

# 宁波沿海陆源排污口细菌结构多样性和铁代谢相关的毒力基因的研究\*

张迪骏 李春丽 周君 张春丹 王中华 苏秀榕

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

**摘要** 应用多重 PCR 技术对肠杆菌铁代谢相关毒力基因 *fhuA*、*irp2*、*sltA* 和 *sodB* 进行同步检测, 研究宁波沿海陆源排污口人畜共患致病菌群落结构在人类活动影响下的分布差异及对环境因子变化的响应趋势。通过 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析技术, 研究了东海重要陆源排污口的细菌群落多样性; 建立肠杆菌铁载体外膜受体蛋白 *fhuA*、铁调节蛋白 *irp2*、类志贺样毒素 *sltA*、含铁超氧化物歧化酶 *sodB* 基因多重 PCR 体系, 并用该体系检测铁代谢相关毒力基因在陆源排污口的分布情况。2011 年 3、5、8、10 月份, 在宁波沿海陆源排污口中共分离纯化 1000 余株、98 种细菌, 16S rRNA 基因序列分析表明, 它们分属于 4 个门 5 个纲 13 个科 21 个属, 其中  $\gamma$ -变形杆菌纲(67 株, 68.4%)和芽孢杆菌纲(16 株, 16.3%)分别为变形菌门、厚壁菌门中主要纲。98 株细菌中, *fhuA+irp2+sodB+* 基因型检出率为 35.71%; *fhuA+irp2+sltA+* 的基因型检出率为 25.27%; *irp2* 的基因型检出率为 13.19%; *fhuA* 基因型检出率为 12.09%; *fhuA+irp2+* 基因型检出率为 9.89%; *sltA+sodB+* 基因型检出率为 8.79%; *fhuA+irp2+sodB+sltA+* 基因型检出率为 8.79%。

**关键词** 陆源排污口; 铁代谢; 毒力基因; PCR  
**中图分类号** X511

铁是致病菌生长繁殖不可缺少的微量营养元素, 在致病菌代谢过程中起着重要作用, 是多种蛋白质的辅基或激活剂(Neilands, 1995; Andrews *et al.*, 2003; Hentze *et al.*, 2004)。生理条件下铁的溶解度很低, 细菌需要高亲和铁的摄取系统特异性结合细胞外的  $Fe^{3+}$  并通过细胞膜上的接收器进行吸收(Braun, 2001)。铁载体(Siderophore)是多数细菌的重要致病因子。铁调节蛋白 *irp2*(iron regulatory protein 2)为 HPI(high-pathogenicity island)保守基因(Shana *et al.*, 2008), HPI 是耶尔森菌中的一个与铁载体-耶尔森杆菌素合成、转运和调节有关的毒力岛(Schubert *et al.*, 2004)。铁色素外膜受体蛋白 *fhuA* (ferrichrome-iron

uptake receptor)编码产生了细菌外膜上摄取和接收铁色素的外膜蛋白, 其结构已经被研究证实(Locher *et al.*, 1998; Baltés *et al.*, 2003)。类志贺样毒素 *sltA* (Shiga-Like-Toxin A)是一种铁螯合蛋白相关基因, 通过抑制蛋白合成对细胞产生效应(李丰生等, 1991)。含铁超氧化物歧化酶 *sodB* (superoxide dismutase B)是 *Fur* (ferric uptake regulator)中一类将过氧化物基团转换成  $H_2O_2+O_2$  的金属酶, 在氧化胁迫时 *Fur* 降低细胞质中游离铁离子的浓度, 有助于抵抗还原态铁的毒性(Sakamoto *et al.*, 1984)。

近年来随着陆源排污量的增多, 邻近海域环境恶化, 海洋环境中的致病菌会随着海水中的铁、铅、

\* 海洋公益性行业专项经费资助项目, 201105007-4 号; 国家自然科学基金项目, 41306135 号; 浙江省教育厅科研计划项目, Y201327789 号; 浙江省重大科技攻关项目, 2006C13089 号; 宁波市科技局资助项目, 2008C50027 号; 宁波大学科研基金项目, xkl1346 号。张迪骏, 硕士研究生, E-mail: 30482902@qq.com

通讯作者: 苏秀榕, 博士生导师, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-20, 收修改稿日期: 2012-07-15

镉、铜等重金属的大量排放而发生变异, 相对的致病基因也会发生变化。本文利用多重 PCR 检测技术, 以与铁代谢相关的毒力岛 *fhuA*、*irp2*、*sodB* 基因和毒素 *sltA* 基因为研究对象, 研究陆源排污口致病基因的分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

克隆质粒 pMD18-T Vector、*Taq* DNA Polymerase (TaKaRa, 大连), 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Generay, 上海), 引物由上海英俊技术有限公司合成, 分析纯试剂购自上海生工生物有限公司, DH5 $\alpha$ 感受态细胞由本实验室保存。

### 1.2 样品的采集

选择宁波沿海 10 个典型陆源排污口和距离排污口 50m 以外的 10 个站位。其中 5 个工业排污、4 个综合排污、1 个市政排污, 于 2011 年 3、5、8、10 月, 每月 1 次, 每次取水 5L。

