

基于 Biolog FF 技术解析辐射对产黑色素短梗霉代谢活性的影响

朱 静, 张志东, 唐琦勇, 顾美英

(新疆农业科学院微生物应用研究所/新疆特殊环境微生物重点实验室, 乌鲁木齐 830091)

摘 要:【目的】分析辐射对短梗霉代谢活性的影响, 研究真菌耐辐射机理机制。【方法】分离鉴定一株产黑色素短梗霉, 并进行菌株的 ^{60}Co γ 射线照射试验。根据菌株的耐辐射能力, 设置 ^{60}Co γ 射线 0、2 500、5 000 和 10 000 Gy 4 个辐射剂量, 采用 Biolog FF 技术检测不同辐射下菌株对 FF 微平板中碳源的利用程度, 分析辐射对产黑色素短梗霉代谢碳源活性的影响。【结果】不同辐射剂量下菌株 AWCD 值存在明显差异。随着辐射剂量的升高, 细胞代谢活性明显下降, 羧酸类和氨基酸的利用呈下降趋势, 而碳水化合物的利用率呈上升趋势。随着辐射剂量增加, 菌株对碳源的利用率发生了变化。在 Biolog FF 微平板 95 种碳源中, 共有 46 个碳源被利用, 其中 7 种碳源利用率随辐射剂量上升而增加。其中, D-核糖, 蔗糖, D-阿拉伯糖, L-阿拉伯糖的利用率增加最为明显。【结论】辐射能明显降低产黑色素短梗霉的代谢活性, 其在高剂量辐射下碳源利用类型会发生明显的改变, 可能是该菌辐射应激和适应的一种有效机制。

关键词: Biolog FF 技术; 产黑色素短梗霉; 辐射; 代谢活性

中图分类号: S188

文献标志码: A

文章编号: 1001-4330(2023)08-2046-09

0 引言

【研究意义】电离辐射(ionizing radiation, IR)可作用于生物大分子, 产生辐射化学效应, 如电离、产生自由基、核酸损伤等, 对生物体产生损害^[1]。生物体在进化过程中产生了各种应对辐射的生存策略, 可最大程度地减少辐射对生物体基础代谢机制的损害, 并对其进行修复。在辐射区微生物研究过程中, 真菌被发现是富集放射性物质的重要生物^[2-4]。在放射性的胁迫下, 真菌表现出极强的辐射耐受性和高度差异的基因组结构^[5], 以及特殊的外观和营养需求^[4], 并产生丰富的次级代谢产物, 如色素、酶、多糖等。分析辐射对短梗霉代谢活动的影响, 对研究真菌辐射机理机制有重要意义。【前人研究进展】短梗霉属(*Aureobasidium*)是一种具有酵母型和菌丝型形态的多形真菌, 其厚垣孢子积累黑色素^[6], 可抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等多种逆境^[7,8], 还

可作为单细胞蛋白、细胞壁多糖、胞外多糖、果胶酶、色素等的生产菌株^[9]。Biolog 微生物自动分析系统是一套微生物碳源代谢和鉴定的分析系统, 采用不同鉴定分析板, 可鉴定和分析包括细菌、酵母、丝状真菌在内的近 2 000 种微生物以及环境微生物群落多样性^[10,11]。其中, Biolog FF MicroPlate (Biolog, Hayward, CA, USA)可用于丝状真菌鉴定, 并被用于环境中真菌群落的碳源代谢多样性分析。Biolog FF MicroPlate 使用 95 个碳源来测定微生物的底物利用率和表型谱, 每个孔中包含的底物随着代谢活性而变化颜色。95 种碳源可归纳为六类碳源, 以分析样品对不同类型碳源的利用情况。其中, 碳水化合物类(Carbohydrates)44 种、氨基酸类(Amino acids)13 种、羧酸类(Acids)17 种、胺类(Amines)6 种、聚合物类(Polymers)5 种、其他(others)10 种^[12]。课题组在前期研究中获得多株短梗霉^[13], 该菌株不但具有高剂量辐射(^{60}Co γ 射线 15 kGy)耐受能力, 还具

收稿日期(Received): 2022-11-03

基金项目: 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费项目(KY2022035); 新疆农业科学院科技创新重点培育专项(xjkcpy-2022004)

作者简介: 朱静(1981-), 女, 云南昆明人, 研究员, 硕士, 研究方向为特殊环境微生物学, (E-mail) 122543537@qq.com

通信作者: 张志东(1977-), 男, 新疆乌鲁木齐人, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为特殊环境微生物学, (E-mail) zhangzheedong@sohu.com

