

一株强抗镉成团肠杆菌的抗性研究

窦敏娜

(咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000)

摘要:对从北京市远郊东三岔铅锌尾矿中筛选到的一株强高度抗镉成团肠杆菌(*Pantoea agglomerans*)进行研究,表明该菌株具极强的抗镉能力,最小抑制浓度(MIC)达 2 000 mg/l。分析该菌株的生长曲线,并通过质粒消除试验证明该菌株的抗镉机制与抗性质粒的存在有关,通过 PCR 扩增抗性基因发现,此抗性是由 *czc* 抗性系统控制的。

关键词:镉;成团肠杆菌;抗镉基因

在自然界中,镉总是与锌伴生,铅锌矿的开采、冶炼和尾矿堆放等过程产生大量含镉的酸性废水和废渣是造成水体和农田土壤污染的主要原因。早在 1972 年,FAO/WHO 把镉列为第三位优先研究的食品污染物^[1],1974 年联合国环境规划署和国际劳动卫生重金属委员会就将其定为重点污染物^[2],并且已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer)确定为对人类的致癌物质^[3]。因此,对镉污染的环境进行监测和修复势在必行。

该文对从铅锌尾矿中筛选出的一株高度抗镉成团肠杆菌(*Pantoea agglomerans*)进行了抗性基因初步研究。希望为进一步研究微生物的抗镉机理,构建抗镉基因工程菌,及应用微生物监测和修复镉污染提供必要的基础。

1 材料与方法

1.1 分离菌株对镉的抗性试验

将分离得到的纯培养菌株接种含有重金属镉的缓冲蛋白胨水固体培养基平板上,30℃,其镉浓度依次为:1 000 mg/l、1 200 mg/l、1 500 mg/l、1 700 mg/l、2 000 mg/l 的固体培养基平板上,每个镉浓度梯度做 3 个平行对照。30℃ 恒温培养 5—7 d 后,观察菌落生长情况。

1.2 测定分离菌株在含镉与不含镉两种情况下的生长曲线

各取 500 ml 新鲜培养的菌液分别接种于镉浓度为 0、100 mg/l 缓冲蛋白胨水液体培养基 100 ml 中。以各自未接种的液体培养基做空白对照,选用 550 nm 波长测定吸光度,每 60 min 记录 OD 值一次,绘制生长曲线。

1.3 质粒消除试验

将纯培养菌株接种于含有 SDS 至终浓度为 0.3% 的缓冲蛋白胨水液体培养基 25 ml 中,42℃ 振荡培养 48 h。将菌液浓度依次稀释至 0、10⁻¹、10⁻² 后分别涂布于镉浓度为 0、250 mg/l 的固体培养基平板上,每个镉浓度梯度做 3 个平行平板。30℃ 恒温培养 3 d 后,观察菌落生长情况。

1.4 抗性基因研究

根据目前对细菌抗镉机制的研究发现,其抗性主要是由两种系统控制的,比较普遍的是 *cad* 基因控制的^[4,5],还有在革兰氏阴性细菌中发现比较多的 *czc* 抗性系统^[6,7],合成这两种系统的 *cadA* 基因引物,和 *czcC*, *B*, *A* 基因引物,分别进行扩增,得到相关抗性基因,进行进一步研究其抗性机理。

参考 Genbank 上已登录的 *czc* 基因序列,经筛选确定 Accession 为 X71400 的雷氏菌属(*Ralstonia metallidurans*)菌株的基因,由于基因较大,将整个基因分成 6 段,应用“DNAMAN”程序设计引物。经计算机处理及筛选,确定引物为:

CzcCf(76051) 5' caagggaagcggcgggaccg 3'
(67)

CzcCb(77205) 5' aatagccatgtttatgaatcccgtc 3'
(61)

CzcBf(77205) 5' gacgggattcataaacatggctatt 3'
(61)