### 1.3 细菌分离纯化

水样用无菌生理盐水稀释成 5 个梯度( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), 每个稀释度设 3 个平行, 取 100 $\mu$ L 稀释液涂布牛肉膏蛋白胨培养基平板, 28 $^{\circ}$ C 连续培养 1—2d, 挑单菌落划线分离纯化 3 次。

### 1.4 16S rDNA 限制性酶切分析

采用捷瑞细菌基因组提取试剂盒方法提取细菌基因组, 采用细菌 16S rRNA 基因 V3 区的通用引物 (16S 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 16S 1492R 5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物用 Agarose Gel DNA Purification Kit (捷瑞, 上海)进行纯化, 纯化后连接至 pMD18-T 载体转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取克隆子进行假阳性检测, 阳性克隆子的 PCR 产物用限制性内切酶 *Hae* 酶切。电泳检测获得酶切图谱。对所得到的酶切图谱进行综合分析, 将酶切图谱一致的归为一个操作分类单元(operational taxonomic unit, OUT)。挑取相应克隆子测序, 与 NCBI 数据库中各种细菌的序列进行比对。

### 1.5 多重 PCR 扩增

以宁波沿海陆源排污口 3、5、8、10 四月份 98 株分离菌株为模板, 筛查 4 种毒力基因在这些菌株中的分布情况。多重 PCR 反应体系和参数: 10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$ L、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ L、1.5 mmol/L dNTPs 1.5 $\mu$ L、10 $\mu$ mol/L 引物各 1.0 $\mu$ L, 1.0U *Taq* 酶

0.5 $\mu$ L、模板 DNA 2 $\mu$ L, 无菌超纯水补足至 30 $\mu$ L。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45s、58 $^{\circ}$ C 退火 45s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物采用 Generay 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收, 送上海英俊生物技术有限公司进行测序。

表 1 PCR 扩增引物  
Tab.1 The primers of PCR

引物名称	序列
<i>irp2</i> -F	5'-AAGGATTCGCTGTTACCGGAC-3'
<i>irp2</i> -R	5'-AACTCCTGATACAGGTGGC-3'
<i>fhuA</i> -F	5'-CAGCAGAACAACCGAAGCAAGA-3'
<i>fhuA</i> -R	5'-TTGAGGTCGTGGCGTAATCGT-3'
<i>sodB</i> -F	5'-ACCACCAGGCGTATGCTACTAA-3'
<i>sodB</i> -R	5'-TGCCGAAAAGATTGGCGATT-3'
<i>sltA</i> -F	5'-CGCAGCCGCTACGCACAAAT-3'
<i>sltA</i> -R	5'-TCGGTTACATCGTACCCATCA-3'

## 2 结果

### 2.1 排污口细菌多样性

通过 DNA 提取与 16S rRNA 基因 PCR 扩增、阳性克隆筛选、RFLP 分析和序列比对, 利用限制性内切酶 *Hae* 对扩增片段进行酶切, 经电泳产生了丰富的谱带类型, 不同类型包含的酶切片段数目不同, 多数为 3 条带, 多态性片段条带丰富, 多态性良好(图 1)。将不同谱带类型对应的阳性克隆测序。根据结果建立四月份排污水体细菌的系统进化树(图 2, 图 3, 图 4, 图 5)。98 株细菌分属于 4 个门 5 个纲(Gammaproteobacteria, Epsilonproteo bacteria, Flavobacteriia, Bacilli, Betaproteobacteria)9 个目的 13 个科 21 个属 98 种。Gammaproteobacteria 菌群最大, 包括 9 个科 13 个属 67 个种细菌; Enterobacteriaceae 科、Vibrionaceae 科菌群最大, 分别为 9 个属、7 个属, 其中 *Enterobacter* 属有 13 株菌, 占该纲菌株数的 48.1%, 而 *Enterobacter cloacae* 为优势种, 有 21 株菌, 分 2 个系统发育型, 占该属菌株数的 69.2%; 另外, *Vibrio* 属也有较



图 1 细菌 16S rDNA PCR 产物经 *Hae* 酶切后的电泳图谱  
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of amplified 16S rDNA digested with *Hae*

多菌株, 占该纲菌株数的 37.0%, *Vibrio harveyi* 占据优势地位, 有 9 株菌, 分 3 个系统发育型, 占该属菌株数的 78%。Bacilli 纲为第二优势纲, 有 16 株菌, 占异养细菌总数的 16.3%, 包括 4 个属 6 个种, 其中 *Bacillus thuringiensis* 为最优势种, 有 9 株菌, 占该纲菌株数 56.2%。其余三个纲及其它种的菌株数量较少。

3 月份水样的细菌中变形菌门(Proteobacteria)为优势菌群, 占 75.8%, 其中以 $\gamma$ -变形杆菌纲比例最高, 占 62%, 检测到的细菌分布于海洋螺菌目(Oceanospirillales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、弯曲菌目

(Campylobacteriales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、交替单胞菌目(Alteromonadales)、肠杆菌目(Enterobacteriales)、伯克氏菌目(Burkholderiales); 5 月份较 3 月份细菌群落结构复杂, 含黄杆菌目(Flavobacteriales)、弧菌目(Vibrionales); 8 月份细菌群落结构与 5 月份相似; 10 月份与 3 月份细菌群落结构基本一致。工业与综合排污站位的群落结构相似, 与市政排污站位差异较大。工业与综合排污细菌中变形菌门(Proteobacteria)为优势菌群, 占 68%, 其中以 $\gamma$ -变形细菌纲丰度最高, 占 45%, 此外检测到的细菌还分布于拟杆菌门(Bacteroi-



