

一种短杆状耐辐射菌的分离与鉴定

吕 星¹ 邢瑞云¹ 周绪斌¹ 刘琼明¹ 郑 晖²

(¹ 军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)(² 中国科技大学研究生院 北京 100039)

摘 要: 从北京地区公园湖岸土壤中分离到一株橙红色杆状耐辐射菌,细胞壁革兰氏染色为阴性,电镜显示菌体大小为 $0.6\mu\text{m} \sim 1.6\mu\text{m}$,略大于日本学者报道的 *Deinobacter grandis* 菌,过氧化氢酶的含量和分子量不同于 *D. radiodurans* R1 菌,分离菌的(G+C)mol%含量为 70.7%,16S rDNA 序列分析表明,分离到的杆状耐辐射菌(RR533.2)16S rRNA 基因序列与 *Deinobacter grandis* 菌高度同源,提示 RR533.2 归于 *Deinobacter* 菌属,并可能是该菌属中的一个新种。

关键词: 细菌分离 耐辐射菌 辐射

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0301-07

1956 年,英国细菌学家 Anderson 从经辐射灭菌处理后仍有腐烂的罐装食品中发现了一种橙红色、可耐受 $2 \times 10^6 \text{ rad}$ (20 000Gy)剂量 γ 射线照射的微小球菌^[1]。其后,加拿大、印度、法国、日本、美国和葡萄牙等国学者相继从医院实验室器械、木屑、动物粪便、干鱼等辐照处理物以及河流、土壤、温泉等自然环境中分离出类似的种^[2~4]。

发现之初,主要依据形态,将其归于微球菌属(*Micrococcus*)。以后经 16S RNA 序列分析证实,该菌与微球菌属亲缘关系较远。1981 年,Brooks 总结了陆续发现的 4 种耐辐射小球菌的遗传学特征,建议取拉丁文“deino—陌生、奇异、不寻常”之意,将其确立为一个新的科(The family *Deinococcaceae*)和属(The genus *Deinococcus*)^[5]。

耐辐射菌的辐射耐受力极强,在经受 5 000 ~ 30 000Gy 剂量的电离辐射或 500 ~ 1 000 J/m² 强度的紫外线照射后仍可存活^[2]。以平均致死剂量(D_0 值)比较,*Deinococcus* sp. ($D_0 = 17500 \text{ Gy}$ ^[2])的辐射耐受力较大肠杆菌($D_0 = 250 \text{ Gy}$ ^[6])高约 70 倍。

目前,奇球菌(*Deinococcus*)属中共有 *D. radiodurans*(又分为 *D. radiodurans* R1 和 *D. radiodurans* Sark 2 个亚型)、*D. radiophilus*、*D. radiopugnans*、*D. proteolyticus*、*D. geothermalis*、*D. murrayi* 等 7 个种。1987 年,日本学者从干鱼中分离到一种形态为杆状的耐辐射菌,尽管理化性质与 *Deinococcus* 属极为相似,但形态为杆状,故另立为奇杆菌(*Deinobacter*)属,种名为 *D. grandis*^[3]。

我国尚未有耐辐射菌种分离与鉴定的报道。中国科学院微生物资源中心仅存的一种 *D. radiodurans* R1 是 1982 年由英国引进的^[7]。本项研究中,从北京地区公园湖岸土壤中分离到一株橙红色杆状耐辐射菌,在探明形态特点、生化特性以及紫外线辐射抗性的基础上,通过细菌基因组 DNA G+C mol% 含量测定以及 16S rDNA 序列的比较,对其归属进行了甄别。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070201)

作者简介:吕 星(1957—),男,副研究员,主要从事 *D. radiodurans* 辐射抗性分子机理研究。Tel:86-10-66932210; Fax:86-10-68214653; E-mail:lx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期:2002-07-22,修回日期:2003-01-06

