

研究报告

基于高通量测序的辐射污染区细菌群落特征分析

张志东^{1,2*} 顾美英¹ 王玮¹ 朱静¹ 唐琦勇¹ 宋素琴¹ 谢玉清¹ 张丽娟¹

(1. 新疆特殊环境微生物实验室 新疆 乌鲁木齐 830091)

(2. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要:【目的】为了更加全面地揭示辐射污染区细菌种群多样性,了解辐射污染对辐射区土壤中细菌群落结构的影响。【方法】运用高通量测序方法,分别进行了土样细菌 16S rRNA 基因的 V3 可变区测序,进而对无辐射污染对照和不同辐射污染程度的土样中细菌群落组成和多样性进行分析。【结果】研究共获得 110 348 条有效序列,17 604 个 OTUs,共涉及细菌域的 19 个门和 6 个潜在菌门和其它未分类菌群的 726 个属。多样性分析表明,辐射污染会引起土壤样品中微生物群落的分布显著差异化,显著提高细菌群落种群多样性和微生物丰度。微生物群落组成分析发现,在辐射污染胁迫下,辐射污染区样品中变形杆菌门分布比例显著下降;随着辐射污染程度的提高,放线菌门所占比例逐步提高,未分类菌门、厚壁菌门和酸杆菌门也有明显的提高。同时,研究发现辐射污染区中存在着大量未分类菌属。【结论】研究揭示了辐射污染区极为丰富的细菌多样性,大量微生物新物种资源有待发掘。

关键词: 高通量测序, 辐射污染土样, 细菌群落

Analysis of bacterial community in radiation polluted soils by high-throughput sequencing

ZHANG Zhi-Dong^{1,2*} GU Mei-Ying¹ WANG Wei¹ ZHU Jing¹ TANG Qi-Yong¹
SONG Su-Qin¹ XIE Yu-Qing¹ ZHANG Li-Juan¹

(1. Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

(2. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

Abstract: [Objective] To fully demonstrate the bacterial diversity in radiation polluted soils from the Northwestern China, and investigate effects of radiation pollution on the bacterial community. [Methods] Composition and structure of bacterial communities in soils from the control of no radiation pollution and the radiation contaminated in different levels was analyzed based on high-throughput sequencing of the V3 region of the 16S rRNA gene. [Results] A total of 110 348 effective sequences

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021705, 2012AA063503); The Cultivating Project of Excellent Young Innovative Talents of Xinjiang Autonomous Region (No. 2014721036)

*Corresponding author: E-mail: zhangzheedong@sohu.com

Received: May 08, 2015; **Accepted:** July 06, 2015; **Published online** (www.cnki.net): March 18, 2016

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021705, 2012AA063503); 新疆自治区优秀青年科技创新人才培养项目(No. 2014721036)

*通讯作者: E-mail: zhangzheedong@sohu.com

收稿日期: 2015-05-08; **接受日期:** 2015-07-06; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-18

and 17 604 OTUs were obtained, which were classified into 726 genera from 19 phyla and others including 6 candidate phyla and the unclassified in bacteria domain. The result of diversity analysis showed that the radiation pollution resulted in significant change in bacterial community in soils, and led to the improvement of bacterial diversity and richness. The analysis of bacterial composition indicated percent rates of bacteria from phylum Proteobacteria decreased significantly under the radiation stress, while the Actinobacteria increased gradually with the improvement in radiation levels. The proportion of the unclassified, Firmicutes and Acidobacteria rise obviously. Additionally, lots of unclassified genera exist in radiation pollution soils. **[Conclusion]** It proved extremely rich bacterial diversity in radiation contaminated area and a lot of novel microbial resources which need to further discover.

Keywords: High-throughput sequencing, Radiation-polluted soil, Bacterial community

核辐射污染能导致环境的剧烈改变, 显著改变土壤物理、化学以及生物学特性, 对核辐射污染周边的生态环境产生巨大的扰动, 进而对土壤微生物群落组成和分布造成影响^[1-2]。截止目前, 国内外对大面积核辐射污染区微生物的相关研究报道较为有限。Durrell 等^[3]对美国内华达核试验基地中微生物调查研究发现, 该区域存在着一定数量的耐辐射微生物; Kieft 等^[4]对该区域中微生物的生长限制因素进行了研究, 发现水是关键限制因素。Dighton 等^[5-6]对切诺尔贝利核电站核泄露周边区域真菌的群落分布和组成进行了较为系统的研究, 发现该区域有丰富的真菌多样性, 真菌群落组成和丰度与辐射剂量存在着明显的分布特征, 且大多数真菌具有令人吃惊的辐射适应性。

