

低剂量辐射下土壤细菌群落及其功能基因的响应*

吴娜, 杨多, 赵鲁玉, 岳海涛[†]

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: 为研究低剂量辐射对土壤微生物组成与丰度的影响, 分析微生物组中对辐射胁迫的主效基因, 本研究从新疆和布克赛尔蒙古自治县关闭回填的铀矿场采集了辐射剂量从7.71 mSv/y到15.07 mSv/y不等的土壤样品. 应用宏基因组测序结合生物信息学分析方法, 发现低剂量辐射环境下的土壤中变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、绿弯菌门和酸杆菌亚门为优势菌门, 其丰度总和占比达80%以上. 属水平上, 假单胞菌属数量最多, 丰度最高, 占31.0%; 芽孢杆菌属次之, 为11.0%; 肠杆菌属为10.3%. 辐射剂量高的土壤中, 微生物OTU数量最高, 多样性丰富度最大. 土壤样品中微生物群落碳氮源的代谢强度也与辐射剂量呈正相关. 宏基因组测序及分析结果表明: 辐射土壤样品中微生物功能基因达到7 558个, 比正常辐射水平对照组高11.3%, 高辐射样品中碱基切除修复通路中的mug (TDG/mug DNA糖基化酶家族蛋白) 的数量显著高于对照组和低辐射组. 从辐射土壤样品中分离出30个属的可培养菌145株, 其中一株藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* R17具有辐射和盐碱逆境的耐受性, 可作为潜在的底盘菌株加以改造.

关键词: 低剂量辐射胁迫; 微生物群落; 代谢通路; 功能基因; mug

DOI: 10.13568/j.cnki.651094.651316.2020.10.23.0003

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-7675(2021)05-0588-011

引文格式: 吴娜, 杨多, 赵鲁玉, 等. 低剂量辐射下土壤细菌群落及其功能基因的响应[J]. 新疆大学学报(自然科学版)(中英文), 2021, 38(5): 588-598.

英文引文格式: WU N, YANG D, ZHAO L Y, et al. Soil microbial community and functional gene response to low-radiation-dose stress[J]. Journal of Xinjiang University(Natural Science Edition in Chinese and English), 2021, 38(5): 588-598.

Soil Microbial Community and Functional Gene Response to Low-Radiation-Dose Stress

WU Na, YANG Duo, ZHAO Luyu, YUE Haitao

(School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi Xinjiang 830046, China)

Abstract: To study the effects of low-dose radiation on soil microbial composition and abundance, and to analyze the primary genes in the microbiome that respond to radiation stress, soil samples with radiation doses ranging from 7.71 mSv/y to 15.07 mSv/y were collected from uranium mines in Xinjiang and Buccaneer County that were closed for reclamation in this study. Metagenomics Sequencing combined with bioinformatics analysis was applied, and it was found that the 6 phyla of *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi* and *Acidobacteria subphylum* were the dominant in the soil under low dose radiation environment, with their combined abundance accounting for more than 80% of the total. At the genus level, *Pseudomonas* spp. is the most abundant and highest in abundance, accounting for 31.0%, followed by *Bacillus* spp. with 11.0% and *Enterobacteriaceae* with 10.3%. The highest number of microbial OTUs and the greatest diversity richness were found in soils with high radiation doses. The metabolic intensity of carbon and nitrogen sources of microbial communities in soil samples was also positively correlated with radiation dose. The number of mug (TDG/mug DNA glycosylase family proteins) in the base excision repair pathway was significantly higher in the irradiated soil samples than in the control and low irradiation groups. One strain of *Micrococcus luteus* R17, 145culturable strain of 30 genera, was isolated from the irradiated soil samples, which was resistant to radiation and saline-alkali stress and could be modified as a potential chassis strain.

Key words: radiation effects; microbial communities; metabolism pathway; functional gene; mug

* 收稿日期: 2020-10-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C049); 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2018B01007).

作者简介: 吴娜(1992-), 女, 硕士生, 从事合成生物学与生物材料方面的研究, E-mail: wwwugirl@126.com.

[†] 通讯作者: 岳海涛(1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事合成生物学与生物材料方面的研究, E-mail: yuehaitao@tsinghua.org.cn.

0 引言

电离辐射是对生物体产生危害的重要因素之一,其主要来源有自然界放射源的本底辐射和人为放射源辐射.按照一般测算,日常生活中,室内伽马辐射的年平均有效辐射剂量为0.41 mSv/y,室外地面辐射的年平均有效辐射剂量为0.07 mSv/y,医疗来源的辐射量为0.4至1 mSv/y,其它来源的年辐射量小于0.02 mSv/y^[1-3].而离开大气层保护的飞机在12 km的飞行高度时,机体所受的辐射剂量约为14.32 mSv/y,机内的机组人员按每年工作500小时计算,所受的年辐射剂量约1.64 mSv/y.自然界的辐射源主要包括²³⁴U、²³⁸U和²²⁶Ra等,对人类所造成的辐射剂量占比超过98%.这些放射性核素可以在环境中广泛传播,尤其在土壤中可以富集并产生影响^[4,5].

辐射会影响生物膜组成和功能完整性,还导致单链DNA甚至双链断裂损伤,使相关蛋白质变性、造成某些酶的减少或失活,利用这一特性,在食品工业中可以应用放射源产生辐照来抑制微生物繁殖^[6-12].土壤中的辐射源会对微生物群落组成、分布和代谢途径产生持续且不可逆的影响^[13,14].研究者通过对核试验核心区、高中低放射性废液储存罐、反应堆和核废物处置场、切尔诺贝利核电站厂址及周边等不同剂量辐射场中的微生物组成及分布进行了分析,发现细菌、真菌在上述涉核、涉辐射环境中均有分布,且这些微生物对不同剂量的辐射均产生了抗性^[15-17].这些环境中所蕴含的微生物资源,经过筛选可应用于低浓度铀污染的环境治理,与传统的治理方法相比,微生物法具有价格低廉、二次污染低、效果好、能回收铀等优点^[18-20].围绕这一目标,国内外学者在高辐射剂量下(1~25 KGy)筛选了一些微生物菌种资源,并研究了其耐辐射特性及核素富集和转化的机理^[18],但对于接近自然界本底辐射的低剂量(50倍以下累计剂量)辐射背景下的微生物区系影响的报道很少.

