

# 一株高锰氧化活性大肠杆菌的分离鉴定和 多铜氧化酶基因的克隆与结构特性

崔晓彦<sup>1</sup> 张震<sup>2</sup> 杨伟红<sup>1</sup> 张忠明<sup>1</sup> 刘凡<sup>2</sup> 李林<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

(2. 华中农业大学 农业部亚热带农业资源与环境重点实验室 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 锰氧化物是 Mn(II)经生物和化学氧化后形成的矿物成分,在元素生物地球化学循环过程中起着重要作用,而不同种类的细菌对 Mn(II)的氧化作用是自然界中氧化锰矿物形成的主要成因。从山东崂峪采集的铁锰结核棕壤中分离得到一株具有高锰氧化活性的土壤杆菌,其对 Mn(II)的氧化作用活性明显高于其它分离菌株,达到 65  $\mu\text{mol/L}$ 。通过个体形态与培养特征观察、生理生化反应、G+C mol% 测定和 16S rRNA 基因序列比对分析等鉴定,确定该菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*),命名为 MB266。进一步对该菌株参与锰氧化作用的多铜氧化酶基因 *mco* 进行了克隆、序列与基因结构分析(GenBank 登录号: JF682492)。结果表明,该基因编码的 MCO 蛋白与已报道的大肠杆菌 III 型多铜氧化酶的氨基酸同源性达 99%,而与已被深入研究的恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) MnB1 菌株锰氧化酶 CumA 的氨基酸序列的相似性仅有 19.2%,但 MCO 与 CumA 二者的一级结构中都存在 2 个保守的铜氧化超家族,而每个保守结构域内又都存在 2 个保守的铜离子结合位点,且二者在二级结构上都存在多个  $\beta$ -折叠片,并形成 2 个  $\beta$ -桶结构域,这些结构上的共性可能与它们均具有对 Mn(II)的氧化活性有关。大肠杆菌野生菌株具有锰氧化活性这一特性目前尚未见于文献报道。

**关键词:** 锰氧化作用, 大肠杆菌, 鉴定, 锰氧化基因

## Isolation and identification of an *Escherichia coli* strain with high manganese-oxidizing activity and cloning and characterization of its multicopper oxidase gene

CUI Xiao-Yan<sup>1</sup> ZHANG Zhen<sup>2</sup> YANG Wei-Hong<sup>1</sup> ZHANG Zhong-Ming<sup>1</sup>  
LIU Fan<sup>2</sup> LI Lin<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(No. 40830527)

\*通讯作者: Tel: 86-27-87286952; 邮箱: lilin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2011-04-08; 接受日期: 2011-06-17

(2. Key Laboratory of Subtropical Agricultural Resource and Environment, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Manganese oxides are a type of high-reactive minerals that formed from biochemical and chemical oxidations of manganese(II), which are capable of influencing significantly the transport and fate of many major and trace elements in the biogeochemical cycles. Increasing evidence is showing that microorganisms, especially a variety of bacteria, play a dominant role in the oxidation of dissolved Mn(II) in natural systems. In this study, a soil-borne bacterial isolate with a maximum manganese-oxidizing activity by 65  $\mu\text{mol/L}$  (it was apparently higher than that of other isolates by using the standard leucoberbelin blue assay procedure), was screened from the Fe/Mn nodule-surrounding brown soil samples that taken in Queyu, Shandong Province, China, and was identified as an *Escherichia coli* strain (named as MB266) according to the morphological, physiological and biochemical characteristics, G+C content of its genomic DNA as well as the 16S rRNA gene sequence alignment analysis. Subsequently, the multicopper oxidase encoding gene (*mco*) of MB266, which was thought to involve in manganese(II) oxidation, was cloned and characterized (GenBank accession number: JF682492). It showed that the corresponding protein, MCO, was highly similar (by 99.0%) with the previously reported *E. coli*-harboring type III multicopper oxidase at their amino acid sequences, whereas the similarity of amino acid sequences was very limited (by only 19.2%) with a currently well-characterized bacterial manganese oxidase, manganese oxidase CumA of *Pseudomonas putida* MnB1. However, the conserved structural domain analysis using online tool CDART revealed that two conserved copper-oxidizing super family domains in both proteins, together with two conserved Cu(II)-binding sites in each conserved domain. Additionally, it appeared that multiple  $\beta$ -sheets in both proteins that were able to form  $\beta$ -barrel domains in their predicted secondary structures. Thus, the structural intercommunity between MCO and CumA might contribute to their similar biochemical activities in manganese oxidation. The manganese-oxidizing activity of an *E. coli* wild-type strain is a distinctive feature that has not been reported prior to this study.