CzcBb(78783) 5' cattgctgttcc cccgtatc 3'
CzcAf1(78783) 5' gatacggg ggaacagcaatg 3'
(59)

CzcAb1(80521) 5' gccaggaatgcgcagcgcct 3'
CzcAf2(80521) 5' aggcgctgcgcattcctggc 3'

收稿日期:2013-01-22

(67)

CzcAb2(82011)5'aaaaattgggcggtacgatg 3'
 CzcDf (82011) 5'catcgtaccgcccaatttt 3'(56)
 CzcDb(82994) 5'ttctacaacaagtaccgccacc 3'
 CzcRf (82994) 5'ggtgcggggtacttgtttagaa 3'

(59)

CzcRb(83676) 5'gaagtcccgggcctcatt 3'

字母是每段基因引物的名称,其后括号内是基因在整个基因组中位置,引物后面的数字是其退火温度。

2 结果与分析

2.1 分离菌株对镉离子的抗性试验结果

分离得到的纯培养菌株在镉浓度分别为 1 000 mg/l,1 200 mg/l,1 500 mg/l,正常生长,在 1 700 mg/l 的固体培养基平板上菌落明显变小,且菌落呈金属光泽,但是在 2 000 mg/l 的固体培养基平板上几乎不生长,即该菌株的最小抑制浓度(MIC)为 2 000 mg/l,比现在已经报道的抗镉细菌的 MIC 高出许多,证明该菌种有极强的研究和应用价值。

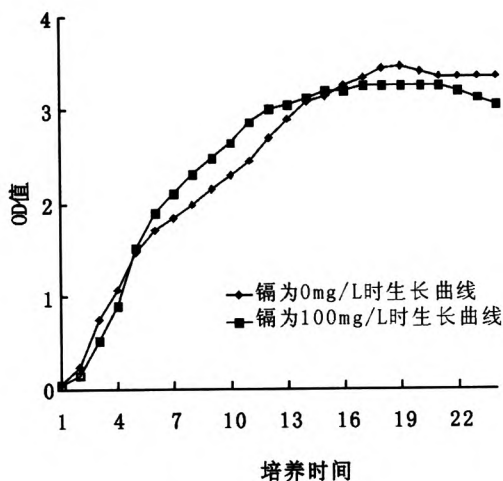


图1 菌株在镉浓度为 0 及 100 mg/l 两种情况下的生长曲线

从图 1 看出,分离菌株在镉浓度为 0 及 100 mg/l 两种情况下都有较为平滑的生长曲线。在镉浓度为 0 的情况下,分离菌株的延滞期比镉浓度为 100 mg/l 的情况时略短。在开始的 1—5 h 内,分离菌株在镉浓度为 0 mg/l 的培养基中生长速率大于其在镉浓度为 100 mg/l 的培养基中的生长速率。在随后的 6—15 h 内,分离菌株在镉浓度为 100 mg/l 的培养基中生长速率超过其在镉浓度为 0 mg/l 的培养基中的生长速率。在镉浓度为 100 mg/l 的培养基中生长的分离菌株首先在培养 16 h 后出现稳定期,并在培养 22 h 后

出现衰亡期。在镉浓度为 0 的培养基中生长的分离菌株培养 16 h 没有出现稳定期并继续缓慢增长,在培养 21 h 后出现稳定期,没有明显的衰亡期。在生长的最初阶段,在含镉培养基中,菌株的生长受到抑制,但在较短一段滞后期后,可能由于镉离子诱导菌体自身潜在的抗性基因表达,使菌体对镉采取了抗性机制,反而诱导了菌株的生长,使其在较短的时间内迅速生长并较早进入平台期。