有极强的耐 UV 辐射和耐多种重金属的能力。菌株生长过程中还大量产生可溶性黑色素,可有效的提高微生物在紫外照射下的存活率,证明其具有良好的紫外辐射保护作用^[14]。【本研究切入点】目前对这类菌株在辐射胁迫下生长代谢活性变化,及其蕴含的应激机制和耐辐射机理研究国内外鲜见报道。需分析辐射对短梗霉代谢活性的影响,研究真菌耐辐射机理机制。【拟解决的关键问题】从新疆辐射污染土样中,分离筛选出一株黑色酵母状真菌 MF1,观察菌落形态和菌丝特征,分析系统发育并进行鉴定。设置不同的⁶⁰Co γ 辐射剂量辐射试验,采用 Biolog FF 技术检测分析辐射后菌株碳源的利用程度,并根据单孔平均颜色变化率(AWCD),分析辐射对菌株代谢活性的影响,为解析耐辐射真菌的辐射适应机理及其开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

该菌株分离自新疆某辐射污染环境地表 5 ~ 20 cm 土壤,取采集的土样 1.0 g 分装于 15 mm × 150 mm 无菌试管中,置于⁶⁰Co γ 射线下进行 10 kGy 剂量辐照处理,向试管中加入 5 mL 液体查氏培养基,28℃振荡富集 3 d。取 1 mL 上述富集液移入装有 9 mL 无菌生理水的试管中,依次进行梯度稀释后,取 0.2 mL 稀释液涂布于查氏培养基平板上,于 28℃恒温条件下培养 7 d,观察菌落生长情况,挑取单菌落进行纯化。

1.1.2 培养基

MEA 培养基:麦芽浸粉 30 g,大豆蛋白胨 3 g,纯净水 1 000 mL。

查氏培养基:NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂糖 16 g, 纯净水 1 000 mL。

1.1.3 主要仪器与设备

SW-CJ-2F 超净工作台,上海博迅实业有限公司;HHW-21.600 电热恒温水浴箱,北京永光明医疗仪器厂;fecycler 96 孔 PCR 反应仪, Bio-Rad 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;GEL Doc2000 凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司;Biolog FF 接种培养板、FF-IF 接种液、Biolog Microsoft 全自动微生物鉴定分析系统(型号 MICROSTATION),美国 Biolog 公司;PL203 电子天

平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SPX-150B 生化培养箱,宁波东南仪器有限公司;HZQ-F160 全温振荡培养箱,哈尔滨东联电子技术开发有限公司;Eppendorf 5424 离心机,德国 Eppendorf 股份公司;UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 LSU rDNA D1/D2 区的 PCR 扩增

将新鲜菌株接种于液体 MEA 培养基,于 28℃恒温条件下培养 4 d,离心收集菌体,使用 TE 洗涤 3 遍。菌体经液氮研磨后,DNA 提取参照 Gerrits 等^[15]方法,DNA 经 70% 乙醇洗涤后自然干燥,加入 50 μ L 无菌的双蒸水,4℃下溶解 2 h, -20℃保存备用。LSU rDNA D1/D2 区的 PCR 扩增采用真菌通用引物 NL1:5' - GCATATCGGTA-AGCGGAGGAAAAG - 3', NL4:5' - GGTCCGT-GTTTCAAGACGG - 3'。扩增条件:95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min^[16]。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,送北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司测序。

1.2.2 系统进化树的构建

将实验菌株所得的 LSU rDNA D1/D2 区序列与 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。从数据库获得相关种属的序列,并结合真菌生物多样性研究中心数据库(<http://www.cbs.knaw.nl/databases/>)的标准模式菌序列,利用 MEGA 7.0 软件包^[17,18]采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建,确定菌种生物学分类地位。

1.2.3 菌株生长及辐射试验

将新鲜培养的试验菌株接种到 MEA 液体培养基中,30℃振荡培养 3 d 后,5 000 r/min 离心收集菌体,用 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)洗涤菌体 3 次,并调整至浓度 OD₆₀₀ 为 1.0 左右。取上述菌悬液 5 mL 装至 15 mm × 150 mm 无菌试管中,送至中国科学院新疆地理生态研究所辐射中心,置于⁶⁰Co γ 射线(剂量率 100 Gy/min)进行不同剂量照射。取辐照处理后的菌液 1 mL 进行梯度稀释后,取 0.2 mL 稀释液涂布于 MEA 琼脂培养基平板上,置 28℃恒温培养,观察记录菌落数,并计算存活率。以 *D. radiodurans* R1 (DR) 和 *E-*

. coli 作为对照菌株,绘制耐辐射曲线。根据耐辐射曲线结果,用上述方法制备菌悬液 5 mL,分别在⁶⁰Co γ 射线辐射 0 Gy(作为空白对照),2 500 Gy,5 000 Gy,10 000 Gy 剂量下进行辐射。辐射完成后,立即用冰盒带回实验室处理。

1.2.4 菌悬液制备及 Biolog FF 培养

使用移液枪,将辐照后的样品原液逐滴加入到 FF-IF 接种液中,充分混匀,并将浓度控制在 75% ± 2%。将接种液倒入无菌平皿或 V 型槽,用移液器在 Biolog FF 板每个孔中加入 100 μL 菌悬液,盖上盖子,控制湿度,30℃ 恒温静置培养。

