

异常球菌 007^T 形态和辐射抗性的研究

周建琴¹ 栾迎春^{2*} 张玉琴¹ 高凌玉¹ 沈继红³ 孙承航^{1**}

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

(青海大学医学院 西宁 810000) (桂林医学院 桂林 541004)

摘要 观察耐辐射异常球菌 *Deinococcus* 属的模式菌株 *Deinococcus radiodurans* R1(AS1.633)和野生型异常球菌 007^T 的生长特性和形态特征;与耐辐射模式菌株 AS1.633 和辐射敏感菌株 *Escherichia coli* DH5 α 的进行平行辐射试验,分析 007^T对紫外线和 γ 射线辐射的抗性。结果表明,AS1.633 和 007^T 的生长特性和形态特征有所不同,AS1.633 为橙红色光滑、边缘整齐的菌落,而 007^T 为鲜红色菌落,边缘不整齐,菌落表面干燥、呈褶皱。耐辐射试验表明 007^T对紫外线辐射存活最高剂量是 624Jm⁻²,存活率为 4%; γ 射线 16kGy 照射后,007^T 存活率为 6%,说明 007^T 具有的极强的辐射抗性。

关键词 异常球菌 形态特征 辐射抗性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0682-04

Study on Morphology and Radiation Resistance of *Deinococcus* 007^T

ZHOU Jian-Qin¹ LUAN Yin-Chun^{2*} ZHANG Yu-Qin¹ GAO Ling-Yu¹ SHEN Ji-Hong³ SUN Cheng-Hang^{1**}

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

(Qinghai University, Medical College, Xining 810000) (Guilin Medical College, Guilin 541004)

Abstract Studies were carried out to characterize and compare the morphology, cultivation and radiation resistance of 007^T to type strain AS1.633 as well as the known radiation resistant organism *Deinococcus radiodurans* R1. To determine the levels of radio resistance, culture of bacteria 007^T by comparing with cultures of bacteria AS1.633 and *E. coli* DH5 α as well as the known radiation resistant and radiation sensitive organisms *Deinococcus radiodurans* R1 and *Escherichia coli*, respectively, were irradiated at the desired doses of UV and ⁶⁰Co gamma radiation. Results showed some difference of the morphology and cultivation characteristics of AS1.633 and 007^T. The colonies of AS1.633 were orange-red and smooth, whereas the colonies of 007^T were bright red and usually dry with pleats. Strain 007^T showed strongly resistant to UV and ⁶⁰Co gamma radiation compared to the radiation resistant organism *D. radiodurans* R1 and the radiation sensitive organism *E. coli* DH5 α , 4% survival after exposition to UV-doses as high as 624Jm⁻² and 6% survival after radiated by 16kGy respectively.

Key words *Deinococcus*, Morphology characteristics, Radiation resistance

异常球菌 *Deinococcus radiodurans* (简称 *D. radiodurans*) 是迄今为止所发现的细菌中辐射耐受性最强的一种细菌。*D. radiodurans* R1 是 *Deinococcus* 属的模式菌株,1956年由美国科学家 Anderson 等^[1]首先从经 X 光照射后仍然腐烂的罐头中分离出来。分离菌在培养基上形成红色菌落、不形成芽胞、革兰氏染色阳性、严格好氧、菌体形态较大、形成四聚体,其家族成员都具有对抗由电离辐射、紫外线等因素引起的致死和致突变效应。指数

生长期的耐辐射球菌耐受电离辐射和紫外线的能力分别是大肠杆菌的 200 倍和 20 倍^[2],这使得该菌成为研究耐辐射机理的一个极佳选择对象。

云南大学筛选到一株编号为 007^T 的细菌,经 16S rRNA 基因序列分析确定属于 *Deinococcus* 家族,是异常球菌属的一个新种 *Deinococcus yunnanensis* sp. nov.^[3]。本文报道利用耐辐射的模式菌株 *D. radiodurans* R1 (AS1.633) 和辐射敏感菌株 *Escherichia coli* DH5 α 与 007^T 的平行试验,对 007^T 的

* 并列为第一作者

** 通讯作者 Tel: 010-63165278, E-mail: chenghangsun@hotmail.com

收稿日期:2006-11-06,修回日期:2007-01-30

生长特征和辐射抗性研究的结果。

1 材料与方法

1.1 菌株

野生型耐辐射异常球菌(DRR1)以及大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 来自中国科学院微生物研究所微生物资源中心。异常球菌 007^T 由云南大学筛选分离。