图 2 3 月份细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树  
Fig.2 Dendrogram for bacteria based on 16S rRNA gene sequences in March

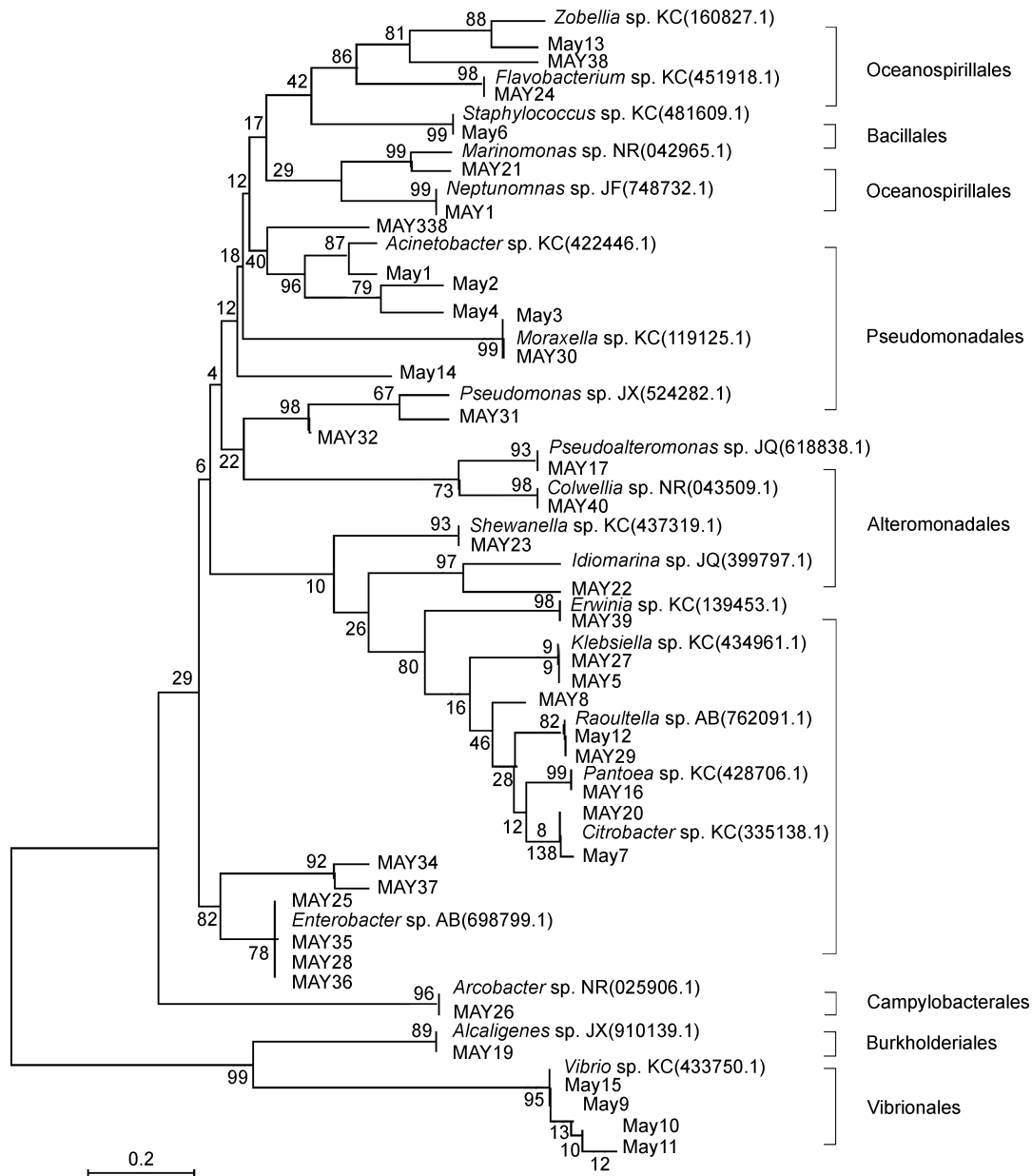


图 3 5 月份细菌的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.3 Dendrogram for bacteria based on 16S rRNA gene sequences in May

detes)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria), 分别占 12%、11%和 8%。而市政排污细菌主要为变形细菌门(Proteobacteria)的 $\gamma$ - $\epsilon$ -亚族和厚壁菌门(Firmicutes)。其中肠杆菌属(*Enterobacter*)、弓形菌属(*Arcobacter*)和梭菌属(*Clostridium*)的细菌比例最高。分别为 57.6%、32.6%和 21.7%。阴沟场杆菌(*Enterobacter cloacae*)为最优势菌种。

## 2.2 *irp2*、*fhuA*、*sltA*、*sodB* 基因结构特点

*irp2*、*fhuA*、*sltA*、*sodB* 的多重 PCR 扩增结果见图 6, 将所得片段克隆测序, 利用 DNA Star、MEGA 4 等软件对 *irp2*、*fhuA*、*sltA*、*sodB* 核心序列进行编辑,