1.3 数据处理

Biolog FF 板 30℃ 恒温静置培养,每隔 24 h 放置到 Biolog 菌种鉴定仪上,读取不同孔的 OD_{590} 值。其中,Biolog FF 板孔中平均吸光值(Average well color development,AWCD)用于描述菌株利用碳源的平均活性,计算公式如下:

$$AWCD = (Ci - R) / n.$$

式中, C_i 为每个有培养基孔的吸光值, R 为对照孔的吸光值, n 为培养基孔数,Biolog FF 板 n 值为 95^[19]。

数据统计及分析采用 Biolog 自动分析系统、Excel 及 Graph Prism7.0 软件^[20]。

2 结果与分析

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌株的形态特征

研究表明,菌株 MF1 可在 4~30℃ 正常生长,最佳培养温度 28℃,可耐受 15% NaCl。在查氏培养基 28℃ 培养条件下,菌落初期均为酵母样,灰白色,菌落后期真菌菌丝体嵌入培养基,培养 2 d 后菌落转暗为黑色或棕黑色,凸起,菌落边缘有或无菌丝体嵌入培养基。培养 7 d 后,菌落大小为 0.2~1.0 cm;其最适生长温度为 28℃,最适初始生长 pH 为 6.0。显微观察,营养菌丝透明,光滑,薄壁,有横隔,培养中后期转换为黑色菌丝。分生孢子透明至黑褐色。透明分生孢子单细胞,光滑,椭圆形,(4.5~10) μm × (3.0~10) μm。图 1,图 2

2.1.2 菌株的分子鉴定

研究表明,实验菌株为 *Aureobasidium* 属,MF1 (557 bp, 基因序列号 OK083625) 与 *A. melanogenum* CBS 105.22^T 和 CBS 621.80^T 聚在一个分支中,支持率为 70%,最大同源性

99.5%。图 3

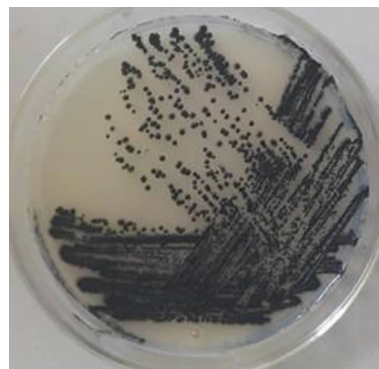


图 1 菌株 MF1 菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of the strain MF1



注:查氏培养基 28℃ 培养 7 d,Olympus BX43 显微镜 40 倍观测

测

Note:cultured on Czapek Dox Agar at 28℃ for 7 days and observed under an Olympus BX43 (40 ×) microscope

图 2 菌株 MF1 菌丝体显微形态

Fig. 2 Mycelial characteristics of the strain MF1

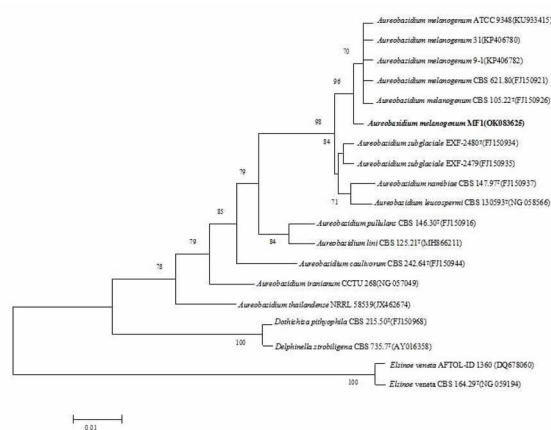


图 3 菌株 MF1 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain MF1

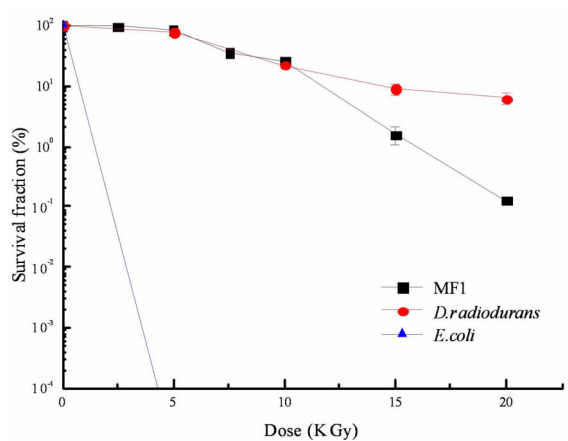


图4 菌株 MF1 的辐射存活曲线

Fig. 4 Gamma radiation survival curves of strain MF1

2.1.3 菌株的耐辐射特性

研究表明,在辐射剂量为5 000 Gy 时,MF1 和 *D. radiodurans* R1 的存活率几乎为 100%。当辐射剂量达到10 000 Gy 时,2 株菌的存活率依然有 20%。然而,大肠杆菌细胞在接近5 000 的辐射剂量时已基本死亡。辐射剂量达到 15 kGy 时,菌株 MF1 依然有细胞存活,表现出与 *D. radiodurans* R1 相似的抗辐射能力。菌株 MF1 对⁶⁰Co γ 辐射同样具有较强的抗性。图4