1.2 半固体培养

AS1.633 和 007^T 菌株的斜面和平板培养是在 ISP2 培养基(中国生物制品检定研究所)上, 28℃, 培养 48h。

E. coli DH5 α 的斜面和平板培养是在 LB 培养基(胰蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 氯化钠 10g, 琼脂 20g, 无菌水 1000mL)上, 消毒前 pH7.0, 37℃ 培养 24h。

1.3 液体培养

AS1.633 的液体培养在添加复合维生素和微量盐的 LB 培养基中, 28℃, 220r/min 的旋转摇床培养 72h 收菌。

E. coli DH5 α 液体培养是在 LB 培养基中, 37℃, 220r/min 的旋转摇床, 培养 24h 收菌, 菌浓度为 10⁸。

007^T 的液体培养是在添加复合维生素和微量盐 LB 培养基中, 28℃, 220r/min 的旋转摇床培养 68h, 加入灭菌的玻璃球继续培养 24h 后收菌。

1.4 照射条件

1.4.1 紫外线照射: 将培养到指数生长期细菌的 *E. coli* DH5 α , AS1.633 和 007^T, 用灭菌玻璃珠将菌体打散, 再用 0.9% 的生理盐水稀释后, 每份取 5mL 转至灭菌的直径 90 毫米平板, 室温条件下 254nm, 距离 30cm, 照射强度为 130 μ JM⁻²/s (美国 Spectronics 公司的数字式紫外强度计测定)。

1.4.2 ⁶⁰Co γ 射线照射: 收集处于对数生长期的 *E. coli* DH5 α , AS1.633 和 007^T, 用灭菌玻璃珠将菌体打散, 用 0.9% 的生理盐水稀释后, 取 1mL 转至灭菌的 1.5mL 的离心管中。分别进行慢辐射和急性辐射。慢辐射剂量率为 1kGy, 照射剂量为 0.1kGy ~ 16kGy。急性辐射剂量率为 8kGy, 照射剂量为 3kGy ~ 9kGy。

1.5 细菌计数

将菌液用 0.9% 的生理盐水 10 倍等比稀释, 定量均匀地涂布在铺有半固体培养、直径 6cm 的培养皿上, 28℃ 培养, 通过计数形成的集落数来推算单位

体积的细菌数量。每个剂量点做 3 个平行样品, 取平均数。细菌存活率 = 照射组集落形成数/对照组集落形成数。

2 结果

2.1 细菌 AS1.633 和 007^T 的生长特征和形态的比较

2.1.1 细菌 AS1.633 和 007^T 在半固体培养基上的生长: 分别取液体培养 72h 的 AS1.633 和 007^T 菌液 1mL, 10 倍等比稀释至 10⁻⁵, 取 100 μ L 均匀地涂布在 9cm 铺有半固体培养基的培养皿上, 置于 28℃ 培养箱中培养。72h 的菌落大小适合观察菌落形态, AS1.633 为橙红色, 而 007^T 的红色变深。96h 菌落很大(见图 1), AS1.633 仍为橙红色, 而 007^T 的菌落变成鲜红色, AS1.633 的菌落表面光滑, 边缘整齐, 紧紧贴在培养基上; 而 007^T 菌落表面干燥, 呈褶皱, 菌落边缘不整齐。

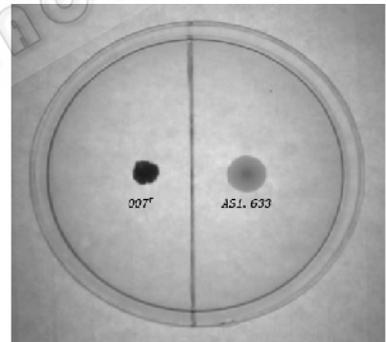


图 1 7d 时 AS1.633 和 007^T 的菌落

2.1.2 AS1.633 和 007^T 在液体培养基中的生长: 液体培养 AS1.633 和 007^T 24h 时 AS1.633 的培养物为均匀的菌悬液, 并由黄色变成淡粉色, 表明该菌已经生长, 而 007^T 的培养物仍为黄色, 固液分明。48h 时 AS1.633 的培养物为均匀的菌悬液, 呈粉色, 表明该菌生长良好, 菌量增加, 而 007^T 的培养物仍为黄色, 而菌体量增大。72h 和 96h 时 AS1.633 菌的菌浓度都约为 10⁵, 可见在 72h 内该菌呈指数生长; 96h 时 007^T 的菌量明显增加, 培养物仍为固液分明, 液体更透亮, 菌体呈鲜红色、为很多大大小小的片状, 表明 007^T 成团生长。经打散涂板, 计数表明 007^T 在 96h 内呈指数生长。