我国西北某区域由于相关试验, 存在着严重的放射性核辐射污染, 造成了我国独一无二、不可复制的特殊辐射生境。由于该区域的危险性和特殊性, 此前对这一环境下微生物的群落组成和分布知之甚少。本课题组作为目前国内外在该区域开展微生物资源调查的唯一团队, 经过近十年的研究^[7-14], 目前已分离各类微生物 1 500 余株, 共涉及近百个属, 获得一大批耐辐射相关特性的菌种资源。同时, 发现潜在新属 5 个, 新种 20 个, 目前已发表新属 1 个, 新种 9 个, 初步证明历经五十多年的适应和演变, 该区域微生物在特殊的生态条件及核辐射环境胁迫下, 存在着丰富的微生物多样性。由于可培养手段的局限性, 分离获得细菌菌株主要由 *Bacillus*

属和 *Streptomyces* 属菌为主要菌群, 分别占 31.31% 和 9.22%。随着微生物研究技术的发展, 基于高通量测序方法的微生物群落结构分析, 由于具有更高效、数据信息大且无需分离培养纯种微生物, 可最大限度地保留微生物群落原有的群落组成和分布特征, 成为微生物群落多样性研究的重要手段之一^[15-16]。

本研究在前期研究基础上进一步利用高通量测序方法对该区域辐射污染土样中细菌群落组成和结构进行分析, 进而更为全面地展现辐射污染区微生物多样性, 同时为宝贵的耐辐射污染区微生物资源的发掘提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

土壤基因组 DNA 快速抽提试剂盒、MiSeq 高通量测序技术平台, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 高速离心机、PCR 仪, 德国 Eppendorf (艾本德)。

1.2 土样采集和保存

供试土壤分别于 2012 年 9 月与 2013 年 5 月采自不同辐射污染区 5–10 cm 土壤, 并放置在铅板盒里 4 °C 保存。根据土样中 ¹³⁷Cs 含量分为 4 个等级, 其中 CK 为未受辐射污染的土样(10–20 Bq/kg); L 为轻度污染地区的土样(100–200 Bq/kg), M 为中度污染地区的土样(1 000–2 000 Bq/kg), H 为重度污染地区的土样(>10 000 Bq/kg)。

1.3 土壤总 DNA 提取

土样经充分混匀后各取 0.50 g, 使用土壤基因

组DNA快速抽提试剂盒,并按说明书抽提并纯化土壤微生物基因组DNA。每份样品进行3个重复,最终经合并后,作为PCR扩增模板使用。

1.4 16S rRNA基因序列V3可变区的PCR扩增

扩增 16S rRNA 基因序列的 V3 可变区,引物为 357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。每个样本的引物序列前均单独加入长度为 7 个碱基的不同碱基序列标签,用以标记不同的样本。PCR 反应体系参照说明书,PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增 PCR 产物经琼脂糖电泳检测阳性后,进行高通量测序和分析。

1.5 测序数据的质控和处理

根据 Barcode 序列将获得的测序数据拆分为不同样品数据,并截去 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列;将拆分的数据使用 FLASH (<http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)对每个样品的 Reads 进行拼接,得到的拼接序列为原始 Tags 数据(Raw Tags);拼接得到的 Raw Tags,需要经过更严格的过滤处理后,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags)。

1.6 测序数据的分析

1.6.1 操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTUs) 分类及注释:对获得的测序数据,用 Uclust 版本(Uclust v1.1.579)对所有样品的全部 Effective Tags 序列聚类,以 97%一致性将序列聚类成为 OTUs 结果。同一 OTUs 中的序列被视为相同分类单元的序列,作为一个假定的分类单元。选取代表性序列采用 RDP classifier 软件进行物种分类,研究 OTUs 之间的系统发生关系^[17]。

1.6.2 Alpha 多样性分析:Alpha 多样分析采用 Mothur 软件,相关网址为 <http://www.mothur.org/>。用 Coverage 指数反映样品文库的覆盖率。采用 Chao1 算法估计群落中含 OTU 数目的指数,采用香农指数衡量群落的异质性,相应计算公式如下:

Coverage 指数计算公式为:
$$C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

其中, n_1 : 只含有一条序列的 OTU 的数目; N : 抽样中出现的总的序列数目。

香农指数计算公式为: $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$

其中 P_i 为各种群物种数与样本总物种比值。

Chao1 指数计算公式为:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

其中, S_{chao1} : 估计的 OTU 数; S_{obs} : 实际 OTU 数; n_1 : 只有一条序列的 OTU 数目; n_2 : 只有两条序列的 OTU 数目。

