

# 一株新的耐辐射菌 WGR702 的分离鉴定 及耐辐射特性

孙继华 申佩弘 武 波\*

(广西大学生命科学与技术学院 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室  
广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 南宁 530005)

**摘 要:** 从辐射污染的土壤中分离到一株新的耐辐射菌 WGR702。该菌为革兰氏阳性球菌, 直径 1.5  $\mu\text{m}$ ~2.5  $\mu\text{m}$ 。菌体呈粉红色、能运动、兼性厌氧及不产孢子。其生长温度和 pH 范围分别为 10 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$  和 pH 5.0~10.0。(G+C) mol% 含量为 60.5%。UV 和  $\gamma$  射线辐射检测表明 WGR702 具有很强的耐辐射性。16S rDNA 序列(EU315117)分析表明, 菌株 WGR702 与沙雷氏菌属(*Serratia*)菌株 16S rDNA 序列有很高相似性(94.79%~98.53%), 但与沙雷氏菌属已报道菌株最大不同点是菌株 WGR702 细胞为球状, 且革兰氏阳性。结合形态、生理生化特征分析表明菌株 WGR702 可能是沙雷氏菌属(*Serratia*)的一个新种。

**关键词:** 耐辐射, WGR702, 沙雷氏菌属, 分离鉴定

## A New Ionizing-radiation Resistant Strain WGR702 Isolated, Identified, and Radioresistant Character

SUN Ji-Hua SHEN Pei-Hong WU Bo\*

(College of Life Science and Technology of Guangxi University, Key Laboratory of Education Ministry for Microbial and Plant Genetic Engineering, Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, Nanning 530005)

**Abstract:** A new ionizing-radiation resistant strain WGR702 was isolated from arid soils which had been radiated. The strain WGR702 was Gram-positive and coccus, the diameter of the cell was 1.5  $\mu\text{m}$ ~2.5 $\mu\text{m}$ . The strain WGR702 was pink-pigmented, motile, facultative anaerobe and non-spore forming. The range temperature and pH for strain WGR702 growth were 10 ~35 and pH 5.0~10.0 respectively. The strain WGR702 had a G+C content of 60.5 mol%. UV and gamma radiation survival curves showed the strain WGR702 had highly ionizing-radiation resistant. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA gene sequences (EU315117) showed 94.79%~98.53% similarities with other recognized *Serratia* species. Primary characteristics that distinguish isolate WGR702 from the species of genus *Serratia* include the cells are spherical and Gram-positive. Based on the phenotypic, biochemical and physiological characteristics differences it is proposed that the new isolated strain WGR702 might be classified as a novel species of *Serratia*.

**Keywords:** Radioresistant bacterium, WGR702, *Serratia*, Isolate and identify

耐辐射菌株的研究有着悠久的历史,在细菌和古生菌中都有发现耐辐射菌的报道<sup>[1]</sup>。耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans* R1)是1956年从电离辐射灭菌处理的肉罐头中分离得到的,研究最广泛的耐辐射菌<sup>[2]</sup>。除*Deinococcus*菌属,其他如*Rubrobacter*、*Acinetobacter*、*Chroococcidiopsis*、*Hymenobacter*、*Kineococcus*、*Kocuria*、*Methylobacterium*和*Thermococcus*菌属中也有发现耐辐射细菌的报道<sup>[1]</sup>。这些耐辐射菌株除了具有UV和 $\gamma$ 射线及许多DNA损伤试剂的抗性外,还对干燥和过氧化物等具有极强的抗性。因此,开发这类微生物资源,研究其DNA损伤的修复机理,对促进新的DNA技术发展以及在环境保护、生物修复和人类健康乃至地外空间的开发和利用等方面都具有极大的应用前景。

沙雷氏菌广泛存在于各种环境,包括水、土壤、植物表面、动物以及人体中<sup>[3]</sup>。迄今为止,沙雷氏菌属中已发现13个种,4个亚种(<http://www.bacteriocict.fr/serratia.html>)。国内外对沙雷氏菌的研究有广泛的研究,但尚未见关于沙雷氏菌具有电离耐辐射抗性的报道。本研究从放射污染的土壤中分离到一株新的具有辐射抗性的菌株WGR702,通过对该菌株的16S rDNA序列分析以及从表型、生理生化等各个方面对菌株WGR702进行鉴定,并对其电离辐射抗性进行检测,最后确定了菌株WGR702可能为沙雷氏菌属中一个有很强耐辐射性的新种。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株的分离与纯化

