

# 一株抗重金属铜镉细菌的分离、鉴定及其 16S rDNA 的序列分析\*

潘园园 陈雯莉 黄巧云\*\*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

**摘要:** 从湖北省大冶市矿区土壤中分离到一株高抗铜和镉的菌株, 命名为 NTG-01。该菌株可以单抗 4.5 mmol/L 的铜和 2 mmol/L 的镉, 因此它是研究抗铜或镉机制的重要菌株。对分离到的 NTG-01 进行了形态学观察和生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析。结果显示菌株 NTG-01 为细菌, 革兰氏染色阴性, 短杆状, 鞭毛周生, 菌体大小约为  $0.8\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m}$ , V-P 实验阳性, 甲基红实验阴性, 利用葡萄糖产酸产气; 通过对菌株 NTG-01 的 16S rDNA 序列进行测定和同源性比对, 发现它与产气肠杆菌的 16S rDNA 有高达 99% 的同源性。结合形态和生理生化指标, 将其鉴定为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。通过测定 NTG-01 对 9 种重金属的 MIC 值, 可知它对多种重金属具有普遍较高的抗性。

**关键词:** 重金属, 产气肠杆菌, 16S rDNA, MICs

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0068-05

## Isolation, Identification and 16S rDNA Sequences Analysis of a Bacterial Resistant to Copper and Cadmium\*

PAN Yuan-Yuan CHEN Wen-Li HUANG Qiao-Yun\*\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** A strain of resistance to copper and cadmium with high concentration, named NTG-01, was isolated from soils of DaYe county mineral area in HuBei province. It can resist copper of 4.5 mmol/L and cadmium of 2 mmol/L, so we can say that it is a important strain used to study the resistance mechanism of copper and cadmium. A series of morphological and biochemical characteristics and sequences analysis of 16S rDNA reveal that it belongs to the bacteria and is gram negative, short rod, flagella around, the size of bacteria is about  $0.8\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m}$ , V-P result shows positive, methyl-red result displays negative, and glucose can be utilized to produce acid and gas; In addition to, we find that it has the percent 99 homologous to *Enterobacter aerogenes* by 16S rDNA sequences BLAST analysis, plus the results of morphological and biochemical parameters, it belongs to *Enterobacter aerogenes*. We can conclude that NTG-01 has higher resistance to many different heavy metals by measuring MICs values of nine heavy metals at last.

**Key words:** Heavy metals, *Enterobacter aerogenes*, 16S rDNA, MICs

除少数重金属是生命所必需的微量元素外, 大多数重金属例如  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ag}^{2+}$  等并不是生命活动所必需的, 它们具有很高的毒性。在浓度很高的情况下重金属都会在细胞内累积形成非特异性的复合物, 替代细胞内有功能的金属离子, 结合于重要的呼吸蛋白上, 导致蛋白质和 DNA 变性<sup>[1]</sup>。另外重金属也是土壤及有关环境中最常见的

\* 高校博士学科点基金资助 (No. 20020504023)

\*\* 通讯作者 Tel/Fax: 86-27-87671033, E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2004-09-03, 修回日期: 2004-11-25

污染物, 它们通过多种途径进入土壤并在其中累积, 使土壤质量下降, 降低农产品产量与品质, 同时恶化水体环境, 并通过食物链危及人类生命和健康。因此重金属污染环境的治理已成为迫切需要解决的问题。近年来关于重金属抗性细菌的研究报道很多, 但主要集中于 *Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*E. coli*、*Enterococcus*、*Alcaligenes eutrophus* 等<sup>[2]</sup>, 本试验从湖北大冶市某铜矿区分离到一株高抗铜和镉的细菌 NTG-01, 根据其形态学特征和生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列的分析, 将其鉴定为产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*), 这在国内铜和镉抗性菌株的研究中尚属首次报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株分离及培养条件

菌株分离: 取采自湖北大冶市某矿区的土样 1g, 溶于含 99g 无菌蒸馏水并带有玻璃珠的三角瓶中, 放 28℃ 摇床 (250r/min) 振荡培养 30min, 然后取样做梯度稀释并涂布含铜和镉的 Luria-Bertani 平板, 28℃ 温箱过夜培养, 挑选抗铜和镉的菌株进行下述试验。