1.6.3 Beta 多样性分析: Beta 多样性主要包括样本距离计算、样本聚类、样本 PCA 分析。该三类分析均是利用 Unifrac metric, 分析中首先将 OTU 种子序列比对到 Greengene 核心 16S rRNA 基因序列中,根据多序列队列构建以种子序列为节点的系统发育树,而后通过进化树计算 Unifrac metric, Unifrac metric 是通过计算进化树中不同环境样本间 Unique branch 长度总和获得。Unifrac metric 值在 0-1 之间,值越小说明样本间相似度越高。

2 结果与分析

2.1 测序结果及序列深度验证

通过各样品中细菌的 16S rRNA 基因 V3 区测序,4 个样品总计测得原始序列条数为 152 784 条,过滤掉低质量的序列后,总数为 136 890 条。在上述序列进行去冗余处理后,有效序列数 110 348 条,并在 97%相似度下将其聚类为用于物种分类的 OTUs,共产生 17 604 个,统计得到所有样品在不同 OTUs 中的丰度信息,各样品测序信息结果如表 1 所示。

稀释曲线反映了测序的深度,也可以用来评价测序量是否足以覆盖样品所有种群。从图 1 可知,4 个样品稀释曲线均基本趋于平缓,但仍未达到饱和,说明所得序列可基本反映真实环境中细菌群落结构,但仍有部分微生物种类尚未被检测发现。

表 1 不同辐射污染程度下土壤样品测序数据统计 Table 1 Sequence data statistics of soil samples in different radiation pollution degree				
样品编号 Samples	原始序列数 Raw number	质控序列数 Clean number	有效序列数 Effective number	OTUs 数量 OTUs number
H	44 334	39 419	29 626	7 299
M	42 088	37 863	30 386	7 354
L	25 732	23 545	19 593	5 969
CK	40 630	36 063	30 743	4 714
Total	152 784	136 890	110 348	17 604

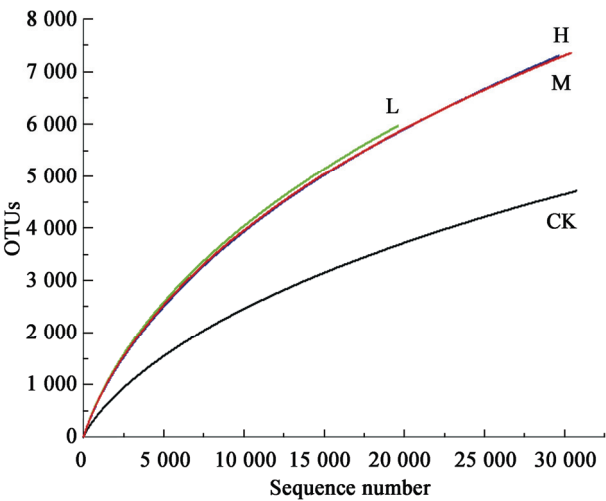


图 1 不同辐射污染程度下土壤样品的稀释曲线
Figure 1 Rarefaction curves for samples in different radiation pollution degree

2.2 各样品中细菌群落相关性分析

以各样品中分布的 OTUs 数为计算依据, 对各样品中菌群梯状性进行分析, 并构建韦恩图(图 2)。依据图 2 中的数据, 不同辐射污染程度土样中, 有 514 个 OTUs 均出现在 4 个样品, 占总 OTUs 的 2.92%, 证明辐射污染程度对这 514 个 OTUs 代表的微生物种群影响不大。对不同辐射污染程度下样品即高、中、低辐射污染样品与对照样品 CK 中各相关 OTUs 分别为 3 030、2 090 和 737 个, 分别占两两相关 OTUs 的 25.22%、17.32%和 6.90%, 即表示随着污染程度的增高样品与对照样品中微生物群落相关性更高, 这一结果在相关辐射污染区微生物群落分布中为首次发现, 相关的产生原因还有待进一步验证和分析。

2.3 样品间 Alpha 多样性分析

采用 Alpha 多样性指标中的 Coverage 指数、香农指数(Shannon index)和 Chao1 指数对样品序列文库的覆盖率、群落的异质性以及估计群落中物种总数。由表 2 可以看出, 辐射污染区土样中细菌香农指数均显著提高, 表明辐射污染能提高土样中微生物群落种群差异性; 而 OTUs 数、Chao1 指数均明显高于对照样品, 进一步证明辐射污染提高了土壤样品中微生物群落的种群多样性和总体丰度。