剪除引物区, 与部分其它物种进行多序列对位分析比较, 并通过邻接法构建系统进化树。如图 7、图 8、图 9、图 10, 由图的拓扑结构可以看出阴沟肠杆菌毒力基因与大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*) 同源性相对较近。

## 2.3 *fhuA*、*sltA*、*irp2*、*sodB* 基因在排污口细菌中的分布

应用所建立的多重 PCR 方法检测了 98 种陆源排污口分离菌株中 *fhuA*、*irp2*、*sltA*、*sodB* 毒力基因的分布情况。在 98 株分离菌株中 *fhuA*、*irp2* 基因的携

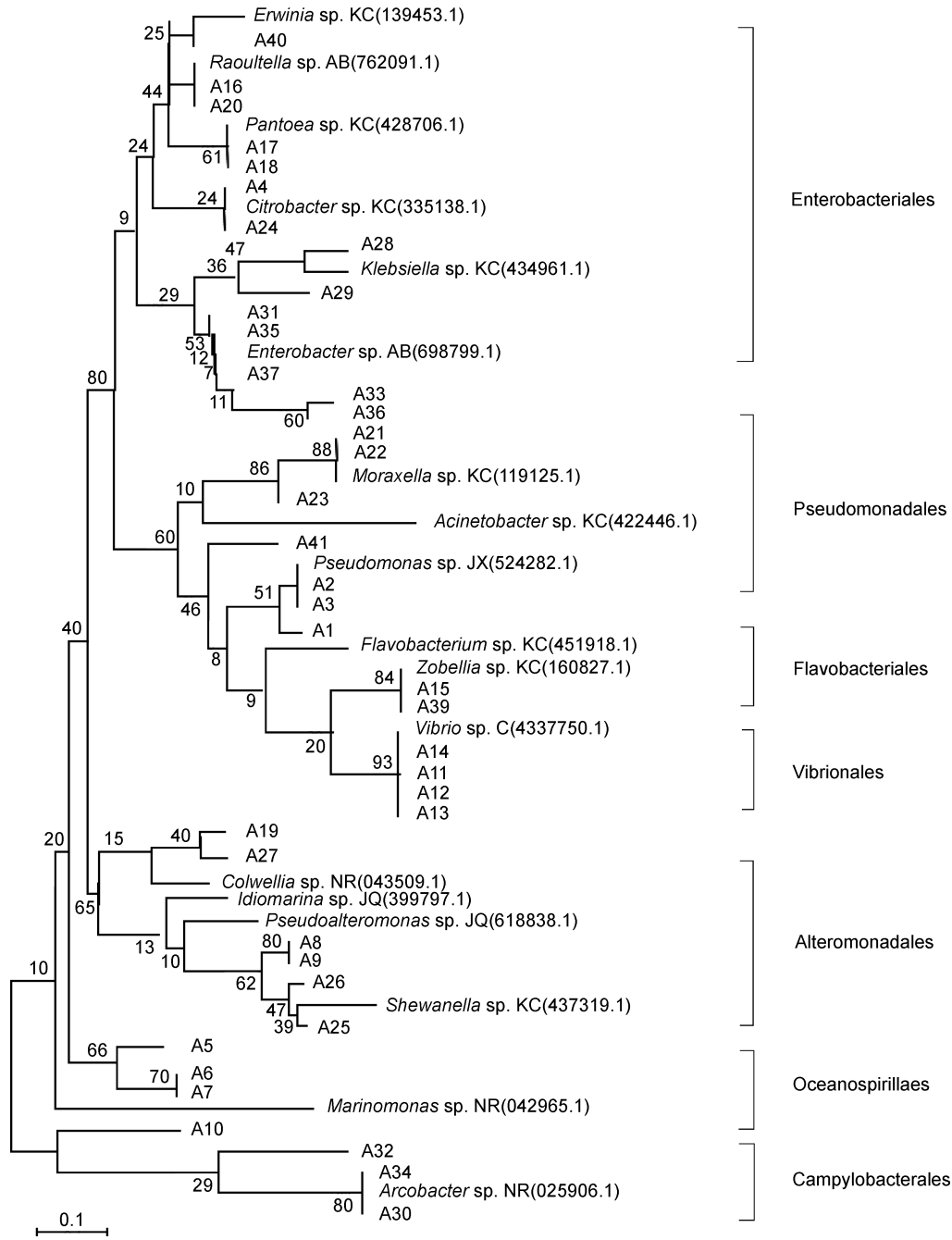


图 4 8 月份细菌的 16S rDNA 序列构建的系统发育树  
 Fig.4 Dendrogram for bacteria based on 16S rRNA gene sequences in August

带率很高, 主要分布于 7 个毒力基因型(表 2), 部分多重 PCR 电泳检测图谱见图 11。

### 3 讨论

#### 3.1 细菌群落多样性分析

陆源污染物入海是造成我国近岸海域环境污染和生态损害的主要原因(Swartz *et al*, 1985)。4 个月份的细菌群落结构差异证明, 随着时间的更替, 群落结