### 1.2 菌体形态结构观察

在 LB 培养基上观察菌落形态, 采用革兰氏染色法在光学显微镜下观察菌体形态, 并采用改良的 Leifson 染色法在光学显微镜下用油镜放大 2,000× 观察鞭毛结构。

### 1.3 生理生化实验

氧化酶试验、接触酶试验、细菌的运动性试验、糖醇类的氧化发酵试验 (包括葡萄糖、乳糖、半乳糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、阿拉伯糖、肌醇、甘露醇、山梨醇、卫矛醇、阿东醇、甘油)、利用糖醇的产气试验、甲基红试验、V-P 试验、吲哚试验、硝酸盐还原试验、TIS 培养基上的 H<sub>2</sub>S 产生试验、赖氨酸脱羧酶试验、精氨酸脱羧酶试验、鸟氨酸脱羧酶试验、精氨酸双水解酶试验、柠檬酸盐利用试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、脲酶试验、明胶液化试验、荧光色素产生试验、酒石酸盐利用试验, 具体方法参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第九版)。

### 1.4 16S rDNA 序列分析

取对数期的菌液, 离心后收集菌体, 抽提基因组总 DNA。依照细菌 16S rDNA 中最保守的序列设计并合成引物, 正向引物: 5' - GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'; 反向引物: 5' - AAGGAGCTCATCCARCCGCA - 3' (其中 R 代表 A/G)。PCR 反应条件: 25μL 的反应体系中含基因组 DNA 200ng、dNTP 0.2mmol/L、正反向引物各 1μmol/L、Mg<sup>2+</sup> 1.5mmol/L、10×PCR Buffer 2.5μL、Taq 酶 2U, 94℃ 变性 4min 后进入循环: 94℃ 1min—60℃ 1min—72℃ 1.5min, 共 25 个循环<sup>[3]</sup>, 最后 72℃ 延伸 6min。PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体 (Promega 公司产品), 经过抽提质粒和酶切验证酶连产物正确, 然后送上海华诺基因测序公司测定 DNA 序列, 最后将测定的序列提交 GenBank 数据库, 与数据库中已有的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。用 ClustalX 进行序列比对后采用 Phylipw3.6 软件进行系统发育分析。

### 1.5 重金属 MIC 值的测定

挑取 NTG-01 的单菌落于新鲜的 LB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养, 待菌液比较浑浊时, 移取少许至含有新鲜定量的 LB 液体培养基中 (根据所测定的重金属样品数以及设置的浓度梯度个数来决定培养多少瓶菌液), 28℃ 继续振荡培养, 待 OD<sub>600</sub> 值达到 0.2

左右, 将其中加入相应的重金属浓度, 大约 15h 后取出, 测定含各种不同重金属的菌液  $OD_{600}$  值<sup>[2,4]</sup>。

2 结果

2.1 革兰氏染色、形态结果

从湖北省大冶市一矿区中分离到一株单抗 4.5mmol/L 铜和 2mmol/L 镉的菌株 NTG-01。NTG-01 革兰氏染色为阴性 (图 1), 短杆状, 光学显微镜下观察到的鞭毛呈周生分布 (图 2)。

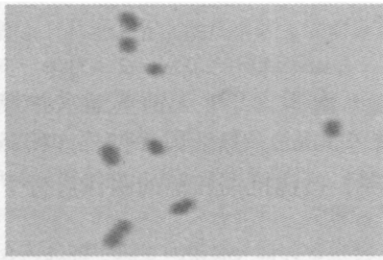


图 1 NTG-01 光镜图 (×1,000)

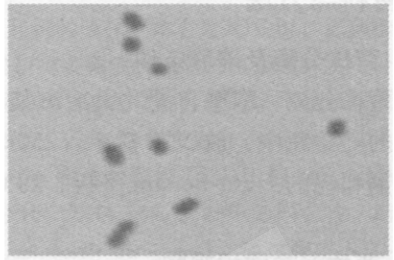


图 2 NTG-01 光镜图 (×2,000)

