococcus*)和链霉菌属 (*Streptomyces*), 其中原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)在包括用于浸泡竹筒的去离子水(CK)的所有样品中均被检出。研究发现, 原小单

表 3 竹筒浸泡液中放线菌菌株的特性及鉴定
Table 3 The morphological characteristics and identification of actinobacteria isolated from soak solution of bamboo slips

菌株编号 Strian No.	形态特征 Morphological characteristics				水解圈直径 Hydrolysis spot diameter (d, mm)		基因库中比对出最相似序列(属) Closest relative sequence in GenBank (Genus)	相似度 Similarity (%)
	颜色 Colour	边缘 Edge	高度 Height	形状 Shape	刚果红 On congo red medium	木质素磺酸钠 On sodium lignosulfonate		
1-0-1	白	不齐	平	圆	—	—	<i>Streptomyces exfoliates</i> ATCC 19631 (AB184868)	100.00
121-2-3	白	不齐	平	圆	—	—	<i>Streptomyces exfoliates</i> ATCC 19631 (AB184868)	100.00
15-0-4	浅棕	不齐	隆起	圆	—	—	<i>Streptomyces olivaceus</i> ATCC 19794 (AB184743)	100.00
15-3-5	白	不齐	平	圆	10.15±0.47	—	<i>Streptomyces althioticus</i> ATCC 19724 (AY999808)	98.41
15-1-8	白	齐	平	圆	—	—	<i>Streptomyces exfoliates</i> ATCC 19631 (AB184868)	100.00
15-3-7	白	齐	平	圆	20.75±0.35	—	<i>Streptomyces flavovirens</i> ATCC 19758 (DQ026635)	99.23
164-2-1	白	齐	平	圆	14.58±0.22	—	<i>Streptomyces diastaticus</i> DSM 40934 (DQ026631)	99.08
98-3-3	白	齐	隆起	圆	12.83±0.22	—	<i>Streptomyces exfoliates</i> ATCC 19631 (AB184868)	100.00
98-2-7	白	齐	平	圆	17.11±0.82	—	<i>Streptomyces carpaticus</i> ATCC 43678 (DQ442494)	99.33
98-3-1	白	不齐	平	圆	—	—	<i>Streptomyces althioticus</i> ATCC 19724 (AY999808)	98.41
98-3-2	白	齐	隆起	圆	13.40±0.93	—	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> ATCC 43682 (AB249930)	98.80
98-2-4	黄	齐	平	圆	—	—	<i>Promicromonospora citrea</i> ATCC 15908 (X83808)	100.00

注: —: 无效果。
Note: —: Not detected.

孢菌属(*Promicromonospora*)广泛分布于土壤、水体以及植物中,但在供试样品中均被检出的主要原因可能是竹筒出土环境中就存在该类菌,即使清洗后仍附着于竹筒表面,因此在竹筒浸泡液中都能被检测到。然而,由于在去离子水(CK)中也被检出,竹筒中该类菌属也有可能是由浸泡竹筒的去离子水带入,说明浸泡液中的放线菌类群可能受内因、外因双重因素影响。此外,一些研究还发现原小单孢菌属(*Promicromonospora*)具有产生纤维素酶、几丁质酶和木聚糖酶的能力^[13-15],很有可能会引起竹筒中纤维素和木质素的降解,对饱水竹筒的长期保存产生不良影响。

目前采用可培养方法尚不能反映真实的微生物群落组成^[16],因此本研究采用免培养和可培养相结合的方法分析竹筒浸泡液中放线菌的种群结构。采用 DGGE 方法从供试竹筒浸泡液中检出的放线菌共有 10 个属,其中原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、芽球菌属(*Blastococcus*)和链霉菌属(*Streptomyces*)为主要的放线菌类群;而可培养方法仅获得链霉菌属(*Streptomyces*)和原小单孢菌属(*Promicromonospora*) 2 种放线菌,除了 176[#]样品,链霉菌属(*Streptomyces*)均能从竹筒浸泡液中分离获得,而原小单孢菌属(*Promicromonospora*)仅在 98[#]样品中被发现。然而,通过免培养检测到的放线菌仅有 2 个属可通过可培养方法获得,2 种方法所获得的放线菌种群结构存在明显差异,这种现象较为普遍^[17]。如谢科等^[18]在研究广式腊肠中优势菌时,结果显示用 PCR-DGGE 方法直接从样品中获得的细菌群落结构与用传统培养技术获得的有一定差异;樊哲新等^[19]在研究新疆传统发酵酸驼乳中乳酸菌的多样性时发现, DGGE 结果中的特异性条带在可培养结果中并未出现,表明分析手段不同可能是导致结果出现差异的原因之一^[20]。此外,分离培养基对放线菌的分离效果具有较大的影响^[21]。本次可培养研究仅采用高氏一号培养基作为分离培养,其营养成分仅能满足部分放线菌的生长需求,这也很有可能是

导致最终分离效果不佳、获得放线菌种群单一的重要原因。因此,要全面了解放线菌资源的遗传信息、生理生化特性及其可能对饱水保藏期竹筒潜在的危害,建立有效的分离方法和设计适宜的分离培养基是今后工作中值得进一步深入研究和关注的重要环节^[22]。