1 材料和方法

1.1 菌株和培养

D. radiodurans R1(中国科学院中国微生物资源中心, AS1.633), 用 TGY 培养基(0.5% tryptone 0.3% yeast extract 0.1% glucose pH 7.0)培养, 温度 30℃; *E. coli* 4468(美国 *E. coli* Genetic Stock Center), 用 LB 培养基(1% tryptone 0.5% yeast extract 1% NaCl pH 7.0)培养, 温度 37℃。

分离的耐辐射菌用与 *D. radiodurans* R1 相同的培养基和温度培养。分离菌的土样采集于北京玉渊潭公园湖岸, 选择较为潮湿的地带, 间隔 3m ~ 5m 选点随机采集地表下约 5cm 土壤样品(约 1g), 置于 50mL 塑料离心管。取回实验室后, 向离心管中加入 10 mL TGY 液体培养基, 与土壤充分混匀, 用 10 000Gy 剂量的⁶⁰Co γ -射线进行照射。照后样品再次混匀, 待泥沙沉降后, 取少量悬浮液涂于 TGY 琼脂培养板, 置 30℃ 温箱。隔天观察, 3 ~ 5d 后, 可见少量橙红色菌落。挑取橙红色单一菌落, 置 2 mL TGY 液体培养基, 扩大培养, 以备进一步鉴定。

1.2 生化试验

甲基红试验、淀粉水解试验、明胶液化试验、DNA 酶试验、Tween-80 水解试验及过氧化物酶试验参照文献 [8]。

1.3 光镜和电镜观察

取指数生长期新鲜菌液, 按文献方法作革兰氏染色^[9], 高倍光镜观察细菌形态。

取指数生长期新鲜菌液, 1 500r/min 离心收集细菌, 固定方法参照文献 [10], 细菌用乙醇脱水后制备超薄切片, 电镜观察细菌形态、大小与菌壁厚度。

1.4 紫外线抗性实验

取指数生长期新鲜菌液, 1 500r/min 离心收集细菌, 用 0.067 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.2)悬浮细菌并调整浓度(以每 μ L 菌液可在培养板长出大致 1×10^4 个菌落为适宜浓度)。对菌液进行不同剂量(J/m^2)的 256nm 紫外线照射。取 20 μ L 照后菌液涂于 TGY 琼脂培养板, 置 30℃ 温箱, 观察并记数菌落至 15d。与未照射菌液比较, 计算存活率。同时作 *D. radiodurans* R1 和 *E. coli* 4468 菌的对照实验。

1.5 过氧化氢酶活性测定

取指数生长期新鲜菌液, 离心收集细菌, 超声破碎菌体, 10 000r/min 离心除去沉淀物, 取上清液测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白量的细菌进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并按文献 [11] 方法作过氧化氢酶活性染色。染色后凝胶进行密度扫描, 估算过氧化氢酶含量。同时作 *D. radiodurans* R1 和 *E. coli* 4468 菌的对照实验。

1.6 基因组 DNA(G + C)mol% 含量测定^[12]

采用酚氯仿法提取细菌基因组 DNA, 测定 A260:A230:A280 比值以保证 DNA 纯度符合要求, DNA(G + C)mol% 含量采用 T_m 值测定法, 以大肠杆菌 K12 菌株作为参照。测定实验在中国科学院微生物研究所完成。

1.7 16S rDNA 序列分析

取指数生长期新鲜菌液, 离心收集细菌, 按文献方法提取基因组 DNA^[12]。依据细菌

16S rDNA 中最保守的序列设计并合成引物^[3] ,正向引物 5'-GAGTTTGGTCCTGGCTCAG-3' ;反向引物 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGC C-3'。PCR 反应条件 :50μL 体系中含基因组 DNA 1μg、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、200μmol/L dNTP、正反向引物各 500 pmol/L、2.5 u Taq 酶 ,97℃ 变性 2min 后进入循环 ,94℃ 1min → 55℃ 1min → 72℃ 1.5min ,共 35 个循环 ,最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体(Promega 公司产品) ,送上海基康公司测定 DNA 序列。将测定的 DNA 序列用 Clustal W program 与 GenBank 中 *D. radiodurans*(Y11332)、*D. radiophilus* (Y11333)、*D. radiopugnans*(Y11334)、*D. proteolyticus*(Y11331)、*D. geothermalis* (Y15444)、*D. murrayi*(Y13034)、*Deinobacter grandis* (Y11329)等菌 16S rDNA 序列进行比对 ,并用 DNAsar 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 革兰氏染色、形态及生化试验