为丰富对不同剂量辐射背景下生物效应及功能基因应答的认识,选取典型的低辐射环境采集土壤样品.样品采集地点位于新疆和布克赛尔蒙古自治县因资源枯竭关闭回填的铀矿场,在矿井口等少数地点,仍然可以检测到连续的低剂量,使用盖革(Geiger)计数器实地检测,其土壤中平均辐射剂量约为7.71 mSv/y,最高辐射剂量可达到32.76 mSv/y,分别是自然界本底辐射剂量的17倍和71倍.对上述地点的土壤样品进行采集,通过Biolog Eco PlateTM微孔板、16SrRNA扩增子测序和宏基因组测序等方法,对其中细菌群落碳氮源代谢情况、多样性和辐射相关功能基因进行分析,并在此基础上筛选了可培养的藤黄微球菌等耐辐射菌株.

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集

土壤样品采集自新疆和布克赛尔蒙古自治县铀矿填埋场,选取临近区域正常土壤作为对照组(1.5 mSv/y以下)LR4.按照土壤样品的不同辐射剂量,分为低辐射组(1.5~5.5 mSv/y)LR1、中辐射组(5~10 mSv/y)LR2、高辐射组(10 mSv/y以上)LR2共三组实验组.采样深度为地面5 cm至20 cm以下的浅表层.同时对不同采样点的地表植物进行鉴定,该铀矿填埋场可生长的植物主要是菊科、禾本科和藜科,在属水平上丰度最高的为蒿属.土壤样品的辐射强度及地表植物分类见表1.

表 1 辐射土壤样品采集信息
Tab 1 The information of radiation soil sample collection

样品	样品描述	辐射剂量mSv/y	地表植物	分组			
				1		2	
13	植物根系土	1.05	芦苇和白茅	A		LR4	对照组
19	沙土	3.50		A	对照组		
122	盐碱沙土	2.37		A			
120	树根土	5.17		B		LR1	低辐射组
121	沙土	5.17		B	低辐射组		
124	植物根系土	4.56	梭梭属	B			
21	植物根系土	6.83	蒿属	C			
22	沙土	6.83		C			
26	植物根系土	7.88	小甘菊	C	中辐射组		
27	干植物根系土	7.36	芨芨草	C			
29	植物根系土	6.83	蒿属	C		LR2	高辐射组
23	植物根系沙土	15.07	蒿属和大白刺	D			
24	植物根系土	14.02	碱蓬	D	高辐射组		
210	植物根系沙土	10.07	蒿属	D			

注:1为细菌多样性分组;2为细菌宏基因组学分组.

1.2 土壤中细菌多样性分析

微生物多样性测序委托北京百迈克生物公司进行。基于Illumina HiSeq测序平台,选择V3+V4区域进行16SrRNA扩增^[21],扩增引物为上游引物:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';下游引物:5'-GGACTACHVGGG-TWTCTAAT-3'。对各样品进行测序后,通过Reads的拼接和过滤^[22-24],对样品OTU聚类分析^[25],测序物种进行注释,并且对物种丰度进行分析,进一步对样品 α 多样性和 β 多样性进行分析^[26]。使用UCLUST^[27]在QIIME^[28](版本1.8.0)软件对所测得样品序列按OTU(分类操作单元)进行分析。

1.3 碳氮源代谢分析

利用Biolog Eco PlateTM对环境样品中碳氮源的利用情况进行分析^[29]。称取5 g土壤样品,将样品加入20 mL灭菌ddH₂O中。60 min后取1 mL上层污泥,12 000 rpm离心20 min,弃上清,加1 mL生理盐水(0.85%NaCl),振荡5 min使之混匀;再次10 000 rpm离心20 min,重复以上步骤2次(除去其中的碳源),弃上清,加1 mL生理盐水,振荡5 min使之混匀,2 000 rpm离心1 min。取上清液加入20 mL灭菌生理盐水的V型槽中,使其OD₅₉₀在0.13±0.02。将V型槽中的稀释液加入Biolog微孔板中,每孔加入150 μ L,置于30 °C恒温培养箱中培养,4 h后测取初始数据,每隔12 h用Biolog细菌自动读数仪读取数据,连续读数240 h。

1.4 可培养细菌筛选

分别称取2 g土壤样品分散于50 mLddH₂O中,120 rpm振荡1 h,静置待分层后,用接种环蘸取上清液在TGYM培养基^[6,30]上划线,分别置于30 °C和37 °C培养7 d,期间按时观察菌落生长情况并作好记录,根据菌落形态、颜色等进行分类统计,将筛选的菌株用10%甘油进行保存,存放于-70 °C。进一步对保存菌株进行16 SrDNA序列分析,取新鲜菌液1 μ L作为模板进行菌液PCR,扩增所需上游引物PrimerF:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物Primer R:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3'。将测序结果在GenBank中进行比对,使用MEGA7.0软件绘制系统发育树。

1.5 代谢通路和功能基因分析

将土壤样品宏基因组测序委托上海美吉生物有限公司进行,测序平台为Covaris M220测序仪。通过KEGG数据库对获得的基因进行了功能注释和匹配,将获得的预测基因与KEGG数据库进行比较,得到相应的KO-ID,从而获得基因参与的特定生物学途径。对这些基因的生物学功能及不同生物合成和分解途径进行关联分析,筛选出修复和重组相关的关键基因。

2 结果与分析

2.1 细菌多样性分析

Alpha多样性指数中的Chao1和ACE指数,Shannon指数和Coverage指数可用于估计群落中的物种总数,群落异质性和数据库的覆盖率见表2。

表 2 Alpha多样性指数统计
Tab 2 The statistics of alpha diversity indexes

样品名称	OTU	ACE ^a	Chao1 ^a	Shannon ^b	Coverage ^c
A122	858	1 195.999 1	1 118.957 7	5.446 6	0.995 2
A13	912	1 041.112 7	1 051.159 1	5.609	0.996
A19	1 280	1 420.834 4	1 431.212 8	5.796 9	0.994 7
B120	963	1 152.580 4	1 164.223 4	5.528 2	0.995 3
B121	751	1 242.077 6	1 015.095 2	4.946 3	0.994 6
B124	1 122	1 282.603 7	1 312.991 4	5.295 4	0.994 5
C21	1 508	1 626.969 8	1 672.741 4	6.237 4	0.994 7
C22	1 527	1 619.417 4	1 667.651 8	6.172 5	0.995 1
C26	1 421	1 636.421 2	1 656.568 9	5.544 5	0.993 4
C27	1 368	1 459.057 5	1 474.446 3	5.819 2	0.996
C29	1 548	1 622.428	1 656.690 5	6.014 9	0.995 6
D210	1 310	1 504.361 8	1 477.159 5	3.777 7	0.994 1
D23	1 310	1 459.432	1 476.930 1	5.503 8	0.994 6
D24	1 413	1 515.405 8	1 528.531 9	5.885 8	0.995 7

结果显示, Coverage指数表明该样品中所注释的微生物群落覆盖率均高于99%, 测序数据覆盖度较好. 高、中剂量辐射组土壤样品的Chao1、ACE指数以及OTU数量, 均显著高于对照组, 表明在辐射背景下, 土壤微生物多样性和群落丰度较正常土壤增加了.