2.2 007^T 对紫外线辐射的抗性

将培养到指数生长期的 *E. coli* DH5 α 经 0s、15s、30s、45s、60s、120s, AS1.633 和 007^T 经 0s、15s、

30s、45s、60s、120s、180s、240s、300s、360s、420s、480s、540s 照射后,分别进行细菌计数,结果如图 2。*E. coli* DH5 α 是紫外线敏感菌,它的存活与照射剂量呈相关性,*E. coli* DH5 α 最高存活剂量是 60Jm $^{-2}$ 只有 3% 的存活,AS1.633 和 007 T 组的存活最高剂量都是 624Jm $^{-2}$ AS1.633 存活率为 4%,007 T 的存活率为 9%,显著高于辐射敏感菌 *E. coli* DH5 α 组 ($P < 0.05$)。AS1.633 和 007 T 对紫外线辐射处理比较,差异有统计学意义,两者存在一致性变化,0s ~ 45s 的照射无死亡,60s ~ 540s 的照射,存活率随着照射剂量的增加呈下降趋势,说明 007 T 具有耐辐射模式菌 AS1.633 同样的紫外线辐射抗性。

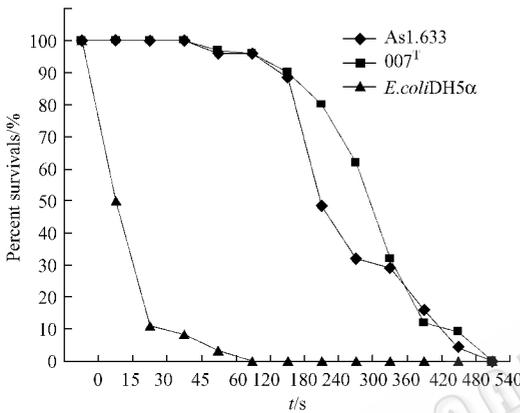


图 2 *E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T 受不同剂量紫外线照射后集落形成的相对数

2.3 007 T 对 γ 射线慢辐射的抗性

收集处于对数生长期的 *E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T ,以剂量率为 1kGy 的慢辐射进行 γ 射线分别照射,*E. coli* DH5 α 经 0kGy、0.1kGy、0.15kGy、0.5kGy、1kGy、3kGy、5kGy、7kGy,AS1.633 和 007 T 经 0kGy、0.1kGy、0.15kGy、0.5kGy、1kGy、3kGy、5kGy、7kGy、9kGy、11kGy、13kGy、14kGy、15kGy、16kGy 照射后,分别进行细菌计数,结果如图 3。*E. coli* DH5 α 经 3kGy 照射后,只有 30% 的存活,5kGy 照射后 100% 死亡。007 T 与 AS1.633 的存活率相当,AS1.633 和 007 T 对 γ 射线慢辐射辐射处理比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),两者存在一致性变化,0kGy ~ 0.5kGy 的照射无死亡;1kGy ~ 9kGy 的照射,存活率恒定;9.0kGy ~ 16kGy 的照射,存活率随着照射剂量的增加呈下降趋势,说明 007 T 与耐辐射模式菌 AS1.633 同样对 γ 射线慢辐射具有抗性。

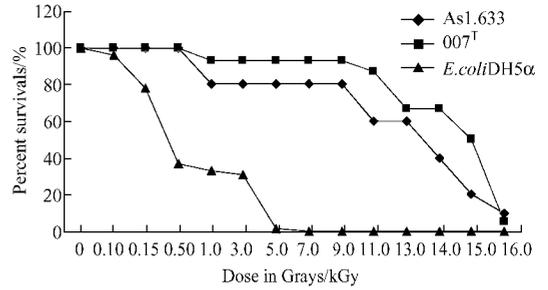


图 3 *E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T 受不同剂量 γ 射线慢辐射后集落形成的相对数

2.4 007 T 对 γ 射线急性辐射的抗性

收集处于对数生长期的 *E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T ,以剂量率为 8kGy 的 γ 射线进行急性辐射,*E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T 经 0kGy、3kGy、5kGy、9kGy 分别照射后,分别进行细菌计数,结果如图 4。经 3kGy 照射,*E. coli* DH5 α 就 100% 死亡,而 AS1.633 和 007 T 100% 存活,显著高于辐射敏感菌 *E. coli* DH5 α 组 ($P < 0.05$)。3kGy ~ 9kGy 照射,AS1.633 和 007 T 对紫外线辐射处理比较,差异有统计学意义,两者存在一致性变化 ($P < 0.05$)。9kGy 照射后,AS1.633 存活率为 63%,007 T 存活率为 38%,说明 007 T 和 AS1.633 同样对强烈的 γ 射线急性辐射也具有耐受性。