从 11 份土壤样品中经 10 000Gy 剂量 γ-射线电离辐射筛选到一株橙红色菌(记为 RR533.2)。RR533.2 菌的革兰氏染色为阴性 ,与日本学者报道的 *Deinobacter grandis* 菌一致^[3] ,而与 *Deinococcus* 属的 *D. radiodurans*、*D. radiophilus*、*D. radiopugnans*、*D. proteolyticus*、*D. geothermalis* 及 *D. murrayi* 等各种球菌革兰氏染色普遍为阳性不同^[2]。光镜下 RR533.2 菌的形态呈短杆状(见图 1) ,电镜观察显示该菌大小为 0.6μm ~ 1.6μm(见图 2A) ,菌壁厚度为 30nm ~ 40nm(见图 2B) ,略大于和厚于 *Deinobacter grandis* 菌(菌体 0.6μm ~ 1.2μm ,菌壁 :10nm ~ 20nm)^[3]。R533.2 菌生化试验结果 :甲基红试验为阴性 ,可以产淀粉酶 ,胶原酶阳性 ,过氧化氢酶阳性 ,DNA 酶和脂酶为阴性。

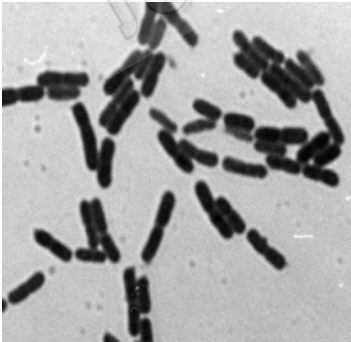


图 1 RR533.2 菌光镜图(×100)

Fig.1 Pattern of strain RR533.2 under the microscopy(×100)

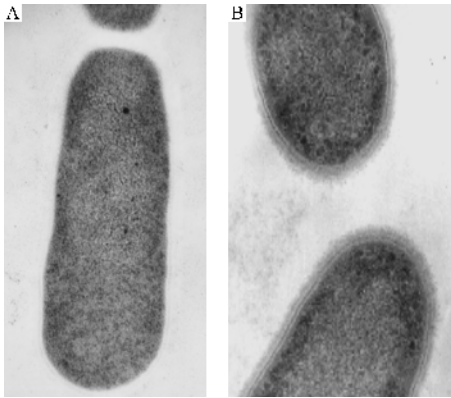


图 2 RR533.2 菌电镜图(×144 000)

Fig.2 Electron microscopy images of strain RR533.2(×144 000)

- A. showing the cell volume ;
- B. showing the thickness of cell wall.

2.2 紫外辐射抗性

图 3 显示了 533.2 菌、*D. radiodurans* R1 和 *E. coli* 4468 紫外照射后的存活曲线。如图所示 ,分离菌具有与 *D. radiodurans* R1 相似的紫外辐射抗性 ,两者的存活曲线均呈 S 型 ,

在小于 400J/m² 剂量范围均有一平台 ,存活数明显下降开始于 600J/m² 剂量之后 ,在 1 000 J/m² 剂量强度紫外照射后仍有少量存活。

2.3 氧化氢酶活性与含量

图 4 为 RR533.2、*D. radiodurans* R1 和 *E. coli* 4468 的过氧化氢酶活性染色图。图中可见 ,分离菌过氧化氢酶分子量明显小于 *D. radiodurans* R1 ,但含量较高。密度扫描显示 ,分离菌过氧化氢酶含量较 *D. radiodurans* R1 约高 16%。