构发生较明显变化, 3 月份与 10 月份主要类群为肠杆菌属、假单胞菌属及交替单胞菌属, 而 5 月份与 8 月份主要有肠杆菌属、弧菌属、希瓦氏菌属等。由于采样时间不同造成站位间海水的温度差异, 导致弧菌属主要出现在 5、8 月份, 验证了温度上升促使水生弧菌增长加速, Bej 等(1996)对波罗的海的研究发现, 水温每上升 1℃, 弧菌数量就会增加 200%。而从空间上 10 个排污口分离的细菌菌落研究表明, 随着污染的

加重, 微生物群落结构的差异性越明显, 污染较严重的工业与综合排污口站位的微生物群落结构变化与市政排污站位差异较大, 污染环境下微生物群落多样性表现出的上述趋势已在很多研究中得到论证: 在香港维多利亚湾, Zhang 等(2008)通过 RFLP 克隆文库的方法, 发现污染区域两个站位微生物群落的平均物种丰度为 47, 香农指数 3.72, 均匀度 0.89, 均明显高于对比清洁站位的微生物群落结构的相应参数 (分别为 33、3.24、0.78); Schäfer 等(2001)在营养盐的

富集模拟实验中, 监测了微生物群落结构组成的变化, DGGE 图谱结果说明控制组的微生物丰度明显低于富集组; 李佳霖等(2011)应用 T-RFLP 对大连长山群岛海岸带沉积物微生物群落结构特征的研究, 结果显示养殖污染较严重的站位的微生物群落丰度较高, 优势物种不明显, 不同物种的均匀度高于其它站位; 在污染严重的环境中, 较高的微生物多样性能够完成更多的生物循环过程, 从而保持生态系统的稳定性, 因此微生物丰度的增加是微生物群落适应环境

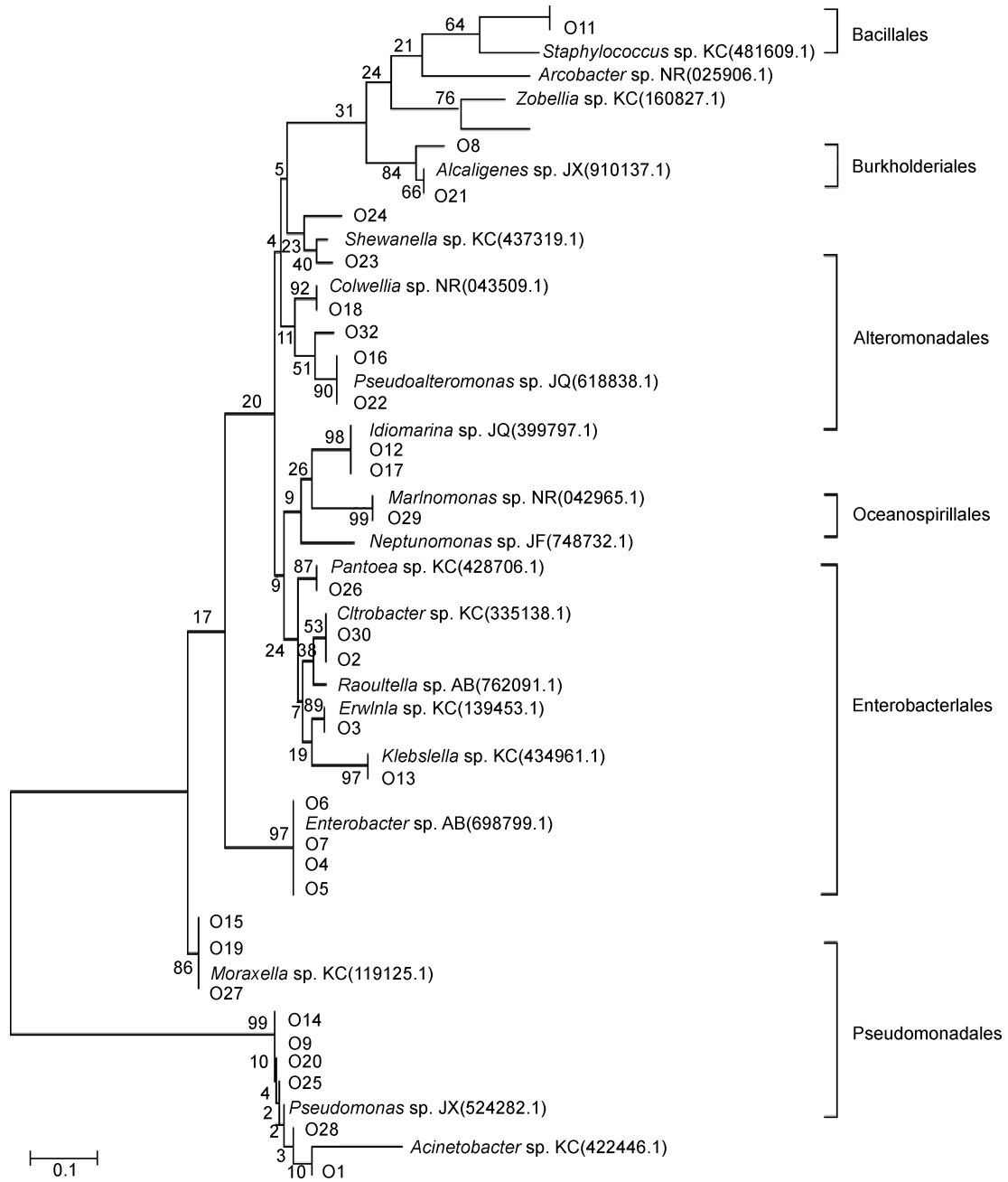


图 5 10 月份细菌 16S rDNA 序列构建的系统发育树  
Fig.5 Dendrogram for bacteria based on 16S rRNA gene sequences in October