本研究样品取自广西大学辐射中心常年间断被<sup>60</sup>Co照射的废水及其周围干燥土壤。对照实验菌株,耐辐射异常球菌(*Deinococcus radiodurans* R1)由中国农业科学院馈赠,大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )本实验室保存。耐辐射异常球菌培养条件为TGY(Tryptone-Glucose-Yeast)培养基(0.1%葡萄糖,0.5%胰蛋白胨,0.3%酵母提取液,pH 7.0),30℃培养2 d~3 d。大肠杆菌用LB(Luria-Bertani)培养基(1.0%蛋白胨,0.5%酵母粉,1.0% NaCl, pH 7.0),37℃过夜培养。

样品取回实验室后分装于EP(Eppendorf)管中(1.0 g/管),然后置于<sup>60</sup>Co下 $\gamma$ 射线(1.0 kGy/h)照射,辐射剂量为5.0 kGy,辐射后的EP管中加入

10 mmol/L磷酸缓冲液1 mL,充分振荡10 min,之后进行了一系列倍比稀释( $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ ),然后各取100  $\mu$ L涂布于GBM(General Bacterial Medium)固体培养基(0.5%聚蛋白胨,0.6%蔗糖,0.2%酵母粉,0.2%牛肉浸膏,2%琼脂,pH 7.0),分别置于28℃、30℃、32℃和37℃培养箱中培养5 d,挑取单菌落,接种到新的GBM固体培养基上,反复多次后获得纯培养菌株WGR702。

### 1.2 UV和 $\gamma$ 射线辐射抗性实验

**1.2.1 UV辐射抗性检测:**取2 mL生长至稳定期菌液于8000 r/min离心收集菌体,重悬于2 mL磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0)中。然后将1 mL细胞悬液置于培养皿中(开盖),在室温条件下,不同剂量的256 nm紫外线(0 J/m<sup>2</sup>、162 J/m<sup>2</sup>、270 J/m<sup>2</sup>、432 J/m<sup>2</sup>、540 J/m<sup>2</sup>和658 J/m<sup>2</sup>)对菌液进行照射。经UV处理的细胞用磷酸缓冲液(10 mmol/L, pH 7.0)进行一系列倍比稀释( $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ )。然后取100  $\mu$ L稀释液涂布于GBM固体培养基上,每个处理设3个重复,在32℃培养5 d,观察记录结果。

**1.2.2  $\gamma$ 辐射抗性检测:**菌液处理同UV辐射抗性实验,将装有1 mL细胞悬液的EP管置于<sup>60</sup>Co下 $\gamma$ 射线(1 kGy/h)照射。辐射剂量设置6个梯度,分别为1.0 kGy、2.0 kGy、4.0 kGy、6.0 kGy、8.0 kGy和10.0 kGy。经辐射后的细胞用10 mmol/L磷酸缓冲液一系列倍比稀释( $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ ),然后各取100  $\mu$ L稀释液分别涂布于GBM固体培养基上,每处理3个重复。经32℃培养5 d,观察记录结果。

UV和 $\gamma$ 辐射抗性检测时,*D. radiodurans* R1和*E. coli* DH5 $\alpha$ 分别作为阳性和阴性对照菌株。存活率计算采用相同条件下的未辐射菌对照。

### 1.3 形态观察和生理生化实验

采用荧光显微镜(BX51-DP70, Olympus)和扫描显微镜(S3400, Hitachi)观察菌株WGR702形态特征。扫描电镜样品制备方法是先将菌株培养至稳定期(32℃, 36 h),然后8000 r/min离心2 min收集细胞,含2.5%戊二醛的磷酸缓冲液固定20 min,之后进行乙醇梯度脱水,临界点干燥,喷镀白金,最后扫描电镜下观察照相。