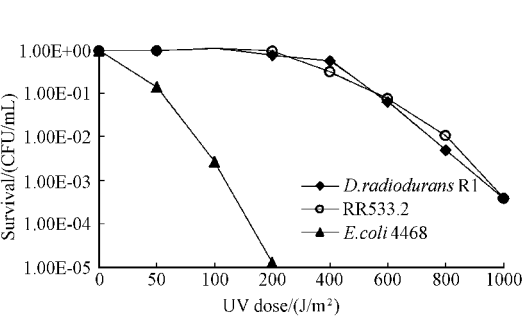


图 3 分离的耐辐射菌 UV 照射后的存活曲线

Fig.3 Ultraviolet radiation survival curves of strain RR533.2 , *D. radiodurans* R1 and *E. coli* 4468

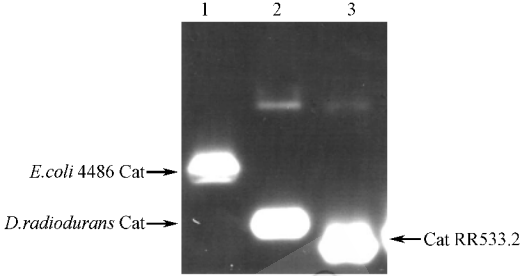


图 4 细菌裂解液上清 PAGE 过氧化氢酶活性染色图

Fig.4 Catalase in crude extracts detected by PAEG and catalase activity staining

1. *E. coli* 4468 2. *D. radiodurans* R1 3. Strain RR533.2.

2.4 基因组 DNA G + C mol% 含量

根据 *T_m* 值法 ,测得分离菌 R533.2 基因组 DNA 的 G + C mol% 含量为 70.7%。

2.5 16S rDNA 序列分析

533.2 菌的 16S rDNA PCR 扩增片段长 1 479bp。与 GenBank 中 *Deinobacter grandis* 菌及 *Deinococcus* 属的 *D. radiodurans*、*D. radiophilus*、*D. radiopugnans*、*D. proteolyticus*、*D. geothermalis*、*D. murrayi* 等菌比较表明 ,RR533.2 菌的 16S rDNA 序列与以上各菌具有高度同源性 ,其中与 *Deinobacter grandis* 菌的同源性最高 ,达到 96.9%(见表 1)。依据革兰氏染色和杆状形态的相似性 ,以及 16S rDNA 序列的高度同源性 ,可以判定该实验中分离到的耐辐射菌应归于 *Deinobacter* 菌属。但从菌体大小和菌壁厚度的差异上看 ,该菌并不就是 *grandis* ,而可能是 *Deinobacter* 菌属中一个新成员。系统发育分析也证实这一结果(见图 5)。

3 讨论

本研究首次报道在我国分离到一株耐辐射菌-RR533.2。γ 射线及紫外线辐射抗性试验表明分离菌 RR533.2 具有与耐辐射菌 *D. radiodurans* 类似的抗射线及紫外线辐射的能力。过氧化氢酶活性染色测定显示该菌与 *D. radiodurans* 类似 ,提示该菌具有极强的抗氧化能力^[11]。革兰氏染色、细菌形态学观察以及生化试验结果都与 *Deinobacter grandis* 极为类似。所分离菌的基因组 DNA G + C mol% 含量为 70.7% ,同样与 *Deinobacter grandis* (69%)和 *Deinococcus* 属的其它细菌极为接近 ,结合 16S rDNA 序列同源性的鉴定结果 ,可以确定该菌归 *Deinobacter* 菌属 ,而且可能是一个新种 ,但对该菌的命名还有待进一步商