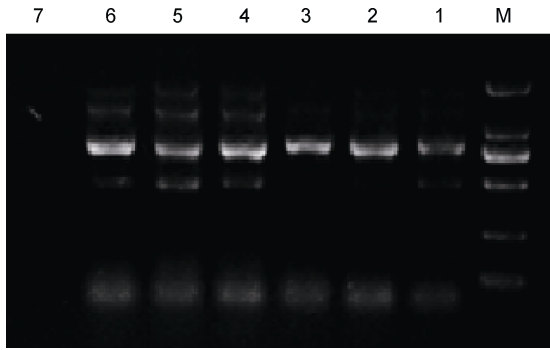


图 6 *irp2*、*fhuA*、*sltA*、*sodB* 的多重 PCR 扩增产物电泳图  
 Fig.6 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification of *irp2*、*fhuA*、*sltA*、*sodB*  
 1、2、3、4 为 *E. cloacae* ATCC, 5、6 为 *E. cloacae* 排污口分离菌株, 7 为阴性对照(4、5 为最终优化体系, 扩增效果最好)

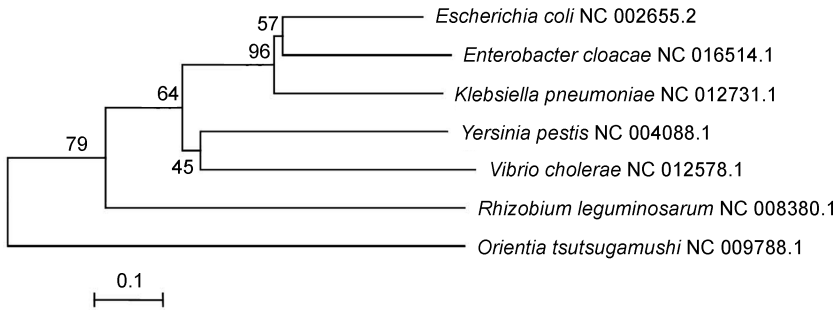


图 7 *sodB* 基因的系统进化树

Fig.7 The phylogenetic tree of *E. cloacae*'s *sodB*

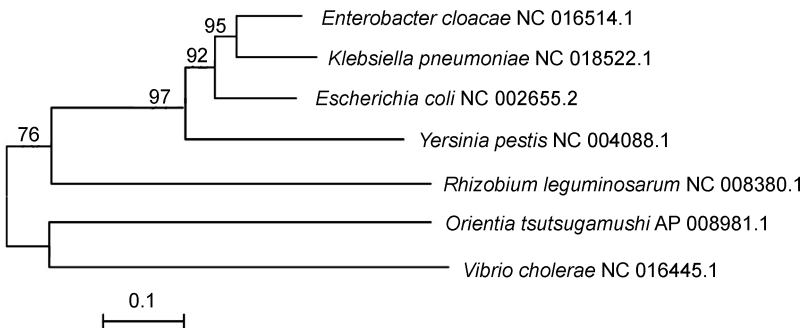


图 8 *sltA* 基因的系统进化树

Fig.8 The phylogenetic tree of *E. cloacae*'s *sltA*

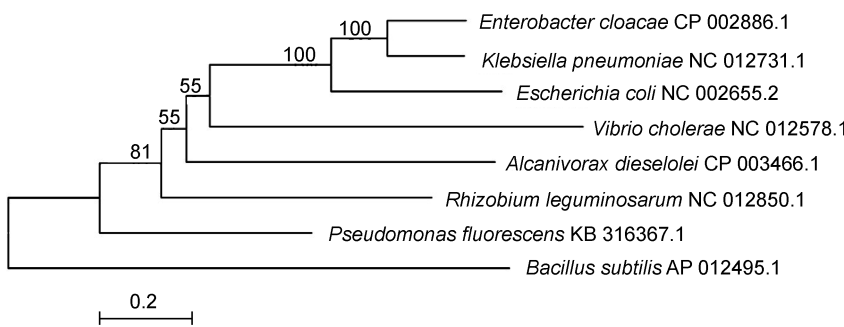


图 9 *fhuA* 基因的系统进化树

Fig.9 The phylogenetic tree of *E. cloacae*'s *fhuA*

变化的表现(Mimura *et al*, 2005; Drake *et al*, 2007; 刘兵等, 2009)。本研究中微生物群落主要包括变形细菌、拟杆菌、厚壁菌、放线菌等多个功能类群, 变形菌门中的 $\gamma$ -变形细菌亚门是最为优势的类群, 其主要构成是肠杆菌目, 是典型的异养厌氧型微生物, 文库中与多数测序细菌处于同一进化枝的为阴沟肠杆菌和志贺氏菌属, 均为致病菌(Nochi *et al*, 2009), 说明环境的污染程度较为严重。拟杆菌门和厚壁菌门细菌能够降解环境中的有机质, 此外, 拟杆菌门细菌也是赤潮藻类的共生细菌, 与赤潮的发生有一定的联系(Aguiló-Ferretjans *et al*, 2008)。