2.2 分离菌株的质粒消除结果

将菌液浓度依次稀释至 0、10⁻¹、10⁻² 后分别涂布于镉浓度为 0、250 mg/l 的固体培养基平板上 30℃ 恒温培养 3 d 后,观察菌落生长情况如图 2 所示:经过消除质粒处理后,3 个稀释度的菌液在含镉浓度为 0 的固体培养基上均能生长,而在含镉浓度为 250 mg/l 的固体培养基上均不生长。说明该菌对重金属镉的抗性机制是由质粒基因决定的。在质粒被消除后其对镉的抗性也就随之消失。

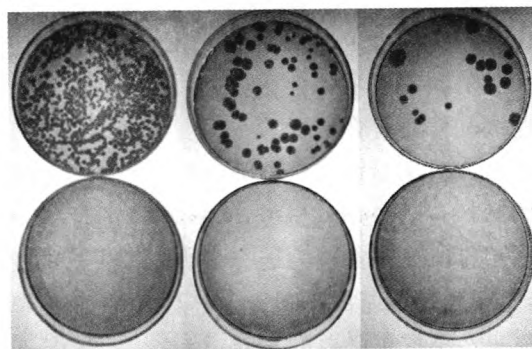


图2 菌株的质粒消除试验

2.3 分离细菌的抗镉基因研究结果

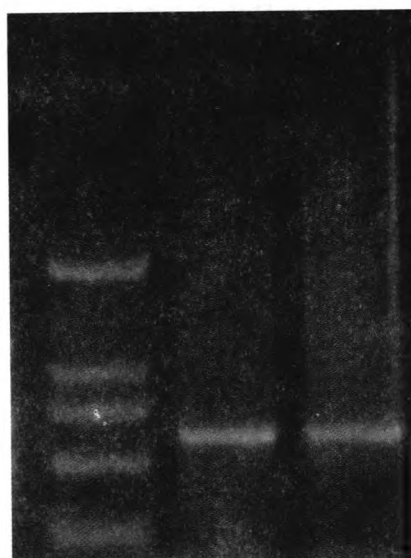


图3 目的基因 PCR 扩增结果

通过抗镉基因扩增,发现在该菌株体内并无 cad 镉抗性系统,该菌株的抗性是由 czc 镉抗性系统控制的,该系统的 czcA 基因已经被扩增得到,为一个大小为 700 bp 左右的特异性 czcA 引物扩增的条带,结果见图 3。并由奥科生物公司测序,该序列与 GENBANK 核酸数据库比对分析,对

测得的 DNA 序列应用 Blast 软件和 Genbank 核算数据库进行比对分析发现其与 drug resistance 基因有极高的相似性,已经研究发现抗重金属基因可能和抗生素基因有一定的关系,而我们找到这段基因可能就和共同抗性有关,有关这方面研究还需进一步探索。

```
GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTcCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATT
CGATTAGGCGCTGCGCATTCTGGCCATCACGCGCCAGTTCAGTGAAGGAGGTCACAGAGTACACGTCGGAGCCCACAC
CGTAGTCTTTCCGAGGATCTGAGCCGCTTCACGGACGTGACGCAGGATAGAACCGGAGCCCAGCAGCTGAACTTTACC
TTTGCTACCTTCGAGGGTTTCGAGTTTGTAGATACCTTTACGGATGCCTTCCTCGGCACCTGCTGGCATTGCCGGCATG
TGGTAGTTTTCGTTCAGGGTGGTATGTAGTAGTAAATGTTCTTTCGCGCTTACCCTACATGCGCTGCAGACCGTCAT
GCATGATGACTGCCACTTCGTACGCGTAAGACGGGTCGTAAGAGATACAGTTAGGGATAGTCAGAGACTGAATGTGGCT
GTGGCCATCTTCGTGCTGCAGACCTTCACCGTTCAGGGTCGTACGACCAGAGGTACCGCTACCAGGAAGCCCGGAGCC
TGCCGGTCGCTGCCTGCCAGCACAGGTCACCGATACGCTGGAACCCGAACATGGAGTAGTAAATGTAGAACGGGATCA
TCGGCAGGTTGTTGGTGTGTAAGAGGTCGACGAGCCAGCCAGGAATGCGCAGCGCTAATCACTAGTGAATTCGCGG
CCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAAT
AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATA
```