以辐射剂量为主要影响因素, 对样品土壤中微生物组成差异进行非度量多维尺度法(NMDS)分析(图1(a)), 结果显示, 对照组和低辐射组的样本分布相对离散, 而中辐射组和高辐射组的样本集中, 表明中、高辐射组之间的相似度较高, 而对照组和低辐射组之间的相似度较低. 从 β 多样性角度对样本进行聚类(图1(b)), 中辐射组和高辐射组的样本之间的距离相对较近, 对照组和低辐射组的样本之间的距离较远. 中、高辐射组聚为一个分支, 低辐射组和对照组聚为另一个分支, 中、高辐射组样本之间的进化距离相近, 样本的相似度更高.

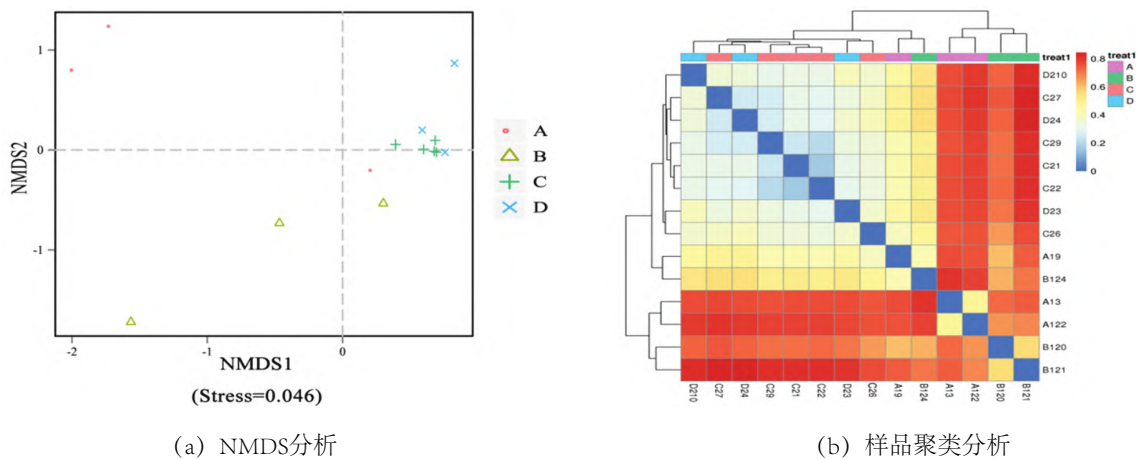


图 1 beta 多样性分析

Fig 1 The analysis of beta diversity

使用UCLUST在QIIME (版本1.8.0) 对土壤样品微生物多样性测序结果进行分析, 获取OTU分类信息, 以97%的相似性为对比阈值进行聚类, 对OTU进行分类注释. 计算每个样品中OTU的分布数量, 分析不同辐射强度下土壤样品中细菌共有和独有的基因数目, 绘制Venn图 (见图2).

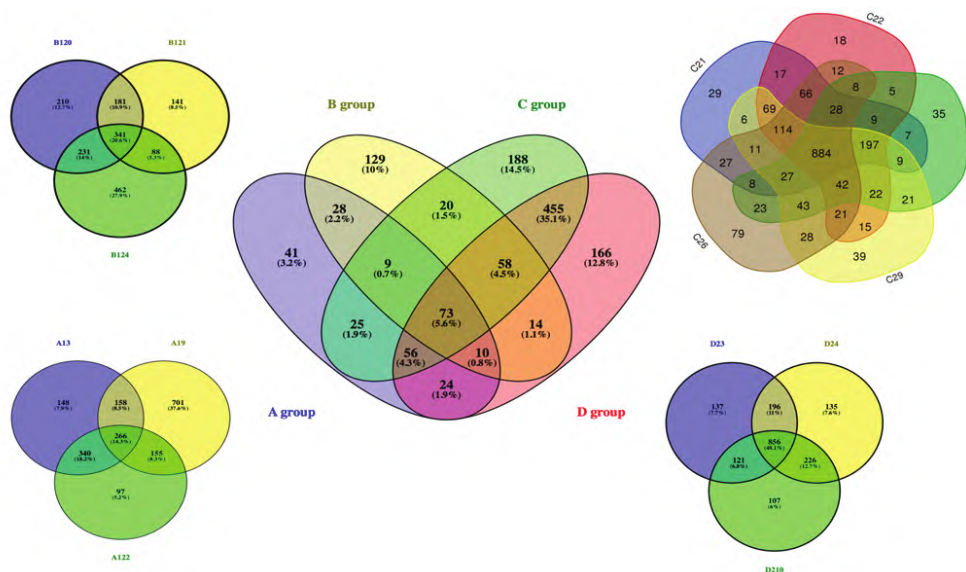


图 2 土壤样品Venn图

Fig 2 The venn diagram of soil sample

14个辐射土壤样本中共注释得到2 488个OTU, 对照组的3个样本中的OTU数量为266个. 其中低辐射组B组3个样本共有341个OTU, 占总数的20.6%; 中度辐射组C组的5个样本共有884个OTU, 占总数的46.5%; 高辐射组D组3个样本共有856个OTU, 占比为48.1%. 辐射组和对照组土壤样本共有OTU为73个, 占总OTU的5.6%.