2.1.4 菌株的碳源利用

研究表明,得到菌株在培养 0 ~ 144 h 代谢 95 种碳源的丰度指数。菌株在 72 h 时利用碳源种类最多,共 46 种,从而确定其可利用 D-阿拉伯醇、熊果苷、D-纤维二糖、吐温 80、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、糊精、赤藻糖醇、D-果糖、D-半乳糖醛酸、龙胆二糖、 α -D-葡萄糖、D-葡萄糖醛酸、丙三醇、肝糖、麦芽糖、麦芽三糖、D-甘露醇、D-甘露糖、D-松三糖、 β -甲基-D-葡萄糖苷、6-O-D-吡喃葡萄糖酰-D-呋喃果糖、D-阿洛酮糖、D-蜜三糖、L-鼠李糖、D-核糖、水杨苷、水苏糖、蔗糖、D-海藻糖、D-木糖、溴代琥珀酸、反丁烯二酸、 γ -羟基丁酸、 α -酮戊二酸、苹果酸、奎尼酸、琥珀酰胺酸、琥珀酸、琥珀酸甲基酯、L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸作为唯一碳源。图5

将菌株利用的碳源按 Biolog FF 板碳源的归类,又可将其利用的碳源分为碳水化合物类 24 种、氨基酸类 6 种、羧酸类 8 种、胺类 1 种、聚合物类 3 种、其他 4 种。图6

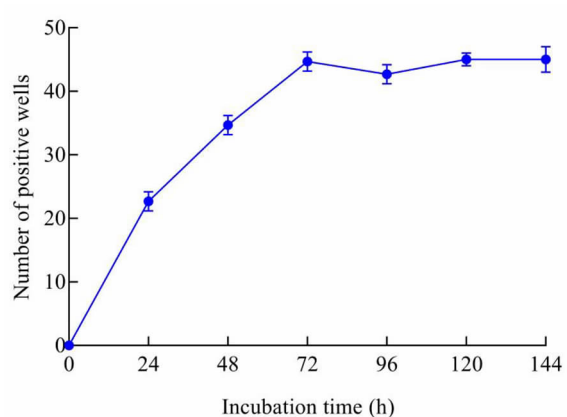


图5 菌株碳源利用丰度指数变化

Fig. 5 Utilization of sole carbon sources by strain MF1 on the basis number of positive wells

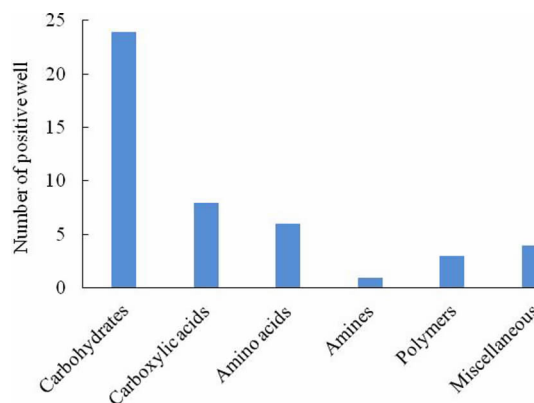


图6 菌株利用的碳源类型

Fig. 6 Utilization of sole carbon sources by strain MF1 based on the number of positive wells.

2.2 不同辐射剂量下菌株代谢活性

研究表明,在对照菌株中,随培养时间增加,AWCD 值增高,96 ~ 168 h 趋于平稳,144 h 基本达到最大。不同辐射剂量下菌株 AWCD 值也呈现相同趋势。其中,在 2 500 Gy 辐照下,细胞代谢活性与对照组比较接近,分别为 0.235 7 和 0.162 8;当辐射大于 5 000 Gy 时,细胞代谢活性急速下降为 0.078 2,低于对照组的 50%;当辐射达到 10 000 Gy 时,细胞代谢活性只有 0.016 2,仅为对照组的 6% 左右。在低剂量辐射作用下,菌株的生长和代谢受到的影响较小,但当辐射剂量大于 5 000 Gy,细胞生长速率及代谢活性开始大幅下降,而当辐射剂量达到 10 000 Gy 时,细胞生长近乎停滞状态,代谢活性极低。图7

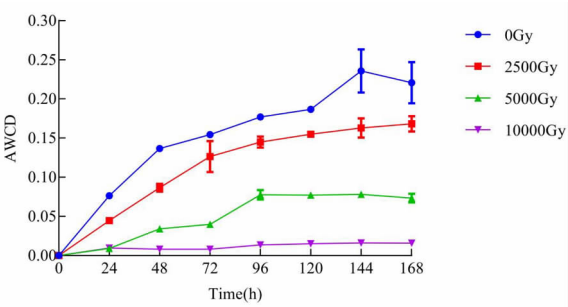


图 7 不同辐射剂量下菌株 AWCD 值变化
Fig. 7 AWCD of strain under different radiation doses

2. 3 不同辐射剂量下菌株对碳源种类利用

研究表明,菌株对于 6 大碳源种类的利用存在明显差异。随着辐射剂量的上升,碳水化合物利用率呈上升趋势,而羧酸类和氨基酸的利用呈下降趋势。其他几类碳源的利用率基本持平,但在10 000 Gy 的辐射下,除了碳水化合物,其他碳源的利用率均为 0。图 8