生长温度测定,采用GBM固体培养基培养,置于4℃~50℃下培养1周,观察生长情况。耐盐性测定,采用GBM液体培养,分别加入0.5%~10%浓度的NaCl,32℃摇床(200 r/min)培养1周,观察生长情

况。研究抗生素对菌株生长的影响时, 抗生素的使用浓度分别为: 利福平(Rif)50 μg/mL、四环素(Tc) 50 μg/mL、氯霉素(Cm) 3 μg/mL、卡那霉素(Km) 8 μg/mL、氨苄青霉素(Amp) 50 μg/mL、链霉素(Sm)25 μg/mL、奈啶铜酸(Nm) 50 μg/mL、壮观霉素(Spc) 50 μg/mL、庆大霉素(Gm)10 μg/mL。革兰氏染色采用标准的革兰氏染色方法<sup>[4]</sup>。基因组DNA的G+C mol%含量分析采用Tm法<sup>[5]</sup>。碳氮源利用试验、糖醇类发酵试验、氧化酶试验、接触酶试验、脲酶试验、吲哚试验、淀粉水解试验、甲基红试验及七叶苷水解试验采用东秀珠等<sup>[4]</sup>的方法。

1.4 总 DNA 提取和 16S rDNA 序列分析

菌株 WGR702 基因组DNA提取和纯化采用Marmur<sup>[6]</sup> 所描述的方法。以菌株WGR702 基因组DNA为模板, 以 16S rDNA通用引物F27 和R1492 为引物, 于PCR扩增仪(Primus 96 PCR-System)进行扩增反应。PCR产物克隆到pGEM-T Easy (Promega)载体上, 然后将连接产物转化到*E. coli* DH5α中, 筛选得到的阳性克隆送上海捷瑞生物工程有限公司进行核苷酸序列测定。测序结果在NCBI网页上用BLAST进行比对, 找到与GenBank中同源性高的相关序列。然后用CLUSTAL X软件对同源性较高的序

列进行相似性分析<sup>[7]</sup>, 并用MEGA3.1 作相关序列的系统进化树。

2 结果

2.1 菌株 WGR702 的分离和生理生化特征

从 5.0 kGy 的 γ 射线辐射后的土壤样品中分离到 1 株菌落呈粉红色的菌株 WGR702。菌株 WGR702 革兰氏反应阳性、能运动、无孢子、兼性好氧。最适生长温度为 28 ~32 , 可在 0%~4.0% (*W/V*) 的 NaCl 浓度及 pH 5.0~10.0 下生长。具有 Rif、Tc、Cm、Amp、Sm、Nm、Spc 抗性, 但对 Km、Gm 敏感, 基因组 DNA 的 G+C mol%含量为 60.5%。生化试验结果: 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 甲基红试验为阴性, 不能产吲哚和淀粉酶, 不能水解七叶苷。菌株 WGR702 与其他沙雷氏菌属菌相关生理生化特征及比较结果见表 1。

2.2 UV 和 γ 射线辐射抗性实验

UV和γ射线辐射检测表明WGR702 具有很强的辐射抗性(图 1, 图 2)。UV辐射抗性实验表明在 300 J/m<sup>2</sup> UV辐射后*E. coli* DH5α就没有存活, 但对 WGR702 和*D. radiodurans* R1 在剂量为 658 J/m<sup>2</sup> 的 UV辐射下不死亡。γ射线辐射抗性实验表明在剂

表 1 菌株 WGR702 和沙雷氏菌属相关菌株的生理生化特征比较  
Table 1 Comparison of the characteristics of strain WGR702 with related *Serratia* members

	WGR702	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> JCM 11315 <sup>T</sup>	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> LMG 2792 <sup>T</sup>	<i>S. odorifera</i> ATCC 33077 <sup>T</sup>	<i>S. rubidaea</i> ATCC27593 <sup>T</sup>	<i>S. ureilytica</i> NiVa51 <sup>T</sup>
Cell-shape	Spherical	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram-reaction	+	-	-	-	-	-
Pigment	+	+	+	-	-	-
Spore	-	+	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	+
Aesculin hydrolysis	-	+	+	+	+	+
Methyl red	-	-	-	+	-	+
Carbon utilization:						
L-Ornithine	-	-	+	nd	-	+
Threonine	-	nd	-	-	nd	+
L-Serine	-	+	+	nd	nd	+
L-arginine	-	+	+	+	+	+
L-histidine	-	+	+	+	+	+
Acidproduction from:						
Lactose	-	-	-	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	+	+	-