**Keywords:** Manganese oxidization, *Escherichia coli*, Identification, Manganese-oxidizing gene

土壤中的氧化锰矿物是原生矿物风化和成土过程的产物,一般认为其形成有化学和生物学两方面的成因,其中土壤微生物由于可以合成具有特异代谢活性的酶蛋白以及特异代谢途径,其对 Mn(II)的氧化速度相比化学作用要快十几万倍,因而被认为是自然界中氧化锰矿物形成的主要成因<sup>[1-2]</sup>。目前研究表明,具有锰氧化活性的微生物主要是一些细菌类群,称之为“锰氧化细菌”(Manganese-oxidizing bacteria),它们往往通过其特有的锰氧化酶在其细胞表面直接将 Mn(II)氧化为 Mn(III)或 Mn(IV)型氧化物;抑或藉胞内代谢作用和细胞外壁的多种大分子物质,来键合、富集和吸附 Mn(II),并通过改变

细菌细胞周围微环境的 pH 值和 Eh 值,或释放代谢末端产物,从而氧化 Mn(II)或加速 Mn(II)自发形成高锰氧化物<sup>[3]</sup>。

研究各种锰氧化细菌在自然生境中的分布、从中分离和鉴定各种特异性种群是进一步研究锰氧化细菌的多样性与锰氧化作用分子机制的基础。迄今已从不同海底沉积物生境和水域环境中发现了多种具有锰氧化活性的细菌类群,其主要类群包括有低 G+C 含量的厚壁菌门(Firmicutes)中的芽胞杆菌属(*Bacillus*)、利斯特氏菌属(*Listeria*)和盐杆菌属(*Halobacillus*);高 G+C 含量的放线菌门(Actinobacteria)中的节杆菌属(*Arthrobacter*)、棒杆菌

属(*Corynebacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和*Chrysiogenetes*属;分别属于 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -变形菌亚纲(Proteobacteria)的纤发菌属(*Leptothrix*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土微菌属(*Pedomicrobium*)、赤细菌属(*Erythrobacter*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、橙单胞菌属(*Aurantimonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、副球菌属(*Paracoccus*)、海洋螺菌属(*Oceanospirillum*)、*Geobacter*属和*Caldimonas*属等<sup>[3]</sup>,但目前对于土壤环境中的锰氧化细菌的研究工作却很少。由于生境上的差异,土壤中的锰氧化细菌与海洋或淡水中的锰氧化细菌的锰氧化机制可能存在较大的差异性。深入研究土壤锰氧化细菌的生态分布和氧化机制,对于理解土壤细菌的锰氧化作用及其在锰及其相关元素的生物地球化学循环中的作用,有着重要的研究意义。

本文报道从国内一处铁锰结核土壤中分离和鉴定一株具有较高锰氧化活性细菌及其多铜氧化酶(Multicopper oxidase)编码基因(*mco*)的实验结果。经过对该菌株氧化Mn(II)化合物的活性、生长特性、*mco*基因及结构信息的测定与分析,并在综合测定其个体形态特征、部分生理生化特性和分子生物学特性的基础上,将其鉴定为大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株。有关大肠杆菌野生型菌株具有锰氧化活性的特性,目前尚未见于文献报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 土 样

土壤样品为从山东烟台采集的含有一定量铁锰结核的棕壤表层(0-20 cm)新鲜土壤,该层土壤属于钙积潮湿变性土(Calci-Aquic Vertisols)。采集的土样置密封的无菌塑料袋中于4 °C保存,并在1周后进行细菌菌群的分离。

### 1.2 菌株和培养基

**1.2.1 标准菌株:**用于形态学观察、生理生化实验和G+C mol%测定的标准参照菌株大肠杆菌K<sub>12</sub>菌株,由美国耶鲁大学CGSC(The Coli Genetic Stock Center)惠赠。

**1.2.2 培养基:**牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏5.0 g,蛋白胨10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2,