4 个辐射剂量下利用率最高的 10 种碳源共

涉及 22 种。其中,对碳水化合物的利用种类最多,共 11 种,占总数的 50%;氨基酸 2 种,占 9%;羧酸类 4 种,占 18%,聚合物只有 1 种,占 5%,以及其他碳源 4 种,占 18%。表 1

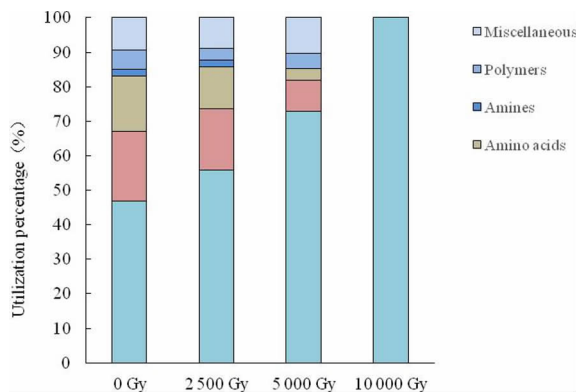


图 8 不同辐射剂量下菌株对不同
类型碳源利用

Fig. 8 Different types of carbon source utilization for strain under different radiation doses

表 1 不同辐射剂量下菌株利用最多的 10 种碳源

Tab. 1 Utilization of 10 carbon sources by strain under different radiation doses

辐射剂量 Radiation Dose(Gy)							
0 Gy		2 500 Gy		5 000 Gy		10 000 Gy	
碳源 Carbon source	吸光值 Absorbance (Ci - R)	碳源 Carbon source	吸光值 Absorbance (Ci - R)	碳源 Carbon source	吸光值 Absorbance (Ci - R)	碳源 Carbon source	吸光值 Absorbance (Ci - R)
L - 苹果酸 L - Malic Acid	0. 716	熊果苷 Arbutin	0. 608	熊果苷 Arbutin	0. 562	D - 核糖 D - Ribose	0. 188
反丁烯二酸 Fumaric Acid	0. 656	反丁烯二酸 Fumaric Acid	0. 555	D - 木糖 D - Xylose	0. 391	蔗糖 Sucrose	0. 138
琥珀酸 Succinic Acid	0. 609	L - 脯氨酸 L - Proline	0. 537	D - 蜜三糖 D - Raffinose	0. 242	D - 阿拉伯糖 D - Arabinose	0. 126
L - 谷氨酸 L - Glutamic Acidine	0. 602	L - 苹果酸 L - Malic Acid	0. 497	6 - O - D - 吡喃葡萄糖 糖酐 - D - 呋喃果糖 Palatinose	0. 239	D - 海藻糖 D - Trehalose	0. 126
L - 脯氨酸 L - Prol	0. 597	琥珀酸 Succinic Acid	0. 444	D - 松三糖 D - Melezitose	0. 232	熊果苷 Arbutin	0. 106
熊果苷 Arbutin	0. 576	水杨苷 Salicin	0. 402	糊精 Dextrin	0. 217	D - 木糖 D - Xylose	0. 105
6 - O - D - 吡喃葡萄糖 糖酐 - D - 呋喃果糖 Palatinose	0. 531	D - 木糖 D - Xylose	0. 389	溴代琥珀酸 Bromosuccinic Acid	0. 215	L - 阿拉伯糖 L - Arabinose	0. 101
水杨苷 Salicin	0. 481	糊精 Dextrin	0. 37	D - 果糖 D - Fructose	0. 197		
D - 葡萄糖醛酸 D - Glucuronic Acid	0. 476	L - 谷氨酸 L - Glutamic Acid	0. 367	D - 海藻糖 D - Trehalose	0. 195		
D - 木糖 D - Xylose	0. 468	海藻糖 D - Trehalose	0. 336	琥珀酸甲基酯 Succinic Acid Mono - Methyl Ester	0. 192		

2.4 不同辐射剂量下菌株对碳源利用的变化

研究表明,一些碳源在不同辐射强度下均被利用,如熊果苷、D-木糖、D-海藻糖。而一些碳源随着辐射强度的增大,就不再被细胞大量利用,如反丁烯二酸、L-脯氨酸、水杨苷、L-苹果酸、琥珀酸、L-谷氨酸。该部分碳源在辐射剂量达到 5 000 Gy 及以上时,利用率显著下降。D-核糖、蔗糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖在低辐射剂量时并未被大量利用,而在 10 000 Gy 照射下利用率显著提高,这提示在高辐射条件下细胞为适应极端条件,开始大量利用这部分碳源以维持存活。