注: +: 阳性; -: 阴性; nd: 未知; 所有菌株都是氧化酶反应阴性, 接触酶反应阳性, 都可在 0%~4.0%(*W/V*) NaCl和pH 5.0~9.0 下生长, 都可利用醋酸盐和琥珀酸盐作为唯一碳源, 并可利用葡萄糖和蔗糖产酸, 都不具有产吲哚和淀粉酶的能力, 沙雷氏菌属相关菌株特征参见Bhadra等的报道<sup>[3]</sup>

Note: +: Positive; -: Negative; nd: Not detected; All strains were oxidase negative , catalase positive , could grow in the presence of 0%~4.0% (*W/V*) NaCl and pH 5.0~9.0; All could utilize acetate, succinate, as sole carbon source and could produce acids from glucose and sucrose. none was able to produce indole, amylase. Data of related *Serratia* members from Bhadra *et al* <sup>[3]</sup>

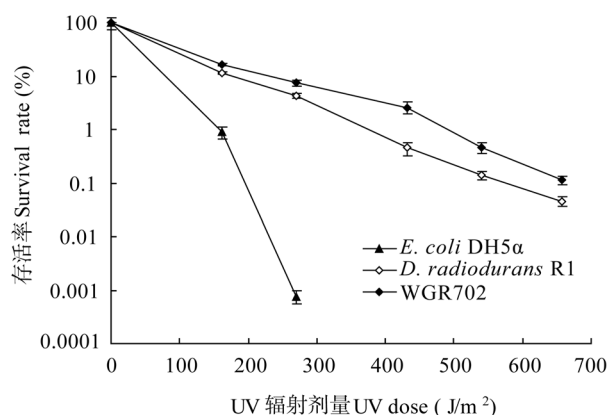


图1 菌株 WGR702 UV 辐射生存曲线

Fig. 1 Survival curves for WGR702 following exposure to UV radiation

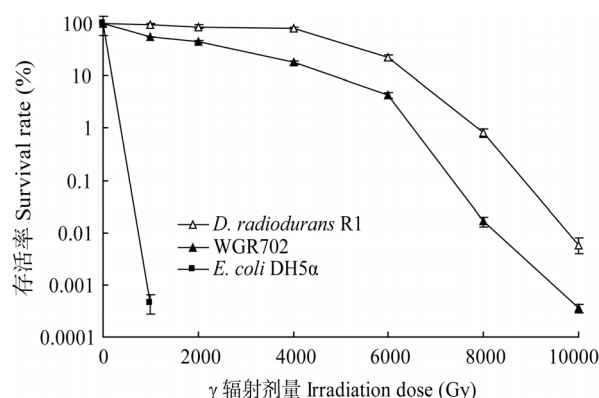


图2 菌株 WGR702 γ 辐射生存曲线

Fig. 2 Survival curves for WGR702 following exposure to γ radiation

量达到 2.0 kGy 后 *E. coli* DH5α 就没有存活, 但对菌株 WGR702 和 *D. radiodurans* R1 生存几乎没有影响。10.0 kGy 后依然有菌株 WGR702 和 *D. radiodurans* R1 存活。

### 2.3 革兰氏染色和形态观察

菌株 WGR702 不同生长时期形态无明显变化, 革兰氏染色及显微镜和扫描电镜图片(图 3)显示菌株 WGR702 为革兰氏阳性球菌, 直径 1.5 μm~2.5 μm。

### 2.4 16S rDNA 序列和系统进化树的分析

菌株 WGR702 的 16S rDNA 序列(EU315117)与 Genbank 中已登录的 16S rDNA 序列同源性比较, 结果显示与沙雷氏菌属菌株 16S rDNA 序列的同源性最高。用 CLUSTAL X 对同源性较高的序列进行相似性分析, 发现菌株 WGR702 与沙雷氏菌属菌株的 16S rDNA 有很高相似(94.79%~98.53%), 其中与 *Serratia marcescens* susp. *sakuensis* (AB0061685)的