2.4 样品间 Beta 多样性分析

进一步对样品间的差异进行研究, 采用 Beta 多样性的样本距离计算、样本聚类、样本 PCA 分析, 来衡量样本间物种组成的相似度。利用 Unifrac metric 计算不同环境样本间 Unique branch 长度总

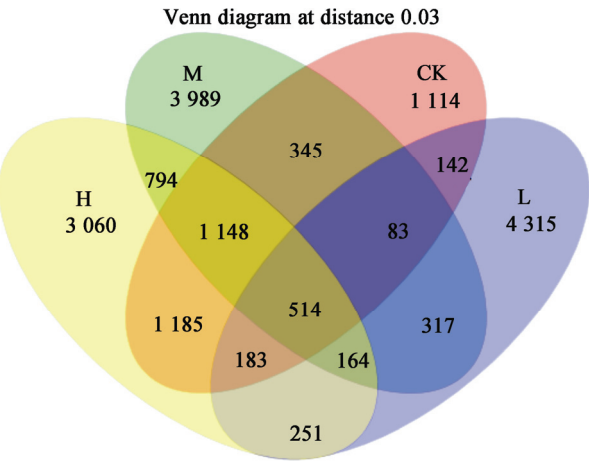


图 2 各样品中细菌群落相关性分析
Figure 2 The similarity analysis of bacterial communities in different samples

表 2 各样间 Alpha 多样性统计表
Table 2 Alpha diversity in different samples

样品编号 Sample_ID	OTUs 数量 OTUs numbers	覆盖率 Coverage	香农指数 Shannon index	Chao1 指数 Chao1 index
CK	4 714	0.919 006	5.789 187	8 438.525 2
L	5 969	0.832 746	7.869 997	11 226.322 0
M	7 354	0.877 279	7.922 097	13 032.804 0
H	7 299	0.871 498	7.859 802	13 261.733 0

和, 其中 Unifrac metric 值在 0–1 之间, 值越小说明样本间相似度越高。样本距离计算、样本聚类、样本 PCA 分析结果如图 3、4 所示。由图 3 可以看出, 样品 M 和 H 最为邻近; 基于权重的热值图也表明, 两者相关性最高, 与样品 CK 相近性次之, 而与样品 L 距离最远。

对 PCA 主成分分析表明, 主成分 1 (PC1) 和主成分 2 (PC2) 分别在样品差异性贡献率上达到 54% 和 29%, 合计达到 83%, 是差异的主要来源。对样品在各主成分的影响进行绘图可以看出, 样品 M 和 H 为别处于均位于 PC2 的负值区域, 分别位于 PC1 作标轴正负两侧, 较为靠近的位置, 说明两样品间

的主成分变异不显著; 而样品 CK 与样品 L 均位于 PC2 坐标轴正值区域, 但分处在 PC1 的正负值, 且间隔较大的位置, 同时与样品 M、H 分布较远, 也进一步说明了辐射对样品的影响情况。总体而言, 辐射污染造成了土壤样品中微生物群落的分布显著变化。

2.5 各样品中细菌群落分布特征分析

利用 RDP classifier 对各样品中 OTU 依次进行门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)分类信息分析, 进一步挖掘样品中种群性群落组成, 发现 4 个样本中共涉及细菌域的变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌

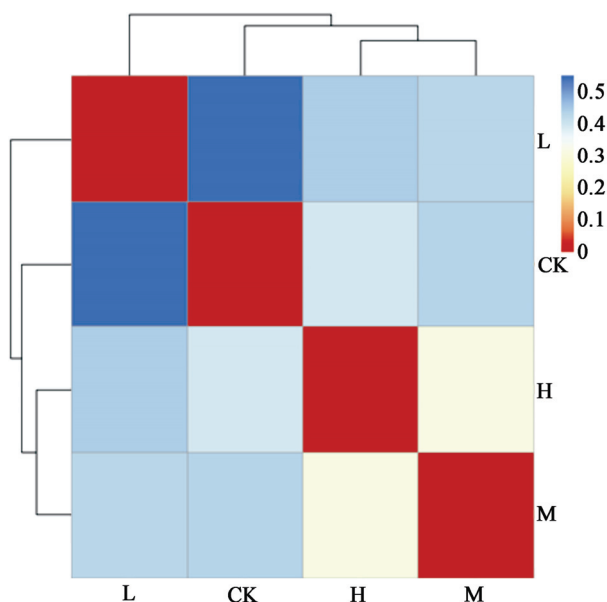


图 3 样本间距离加权重聚类图
Figure 3 Weighted distance between samples

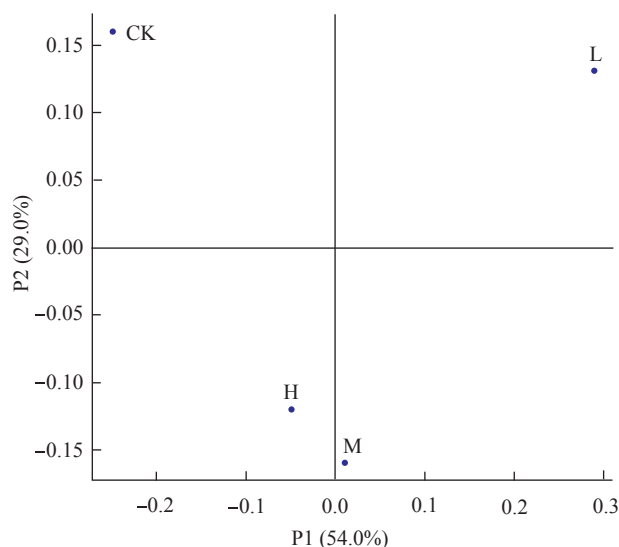


图 4 样本间微生物群落主成分分析
Figure 4 PCA results of soil microbial communities from samples

门(Bacteroidetes)、未分类菌群、厚壁菌门(Firmicutes)、酸杆菌亚门(Acidobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、TM7、奇异球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、装甲菌门(Armatimonadetes)、BRC1、WS1、SR1、黏胶球形菌门(Lentisphaerae)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、蓝菌门(Cyanobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)、OP11、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、OD1、迷踪菌门(Elusimicrobia)、产水菌门(Aquificae)、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)等19个菌门以及6个潜在细菌门和未知菌群。

对样品信息中主要组成的10个门分析表明,其均占各样品群落的96.0%以上,进行门水平菌群比例分布绘图,结果如图5所示。由图5可知,不同辐射污染程度间微生物群落组成存在着明显的差异,但也存在着一定的规律性,变形杆菌门、放线菌门、拟杆菌门、未知菌群、厚壁菌门和酸杆菌门为最主要菌群,总计占对照样品(CK)、低辐射污染样品(L)、中辐射污染样品(M)和高辐射污染样品(H)的96.05%、82.16%、92.28%和93.30%。进一步分析表明,在辐射污染胁迫下辐射污染区样品中变形杆菌门分布比例显著下降;随着辐射污染程度的提高,放线菌门所占比例显著提高;未知菌群、

厚壁菌门和酸杆菌门也有明显的提高,而拟杆菌门的分布出现先略微下降后提高的趋势。尤其是在高辐射土样中,上述分布变化特别明显,其中变形杆菌门下降为对照样品的2.25倍,而放线菌门、未知菌群、厚壁菌门和酸杆菌门分布比例较对照分别提高了2.86、1.73、1.72、2.24和1.58倍。在低辐射污染区土样中,未知菌群和酸杆菌门分布比例提高最为显著,分别增加了7.88倍和4.45倍。

在属的层次中,各样品中共涉及726个属,其中对照样品和低、中、高辐射污染程度的样品中共涉及343、341、284、216个属,样品间优势种属分布存在极大的差异性。由表3可知,对照样品中不动杆菌属(*Acinetobacter*)占绝对优势,而在高、中、低辐射污染土样中未分类的属均为最主要菌群,分别占24.79%、11.78%、14.51%,表明辐射污染区存在着大量有待发掘的未知微生物资源。另外,*Devosia*、*Microvirga*均出现在4个样品的主要菌群中,其中,*Devosia*属菌群的组成比例随着辐射污染程度的增加而增加;辐射污染土样中*Microvirga*属也较之对照样品明显提高。其它已种属中*Salinimicrobium*、*Arthrobacter*、*Kocuria*、*Devosia*、*Bacillus*、*Planomicrobium*也在4个样品的主要菌群中不同程度存在,这一结果与目前已分离获得的种属组成存在巨大的差异,进一步证明辐射污染区存在大量有待挖掘的微生物资源。

3 结论与讨论

尽管放射辐射对生命体具有普遍的损害,但辐射污染区域并非生命禁区。20世纪60年代,对国内华达试验场(Nevada test site, NTS)开展了微生物研究,分离获得各类菌株500余株,发现了41个分类单元的微生物^[3]。国外学者在近二十余年内,对前苏联切尔诺贝利核电站事故周边区域真菌进行系统发掘,已从不同辐射强度地点分离出约2000株,涉及98个属的200个种的真菌,初步证明辐射污染区域依然存在着丰富的真菌多样性,并存在着多样的辐射适应性^[1,5-6]。同时,在群落分布