一般竹筒的组成主要包括纤维素、半纤维素、木质素,但在数千年的地下浸泡过程中饱水竹筒的化学成分在各种因素的作用下,各组成成分发生了不同程度的降解,支持饱水竹筒骨架的主要成分为木质素和纤维素^[11],但这 2 种成分可以作为微生物生长的碳源而被微生物分解利用,如果竹筒浸泡液中存在具有降解纤维素和木质素的微生物将会严重威胁竹筒的安全保存。可培养研究结果显示,仅从 1[#]、15[#]、98[#]、121[#]、164[#]样品中获得 12 株放线菌纯培养菌株,经检测这 12 株放线菌均没有降解木质素的能力,但由于受分离技术的限制,并不能认为竹筒浸泡液中没有木质素降解潜力菌株;而具有纤维素降解能力的 6 株放线菌多数分离自 15[#]、98[#]浸泡液,说明这 2 个竹筒样品存在被降解的潜在可能。值得注意的是,从 1[#]、15[#]、98[#]、121[#]样品中均分离获得的菌株 1-0-1、121-2-3、15-1-8、98-3-3 与 *Streptomyces exfoliates* ATCC 19631 (AB184868)相似性均为 100%,却只有菌株 98-3-3 检测出纤维素降解能力,这可能与竹筒本身的糟朽程度有一定的关系,糟朽程度的差异导致浸泡液中微生物种群组成发生变化,进而影响微生物的功能发生变化。

用于保存竹筒的去离子水可能带入有害微生物,因此,为了饱水竹筒长期安全保存,建议用无菌去离子水浸泡竹筒,以减少外界因子对饱水竹筒的影响。本研究首次对竹筒浸泡液中放线菌的种群结构及功能进行了探究,结果表明竹筒中不仅放线菌种群丰富,而且存在破坏竹筒的潜在可能。为了深入全面了解竹筒浸泡液中放线菌的危害程度,在今后的工作中应该根据免培养结果设计更为合理的分离培养,采用合适的分离技术获得更多的纯培养放线菌,为科学有效地保存竹筒提供依据。

REFERENCES

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. *Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26
- [2] Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 240-245
- [3] Chen YH. Isolation, identification and lignin degrading capability of microorganism from erosive bamboo slips of Kingdom Wu[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University, 2009 (in Chinese)
陈跃辉. 三国吴简腐蚀斑微生物的分离鉴定及其木质素降解性能研究[D]. 长沙: 中南大学硕士学位论文, 2009
- [4] Lai SJ, Guo J, Tao XY, et al. Comparison of several methods for extraction of total community for water[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(10): 2440-2442 (in Chinese)
赖树锦, 郭佳, 陶新园, 等. 四种水体微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(10): 2440-2442
- [5] Schäfer J, Jäckel U, Kämpfer P. Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 311(2): 103-112
- [6] Li J, Zhang JY, Zhang Q, et al. Diversity and community structure of gut actinobacteria of giant panda[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(5): 1138-1148 (in Chinese)
李静, 张金羽, 张琪, 等. 大熊猫肠道放线菌的种群组成及多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(5): 1138-1148
- [7] Lepš J, Šmilauer P. Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2003: 193-193
- [8] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [9] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(Pt 2): 357-363
- [10] Li J, Zhang HN, Zhao C, et al. Isolation and screening of cellulose decomposing microbe and the straw decomposing effect of complex microbial system[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2016, 22(4): 689-696 (in Chinese)
李静, 张瀚能, 赵翀, 等. 高效纤维素降解菌分离筛选、复合菌系构建及秸秆降解效果分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2016, 22(4): 689-696
- [11] Jin P. A brief analysis of the technical conservation of the Wu Bamboo slips unearthed from Zoumalou in their water-soaked state[J]. *Hunan Provincial Museum*, 2010, 7: 599-606 (in Chinese)
金平. 简析走马楼吴简饱水状态的科技保存[J]. *湖南省博物馆馆刊*, 2010, 7: 599-606
- [12] Chai LY, Chen YH, Huang Y, et al. Diversity of culturable microorganisms from erosive bamboo slips of Kingdom Wu[J]. *Journal of Central South University (Science and Technology)*, 2010, 41(5): 1674-1679 (in Chinese)
- 柴立元, 陈跃辉, 黄燕, 等. 三国吴简蚀斑可培养微生物的多样性[J]. *中南大学学报: 自然科学版*, 2010, 41(5): 1674-1679
- [13] Cazemier AE, Verdoes JC, Reubsaet FAG, et al. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 83(2): 135-148
- [14] Han KH, Lee CU, Kim SD. Antagonistic role of chitinase and antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 toward *F. oxysporum*[J]. *Korean Society for Applied Microbiology*, 1999, 27(5): 349-353
- [15] Kumar M, Joshi A, Kashyap R, et al. Production of xylanase by *Promicromonospora* sp. MARS with rice straw under non sterile conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(8): 1614-1618
- [16] Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, et al. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese, using culture-dependent and -independent methods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(18): 5662-5673
- [17] Kao CM, Chen CS, Tsa FY, et al. Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 178(1/3): 409-416
- [18] Xie K, Yu XF, Zheng HS, et al. Analysis of dominant microbial species in cantonese sausage by independent culture and PCR-DGGE technology[J]. *Food Science*, 2013, 34(4): 157-160 (in Chinese)
谢科, 余晓峰, 郑海松, 等. 传统分离培养结合 PCR-DGGE 技术分析广式腊肠中优势菌[J]. *食品科学*, 2013, 34(4): 157-160
- [19] Fan ZX, Li BK, Li KX, et al. Analysis of lactic acid bacteria diversity in traditional fermented camel milk products in Xinjiang by the culture-independent and denaturing gradient gel electrophoresis methods[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(4): 208-217 (in Chinese)
樊哲新, 李宝坤, 李开雄, 等. 传统分离培养结合 DGGE 技术研究新疆传统发酵驼乳中乳酸菌的多样性[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 208-217
- [20] Qin S, Chen HH, Zhao GZ, et al. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(5): 522-531
- [21] Qin S, Xing K, Jiang JH, et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 457-473
- [22] Park MS, Jung SR, Lee MS, et al. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(3): 219-227