相似性最高达到 98.53%。基于 16S rDNA 基因序列构建了与菌株 WGR702 亲缘关系相近菌种的系统发育树(图 4)。系统发育树表明菌株 WGR702 与其他沙雷氏菌的进化距离非常近, 这与 16S rDNA 序列分析结果一致。

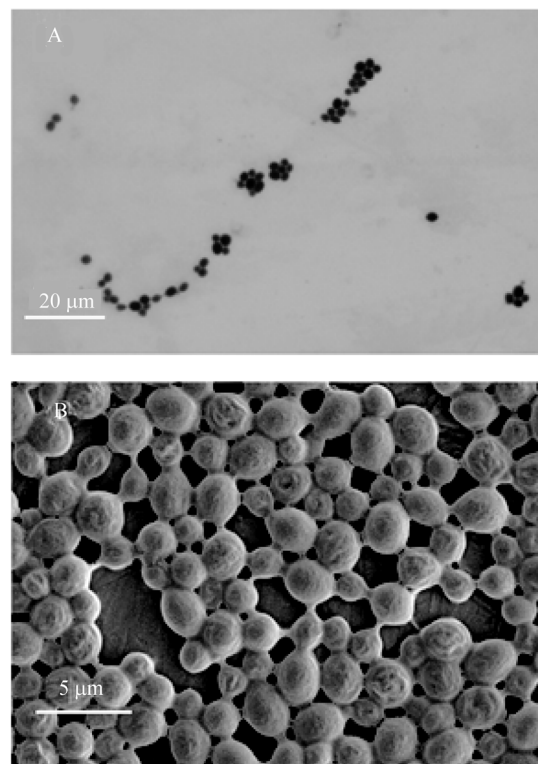


图3 菌株 WGR702 显微镜和扫描电镜图片(32℃ GBM 固体培养 36 h)

Fig. 3 Microscope and scanning electron micrographs of cells of strain WGR702 grown on GBM agar at 32 °C for 36 h

注: A: 显微镜图片(标尺, 20.0 μm); B: 扫描电镜图片(标尺, 5.0 μm)  
Note: A: Microscope micrograph (Bar=20.0 μm); B: Scanning electron micrograph (Bar=5.0 μm)

## 3 讨论

菌株 WGR702 能够在剂量为 10.0 kGy 的 γ 射线辐射后依然具有存活能力, 7.5% 能生存在 6.0 kGy 的辐射剂量下。形成明显对比的是, *E. coli* DH5α 细胞辐射抗性极低, 在 150 Gy 剂量下生存率不到 10%<sup>[8]</sup>。两者抗性相差 30 倍。10 kGy 后依然有菌株 WGR702 和 *D. radiodurans* R1 存活(图 2, 图 3)。说明菌株 WGR702 和 *D. radiodurans* R1 都具有很强的耐辐射性。

结合 16S rDNA 序列和系统进化树分析(图 4)及菌株 WGR702 与沙雷氏菌属其他菌株各项生理生化特征的比较结果(表 1), 提示菌株 WGR702 应属于沙