共有 7 种碳源随辐射强度升高,利用率显著增加,全部为碳水化合物:D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-核糖、蔗糖、D-海藻糖、D-木糖、熊果苷。

3 讨论

杨永华等^[21]发现 10~50 Gy 低剂量的 X-射线和 γ 射线有促进真菌孢子萌发和菌丝生长的作用,Tuga 等^[22]指出真菌在放射性环境下出现了趋放射性(radiotropism)和放射刺激作用(radiostimulation)。项目组先后从新疆辐射污染土样中获得耐辐射菌 1000 多株,包括细菌、放线菌、真菌等。其中,酵母、丝状真菌 100 余株,分类鉴定归属于 15 个属^[23,24],其中多个属此前无相关耐辐射特性报道。

在白垩纪早期的沉积层中出现了许多真菌化石黑化现象,而同一时期许多动植物的灭绝也基本归因于遭受宇宙辐射^[25,26]。黑色素可增强微生物在各类极端环境中生存,包括高海拔地区,北极和南极地区^[27]。在美国内华达试验场、布鲁克海文国家慢性辐射实验室都分离到产黑色素真菌。一些产黑色素真菌物种定殖在切尔诺贝利反应堆损坏的墙壁上,核反应堆冷却池也被产黑色素微生物污染^[28,29]。在以色列螺旋谷,紫外辐射强烈的南坡黑曲霉孢子中黑色素含量是阴凉北坡的 3 倍(南坡日照是北坡的 2~8 倍)^[30]。一些产黑色素真菌不仅是抗辐射的,慢性亚致死辐射条件还能刺激它的增殖^[31]。黑色素具有保护真菌免受辐射损伤的功能,使其能在放射环境中成为优势种群。

短梗霉(*Aureobasidium*)是一种具有酵母型和菌丝型形态的多形真菌,其厚垣孢子积累黑色素,可抵抗紫外线、高渗胁迫及重金属毒害等多种逆

境^[8,9,13]。项目组通过对该属菌株的研究发现,该菌可大量产生可溶性黑色素,最高发酵产量可达 1.0 g/L 以上^[14]。黑色素可有效的提高菌株在紫外照射下的存活率,证明其具有良好的紫外辐射保护作用^[8]。目前,国内外对短梗霉的研究主要集中在与生产普鲁兰多糖相关的内容^[32-34],以及单细胞蛋白、细胞壁多糖、胞外多糖、果胶酶、色素等的生产相关研究^[35]。而该菌株较强的耐辐射能力是否与其代谢过程及代谢产物相关,以及其耐辐射机理尚未有研究报道。

Biolog-FF 微孔板除了用于检测多种丝状真菌的碳源利用情况,并对真菌种类进行鉴定外,该技术还可以对环境中的真菌群落的特性及代谢情况进行分析^[36]。试验中,当辐射剂量小于 5 000 Gy 时,细胞存活率以及细胞代谢活性与对照组没有显著差异,在该剂量的辐射作用下,菌株的生长和代谢受到的影响较小,但当辐射剂量大于 5 000 Gy,细胞生长速率及代谢活性开始大幅下降,以细胞生长的稳定期 96 h 为例,辐射剂量为 5 000 Gy 时,AWCD 值约为对照组的 1/2;当辐射剂量达到 10 000 Gy 时,细胞存活率约为 20%,AWCD 值不足对照组的 1/10,代谢活性极低。使用 Biolog-FF 微孔板可以直观简易的反映出细胞对碳源利用的变化。例如,D-核糖、蔗糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖在低辐射剂量时并未被大量利用,但在高剂量照射下利用率显著上升。在 95 种碳源中,共有 17 种碳源表现出类似的趋势。在高剂量辐射下碳源利用类型会发生明显的改变,可能是该菌辐射应激和适应的一种有效机制。

目前,以耐辐射奇球菌为代表对微生物抗辐射作用进行的研究表明,在辐射的损伤作用下,细胞会启动应激机制并进行自我修复,包括通过抗氧化酶清除自由基,DNA 和蛋白质的修复等^[37]。试验中,辐射导致碳水化合物、胺类的利用率上升。胺类存在于所有生物细胞内,并随细胞增殖、分化而作相应的变化,胺类可通过直接与 DNA 相互作用调节 DNA 构象和参与 RNA 及蛋白质的合成^[38]。而碳水化合物是生命细胞结构的主要成分及主要供能物质,有调节细胞活动的重要功能。碳源最有用的利用方式是糖,他们可能在生存中起关键作用。三羧酸循环(TCA)是葡萄糖,脂质和氨基酸最终的代谢途径。在汪汉成等^[39]利用灰葡萄孢杀菌剂对烟草灰霉病菌代谢活性的研究中,当杀菌剂啉酰菌胺的浓度升高,TCA 中的新陈