權。

表 1 RR533. 2 与 *Deinobacter grandis* 及 *Deinococcus* spp. 16S rDNA 序列同源性

Species	Sequence similarity/%						
	RR533.2	<i>D. grandis</i>	<i>D. radiodurans</i>	<i>D. radiopugnans</i>	<i>D. murrayi</i>	<i>D. radiophilus</i>	<i>D. geothermalis</i>
		DSM3963	DSM 20539	ATCC19172	DSM11303	DSM20551	DSM11300
<i>D. grandis</i> DSM3963	96.9						
<i>D. radiodurans</i> DSM 20539	94.1	93.7					
<i>D. radiopugnans</i> ATCC19172	93.2	93.2	90.9				
<i>D. murrayi</i> DSM11303	93.1	94.4	93.2	93.5			
<i>D. radiophilus</i> DSM20551	92.8	90.8	90.9	89.7	92.3		
<i>D. geothermalis</i> DSM11300	91.8	92.0	90.7	91.7	90.2	92.4	
<i>D. proteolyticus</i> DSM20540	91.3	91.5	90.1	90.1	92.5	94.9	89.7

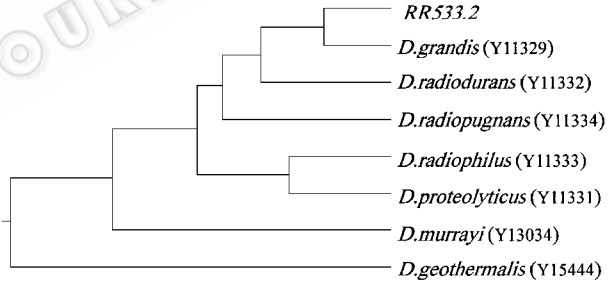


图 5 RR533.2 和其它耐辐射菌的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain RR533.2 and sequences of other radiation-resistant bacteria

迄今为止 ,*Deinobacter* 菌属中只发现了一个种 ,即 *D. grandis*。有关是否依据杆状形态就一定要另立 *Deinobacter* 菌属 ,一直存在争议。*D. grandis* 分离鉴定之初将之另归于 *Deinobacter* 属的唯一理由就是因为其与 *Deinococcus* 属其它菌形态不同。从 16S rDNA 序列同源性分析的资料看 ,*Deinobacter grandis* 菌与有些 *Deinococcus* 属菌的同源性要明显高于 *Deinococcus* 属内部分菌间的同源性 ,这提示 *D. grandis* 与 *Deinococcus* 属内某些菌种存在更为接近的亲缘关系 ,因此认为另立 *Deinobacter* 菌属不尽合理 ,可以根据 16S rDNA 序列同源性将 *D. grandis* 归于 *Deinococcus* 属。如果根据细菌形态将 *D. grandis* 另列为一个属 ,则 *Deinococcus* 属其它菌的分类地位也有必要重新考虑^[14]。但形态差异在细菌分类中仍是不

可忽略和逾越的,事实上,在 RR533.2 16S rDNA 序列同源性分析中也发现类似现象(见表 1),16S rDNA 进化树分析也证实本实验中分离到的杆状耐辐射菌 RR533.2 与 *D. grandis* 在进化中的关系极为密切,因此,RR533.2 菌的分离与鉴定提供了 *Deinobacter* 属分类地位的另一个证据。

耐辐射菌是国际上极受重视的具有开发与利用前景的微生物资源,如美国能源部已着手进行将耐辐射菌用于核废料污染物处理的研究^[15]。另一方面,具有超强辐射抗性的细菌,对食品、药材等的消毒与贮存可能产生的危害,以及与环境、生态、人体的关系等,也是值得探讨和引起充分警觉的问题。在我国分离到耐辐射菌的新种,无疑对以上问题的研究具有重要意义和价值。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所东秀珠研究员和黄英博士在实验中给予的指导与帮助。