以 $1 \times 10^5$  Pa灭菌30 min,用于土壤中可培养细菌的分离;Luria-Bertani (LB)培养基:胰蛋白胨10.0 g,酵母提取物5.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2, 以 $1 \times 10^5$  Pa灭菌30 min,用于分离的锰氧化细菌的培养;K培养基:胰蛋白胨2.0 g, 酵母提取物0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 1.0 mol/L MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.0 mL (其中无机盐FeSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>和MnCl<sub>2</sub>均为在培养基灭菌后通过无菌滤器过滤加入), 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2, 以 $1 \times 10^5$  Pa灭菌30 min,用于锰氧化活性菌株的分离及锰氧化活性的测定。固体培养基是在上述各培养基中添加1.5%的琼脂而成。

### 1.3 方 法

**1.3.1 锰氧化活性菌株的筛选:**取1 g土样用灭菌ddH<sub>2</sub>O配置成1% (W/V)悬液,再取其 $10^{-3}$ 稀释液100  $\mu$ L接种于牛肉膏蛋白胨培养液100 mL中富集培养24 h,然后取其 $10^{-4}$ 稀释液100  $\mu$ L涂布于牛肉膏蛋白胨平板,30 °C培养分离单菌落后进行划线分离纯化,观察测定其培养状况。将纯化菌种接种到含有1 mmol/L浓度Mn(II)的LB平板上,30 °C培养3 d后观察测定其锰氧化活性。

**1.3.2 分离菌株锰氧化活性的测定:**取在含1 mmol/L Mn(II)的液体K培养基中于30 °C振荡培养3 d后的菌液1 mL离心,去上清液,加适量的10 mmol/L HEPES缓冲液悬浮菌体,然后按1:5比例(V/V)加入浓度为0.04%的LBB (N,N'-dimethyl-amino-p,p'-triphenylmethane-o''-sulphonic acid)试剂,充分混合,室温下于暗处反应30 min后,参照文献[4]的方法判定其锰氧化活性的阴性与阳性结果,并用KMnO<sub>4</sub>标准曲线法定量测定阳性菌株的锰氧化活性值<sup>[4]</sup>。

**1.3.3 生长曲线测定:**将等量纯培养菌株分别接种于含有0和1 mmol/L Mn(II)的100 mL LB液体培养基中,30 °C振荡培养,每隔2 h取样测定其OD<sub>600</sub>值,绘制生长曲线。实验重复3次取平均值。

**1.3.4 分离菌株的形态观察与生理生化特征测定:**分离菌株的简单染色、革兰氏染色后的光学显微镜观察和扫描电镜(JSM-6390/LV型,日本NTC)观察,以及葡萄糖发酵产酸产气、乳糖发酵试验、甲基红实验、

V-P 实验、吲哚产生、穿刺培养、产  $H_2S$  实验等生理生化特征的测定均按文献所示的方法进行<sup>[5-6]</sup>。

**1.3.5 G+C mol%的测定:** 制备分离菌株的总DNA, 用苯酚/氯仿/异戊醇混合液进行抽提纯化<sup>[7]</sup>, 使其  $OD_{230}:OD_{260}:OD_{280}$  接近于0.454:1.000:0.515, 然后按照热变性法<sup>[8]</sup>, 用Beckman DU800型分光光度计测定该DNA的熔解温度( $T_m$ 值), 以大肠杆菌K<sub>12</sub>菌株作为标准参考菌株, 按公式  $G+C \text{ mol}\% = 51.2 + 2.08 \times (T_{m\text{未知菌}} - T_{m\text{K12}}) \times (0.1 \times SSC \text{ 溶液})$  计算分离菌株的G+C mol %含量。

**1.3.6 总DNA的制备、PCR扩增16S rRNA基因与序列分析:** 细菌菌株的总DNA制备参照标准方法进行<sup>[7]</sup>。以所制备的总DNA为模板, 用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTGTTCAGACTT-3')进行16S rRNA基因的PCR扩增反应。PCR反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30个循环; 72 °C 10 min。用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 并用快速凝胶回收试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)回收扩增产物, 然后由北京三博远志生物科技有限公司进行测序。测序结果用BLAST软件与GenBank核酸数据库中相关种属的16S rRNA基因序列进行同源性比较, 然后用MEGA 4.0.2软件包中的Phylogeny以邻接法(Neighbor-Joining)进行系统发育树的构建, 采用重抽样法(Bootstrap test)对分支点的置信度进行评价, 重复抽取数为1 000次, 以Kimura-2参数模型进行遗传距离计算<sup>[9-10]</sup>。