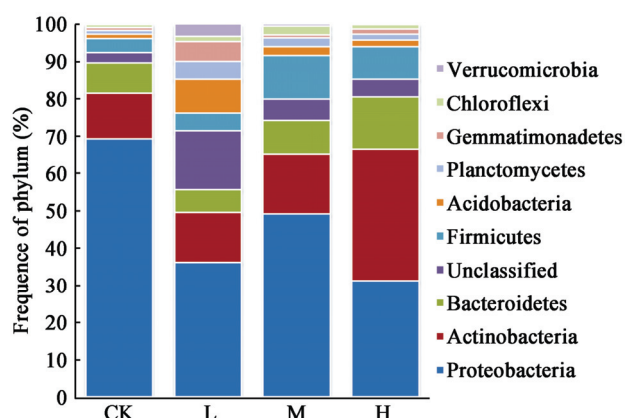


图5 Phylum水平各样本菌群分布图

Figure 5 Frequency of phylum in microbial communities from samples

表 3 各样品中主要微生物菌落种属组成
Table 3 Major genera in microbial communities from samples

编号 Number	CK		L		M		H	
	属名 Genus name	比例 Ratio (%)	属名 Genus name	比例 Ratio (%)	属名 Genus name	比例 Ratio (%)	属名 Genus name	比例 Ratio (%)
1	<i>Acinetobacter</i>	50.18	Unclassified	24.79	Unclassified	11.78	Unclassified	14.51
2	Unclassified	5.69	Gp4	5.34	<i>Kocuria</i>	10.55	<i>Devosia</i>	3.54
3	<i>Salinimicrobium</i>	4.30	<i>Gemmatimonas</i>	5.05	<i>Salinimicrobium</i>	6.08	<i>Halomonas</i>	3.32
4	<i>Arthrobacter</i>	2.73	<i>Sphingomonas</i>	3.84	<i>Arthrobacter</i>	4.88	<i>Bacillus</i>	2.73
5	<i>Kocuria</i>	2.72	<i>Microvirga</i>	3.43	<i>Planomicrobium</i>	3.31	<i>Microvirga</i>	2.53
6	<i>Devosia</i>	1.96	<i>Tepidamorphus</i>	3.17	<i>Devosia</i>	2.69	<i>Jeotgalibacillus</i>	2.48
7	<i>Bacillus</i>	1.11	<i>Aciditerrimonas</i>	2.60	<i>Microvirga</i>	2.65	<i>Salinimicrobium</i>	2.34
8	<i>Microvirga</i>	1.05	<i>Bacillus</i>	2.25	<i>Blastococcus</i>	2.50	<i>Rhizobium</i>	2.18
9	<i>Adhaeribacter</i>	1.04	<i>Spartobacteria</i>	2.01	<i>Adhaeribacter</i>	2.41	<i>Gracilimonas</i>	2.04
10	<i>Planomicrobium</i>	0.97	<i>Planctomyces</i>	1.88	<i>Pontibacter</i>	2.18	<i>Arthrobacter</i>	2.01

上,不同辐射剂量下存在明显的群落优势菌,*Paecilomyces lilacinus*和*Chaetomium aureum*是土壤高剂量辐射(3.7×10^6 – 3.7×10^8 Bq/kg)的优势菌、*Acremonium strictum*和*Arthrinium phaeospermum*是中剂量辐射(3.7×10^3 – 3.7×10^5 Bq/kg)的优势菌;*Myrothecium roridum*和*Metarhiziumanisopliae*是低剂量辐射($<3.7 \times 10^2$ Bq/kg)的优势菌,上述菌株同时可以作为相应辐射剂量的指示菌^[5]。近年来,通过对放射性核素废弃物处置点研究发现,复杂多样的辐射环境下存在着大量不同类型的微生物,其不仅适应了辐射环境,并参与了核素的固定或迁移活动^[6,18-19]。同时,多个新种属在辐射环境下被发现,其中菌株*Kineococcus radiotolerans*^[20]、*Deinococcus wulumuqiensis*、*Deinococcus xibeensis*和*Streptomyces radiopugnans*等具有极强辐射耐受性,证明辐射污染区存在着丰富多样的微生物资源。