### 3.2 毒力基因的分布特点

铁是所有细菌活细胞代谢必要的微量营养元素。

研究发现, 铁不仅影响病原菌的生长, 还与病原菌的致病性密切相关, 它调控着许多致病基因的表达。铁调节蛋白 *irp2*、铁载体外膜受体蛋白 *fhuA* 编码产生了细菌外膜上摄取和接收铁色素的外膜蛋白。李刚山等(2007)对多种致泻微生物分离时检出的 9 株阴沟肠杆菌也做了小肠结肠炎耶尔森菌 HPI 毒力岛 *irp2* 基因的检测, 结果 9 株阴沟肠杆菌毒力岛 *irp2* 基因均为阳性。类志贺样毒素 *sltA* 是一种铁螯合蛋白相关基因, Ohmura 等(1993)从野生株提纯的志贺样毒素 *SLT* 做了许多生化及毒理方面的实验, 证实其可以抑制细胞蛋白质的合成和引起细胞凋亡; 含铁超氧化物歧化酶 *sodB* 是 *Fur* 中一类将过氧化物基团换转成  $H_2O_2$  和  $O_2$  的金属酶, 在氧化胁迫时细菌通过 *Fur* 数量上的变化来增加细胞质的  $Fe^{2+}$  结合能力、抑制铁的运输以及诱导铁储藏系统的表达等(Mimura *et al*, 2005)。国内针对 *sodB* 的研究侧重于在福氏志贺氏菌中克隆及其在该菌致病性中的作用。本研究建立了可以同时快速准确检测 4 种主要毒力基因的多重 PCR 方法, 对试验标准菌株及对照菌株进行检测, 结果说明敏感性和特异性均较好, 而且 *fhuA*、*irp2*、*sltA*、*sodB* 基因广泛存在于陆源排污口分离菌株中。

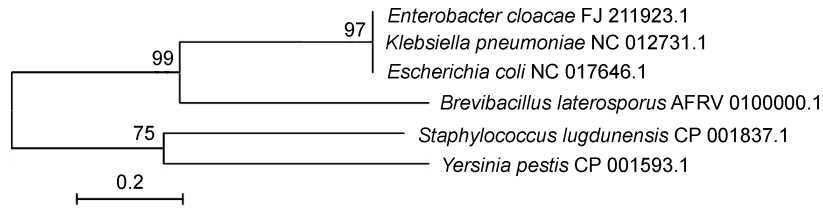


图 10 *irp2* 基因的系统进化树

Fig.10 The phylogenetic tree of *E. cloacae*'s *irp2*

表 2 毒力基因型统计分析

Tab.2 The statistics analysis of the virulence genotypes

毒力基因型	菌株数	所占比例(%)	毒力基因型	菌株数	所占比例(%)
<i>fhuA+irp2+sodB+</i>	22	35.71	<i>fhuA+irp2+</i>	9	9.89
<i>fhuA+irp2+sltA+</i>	20	25.27	<i>sltA+sodB+</i>	8	8.79
<i>irp2</i>	15	13.19	<i>fhuA+irp2+sodB+sltA+</i>	8	8.79
<i>fhuA</i>	11	12.09			

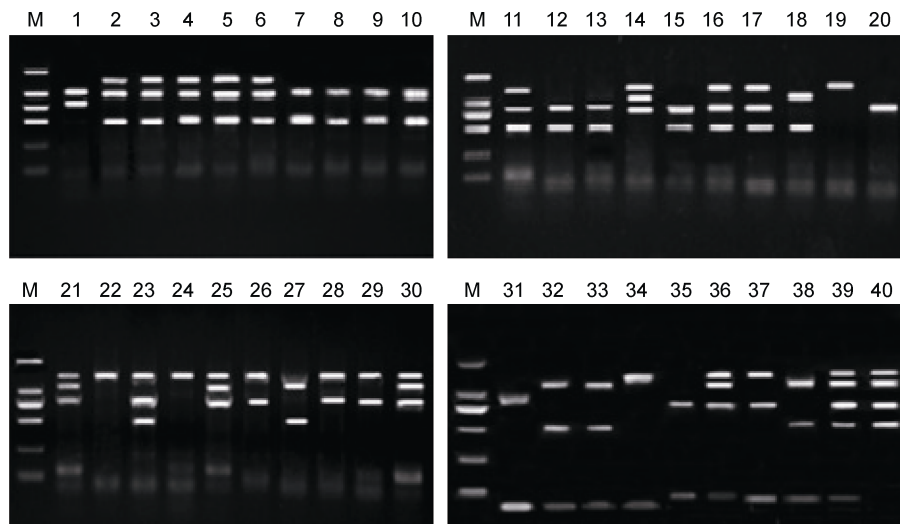


图 11 多重 PCR 扩增产物电泳图

Fig.11 Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR amplification

参 考 文 献

刘 兵, 李 宇, 叶 倩等, 2009. 链状亚历山大藻共附生细菌多样性. 生态学杂志, 28(5): 889—894

李丰生, 黄培堂, 芮贤良等, 1991. 痢疾志贺氏 I 型菌毒素基因的克隆与表达. 微生物学报, 36: 420—425

李刚山, 范泉水, 徐 庆等, 2007. 国内首次发现携带耶尔森菌 HPI 毒力岛 *irp2* 基因的阴沟肠杆菌. 中国热带医学, 7(4): 4502—4503