**1.3.7 分离菌株mco基因的扩增与序列分析:** 用于分离菌株扩增mco基因的引物是参照GenBank中大肠杆菌的多铜氧化酶基因cueO序列(GenBank登录号为: NP\_414665、NP\_285819.1、YP\_003043351.1和YP\_002925318.1)进行Alignment比对后根据保守序列来进行设计, 其上游引物为P<sub>1</sub>: 5'-ATGCAACGTCGTGATTTC-3'; 下游引物为P<sub>2</sub>: 5'-TTATACCGTAAACCCTAAC-3'。扩增mco基因的PCR反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 60 s, 72 °C 90 s, 25个循环; 72 °C 10 min。PCR扩增产物经纯化回收后, 由北京三博远志生物科技有限公司进行测序。测序结果在GenBank数据库进行BLAST分析。

## 2 结果

### 2.1 锰氧化活性菌株的初筛与活性测定

从含有一定量铁锰结核的山东崂山棕壤表层土样中初筛到8株具有锰氧化活性的菌株, 经过锰氧化活性的测定发现, 其中一株分离细菌对Mn(II)的氧化能力最强, 最高Mn(IV)浓度达到65  $\mu\text{mol/L}$ 。将该菌株在含锰培养基中培养, 每隔24 h取样用LBB定性检测是否产生氧化锰[Mn(III)或Mn(IV)], 图1, 并测定氧化锰浓度的变化曲线(图2)。由以上结果可知该菌株从48 h后开始氧化锰, 随着时间的延长生成氧化锰的量逐渐升高, 5 d后达到最高并趋于稳定。本研究将该菌株用于进一步的鉴定和锰氧化相关基因的扩增, 命名为MB266。

### 2.2 生长曲线测定

对分离菌株MB266分别在含有0和1 mmol/L Mn(II)的2种培养条件下的生长曲线进行了测定。如图2

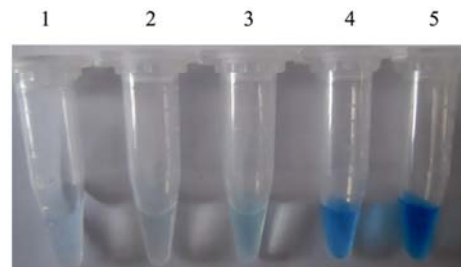


图1 MB266菌株的锰氧化活性的LBB检测反应结果

Fig. 1 LBB analysis of manganese-oxidizing reactivity of strain MB266

注: 1: 阴性对照; 2: 1 d; 3: 3 d; 4: 5 d; 5: 7 d.

Note: 1: The negative control; 2: 1 d; 3: 3 d; 4: 5 d; 5: 7 d.

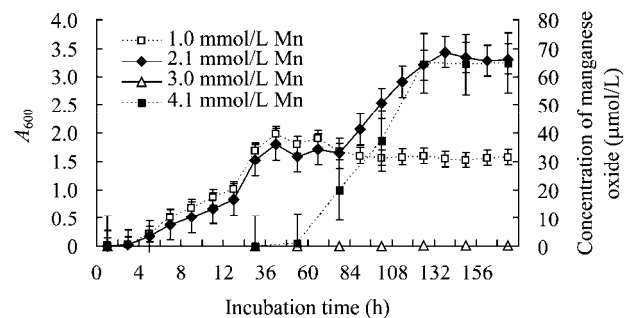


图2 MB266菌株的锰氧化活性变化及生长曲线

Fig. 2 Determined manganese-oxidizing activity and growth curves of strain MB266

注: 1, 2: 生长曲线; 3, 4: 锰氧化活性变化曲线。

Note: 1, 2: Growth curves; 3, 4: Manganese-oxidizing activity curves.

所示, MB266菌株在不含Mn(II)的培养条件下稳定期之前的生长速度略大于含Mn(II)培养基中的生长速度, 说明一定浓度Mn(II)的加入在细菌生长的初始阶段一定程度上抑制了该菌株的生长; 3 d之后菌株进入衰亡期, 但在含Mn(II)培养条件下由于菌株氧化Mn(II)生成氧化锰所以吸光值仍呈上升趋势, 5 d时达到最大, 其后保持稳定。LBB检测氧化锰的浓度发现, 细胞生长至稳定期后, 氧化锰开始形成, 说明MB266对锰的氧化发生在生长的稳定期。