我国西北某区域地处新疆典型的干旱盐碱荒漠地区,由于相关试验存在着严重的放射性核辐射污染,造成了我国独一无二、不可复制的特殊辐射生境。本课题组经过近十年研究已初步证明,该区域存在着丰富的微生物多样性,并蕴藏着大量未知

微生物。目前,课题组已从该区域获得各类微生物菌株 2 000 余株,其中多数微生物呈现不同程度的耐辐射特性。分子学鉴定和系统鉴定表明,菌株涉及细菌、放线菌和真菌,其中涉及细菌域的 76 个属 273 个种,*Bacillus*属菌为主要菌群,占 31.31%,其次为*Streptomyces* (9.22%),其余占多数的分别为*Pseudomonas* (3.64%)、*Gracilibacillus* (3.88%)、*Microbacterium* (3.64%)、*Micrococcus* (3.27%)、*Halobacillus* (3.64%);涉及真菌域的 20 个属 50 余种。前期利用可培养方法对本研究土样细菌分离结果表明^[7],随着辐射污染程度的增高,菌株的检出率显著下降,各土样分离株分别占 55.2%、21.2%、12.6%和 10%。所获得菌株共涉及厚壁菌门、放线菌门和变形菌门和拟杆菌门,其中厚壁菌门占绝对优势,占总菌数的 66.7%,其在不同辐射污染程度样品中均为优势菌群,所占比例均大于 50%。放线菌门、变形菌门分离株所占比例随着辐射程度增加而增加。同时发现,不同辐射区域获得的微生物其耐辐射特性存在明显的差异。一般来说,污染程度越高的土样,高剂量辐射耐受性的微生物所占比例较高;同时,上述微生物普遍产生各类色素、多糖

等代谢产物,推测与其耐辐射特性相关。利用 Biolog EcoTM 技术对辐射污染程度高、中、低区域土样及无污染对照区域样品中微生物分布和代谢特性的研究表明,不同辐射污染程度下微生物的碳源利用差异显著($P<0.05$)。随着辐射污染程度的增强,微生物活性逐渐降低;随着辐射程度增高,土壤微生物的主要利用碳源由糖类逐步转为羧酸类和聚合物类,均表明辐射对污染土壤中微生物群落组成和分布有着明显影响^[10]。

本研究选取细菌 16S rRNA 基因 V3 可变区序列,利用 MiSeq 高通量测序方法,对辐射区中高、中、低辐射污染程度土样以及无污染对照样品土样的细菌进行了细菌群落组成和分布特性研究,共获得 110 348 条有效序列,17 604 个 OTUs。通过多样性分析发现,辐射污染造成了土壤样品中微生物群落的分布显著变化,能明显提高土壤样品中微生物群落的种群多样性和微生物总体丰度,这一结果与此前研究相反,可能与辐射污染程度增加后,不可培养或稀有菌群难以获得有关。分析发现,辐射污染区土壤中共涉及细菌域的 19 个门和 6 个潜在门和未分类门的总计 726 个属。尽管 Sun 等^[21]研究指出细菌基因组中存在 16S rRNA 基因多拷贝,且存在基因组内部异质性,而不同可变区中异质率不同,从而可造成基于 16S rRNA 基因测序的分子鉴定的物种种类(单一性)严重高估,累计可达 123.7%。而本研究选用的细菌 16S rRNA 基因 V3 可变区在 3%差异性上仅可造成 5.2%的物种高估,证明本研究所分析发现的物种种类仍远远高于目前已分离获得的菌数,也极大地展现了污染区微生物丰富的多样性。通过对序列代表的微生物群落特征分析发现,辐射污染胁迫下,辐射污染区样品中变形杆菌门分布比例显著下降;随着辐射污染程度的提高,放线菌门所占比例显著提高,未知菌群、厚壁菌门和酸杆菌门也有明显的提高,可能与相关菌门中辐射耐受性菌株所占比例有关,这一结果与前期分离培养所得趋势基本一致。对属一级菌群分布分析发现,在高、中、低污染土样中,未知菌属均为各样

品中的主要菌群,分别占各自菌群的 14.51%、11.78%和 24.79%,均高于对照样品的 5.69%,特别是低污染样品,高出对照 4.36 倍;同时对包括门在内的更高分类分析中,辐射污染土样中未知分类均高于对照样品,证明辐射污染区存在着大量未知的微生物资源,有待发掘。