2.2 生理生化试验结果

生理生化试验具体结果为: 氧化酶试验阴性、接触酶试验阳性、细菌具有运动能力、在糖醇类的氧化发酵试验中, 能发酵包括葡萄糖、乳糖、半乳糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、棉子糖、阿拉伯糖、肌醇、甘露醇、山梨醇、阿东醇、甘油在内的 14 种糖醇, 且都产生气体, 不能发酵卫矛醇, 也不产生气体、甲基红试验阴性、V-P 试验阳性、吡啶试验阴性、硝酸盐还原试验阳性、TIS 培养基上的  $H_2S$  产生试验阴性、赖氨酸脱羧酶试验阳性、精氨酸脱羧酶试验阴性、鸟氨酸脱羧酶试验阳性、精氨酸双水解酶试验阴性、柠檬酸盐利用试验阳性、苯丙氨酸脱氨酶试验阴性、脲酶试验阴性、明胶液化试验阳性 (反应迟缓)、产生荧光色素、酒石酸盐利用试验阴性。

2.3 16S rDNA 序列分析

NTG-01 菌的 16S rDNA 序列的扩增长度为 1,567bp, 此序列在 GenBank 数据库中的注册序列号 (Accession No.) 为 AY825036, 将序列输入生物技术信息网页 ([www.ncbi.nlm.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.gov/blast)) 进行序列分析和同源性比较, 其与 *Enterobacter aerogenes* 及 *Enterobacter* 和 *Klebsiella* 菌属中的其它种的 16S rDNA 序列具有 98% ~ 99% 的高度同源性, 其中与 *Enterobacter aerogenes* 菌的同源性最高, 达到 99% (表 1)。

表 1 NTG-01 与 *Enterobacter* 和 *Klebsiella* 属中各种 16S rDNA 序列同源性比较

Sequence similarity	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>
NTG-01	99%	98%	98%	98%	98%

2.4 系统发育分析

对所测定的 NTG-01 与它同源性最高的 13 株细菌的 16S rDNA 全序列进行遗传距离计算 (另外模式菌株在 GenBank 中的序列注册号为 AJ001237), 并根据遗传距离得到系统发育树 (图 3), 可以看出 NTG-01 与 *Enterobacter* 菌属的几株细菌处于大的分支内, 但与 *Klebsiella* 和 *Kluyvera* 菌属在进化上的距离则相对较远, 且同源性上也稍低于 *Enter-*

obacter 菌属。因此依据前面形态学和生理生化试验的鉴定结果,可以判定试验分离到的菌株是产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。