### 2.3 分离菌株 MB266 的鉴定

**2.3.1 细菌形态与培养性状:** 分离菌株 MB266 在 LB 培养基上菌落呈乳白色, 圆形, 菌落边缘整齐,

表面光滑, 湿润粘稠。对MB266菌株形态进行了染色镜检和扫描电镜观察, 结果见图3, 发现MB266菌株呈直杆状, 无芽胞, 周生鞭毛, 革兰氏染色阴性。以上菌体形态和培养特征符合文献[5]中所描述的“好氧或兼性厌氧发酵型革兰氏阴性杆菌”类型细菌的特征。

**2.3.2 生理生化特性:** MB266 菌株的最适生长温度为 37 °C, 穿刺接种至半固体培养基连续培养 72 h 后, 发现其向四周扩散生长, 且在培养基水平面上有生长, 说明是好氧或兼性厌氧菌, 而且具有运动性。以大肠杆菌 K<sub>12</sub> 作为测定的标准参照菌株, MB266 菌株其它生理生化特征与标准菌株一致 (表 1)。

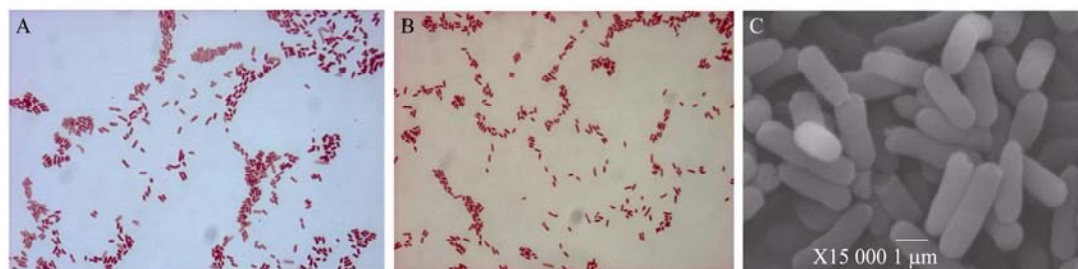


图3 分离菌株MB266的简单染色、革兰氏染色和扫描电镜观察的形态

Fig. 3 Microscopic photograph of MB191 by simple and Gram stain, and SEM observation

注: A: 简单染色镜检(×2 500); B: 革兰氏染色镜检(×1 000); C: 扫描电镜观察(×15 000).

Note: A: Simple stain (×2 500); B: Gram (×1 000); C: SEM (×15 000).

表 1 MB266 菌株的部分生理生化特征测定

Table 1 Determinative biophysical and biochemical characteristics of MB266 strain

测定项目 Determinative items	特征 Characteristics	
	MB266	<i>E. coli</i> K <sub>12</sub>
吲哚产生 Indole production	+	+
甲基红测定 Methyl red test	+	+
V-P 测定 V-P test	-	-
H <sub>2</sub> S产生 H <sub>2</sub> S production	-	-
运动性 Sports test	+	+
葡萄糖产酸 Acid production from glucose	+	+
葡萄糖产气 Gas production from glucose	+	+
乳糖产酸产气 Acid and gas production from glucose	+	+
D-甘露糖利用 D-mannose utilization test	+	+
D-甘露醇利用 D-mannitol utilization test	+	+

注: +: 结果阳性; -: 阴性结果.

Note: +: Positive; -: Negative.

**2.3.3 G+C mol%的测定:** 通过测定菌株 MB266 的热变性曲线, 得出该菌株的平均  $T_m$  值为 80.25 °C, 而相同条件下测定的标准菌株大肠杆菌 K<sub>12</sub> 菌株的平均  $T_m$  值为 80.20 °C, 由此计算出分离菌株 MB266 的 G+C mol% 值为 51.30%。根据文献[5]的检索表, 分离菌株 MB266 可鉴定到大肠杆菌属。

**2.3.4 16S rRNA 基因扩增、序列测定与系统进化分析:** 以 MB266 总 DNA 为模板, 以细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 1.5 kb 的扩增产物。将扩增产物所测定的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析, 发现其序列与大肠杆菌菌株的 16S rRNA 基因的相似性达 99%。对 BLAST 结果中具有最高相似性的近缘种群进行系统进化分析见图 4, 结果表明, MB266 可属于大肠杆菌属。根据以上形态学特征、生理生化特征、G+C mol% 含量测定及 16S rRNA 基因序列分析, 将分离菌株 MB266 鉴定为大肠杆菌。