李佳霖, 王中华, 秦 松等, 2011. 大连长山群岛海岸带沉积物微生物群落结构特征. 微生物学报, 51(5): 656—666

Aguiló-Ferretjans M M, Bosch R, Martín-Cardona C *et al*, 2008. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). Systematic and Applied Microbiology, 31(3): 231—240

Andrews S C, Robinson A K, Rodríguez-Quiñones F, 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiology Reviews, 27 (2—3): 215—237

Baltes N, Tonpitak W, Hennig-Pauka I *et al*, 2003. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 siderophore receptor *FhuA* is not required for virulence. FEMS Microbiology Letters, 220(1): 41—48

Bej A K, Ng W Y, Morgan S *et al*, 1996. Detection of viable *Vibrio cholerae* by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Molecular Biotechnology, 5(1): 1—10

Braun V, 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. International Journal of Medical Microbiology, 291(2): 67—79

Drake L A, Doblin M A, Dobbs F C, 2007. Potential microbial



- bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm. *Marine Pollution Bulletin*, 55(7): 333—341
- Hentze M W, Muckenthaler M U, Andrews N C, 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3): 285—297
- Locher K P, Rees B, Koebnik R *et al*, 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated *FhuA* receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell*, 95(6): 771—778
- Mimura H, Katakura R, Ishida H, 2005. Changes of microbial populations in a ship's ballast water and sediments on a voyage from Japan to Qatar. *Marine Pollution Bulletin*, 50(7): 751—757
- Neilands J B, 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45): 26723—26726
- Nochi Z, Sahebkhari N, Kharaziha P *et al*, 2009. Comparison of 16S rRNA, 23S rRNA and *gyrB* genes sequences in phylogenetic relationships of *Shigella* isolates from Iran. *Annals of Microbiology*, 59(3): 615—622
- Ohmura M, Cao C, Karasawa T *et al*, 1993. Purification and some properties of a Vero toxin 2 (Shiga-like toxin II) variant (SLT-IIva) of *Escherichia coli* isolated from infantile diarrhea. *Microbial Pathogenesis*, 15(5): 399—405
- Sakamoto H, Touati D, 1984. Cloning of the iron superoxide dismutase gene (*sodB*) in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 159(1): 418—420
- Schäfer H, Bernard L, Courties C *et al*, 2001. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3): 243—253
- Schubert S, Rakin A, Heesemann J, 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2): 83—94
- Swartz R C, Schults D W, Ditsworth G R *et al*, 1985. Sediment toxicity, contamination, and macrobenthic communities near a large sewage outfall. *Special Technical Testing Publication*, 865: 152—175
- Zhang W, Ki J S, Qian P Y, 2008. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(3): 668—681

## RESEARCH OF THE STRUCTURE DIVERSITY OF BACTERIA FORM NINGBO COASTAL OUTFALL AND VIRULENCE GENES ASSOCIATED WITH IRON METABOLISM

ZHANG Di-Jun, LI Chun-Li, ZHOU Jun, ZHANG Chun-Dan,  
WANG Zhong-Hua, SU Xiu-Rong  
(School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211)

**Abstract** To analysis the trend of the zoonotic pathogens structure diversity from Ningbo coastal outfall related to the human activates and environmental factors, multiple PCR was used to detect the virulence genes associated with the iron metabolism such as *fhuA*, *irp2*, *sltA* and *sodB* which are in *Enterobacter*. The structure diversity of bacteria form Ningbo coastal outfall was analyzed through PCR amplification of 16S rRNA and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis technology; the multiple PCR system on the *Enterobacter* rail carrier outer membrane receptor protein *fhuA*, iron regulatory protein *irp2*, Shiga-like toxin *sltA*, super oxide dismutase content with iron *sodB* was established; then the metabolism related virulence genes in the distribution of Ningbo coastal outfall was detected by using this system. More than 1000 strains, 98 kinds of bacteria were isolated and purified from Ningbo coastal outfall in March, May, October and December in 2011, the sequence analysis of 16S rRNA showed that, these points belong to 4 doors 5 classes 13 families and 21 species respectively, among them, gamma proteus classes (67 strains, 68.4%) and bacillus classes (16 strains, 16.3%) were the major classes in Proteobacteria and Firmicutes. Among the 98 strains of bacteria, the detection rate of *fhuA+irp2+sodB* genotype was 35.71%, *fhuA+irp2+sltA+* was 25.27%, *irp2* was 13.19%, *fhuA* was 12.09%, *fhuA+irp2+* was 9.89%, *sltA+sodB+* was 8.79%, *fhuA+irp2+sodB+sltA+* was 8.79%.

**Key words** coastal outfall; iron metabolism; virulence gene; PCR