对照组独有的OTU为41, 占OTU总数的3.2%。与对照组相比, 高、中、低辐射水平样本组独有OTU数量分别为166、188、129, 占OTU总数的12.8%、14.5%、10%, 表明辐射样品中的独有微生物群体的数量显著高于对照组。中度和高度辐射样本共有455个OTU, 占总OTU的35.1%, 表明两组的微生物群落相似性高于其它组。

通过门、纲、目、科、属、种和OTU等水平对每组样品分类情况进行统计(表3)。在门、纲、目和科水平, 对照组的菌群丰度显著高于辐射组, 而在物种和OTU水平, 中、高辐射组的菌群种类数量显著高于对照组, 低辐射组的菌群种类数量是四组中最低的。在门水平上, 变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和酸杆菌亚门(*Acidobacteria*) 6个菌门的丰度为所有样品的80%以上(图3)。与对照组相比, 辐射组土样中变形菌门数量降低, 而酸杆菌亚门数量增多, 此结果与报道的高剂量辐射土壤中微生物多样性结果一致。

2.2 碳氮源代谢分析

为了研究在辐射照射下土壤样品中微生物碳、氮源的利用情况, 利用Biolog Eco plateTM微平板方法, 对31种碳、氮源进行了测试。供试碳、氮源包括8种有机酸, 7种糖, 6种氨基酸, 3种多元醇, 2种聚合物, 2种胺, 2种酯类, 每个碳、氮源设置三组平行。初始测试时间为4 h, 每间隔12 h测量一次吸光度, 横坐标为检测样品的时间点, 纵坐标为32种碳、氮源。随着辐照强度的增加, 土壤样品中微生物群落的代谢强度增加, 并且不同样品中微生物群落可利用的碳、氮源和化合物的丰富度与辐照度呈正相关(图4)。辐射组在48 h开始快速生长, 而对照组在60 h开始快速生长, 中度和高辐射水平的碳水化合物、氨基酸、胺和酯的利用率显著高于对照组, 特别是 β -甲基-D-葡萄糖苷、D-木糖、苯乙基胺、丙酮酸甲基酯。每个样本对Tween 40和Tween 80均有较高的利用率, 表明上述样品中的微生物对聚合物类型的碳、氮源仍有利用能力, 可作为潜在的高分子聚合物降解菌株的筛选来源。

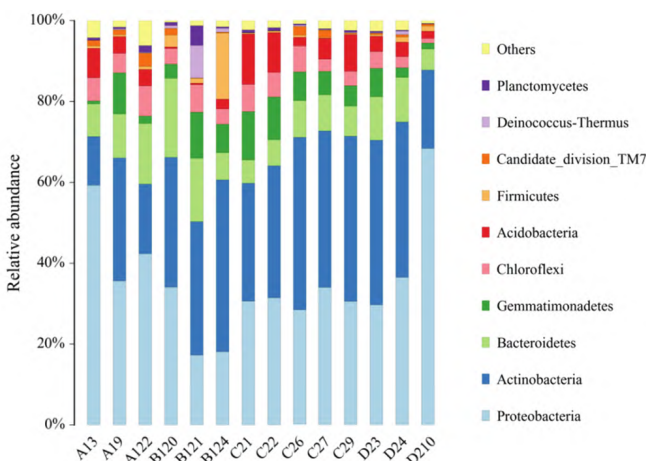


图3 土壤样品各菌门丰度图

Fig 3 The abundance map of each bacterial phyla in soil samples

注: 32种碳源为1. 水; 有机酸: 2. D-葡萄糖胺酸, 3. D-半乳糖醛酸, 4. 2-羟基苯甲酸, 5. 4-羟基苯甲酸, 6. γ -羟基丁酸, 7. 衣康酸, 8. α -酮丁酸, 9. D-苹果酸; 糖: 10. 糖原, 11. D-纤维二糖, 12. α -D-乳糖, 13. β -甲基-D-葡萄糖苷, 14. D-木糖, 15. N-乙酰基-D-葡萄糖胺, 16. 1-磷酸盐氨基酸, 17. L-精氨酸, 18. L-天冬酰胺, 19. L-苯丙氨酸, 20. L-丝氨酸, 21. L-苏氨酸, 22. 糖基-L-谷氨酸; 多元醇: 23. 异赤藓糖醇, 24. D-甘露糖醇, 25. D, L- α -甘油磷酸; 聚合物: 26. 吐温40, 27. 吐温80. 胺: 28. 苯乙胺, 29. 腐胺; 酯: 30. 丙酮酸甲基酯, 31. D-半乳糖酸 γ -内酯; 其它: 32. α -环糊精。

表3 不同分类水平的物种丰度统计

Tab 3 The statistics of species abundance on different taxonomic levels

分类水平	A	B	C	D
门	21	18	19	19
纲	55	49	51	54
目	112	104	106	101
科	218	194	210	202
属	369	337	372	360
种	449	411	471	453
OTU	1 017	945	1 474	1 344

A组: A13, A19, A122; B组: B120, B121, B124; C组: C21, C22, C26, C27, C29; D组: D23, D24, D210.

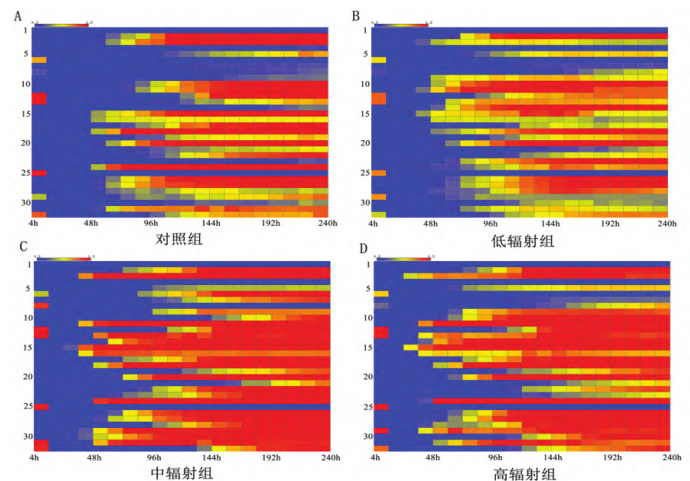


图4 环境样品碳氮源利用情况分析

Fig 4 The analysis of the utilization of carbon and nitrogen sources in environmental samples