## 2.4 MB266 菌株 *mco* 基因的扩增与序列分析

以 MB266 总 DNA 为模板, 用上下游引物 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增, 电泳结果显示得到 1.5 kb 大小条带。将扩增片段连接 T 载体测序后发现, 扩增片段为一个完整的基因编码框, 其大小为 1 551 bp, 经 BLAST 分析, 该片段序列与 GenBank 中登记的大肠杆菌 III 型多铜氧化酶的氨基酸同源性达 99%, 命名为 *mco* (GenBank 登录号: JF682492)。经 Alignment 比对分析发现, *mco* 编码的 MCO 蛋白与恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 锰氧化相关基因 *cumA* (GenBank 登录号: AF086638) 编码蛋白质的氨基酸序列的相似性只有 19.16%<sup>[11-13]</sup>(图 5)。对 MCO 和 CumA 的保守结构域利用 NCBI 数据库在线工具 CDART (Conserved domain architecture retrieval tool) 进行了分析, 发现 MCO 和 CumA 中都有 2 个保守的铜氧化超家族, 每个保守结构域内有 2 个保守的铜离子结合位点。虽然二者的氨基酸序列相似性很低, 但是保守结构域的高度相似预示着二者可能有相似的

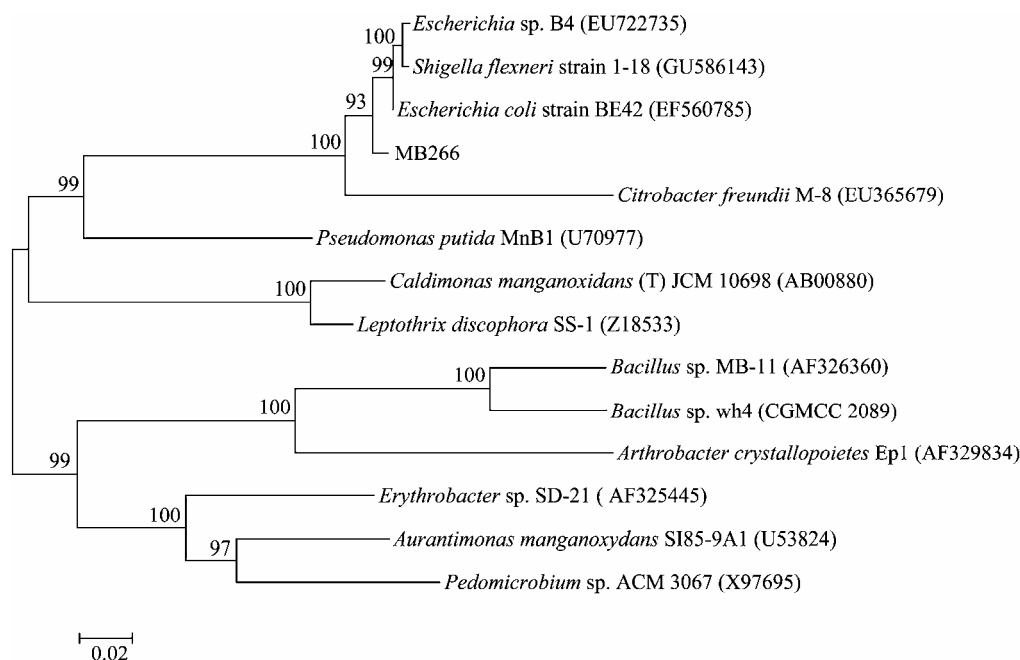


图4 基于MB266菌株16S rRNA基因序列的系统进化分析结果

Fig. 4 Phylogenetic analysis of MB266 based on the 16S rRNA gene sequences

注: 细菌种名后括号内的数字为 GenBank 的登录号; 分支旁的数字为采用重抽样法对分支点的重复抽取数为 1 000 次时的置信度(%); 左上方标尺刻度表示核苷酸序列为 2% 的差异。

Note: The numbers followed the species names denote the sequences accession numbers in GenBank. Numbers near the branches are bootstrap probability values (%) with 1 000 replicates. Scale bar represents 0.02% differences in nucleotide sequences.