参 考 文 献

- [1] von Wehrden H, Fischer J, Brandt P, et al. Consequences of nuclear accidents for biodiversity and ecosystem services[J]. Conservation Letters, 2012, 5(2): 81-89
- [2] Zhu YG, Shaw G. Soil contamination with radionuclides and potential remediation[J]. Chemosphere, 2000, 41(1/2): 121-128
- [3] Durrell LW, Shields LM. Fungi isolated in culture from soils of the Nevada Test Site[J]. Mycologia, 1960, 52(4): 636-641
- [4] Kieft TL, Kovacic WP, Ringelberg DB, et al. Factors limiting microbial growth and activity at a proposed high-level nuclear repository, Yucca Mountain, Nevada[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3128-3133
- [5] Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 109-120
- [6] Dadachova E, Casadevall A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(6): 525-531
- [7] Gu MY, Zhang ZD, Wang W, et al. The effects of radiation pollution on the population diversities and metabolic characteristics of soil microorganisms[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2014, 225: 2133
- [8] Zhu J, Gu MY, Song SQ, et al. Study on the tolerance and adsorption of heavy metal ions by bacteria isolated from radiation-polluted soil[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2013, 50(6): 1101-1107 (in Chinese)
朱静, 顾美英, 宋素琴, 等. 辐射污染区土壤中细菌对重金属的耐受和吸附研究[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(6): 1101-1107
- [9] Zhang ZD, Xie YQ, Wang W, et al. Isolation and character of radio-resistant black yeast-like fungus[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 724-731 (in Chinese)
张志东, 谢玉清, 王伟, 等. 耐辐射黑色酵母状真菌的筛选和特性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 724-731
- [10] Zhang ZD, Mao J, Tang QY, et al. Diversity investigation of actinomycetes isolated from radiation-polluted soil[J]. Microbiology China, 2009, 32(9): 1329-1333 (in Chinese)
张志东, 茆军, 唐琦勇, 等. 辐射污染区土壤中放线菌的分离及多样性[J]. 微生物学通报, 2009, 32(9): 1329-1333
- [11] Mao J, Wang J, Dai HQ, et al. *Yuhushiella deserti* gen. nov., a new member of the suborder *Pseudonocardineae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(3): 621-630
- [12] Wang W, Mao J, Zhang ZD, et al. *Deinococcus wulumuqiensis* sp. nov., and *Deinococcus xibeiensis* sp. nov., isolated from radiation-polluted soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(9): 2006-2010
- [13] Mao J, Tang QY, Zhang ZD, et al. *Streptomyces radiopugnans* sp. nov., a radiation-resistant actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(11): 2578-2582
- [14] Wang W, Zhang ZD, Tang QY, et al. *Lechevalieria xinjiangensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from radiation-polluted

- soil in China[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 2819-2822
- [15] Qin N, Li DF, Yang RF, et al. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(4): 445-457 (in Chinese)
秦楠, 栗东芳, 杨瑞馥. 高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(4): 445-457
- [16] Holt KE, Parkhill J, Mazzoni CJ, et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi[J]. Nature Genetics, 2008, 40(8): 987-993
- [17] Cole JR, Chai B, Marsh TL, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(1): 442-443
- [18] Zaitsev AS, Gongalsky KB, Nakamori T, et al. Ionizing radiation effects on soil biota: Application of lessons learned from Chernobyl accident for radioecological monitoring[J]. Pedobiologia, 2014, 57(1): 5-14
- [19] Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, et al. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4230-4241
- [20] Phillips RW, Wiegel J, Berry CJ, et al. *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(Pt 3): 933-938
- [21] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969

2016 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	鼠疫菌生态与遗传研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	3 月	100	北京	
2	2016 年全国微生物毒素与急危重症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	4 月	400	上海	陈德昌 13901674318
3	生物过程优化与放大研讨会	中国微生物学会生化工程模型化与控制专业委员会	4 月	260	湖北宜昌	尤舸浩 13908607687
4	第四届全国食用昆虫与微生物转化废弃物及高效利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5 月 13-15 日	120	湖北武汉	吴悦 027-87287254
5	第二届噬菌体学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	5 月	150	湖北武汉	童贻刚 133611272813
6	第二届合成微生物学与生物制造学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	6 月	200	浙江杭州	李永泉 13735591622
7	第七届传染病基础与技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月	400	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
8	酿造食品的营养化学学术研讨会	中国微生物学会酿造分会	6 月	120	浙江杭州	张秀梅 13503213265
9	第十届全国海洋生物技术与创新药物学术讨论会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	250	江苏南京	王梁华 13386271017
10	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8 月	200	北京	010-53218310
11	第八届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月 22-25 日	400	内蒙古 呼和浩特	阮志勇 13001101231
12	第二届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9 月	200	浙江宁波	李祥 13811495603