2.3 可培养菌株分析

从连续的低辐射土壤样品中共分离并测序145个单菌落(表4), 对测序菌株构建了系统发育树(图5)。分离样品属于30个属, 包括假单胞菌属(*Pseudomonas* spp)、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp)、节杆菌属(*Arthrobacter* spp)、泛团聚体属(*Pantoea agglomerans* spp)和微杆菌属(*Microbacterium* spp)等。其中, 假单胞菌属数量最多, 丰度最高, 占31.0%; 芽孢杆菌属次之为11.0%, 肠杆菌属为10.3%。从辐射土壤样品中, 筛选了3株可培养的具有抗辐射和耐盐碱胁迫特性菌株, 其中1株经16S rDNA鉴定为藤黄微球菌属(*Micrococcus luteus*), 将其命名为*M.luteus* R17。*M.luteus* SC1204可以在8 kGy剂量的伽马射线照射下存活下来, 与*M.luteus* DSM 20030^T的相似性为99%^[31]。R17也可能具有类似的抗辐射性, R17可产生大量的多糖, 可用于抗菌和抗真菌研究, 它还具有抗氧化活性, 可以吸收UVA射线^[32]。为了测试*M.luteus* R17对伽马射线的耐受性, 我们用⁶⁰Co辐射源照射了*M.luteus* R17和*E. coli* S17-1, 结果显示在4 kGy的辐射剂量下(细菌和辐射源之间的距离约50 cm), *M.luteus* R17菌落的存活率超过50%, 而所有大肠杆菌菌落均死亡(关于*M.luteus* R17的耐辐射特性将另文报道)。

表 4 可培养菌株统计

Tab 4 The statistics of cultivable strains

可培养菌株	数量	样品中的分布情况
<i>Pseudomonas</i> spp	45	12
<i>Bacillus</i> spp	16	10
<i>Enterobacter</i> spp	15	8
<i>Arthrobacter</i> spp	8	5
<i>Pantoea agglomerans</i> spp	8	3
<i>Microbacterium</i> spp	7	5
<i>Exiguobacterium</i> spp	6	3
<i>Streptomyces</i> spp	4	2
<i>Massilia</i> spp	3	3
<i>Saccharibacillus</i> spp	3	1
<i>Variovorax</i> spp	3	1

注: 表4中显示丰度为前十的菌属名称。



图 5 可培养菌株系统发育树

Fig 5 The phylogenetic tree of cultivable strains

2.4 功能基因和代谢通路分析

对照组(LR4)功能基因数为6 762,高辐射组(LR2)功能基因数为7 558,是对照组的1.12倍,低辐射组(LR1)功能基因数为7 289,是对照组的1.08倍.结果表明连续低辐射提高了功能基因的多样性,并且随辐射剂量升高,功能基因种类越丰富.在Venn图(图6)中,对照组和辐射组共有5 449个基因,占总基因的59.9%,表明各样品间功能基因存在共性,也有很大的差异.其中高低辐射组共有6 261个基因,占68.8%;高辐射组与对照组共有基因为5 716个,占62.7%;低辐射与对照组共有基因为5 988个,占65.8%.而高辐射组、低辐射组、对照组特有基因为1 040、489、517,分别占11.4%、5.4%、5.7%.表明连续低辐射环境对功能基因有一定的趋同性,而辐射组与对照组功能基因存在差异,其中辐射剂量越高差异越大.

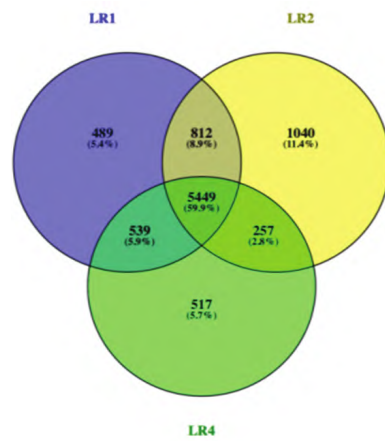
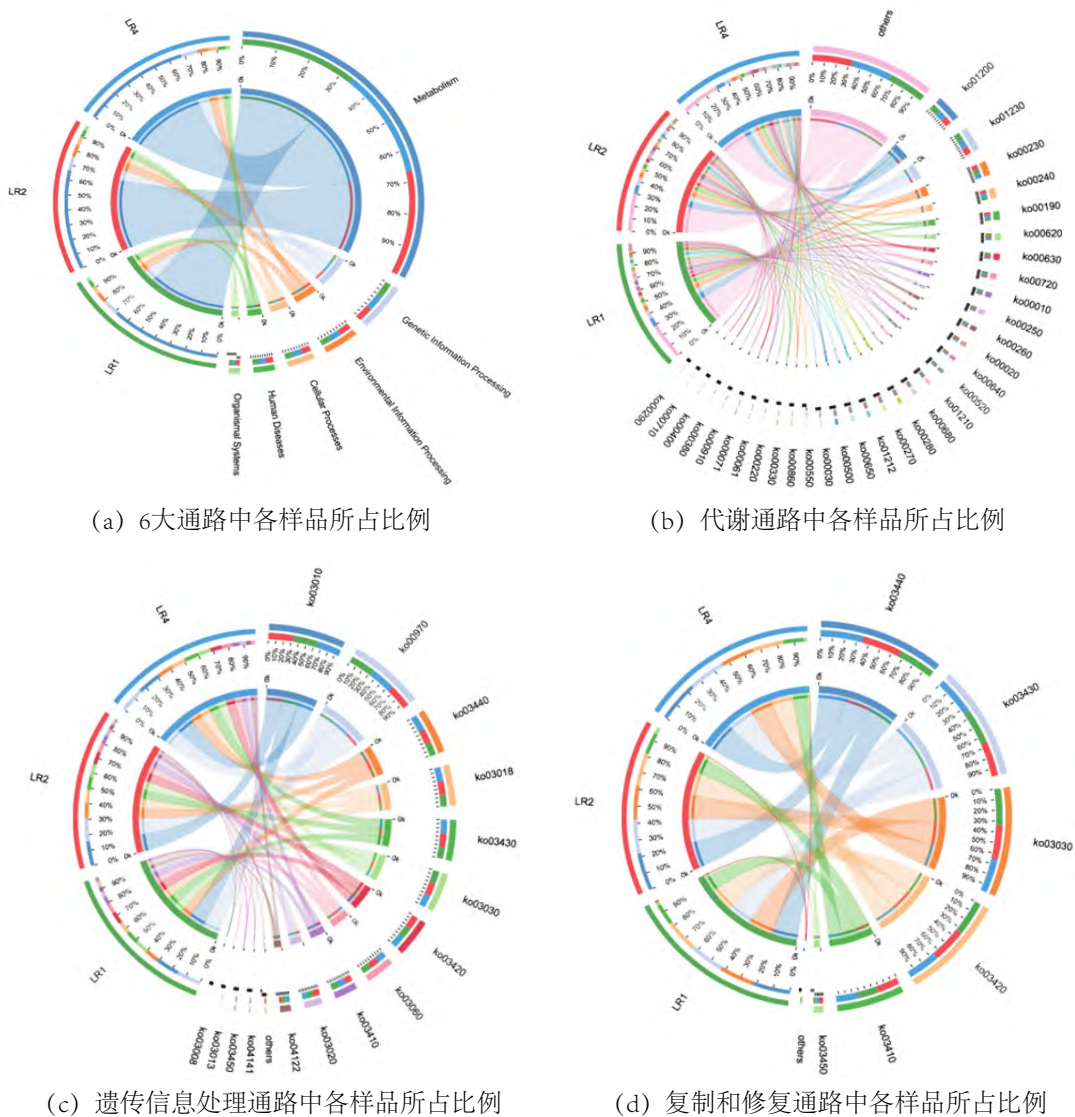