生物学活性。对MCO的II级结构用在线工具“PSIPRED”(http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/)进行了分析预测,发现MCO与CumA的II级结构类似,都有多个 $\beta$ -折叠并形成2个 $\beta$ -桶结构域,这与其它锰

氧化细菌的锰氧化酶,如MnxG、Mof等的二级结构类似,而这些结构上的共性可能与它们均具有对Mn(II)的氧化活性有关。由此本文初步确定分离菌株的*mco*是与锰氧化相关的基因。

Mco.seq	MQRDFLKYS VALGVASALP VSRAVF AERPTLPI PDLLTTDARNRI QITI G. AGQSTF	59
CumA.seq	..... MSFTRRQMLKGLTGVVVVGLGAGGAARYWLGKVEEDNAGHDEYELI AAPLDVELV	54
Mco.seq	GKKTATT GYNGNLLCPAVKLRQKAVTNDI YNQLTEETLHWHGLEVPGEVGCGF...N	116
CumA.seq	PFKTEAVAFGPSAPTELRVRCETWLRRFI NHLPVETTLHWHGRLPLEMCGEVYVS	114
Mco.seq	GI I PFGKRS VTLN DCPAATCFHFFQHGKTGRQVAMFAGLVVI DDEI LKLM.PKQW	176
CumA.seq	LPVKPGEYFDYKFRNPD. AGSYVYFFHVS. . SSEELGRGLVGPLI VBEREPTGFLHERTL	171
Mco.seq	GI DDVP I VDKKF SADGQI DYCLEVMT IAVGWF GDTLLTNGAI YPCHAAFRC WLRLRL	235
CumA.seq	SLKNWFDEIG. .... AWLPFSI PREARNNTAGRLI TI NGCADSVTELEAGQVVRVRL	225
Mco.seq	LNGCMARSLNFATSDNRPLYVI SLSGGLLXEPVKVSELPVLMGERFEVLVEVNDNPKPFDL	295
CumA.seq	LNLDTWTYRLNLKGNCEAKI YELLDGNPVTP. . RPL EDDYWLCPGMRI CLAI R. ....	276
Mco.seq	VTLPVSNMGMAI APFDEKPHPVMRI CPI AI SAS GALPPTLS SL PALP SLEGLTVRKLQLSM	355
CumA.seq	... I PFAAGEE SLRIG. . FVRLGTLRSVASNDAPSDWP. . PALP PNP. .... IA	318
Mco.seq	DFM LDMGMQMLEKYGDQAMAGMHSQMMGHMGHGNHNNHGKGFIFHHANKI NGQAF	415
CumA.seq	EPDL ENAEKLNFNFEWAASVTVP LDPKPS. .... SNVQI N. GQAWI TEKTCAD. . .	367
Mco.seq	DMNKNFAAAIRQYERWVI SGGVDMMLHFFI HGTQFRI LSENGKPPAAHRAGVKDTAKV	475
CumA.seq	... RRI ATLQNGKSYI FELKNV. TCYCHPI ELHGMSKVI GSNR. . HDI KEPVFTDTYL	420
Mco.seq	EGNVSEVLKFNHDAFKEHAYIAHCHLLHEHDTGMLGFTV	516
CumA.seq	LGNERAQVALVAENF. . GTWV FHCHVI DNETGLNAAI AV	459

图5 菌株MB266的*mco*基因和恶臭假单胞菌的*cumA*基因的编码蛋白氨基酸序列的Blast分析

Fig. 5 Blast analysis of amino acid sequences encoded by *E. coli* MB266 *mco* and *P. putida* *CumA*

### 3 讨论

目前研究最多的锰氧化菌主要是从海水和淡水环境中分离得到的,而对土壤锰氧化细菌的研究较少。由于生长环境的不同,同种细菌的生理生化性质可能存在较大差异,因而土壤细菌氧化锰的分子机制可能与海洋和淡水中的细菌有较大的不同。本研究从含铁锰结核的棕壤中分离到一株高锰氧化活性菌株,经对该菌株的形态学特征和生理生化特征

的观察测定,并结合G+C mol%测定、16S rRNA基因序列测定与系统进化分析、多铜氧化酶基因的克隆与基因结构比对分析等多重方法,将其鉴定为大肠杆菌。这是首次报道大肠杆菌具有锰氧化活性的特性,从而有助于增加对土壤锰氧化细菌的种群与锰氧化作用活性的新认识。本文还观察到,MB266对Mn(II)的氧化发生在稳定期的中期,而已报道的其它锰氧化细菌对Mn(II)的氧化多发生在细胞生长的对数生长期的末期和稳定期前期,表现出明显的与其它生境来源的锰氧化细菌的差异性。目前尚不能确定这种生境与代谢特性上的差异性是否导致不同来源的锰氧化细菌形成不同的锰氧化机制。进一步通过分析确定其锰氧化相关的