代谢被抑制,包括溴丁二酸、富马酸、 α -酮戊二酸、D-苹果酸、L-苹果酸、奎尼酸、琥珀酰胺酸、琥珀酸、L-丙氨酰胺、L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-焦谷氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸和腐胺。但当 TCA 中这些底物的代谢受到抑制,磷酸戊糖途径 (PPP) 中的某些碳源仍然可以使用,并且代谢不受抑制,包括 D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-核糖和 D-木糖。研究中,D-核糖、蔗糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖,在高剂量照射下利用率显示出明显优势,另有 17 种碳源表现出相同的趋势,包括 D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖、D-木糖等。TCA 不是葡萄糖代谢的唯一途径。当 TCA 被抑制时,磷酸戊糖途径 (PPP) 可用于代谢碳水化合物。

4 结 论

不同辐射剂量下菌株 AWCD 值存在显著差异。随着辐射剂量的升高,细胞代谢活性显著下降。同时,随着辐射剂量的上升,在 95 种碳源中碳水化合物的利用率呈上升趋势,而羧酸类、氨基酸和其他碳源的利用呈下降趋势。随着辐射剂量增加,菌株对碳源的利用也发生着变化。其中,D-核糖、蔗糖、D-阿拉伯糖、L-阿拉伯糖在低辐射剂量时并未被大量利用,但在高剂量照射下利用率显著上升。在 95 种碳源中,共有 17 种碳源表现出类似的趋势。

参考文献 (References)

- [1] Cox M M, Battista J R. *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3: 882 - 892.
- [2] McGee E J, Synnott H J, Johanson K J, et al. Chernobyl fallout in a Swedish spruce forest ecosystem [J]. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2000, 48: 59 - 78.
- [3] Baeza A, Guillén J. Influence of the soil bioavailability of radionuclides on the transfer of uranium and thorium to mushrooms [J]. *Applied Radiation and Isotopes*, 2006, 64: 1020 - 1026.
- [4] Dighton J, Tugay T, Zhdanova N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides [J]. *FEMS microbiology letters*, 2008, 281: 109 - 120.
- [5] Mironenko N V, Alekhina I A, Zhdanova N N, et al. Intraspecific variation in gamma - radiation resistance and genomic structure in the filamentous fungus *Alternaria alternata*: A case study of strains inhabiting Chernobyl reactor No. 4 [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45: 177 - 187.
- [6] 王戈林, 宁华, 沈萍, 等. 酪氨酸酶基因工程菌产黑色素的发酵条件研究 [J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(4): 150 - 154.
- [7] Zalar P, Gostinčar C, de Hoog Gauth, et al. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties [J]. *Studies in Mycology*, 2008, 61(1): 21 - 38.
- [8] 张志东, 谢玉清, 王玮, 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.
- [9] 周宁一. 耐辐射的产黑色素酵母状真菌 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 722 - 723.
- [10] 王丽敏, 李军, 胡小松. 苹果原料中酵母菌的分离鉴定 [J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 14 - 17.
- [11] 李运, 盛慧, 赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用 [J]. 酿酒科技, 2005, 26(7): 84 - 85.
- [12] Buyer J S, Roberts D P, Millner P, et al. Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profiles [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, (45): 53 - 60.
- [13] 朱静, 顾美英, 王玮, 等. 一株耐辐射真菌的鉴定及黑色素分离提取 [J]. 新疆农业科学, 2013, 50(10): 1858 - 1864.
- [14] 朱静, 房世杰, 王玮, 等. 耐辐射短梗霉黑色素的发酵条件优化及稳定性研究 [J]. 新疆农业科学, 2016, 53(9): 1692 - 1699.
- [15] Gerrits van der Ende AHG, de Hoog G S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana* [J]. *Studies in Mycology*, 1999, (43): 151 - 162.
- [16] Zalar P, Gostinčar C, de Hoog G S, et al. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties [J]. *Studies in Mycology*, 2008, 61(1): 21 - 38.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor - joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, (4): 406 - 425.
- [18] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular

- evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [19] 邢华铭, 杜海涛, 张黎黎, 等. PCR – DGGE 与 Biolog 技术在土壤微生物多样性研究的比较 [J]. 农业开发与装备, 2013, (10): 48–49.
- XING Huaming, DU Haitao, ZHANG Lili, et al. Comparison of PCR – DGGE and Biolog technology research in soil microbial diversity [J]. *Agricultural Development and Equipments*, 2013, (10): 48–49.
- [20] Jiang S Y, Wang W X, Xue X X. Diversity in Microbial Carbon Metabolism of the Oil Shale at the Western Open Group in Fushun Basin [J]. *Advanced Materials Research*, 2014, 864–867: 140–144.
- [21] 杨永华, 姚健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响 [J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23–25.
- YANG Yonghua, YAO Jian, HUA Xiaomei. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil [J]. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 23–25.
- [22] Tugai T, Zhdanova N N, Zheltonozhskii V A, et al. Development of radioadaptive properties for microscopic fungi, long time located on terrains with a heightened background radiation after emergency on Chernobyl NPP [J]. *Radiats Biol Radioecol*, 2007, 47(5): 543–549.
- [23] 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 Pollut*, 2014, 225: 2133.
- [24] 张志东, 张丽娟, 朱静, 等. 核辐射污染区真菌的分布及多样性研究 [J]. 微生物学杂志, 2018, 38(1): 50–57.
- ZHANG Zhidong, ZHANG Lijuan, ZHU Jing, et al. Preliminary study on fungi distribution and diversity in nuclear radiation polluted area [J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(1): 50–57.
- [25] Taylor TN, Hass H, Kerp H, et al. Perithecial ascomycetes from the 400 million year old Rhynie chert: an example of ancestral polymorphism [J]. *Mycologia*, 2005, 97: 269–285.
- [26] Jansonius J, Kalgutkar RM. Redescription of some fossil fungal spores [J]. *Palynology*, 2000, (24): 37–47.
- [27] Robinson CH. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi [J]. *New Phytologist*, 2001, 151: 341–353.
- [28] Durrell L, Shields LM. Fungi Isolated in Culture from Soils of the Nevada Test Site [J]. *Mycologia*, 1960, 52: 636–641.
- [29] Gochenaur S, Woodwell G M. The Soil Microfungi of a Chronically Irradiated Oak – Pine Forest [J]. *Ecology*, 1974, 55: 1004–1016.
- [30] Andrea S, Luz M M, Ramón de Anda, et al. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: Use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain [J]. *Plasmid*, 2013, 69: 16–23.
- [31] Charles E T, Amy A E, Charles E M, et al. Gamma radiation interacts with melanin to alter its oxidation – reduction potential and results in electric current production [J]. *Bioelectrochemistry*, 2011, 82: 69–73.
- [32] Ravella, S R Quinones, T S. Retler, et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast – like fungus *Aureobasidium pullulans* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(3): 728–732.
- [33] Zheng Weifa, Bradley S M, Barbara M S, et al. Effects of melanin on the accumulation of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* grown on Nitrate [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(16): 7480–7486.
- [34] Zhang D P, Spadaro D V, Garibaldi S, et al. Cloning, characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153(3): 453–464.
- [35] 陈波, 蒲刚军. 出芽短梗霉的发酵性能研究 [J]. 食品科技, 2002, (11): 15–17.
- CHEN Bo, PU Gangjun. Study on Fermentation Properties of *Aureobasidium pullulans* [J]. *Food Science and Technology*, 2002, (11): 15–17.
- [36] Schu T M, Dick R. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(11): 1481–1491.
- [37] Sangyong L, Jong – Hyun J, Laurence B, et al. Conservation and diversity of radiation and oxidative stress resistance mechanisms in *Deinococcus* species [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43: 19–52.
- [38] 易星, 莫远亮, 姜冬梅, 等. 多胺的生物学功能及其调控机制 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(2): 348–352.
- YI Xing, MO Yuanliang, JIANG Dongmei, et al. Biological Functions of polyamine and its regulatory mechanisms [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(2): 348–352.
- [39] Wang H, Wang J, Li L, et al. Metabolic activities of five botryticides against *Botrytis cinerea* examined using the Biolog FF MicroPlate [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31025.

Effects of radiation on metabolic activities of *Aureobasidium melanogenum* based on biolog FF system

ZHU Jing, ZHANG Zhidong, TANG Qiyong, GU Meiyong

(Xinjiang Key Laboratory of Special Environmental Microbiology /Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: **[Objective]** In order to analyze the effects of radiation on the metabolic activity of *Aureobasidium melanogenum*, this project aims to explore the mechanism of fungal radiation tolerance. **[Methods]** The experiment used ^{60}Co γ radiation, and set four radiation doses of 0, 2,500, 5,000, and 10,000 Gy. Biolog FF technology was used to detect the use of carbon source in FF microplate by *A. melanogenum* under different radiation doses, and analyze the impact on carbon metabolic activity of *A. melanogenum* by radiation. **[Results]** There were significant differences in AWCD values under different radiation doses. With the increase of radiation dose, the metabolic activity of cells decreased significantly. The utilization of carboxylic acids and amino acids showed a downward trend, while the utilization rates of carbohydrates an upward trend. At the same time, as the radiation dose increased, the utilization of carbon source changed. Among the 95 carbon sources in the Biolog FF microplates, a total of 46 carbon sources were used, and 7 carbon sources increased in average utilization rate with the increase of radiation dose. Among them, the utilization rate of D – ribose, sucrose, D – arabinose and L – arabinose was the most obvious. **[Conclusion]** Radiation can obviously reduce the metabolic activity of *A. melanogenum*, and the utilization of carbon source will change significantly under high doses of radiation, which may be an effective mechanism for its adaptation to radiation.

Key words: biolog FF system; *Aureobasidium melanogenum*; radiation; metabolic activity

Fund projects: Basic Scientific R & D Program of Public Welfare Research Institutions of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China; (KY2022035); Special Incubation Project of Science & Technology Renovation of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (xjkpy – 2022004)

Correspondence author: ZHANG Zhidong (1977 –), male, Urumqi of Xinjiang, master degree professor, research field in special environmental microbiology, (E – mail) zhangzheedong@sohu.com