图 6 KEGG注释的功能基因Venn图

Fig 6 The Venn diagram of the KEGG annotated of functional genes



(a) 6大通路中各样品所占比例

(b) 代谢通路中各样品所占比例

(c) 遗传信息处理通路中各样品所占比例

(d) 复制和修复通路中各样品所占比例

图 7 各样品代谢通路分布差异圈图

Fig 7 The circle diagram of the distribution difference of metabolic pathways for each sample

KEGG注释的6大通路(图7(a))中,代谢通路所占比例高达68%~70%,遗传信息处理通路所占比例约10%。在代谢通路(图7(b))中,辐射组中乙醛酸、二羧酸代谢、丙酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、脂肪酸降解、氮代谢、色氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成的比例均高于对照组,其中碳代谢、氨基酸的生物合成、嘌呤代谢所占比例最高。在遗传信息处理通路和复制修复通路(图7(c)、图7(d))中,高辐射组DNA复制,核苷酸切除修复,碱基切除修复和非同源末端连接途径的比例均高于对照组。然而,在低辐射组中,只有DNA复制和核苷酸切除修复途径的比例高于对照组。

KEGG注释了各样品基础代谢通路,并对各代谢通路包含的基因个数进行了统计,其中对照组基因数目高于辐射组,且辐射剂量越高基因数目越少,高辐射组在各代谢通路中基因数目约是对照组的一半。辐射对细菌种群的整体代谢通路活性具有抑制作用。

进一步研究了三组不同土壤样品的宏基因组学数据,重点研究了与DNA修复相关的功能基因,结果表明,在高辐射剂量组中,ko03410(碱基切除修复)通路中的功能基因的数量—*mug*(TDG/*mug*DNA糖基化酶家族蛋白)显著高于对照组和低辐射组。但是,在DNA复制、修复和重组相关的功能基因中,对照组的基因数量要高于辐射组(表5)。辐射组总功能基因的丰富度高于对照组,但基因数量却少于对照组。辐射损伤的主要修复方法是碱基切除修复、直接损伤修复、核苷酸切除修复、碱基错配修复、重组修复和SOS修复。随着辐射值的增加,每个修复途径中功能基因的数量减少。

表 5 基于宏基因组学复制、修复和重组相关编码基因分析

Tab 5 The analysis of coding genes related to replication, repair and recombination based on metagenomics

基因	Ko-ID	LR1	LR2	LR4	定义	代谢通路	酶
<i>recO</i>	K03584	1858	1346	2896	DNA修复蛋白RecO	ko03440	-
<i>yhdJ</i>	K07319	606	1314	2666	腺嘌呤特异性DNA甲基转移酶	ko02048	2.1.1.72
<i>ogt</i>	K00567	1484	1068	2150	O-6-烷基鸟嘌呤-DNA / 半胱氨酸蛋白质甲基转移酶	ko03400	2.1.1.63
<i>alkA</i>	K01247	1050	924	1216	DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶II	ko03400	3.2.2.21
<i>nfi</i>	K05982	800	416	408	核酸内切酶V	ko03400	3.1.21.7
<i>radA</i>	K04485	3490	2436	4350	DNA修复蛋白RadA /Sms	ko03400	-
<i>mfd</i>	K03723	8222	5896	12264	转录修复偶联因子	ko03400,03420	3.6.4.-
<i>mutL</i>	K03572	4240	1718	6300	DNA错配修复蛋白	ko03430	-
<i>mutS</i>	K03555	6402	3168	8434	DNA错配修复蛋白	ko03430	-
<i>dnaQ</i>	K02342	4188	3904	5402	DNA聚合酶III亚基ε	ko00230,ko00240,ko03030,ko03430,ko03440	2.7.7.7
<i>dnaB</i>	K02314	4968	4172	10446	复制性DNA解旋酶	ko03030,ko04112	3.6.4.12
<i>mhbB</i>	K03470	2374	1506	2898	核糖核酸酶HIII	ko03030	3.1.26.4
<i>xthA</i>	K01142	2656	3888	5016	外脱氧核糖核酸酶III	ko03410	3.1.11.2
<i>uvrA</i>	K03701	12020	7946	19764	核酸外切酶ABC亚基A	ko03420	-
<i>dnaE</i>	K02337	11700	7916	17812	DNA聚合酶III亚基α	ko00230,ko00240,ko03030,ko03430,ko03440	2.7.7.7
<i>xseB</i>	K03602	368	408	626	外脱氧核糖核酸酶VII小亚基	ko03430	3.1.11.6
<i>xseA</i>	K03601	2106	2226	4244	外脱氧核糖核酸酶VII大亚基	ko03430	3.1.11.6
<i>ssb</i>	K03111	2416	2584	4208	单链DNA结合蛋白	ko03030,ko03430,ko03440	-
<i>dnaG</i>	K02316	4618	3384	8006	DNA启动酶	ko03030	2.7.7.-
<i>polA</i>	K02335	8548	13022	14132	DNA聚合酶I	ko00230,ko00240,ko03030,ko03410,ko03420,ko03440	2.7.7.7
<i>mug</i>	K03649	372	1306	422	TDG/<i>mug</i> DNA糖基化酶家族蛋白	ko03410	3.2.2.-
<i>mpg</i>	K03652	1022	984	1648	DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶	ko03410	3.2.2.21
<i>uvrD</i>	K03657	12098	8844	18782	DNA解旋酶II / ATP依赖性 DNA解旋酶PcrA	ko03420,ko03430	3.6.4.12
<i>ruvA</i>	K03550	1866	1074	3240	霍利迪连接DNA解旋酶RuvA	ko03440	3.6.4.12
<i>ruvB</i>	K03551	3066	2042	5010	霍利迪连接DNA解旋酶RuvB	ko03440	3.6.4.12
<i>ruvC</i>	K01159	1602	1160	2788	交叉连接内脱氧核糖核酸酶RuvC	ko03440	3.1.22.4
<i>recG</i>	K03655	5868	3212	9956	ATP依赖性DNA解旋酶RecG	ko03440	3.6.4.12