蛋白(酶)及其锰氧化作用的分子机制,对于人们深入理解土壤锰氧化细菌活性、产物及其迁移转化形式和对元素地化循环的作用,以揭示它们在土壤圈中氧化锰矿物形成过程中所扮演的特殊作用无疑将具有重要意义。

在细菌锰氧化作用的研究中,已有相关报道认为是多铜氧化酶在氧化锰的过程中起催化作用<sup>[3]</sup>。在目前公认的3种锰氧化细菌的模式菌,即生盘纤发菌(*L. discophora*) SS-1和SP-6<sup>[14-15]</sup>、恶臭假单胞菌 MnB1和GB-1<sup>[11,13]</sup>、芽孢杆菌 SG-1<sup>[16]</sup>中多铜氧化酶都参与锰氧化的过程,因此多铜氧化酶被推断为重要的“锰氧化因子”。多铜氧化酶是一个种类多样的酶家族,能够利用铜离子作为辅酶氧化各种有机和无机底物。从本研究分离的菌株中扩增得到多铜氧化酶编码基因,与恶臭假单胞菌菌株的 *cumA* 基因仅有19.16%的序列相似性,但是编码的蛋白质的Ⅱ级结构和保守结构域非常类似,推断属于同一类酶。对其它大肠杆菌的基因组中的 *mco* 基因类进行分析发现,此类基因是一个单顺反子,但是其它已鉴定的锰氧化相关 *mco* 基因都位于由多个基因组成的操纵子中。一般认为不同的 MCO 是从同一蛋白进化而来,由于生存环境和物种的差异,而使 MCO 在结构和功能上有了巨大的差异<sup>[3]</sup>。但是在物种进化的过程中, MCO 的铜离子结合位点编码序列却十分保守地保留了下来<sup>[17]</sup>。本研究中所克隆的 MCO 与其它锰氧化细菌中的锰氧化相关 MCO 的保守结构域十分相似,都具有 HXH 的保守的铜离子结合位点和铜氧化超家族的保守结构域。但是其它的氨基酸残基的相似性却十分低,说明二者的主要功能可能相同,但是氧化机制可能已经有了较大的变化。针对这种由于结构的不同可能会造成 MCO 氧化锰的分子机制的不同,本实验室正在进行后续的研究工作。

## 参 考 文 献

- [1] 刘凡,冯雄汉,陈秀华,等. 氧化锰矿物的生物成因及其性质的研究进展[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 66-73.
- [2] 张震,李林,刘凡. 细菌氧化锰的分子机制[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 170-177.
- [3] Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, et al. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation[J]. Annu Rev Earth Pl Sc, 2004, 32(1): 287-328.
- [4] Johnson HA, Tebo BM. *In vitro* studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation[J]. Arch Microbiol, 2008, 189(1): 59-69.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 66-106.
- [6] 赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 121-167.
- [7] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Current Protocols in Molecular Biology[M]. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1997: 2.4.1-2.4.5.
- [8] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature[J]. J Mol Biol, 1962, 5(1): 109-118.
- [9] Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology[J]. Sysi Zool, 1971, 20(4): 406-416.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [11] Caspi R, Tebo BM, Haygood MG. C-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3549-3555.
- [12] Francis CA, Tebo BM. *CumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(9): 4272-4278.
- [13] Villalobos M, Toner B, Bargar J, et al. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1[J]. Geochim Cosmochim Ac, 2003, 67(14): 2649-2662.
- [14] Corstjens PLAM, de Vrind JPM, Goosen T, et al. Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 *mofA* gene, a gene putatively encoding a manganese-oxidizing protein with copper domains[J]. Geomicrobiol J, 1997, 14(2): 91-108.
- [15] Emerson D, Ghiorse WC. Isolation, cultural maintenance, and taxonomy of a sheath-forming strain of *Leptothrix discophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(12): 4001-4010.
- [16] Nealson KH, Ford J. Surface enhancement of bacterial manganese oxidation: implications for aquatic environments[J]. Geomicrobiol J, 1980, 2(1): 21-37.
- [17] Nakamura K, Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(18): 2050-2066.