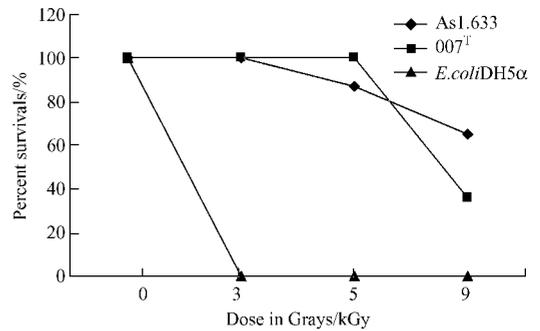


图 4 *E. coli* DH5 α 、AS1.633 和 007 T 受不同剂量 γ 射线急性辐射后集落形成的相对数

3 讨论

异常球菌是迄今为止所发现细菌中辐射耐受性最强的一类细菌。耐辐射异常球菌拥有多种“家族成员”,耐辐射异常球菌 R1 (*Deinococcus radiodurans* R1) 是异常球菌属 (*Deinococcus*) 的第一个鉴定种。目前,异常球菌属 (*Deinococcus*) 20 个有效发表种^[4-7],以及云南大学微生物研究所实验室发现的异常球菌属的另一个新种,细胞形态不仅有

球形,还有短杆状。AS1.633的细胞呈球形,菌落颜色呈粉红色,菌落表面光滑,007^T是一个和AS1.633不同的新种,所以生长特性有一定的差异,细胞呈杆状,菌落颜色呈鲜红色,菌落表面干燥、稍呈褶皱。

耐辐射异常球菌的“家族成员”,都具有对抗由辐射等因素引起的致死或致突变效应,5kGy~15kGy的 γ 射线或500J~1000J的紫外线照射后,仍不失其存活能力^[8]。用集落形成法绘制剂量-效应曲线,紫外线照射指数生长期细菌,*E. coli* DH5 α 的D₃₇仅为30Jm⁻²,而AS1.633和007^T的D₃₇为468Jm⁻²是*E. coli* DH5 α 的15倍,⁶⁰Co γ 射线,D=1kGy/h的慢辐射照射指数生长期细菌,AS1.633和007^T的D₃₇为7kGy,而*E. coli* DH5 α 的D₃₇仅为0.15kGy,研究表明抗辐射异常球菌受DNA破坏因子影响后的生存曲线均为肩形存活曲线^[9]。经紫外线和 γ 射线照射指数生长期细菌,所测得的AS1.633和007^T的剂量-效应曲线均为相似的肩形存活曲线,并且具有同样的肩宽,充分说明007^T与耐辐射球菌*Deinococcus*属的模式菌株*Deinococcus radiodurans* R1(AS1.633)的一样,具有极强的辐射抗性。

异常球菌是迄今为止地球上发现的抗辐射能力最强的生物之一,一直倍受生物界、医学界和环

境工程界的关注和重视。研究和利用异常球菌抗辐射特征,对异常球菌的应用具有重要意义。

致谢 北京博朗特科技有限公司的李民先生提供美国 Spectronics 公司的数字式紫外强度计测定紫外线的照射强度。

参考文献

- [1] Anderson A W, Nordan H C, Cain R F, *et al.* Food Technol, 1956, **10** :575 ~ 5771.
- [2] White O, Jonathan A, John F, *et al.* Science, 1999, **286**(19):1571 ~ 1577.
- [3] Zhang Y Q, Sun C H, Li W J, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2007, (in press).
- [4] Brooks B W, Murray R G E. Int J Syst Bacteriol, 1981, **31** :353 ~ 360.
- [5] Groot A de, Chapon V, Servant P, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2005, **55** :2441 ~ 2446.
- [6] Lai W A, Kämpfer P, Arun A B, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2006, **56** :787 ~ 791.
- [7] Rainey F A, Ray K, Ferreira, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2005, **71** :5225 ~ 5235.
- [8] Kenneth W M. Mutayion Res, 1996, **363**(1):1 ~ 7.
- [9] 孙翠凤,刘芬菊,汪涛. 辐射研究与辐射工艺学报, 2002, **20** (3):161 ~ 165.