续表 5

基因	Ko-ID	LR1	LR2	LR4	定义	代谢通路	酶
<i>uvrC</i>	K03703	5648	3252	7496	核酸外切酶ABC亚基C	ko03420	-
<i>mutM</i>	K10563	3324	1938	5126	甲酰胺-DNA糖基化酶	ko03410	3.2.2.23, 4.2.99.18
<i>recA</i>	K03553	4050	2634	5930	重组蛋白RecA	ko03440	-
<i>ligA, ligB</i>	K01972	5994	4494	9450	DNA连接酶(NAD ⁺)	ko03030,ko03410, ko03420,ko03430	6.5.1.2
<i>recR</i>	K06187	1896	1394	3034	重组蛋白RecR	ko03440	-
<i>dnaX</i>	K02343	3876	3082	6794	DNA聚合酶III亚基 γ/τ	ko00230,ko00240,ko03030, ko03430,ko03440	2.7.7.7
<i>uvrB</i>	K03702	6784	4202	9530	核酸外切酶ABC亚基B	ko03420	-
<i>ung</i>	K03648	1392	972	1032	尿嘧啶DNA糖基化酶	ko03410,ko05340	3.2.2.27
<i>mutY</i>	K03575	2772	1666	4104	A/G特异性腺嘌呤糖基化酶	ko03410	3.2.2.-
<i>holA</i>	K02340	1834	1512	2668	DNA聚合酶III亚基	ko00230,ko00240,ko03030, ko03430,ko03440	2.7.7.7
<i>tag</i>	K01246	1464	1156	2224	DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶I	ko03410	3.2.2.20
<i>nth</i>	K10773	3232	1496	4036	核酸内切酶III	ko03410	4.2.99.18
<i>priA</i>	K04066	4946	2820	8408	原始蛋白N' (复制因子Y) (超家族II解旋酶)	ko03440	3.6.4.-
<i>holB</i>	K02341	2542	1736	3958	DNA聚合酶III亚基 δ	ko00230,ko00240,ko03030, ko03430,ko03440	2.7.7.7
<i>recF</i>	K03629	3088	1910	4280	DNA复制和修复蛋白RecF	ko03440	-
<i>dnaN</i>	K02338	3500	3068	6570	DNA聚合酶III亚基 β	ko00230,ko00240,ko03030, ko03430,ko03440	2.7.7.7

3 讨论

电离辐射是常见的对生物体造成危害的环境因素之一,但由于自然辐射环境在自然界中并不多见,且具有一定的危险性,因此此类环境样本较难获取,对微生物的影响研究报告较少.现有的报告主要集中在从切尔诺贝利核电站的核泄漏中收集的高辐射环境、内华达州核试验基地的高辐射环境、中国新疆放射性核辐射试验区的高辐射环境样品及其报道等,这些研究的电离辐射背景特征为高强度、短作用时间,目前较缺乏对长期且连续、低辐射背景环境下微生物区系影响的研究报道^[15-17].本研究以采掘后回填的铀矿为样品采集地,研究了辐射背景下土壤中的细菌区系和宏基因组对辐射环境的响应.

研究结果表明,土壤细菌区系的多样性丰富程度与辐射剂量呈现出正相关.低辐射剂量的微生物多样性与对照组相比,变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、芽孢杆菌门、绿弯菌门和酸杆菌亚门的丰度占有菌门的80%以上^[33,34].在OTU分类水平上,高和中等辐射组的OTU数量显著高于对照组,这表明辐射增加了土壤微生物的多样性和群落丰度.与多样性水平相对应,土壤样品中微生物群落碳、氮源的代谢强度与辐射剂量呈正相关.宏基因组测序的结果表明高辐射样品中的MUG蛋白家族数目明显高于低辐射组和对照组. Josef Jiricny实验室首次发现TDG/mug(胸腺嘧啶DNA糖基化酶)时,由于其能够从G:T错配中去除T,因此被命名为胸苷糖苷酶^[35].后来的研究表明TDG实际上属于mug(错配导向的尿嘧啶DNA糖基化酶)蛋白家族,具有mug蛋白的一般特性,具有修复G:U错配的功能.越来越多的研究表明TDG不仅具有碱基切除修复的功能,而且还与人类的基因表达调控,CpG岛甲基化,胚胎发育以及肿瘤的发生和治疗密切相关^[36,37].迄今为止,它已经引起了学术界的广泛关注,并取得了许多进展.根据本文中的数据,在高剂量辐射组中,TDG/mug相关基因在响应外部电离辐射压力中起主要作用.

从低辐射土壤样品中分离并鉴定了145株,这些菌株属于30个属,包括假单胞菌属、芽孢杆菌属、肠杆菌属、关节杆菌属、团聚泛菌属和微杆菌属.假单胞菌属物种数量最多,丰度最高,占31.0%.芽孢杆菌属为11.0%,肠杆菌属为10.3%.这些菌株因其具有良好的抗逆性,可作为潜在的高鲁棒性底盘生物改造对象,应用于工业

发酵生产中.