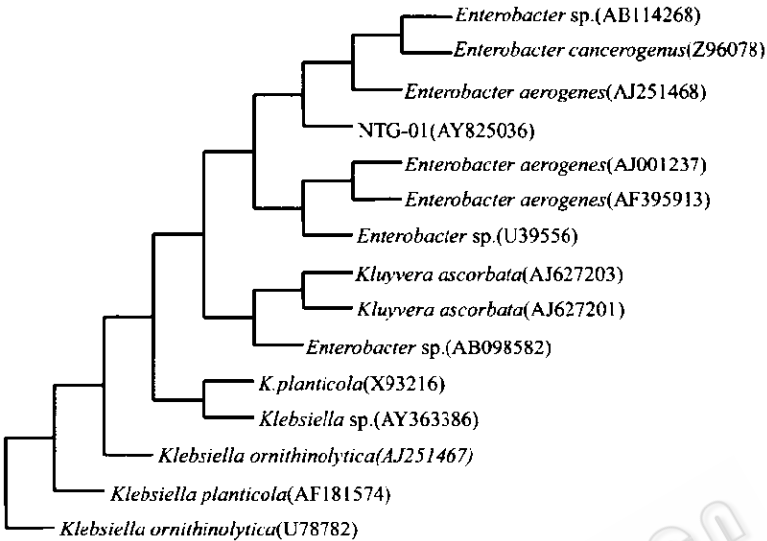


图 3 菌株 NTG - 01 在系统发育树中的位置

2.5 重金属最低抑菌浓度 (MICs) 的测定

最低抑菌浓度 (MICs) 是指在体外试验中, 各种重金属能抑制培养液中细菌生长的最低浓度, MIC 值越大, 重金属对菌体的毒性越小, 相反, 其对菌体的毒性就越大。本实验通过测定 9 种重金属对菌株 NTG-01 的毒性, 结果显示毒性顺序依次为: Ag (0.00625mmol/L) > Pb (0.9mmol/L) > Zn (1.6mmol/L) = Co > Ni (2.0mmol/L) = Cd > Cr (2.11mm/L) > Cu (4.5mmol/L) > Mn (26.7mmol/L), 需要说明的是, NTG-01 对银非常敏感, 在浓度为 0.00625mmol/L 时仍然表现出对 NTG-01 的抑制, 而由于 PbCl<sub>2</sub> 的溶解度很低, 使得几乎在最大溶解度时, 还没有表现出对 NTG-01 的抑制。对 9 种重金属的 MIC 值结果 (图 4) 分析表明, NTG-01 具有普遍较高的抗重金属性能。

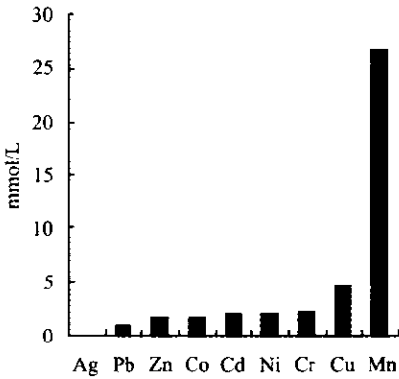


图 4 菌株 NTG - 01 对重金属的 MICs 值

3 讨论

目前抗重金属菌株的研究局限于 *Pseudomonas*、*Xanthomonas*、*E. coli*、*Enterococcus*、*Alcaligenes eutrophus* 这几类<sup>[2]</sup>, 而且研究的重金属基因主要涉及 *cop*、*czc*、*ncc*、*phr* 等<sup>[5,6]</sup>, 因为镉对生物具有较强的毒性, 可以造成环境污染和生态破坏, 因此开展重金属抗镉基因的研究具有重要的理论和实践意义。据文献报道, 仅巴基斯坦 Karachi 大学在肠杆菌属的一个变种中克隆到抗 4mmol/L 的抗铜基因<sup>[7]</sup>, 但还未见有涉及产气肠杆菌中抗镉基因克隆的相关报道。本实验从土壤中分离到一株产气肠杆菌, 且具有单抗

较高铜和镉的性能, 还发现其镉抗性基因的表达受铜抗性基因的诱导, 另外通过质粒抽提, 质粒快检、脉冲电泳等方法的验证, 均无发现 NTG-01 中有质粒的存在, 因此可以知道 NTG-01 的铜镉抗性基因定位在染色体上, 而这一点与以前报道的抗性基因主要位于质粒上不同, 这种抗性可以较为稳定的存在。目前铜和镉抗性基因克隆的工作正在我们实验室开展, 相信此基因的成功克隆必定会对环境中重金属镉和铜污染的治理起到一定的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Silver S, Phung L T. Annual Review Microbiology, 1996, **50**: 753 ~ 789.
- [2] Nies D H. Appl Microbial Biotechnol, 1999, **51**: 730 ~ 750.
- [3] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.
- [4] Spain A, Alm E. Reviews in Undergraduate Research, 2003, **2**: 1 ~ 6.
- [5] Lim H K, Cooksey D A. Journal of Bacteriology, 1993, **175**: 4492 ~ 4498.
- [6] Brown N L, Barrett S R, Camakaris J, *et al.* Molecular Microbiology, 1995, **17** (6): 1153 ~ 1166.
- [7] Qureshi F, Akhtar J, Badar U, *et al.* Soil Sediment and Water, 2001, 10.