图 4 目的基因的核酸序列

3 结论

从铅锌尾矿中筛选的高度抗镉成团肠杆菌 (*Pantoea agglomerans*) 具极强的抗镉能力,当在含镉固体培养基平板上生长时,其最小抑制浓度 (MIC) 高达 2 000 mg/l。通过质粒消除试验证明该菌株的抗镉基因是由抗性质粒编码的,而从该菌株中扩增出了 czc 系统的基因,充分说明了该菌株的抗性机制;czcCBA 蛋白在细胞膜上构成了一个复杂的阳离子泵,在消耗 ATP 的情况下将镉离子转运出膜外来为细胞解毒,此文为研究成团肠杆菌的抗镉机制提供了一定的理论基础,为利用微生物技术监测和治理重金属镉污染提供了一株极有潜力的菌株。

参 考 文 献:

[1] 谢黎虹,许梓荣. 重金属镉对动物及人类的毒性研究进展[J]. 浙江农业学报:2003,15(6):376-381.
 [2] 王鸿飞. 环境镉污染及镉对环境暴露人群影响的研究[J]. 广东微量元素科学:2002,9(7):24-26.

[3] IARC. Cadmium. [M]. Lyon: IARC Press;1993, 58:119-238.
 [4] LANG Minglin, ZHANG Yuxiu, ZHOU Jie, et al. Isolation and preliminary characterization of diferential displayed cDNAs in Brassica Judea exposed to heavy metal[J]. 遗传学报:2004, 31(9): 1 007 — 1 009.
 [5] M Lebrun. Plasmid — borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium[J]. MICROBIOLOGY:2002, 68(11): 5 508-5 516.
 [6] DIETRICH H. NIES. CzcR and CzcD, Gene Products Affecting Regulation of Resistance to Cobalt, Zinc, and Cadmium (czc System) in *Alcaligenes eutrophus* [J]. JOURNAL OF BACTERIOLOGY: 1992,174(24):8 102-8 110.
 [7] CORNELIA GRO? E. Transcriptional Organization of the czc Heavy-Metal Homeostasis Determinant from *Alcaligenes eutrophus* [J]. . JOURNAL OF BACTERIOLOGY:1999,181(8):2 385-2 393.

一株强抗镉成团肠杆菌的抗性研究

作者: [窦敏娜](#)
作者单位: [咸阳职业技术学院, 陕西咸阳, 712000](#)
刊名: [陕西农业科学](#) 
英文刊名: [Shaanxi Journal of Agricultural Sciences](#)
年, 卷(期): 2013, 59(4)

参考文献(7条)

1. [谢黎虹, 许梓荣](#) [重金属镉对动物及人类的毒性研究进展](#) 2003(06)
2. [王鸿飞](#) [环境镉污染及镉对环境暴露人群影响的研究](#) 2002(07)
3. [IARC](#) [Cadmium](#) 1993
4. [LANG Minglin, ZHANG Yuxiu, ZHOU Jie](#) [I-solation and preliminary characterization of diferential displayed cDNAs in Brassica Judea exposed to heavy metal](#) 2004(09)
5. [M Lebrun](#) [Plasmid-borne cadmium resistance genes in Listeria monocytogenes are similar to cadA and cadC of Staphylococcus aureus and are induced by cadmium](#) 2002(11)
6. [DIETRICH H NIES, CzcR and CzcD, Gene Products Affecting Regulation of Resistance to Cobalt, Zinc, and Cadmium \(czc System\) in Alcaligenes eutrophus](#) 1992(24)
7. [CORNELIA GRO?E](#) [Transcriptional Organization of the czc Heavy-Metal Homeostasis Determinant from Alcaligenes eutrophus](#) 1999(08)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_sxnykx201304023.aspx