目前,对于辐射背景下土壤微生物多样性及其功能基因的研究,主要集中于高剂量辐射环境样品的研究,如核试验场地核心区、高浓度铀矿蒸发池、乏燃料存储装置等环境中.对于高于自然辐射背景50倍左右的低剂量辐射样品研究报道很少^[18-20].而此类低剂量辐射环境对于人类的医疗(如PET-CT检查需要服用放射性核素¹⁸F-FDG葡萄糖等)、工业生产可能遭受的辐射剂量更为接近,故本研究中MUG蛋白家族编码基因的高响应等结果也为相关辐射生物学研究提供了一些新证据,丰富了电离辐射对单细胞生物体影响的认识.

参考文献:

- [1] UNITED N. Sources, effects and risk of ionizing radiation[R]. New York: Unsear Report, 1988.
- [2] UNSCEAR. The United Nations scientific committee on the effect of atomic radiation[J]. Health Physics, 2000, 79(3): 314.
- [3] AIONSO-HEMANDEZ CM, TOLEDO-SIBELLOAL, GUILLEN-ARRUEBAREN A, et al. Natural radioactivity and evaluation of radiation hazards in soils from granitoid-granite geological formation in cuba[J]. Rad Protect, 2019, 184: 5-11.
- [4] ROQUIER C, REGENSPURG S, HARFOUVHE M, et al. Binding of uranium to organic-rich soils in an alpine region in Switzerland[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2010, 74: 2082-2098.
- [5] BAI A Q, FU B J, QU L Y, et al. The characteristics of soil microbial communities at burned forest sites for the Great Xingan mountains[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32: 4762-4771.
- [6] BURRELL A, DFELDSCHREIBER P, DEAN C J. DNA-membrane association and the repair of double breaks in X-irradiated *Micrococcus radiodurans*[J]. Biochim Biophys Acta, 1971, 247: 38-53.
- [7] BONUR A K, SMITH K C. The involvement of indirect effects in cell-killing and DNA double-strand breakage in γ -irradiated *Escherichia coli* K-12[J]. Int J Rad Biol, 1976, 29: 293-296.
- [8] BEBLO K, RABOW E, RACHEL R, et al. Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation[J]. Extremophile, 2009, 13: 521-531.
- [9] BEBLO K, RABOW E, RACHEL R, et al. Survival of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms after exposure to UV-C, ionizing radiation and desiccation[J]. Arch Microbiol, 2011, 193: 797-809.
- [10] KUJAWA J, ZAVODNIK L, ZAVODNIK I, et al. Effect of low-intensity (3. 75-25 J/cm²) near-infrared (810nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure[J]. J Clin Laser Med Surg, 2004, 22: 111-117.
- [11] CABISCOL E, TAMARIT J, ROS J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species[J]. Int Microbiol, 2000, 3: 3-8.
- [12] ROTHKAMMK, KRUGER I, THOMPSON L H, et al. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23: 5706-5715.
- [13] KOONIN E V, WOIF Y I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: 6688-6719.
- [14] DANIEL R. The metagenomics of soil[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3: 470-478.
- [15] RENSHAW J C, LLOYD J R, LIVENS F R. Microbial interactions with actinides and long-lived fission products[J]. CR-Chimie, 2007, 10: 1067-1077.
- [16] LANDA E R. Uranium mill tailings: nuclear waste and natural laboratory for geochemical and radioecological investigations[J]. J Environ Radioact, 2004, 77: 1-27.
- [17] ZHDANOVA N N, ZAKHARCHENKO V A, VEMBER V V, et al. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor[J]. Mycol Res, 2000, 104: 1421-1426.
- [18] SHUKLA A, PARMAR P, SARAF M. Radiation, radionuclides and bacteria: An in-perspective review[J]. J Environ Radioact, 2017, 180: 27-35.
- [19] GAZSO L G. The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment[J]. Central Eur J Occup Environ Med, 2001, 7: 178-185.
- [20] ABDELOUAS A, LU Y M, LUTZW W. Reduction of U (IV) to U (IV) by indigenous bacteria in contaminated ground water[J]. J Contam Hydrol, 1998, 35: 217-233.
- [21] QUAIST C, PRUESSE E, YILMAZP, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nuc Ac Res, 2013, 41: D590-6.
- [22] MAGOCET T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinform, 2011,

- 27: 2957-2963.
- [23] BOLGERA M, LOHSE M, USADELB. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinform*, 2014, 30: 2114-20.
- [24] EDGAR R C, HAAS B J, CLEMENTE J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. *Bioinform*, 2011, 27: 2194-2200.
- [25] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing[J]. *Nat Meth*, 2013, 10: 57-59.
- [26] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *App and Envir Microbio*, 2009, 75: 7537-7541.
- [27] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinform*, 2010, 26: 2460-2461.
- [28] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nat Meth*, 2010, 7: 335-336.
- [29] CHOIK H, DOBBS C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities[J]. *J of Microbio Meth*, 1999, 36: 203-213.
- [30] WANG P, SCHELLHOM H E. Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*[J]. *C J of Microbio*, 1995, 41: 170-176.
- [31] WU Y D, YANG Y, PENG G, et al. Radiation-Resistant *Micrococcus luteus* SC1204 and its proteomics change upon gamma irradiation[J]. *Curr Microbiol*, 2016, 72: 767-775.
- [32] NIS P, JOHN N, MAMATH C, et al. Characterization of bioactive compound produced by microfouling actinobacteria (*Micrococcus luteus*) isolated from the ship hull in Arabian Sea, Cochin, Kerala[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 25: 257-264.
- [33] ZHANG Z D, MAO J, TANG Q Y, et al. Diversity investigation of actinomycetes isolated from radiation-polluted soil[J]. *Microbiology*, 2009, 36: 1329-1333.
- [34] GU M Y, ZHANG Z D, WANG W, et al. The effects of radiation pollution on the population diversities and metabolic characteristics of soil microorganisms[J]. *Water Air Soil Pollut*, 2014, 225: 2133.
- [35] GALLINAR I P, JIRICNY J. A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase[J]. *Nature*, 1996, 383: 735-738.
- [36] LIU P, BURDZY A, SOWERS L C. Substrate recognition by a family of Uracil-DNA glycosylases UNG, MUG, and TDG[J]. *Chemical Res in Toxicol*, 2002, 15: 1001-1009.
- [37] DANIEL C, CHRISTOPHE K, YUSUKE S, et al. The enigmatic thymine DNA glycosylase[J]. *DNA Repair*, 2007, 6: 489-504.

责任编辑: 赵新科