参 考 文 献

- [1] Anderson A W, Nordan H C, Cain R F, *et al.* Studies on a radio-resistant *micrococcus*. I. Isolation, morphology, culture characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol*, 1956, **10**: 575 ~ 578.
- [2] Moseley B E B. Photobiology and radiobiology of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans*. *Photochem Photobiol Rev*, 1983, **7**: 223 ~ 274.
- [3] Oyaizu H, Stackebrandt E, Schleifer H, *et al.* A radiation-resistant rod-shaped bacterium, *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, **37**: 62 ~ 67.
- [4] Ferreira A C, Nobre M F, Rainey F A, *et al.* *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 939 ~ 947.
- [5] Brooks B W, Murray R G E. Nomenclature for "*Micrococcus radiodurans*" and other radiation-resistant coccus; *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int J Syst Bacteriol*, 1981, **31**: 353 ~ 360.
- [6] 夏寿萱. 分子放射生物学. 北京: 原子能出版社. 1992: 66 ~ 77.
- [7] 中国微生物菌种保藏管理委员会, 中国科学院典型培养物保藏委员会, 中国科学院微生物研究所, 中国普通微生物菌种保藏管理中心. 菌种目录. 第三版. 北京: 中国农业科技出版社. 1997: 23.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001.
- [9] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌, 等. 病原细菌检验技术. 长春: 吉林科学技术出版社. 1992: 28 ~ 29.
- [10] Silva M T, Sousa J C F. Ultrastructure of the cell wall and cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria with different fixation techniques. *J Bacteriol*, 1973, **113**: 953 ~ 962.
- [11] 吕星, 邢瑞云, 郑晖. PAGE 活性染色法分析 *D. radiodurans* 过氧化氢酶和超氧化物歧化酶. 微生物学杂志, 1999, **19**: 1 ~ 3.
- [12] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社. 1990: 84 ~ 92.
- [13] Rainey F A, Ward-Rainey N, Kropenstedt R M, *et al.* The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 1088 ~ 1092.
- [14] Rainey F A, Nobre M A, Schumann P, *et al.* Phylogenetic diversity of the *Deinococci* as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 510 ~ 514.
- [15] Lange C C, Wackett L P, Minton K W, *et al.* Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 979 ~ 936.

Isolation and Characterization of a Novel Radiation-Resistant Rod-shaped Bacterium

Li Xing^{1*} Xing Ruiyun¹ Zhou Xubin¹ Liu Qiongmeng¹ Zheng Hui²

(¹ Academy of Military Medical Sciences, Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

(² Postgraduate School, Chinese University of Science and Technology, Beijing 100039, China)

Abstract : A novel radiation-resistant bacterium was isolated from soil of lake bank in Beijing. The bacterium produced orange-pigmented colonies and formed rod-shaped cells that stained gram negative alike the *Deinobacter grandis* previously described by Japan's scientist. It was found with electron microscopy that the isolate is of $0.6\mu\text{m} \sim 1.6\mu\text{m}$ size and has a $30 \sim 40\text{nm}$ thickness of cell wall, being slightly larger and thicker than the *Deinobacter grandis*. There was a difference in the concentration and molecule weight of catalase between the isolate and the *Deinococcus radiodurans* R1. The deoxyribonucleic acid guanine plus cytosine (G + C) base ratio was 70.7mol%. 16S RNA gene sequencing also showed that this rod-shaped bacterium possessed a high homology with the *Deinobacter grandis*, suggesting that it might be classified into the genus *Deinobacter* and constitute a new species in this genus.

Key words Isolation of bacterium, Radiation-resistant bacterium, Radiation

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund (30070201)

* Corresponding author. Tel 86-10-66932210 Fax 86-10-68214653 E-mail lxx@nic.bmi.ac.cn

Received date : 07-22-2002

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

Li Jilun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

Tan Huarong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Lu Deru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Wao Aoquan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Qu Yinbo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Xu Jianguo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

MEMBERS OF THE BOARD

Fan Yunliu

Tien Po

Zhai Zhonghe

Qian Shijun

Huang Li

Tang Hong

Lu Chengping

Cai Yongfeng

Zheng Tianling

Guo Jun

Chen Yongqing

Zhu Baoquan

Hu Fuquan

Zhuge Jian

Yang Susheng

Cheng Chi

Shao Yiming

Xie Hong

Min Hang

Hu Yuanyang

Dong Xiuzhu

Wang Ping

Sheng Jun

MANAGING EDITORS

Wang Jinfang

Wang Min