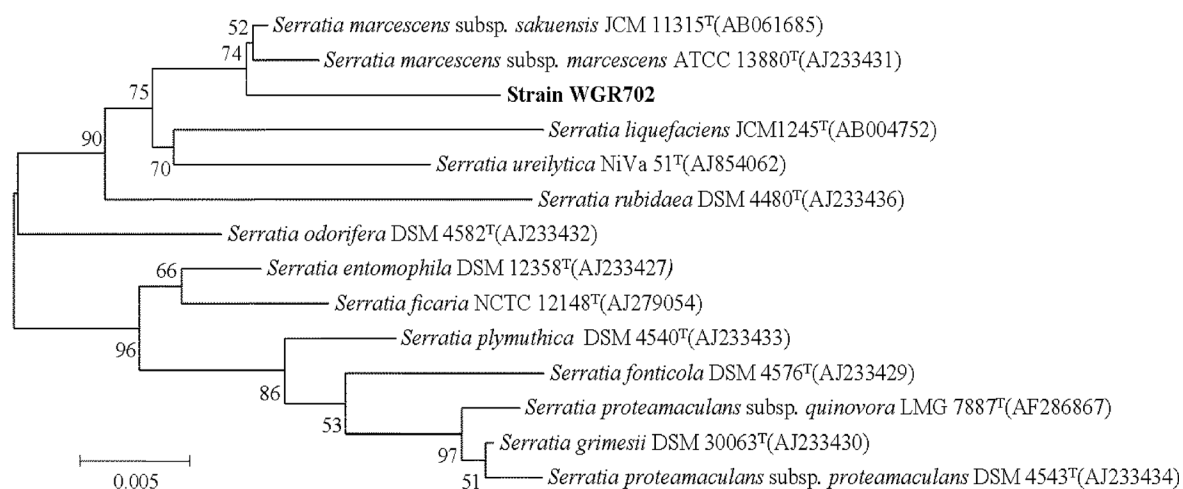


图4 根据16S rDNA序列构建的WGR702及沙雷氏菌属相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic dendrogram obtained by distance-matrix analysis of 16S rDNA gene sequences, showing the position of strain WGR702 among its phylogenetic neighbours

Note: Bar: 0.5% sequence divergence

雷氏菌属。已报道的沙雷氏菌属菌株都是革兰氏阴性杆菌<sup>[3]</sup>，新分离的菌株WGR702与这些菌株的最大不同点是细胞呈球状且革兰氏反应阳性，提示这可能与菌株WGR702具有很强的耐辐射特性相关。在同一菌属中存在革兰氏阳性和革兰氏阴性菌种在其他菌属中也有出现，如异常球菌属(*Deinococcus*)中大都为革兰氏阳性球菌<sup>[9]</sup>，但也有发现革兰氏阴性杆菌的报道<sup>[10]</sup>。UV和 $\gamma$ 射线辐射结果表明菌株WGR702具有很强的电离辐射抗性，这在其他沙雷氏菌种中未见报道。生理生化特征上WGR702与沙雷氏菌属其他菌株有许多共性，但也有很多的不同之处(表1)。结合菌体形态、革兰氏染色及各项生理生化特征比较分析，菌株WGR702可能是沙雷氏菌(*Serratia*)的一个新种。

关于耐辐射细菌的研究越来越受到国内外科学家的关注，最新研究表明*D. radiodurans* R1之所以具有极强的抗辐射特性和它具有一套完善的DNA损伤修复系统有关，但是关于*D. radiodurans* R1如何在高剂量辐射下进行修复，以及详细的修复机理的还不是特别清楚<sup>[11]</sup>。本研究首次报道了在沙雷氏菌属中发现耐辐射菌。菌株WGR702的分离鉴定及其耐辐射特性研究为进一步克隆耐辐射基因、了解DNA损伤修复的分子机制具有一定的意义和价值。

## 参考文献

- [1] Rainey FA, Ray K, Ferreira M, *et al.* Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria Recovered from Sonoran desert soil and description of nine new species of the genus *deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 5225–5235.
- [2] Anderson A, Nordan H, Cain R, *et al.* Studies on a radioresistant micrococcus. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol*, 1956, **10**: 575–578.
- [3] Bhadra B, Roy P, Chakraborty R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**: 2155–2158.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*, 1962, **5**: 109–118.
- [6] Marmur J. A procedure for the isolation of DNA from microorganism. *J Mol Biol*, 1961, **3**: 208–218.
- [7] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4876–4882.
- [8] Smith KC, Martignoni KD. Protection of *Escherichia coli* cells against the lethal effects of ultraviolet and x irradiation by prior x irradiation: a genetic and physiological study. *Photochem Photobiol*, 1976, **24**: 515–523.
- [9] Rainey FA, Nobre MF, 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.
- [10] Suresh K, Reddy GSN, Sengupta S, *et al.* *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**: 457–461.
- [11] Cox MM, Battista JR. *Deinococcus radiodurans*-the consummate survivor the consummate survivor. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**: 882–892.