

一株抗锰土壤芽胞杆菌的分离鉴定与生物学活性分析

王伟¹ 李林^{1*} 张忠明¹ 张震² 刘凡²

(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: 从山东烟台采集的黄棕壤中分离得到一株具有抗 Mn (II)和 Mn (II)氧化双重活性的芽胞杆菌,其最高 Mn (II)耐受浓度达到 130 mmol/L,对 Mn (II)的氧化活性为 3.3 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$ 。通过个体形态与培养特征观测、生理生化反应、G + C mol% 测定和 16S rDNA 序列比对分析等鉴定,确定该菌株为巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*),命名为 MB283。该菌株在添加 Mn (II) (10 mmol/L)条件下比不添加 Mn (II)表现出相对较快的生长速率。采用高温培养并结合 0.01% SDS 处理,从 MB283 菌株筛选到一株发生内生质粒消除的突变株 MB287,具有与野生菌株类似的锰耐受活性,且对 Mn (II)的氧化活性与野生菌株相比无明显改变,表明野生菌株 MB283 中与锰抗性和锰氧化相关的基因可能是定位于该菌的染色体上。

关键词: 锰抗性, 巨大芽胞杆菌, 锰氧化, 鉴定, 质粒消除

Identification and Characterization of a Manganese-resistant Bacilli Isolate from Soil

WANG Wei¹ LI Lin^{1*} ZHANG Zhong-Ming¹ ZHANG Zhen² LIU Fan²

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

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

Abstract: A bacilli-shaped isolate with a unique dual manganese (II)-resistant and manganese (II)-oxidizing activities was screened from the yellow brown soil samples that collected in Queyu, Shandong Province, China. It exhibited a maximum manganese-resistant activity by 130 mmol/L of Mn (II), and a maximum manganese-oxidizing activity by 3.3 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$. This isolated was identified as a *Bacillus megaterium* strain (named as MB283) according to the morphological, physiological and biochemical characteristics, G + C content as well as the 16S rDNA sequence alignment analyses. Interestingly, the cell growth of MB283 was favored by the low concentration Mn (II) (10 mmol/L). A plasmid-cured mutant strain named as MB287 was obtained by perseveringly incubation of the strain at 43°C and supplementing additionally with 0.01% SDS. It was found that this mutant strain exhibited the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40830527)

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

收稿日期: 2010-03-07; 接受日期: 2010-05-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

proximate Mn (II)-resistant and Mn (II)-oxidizing activities compared to its wild-type strain. Thus, the results indicated that the corresponding genes of manganese resistance/oxidation in MB283 could locate in its chromosomal DNA.

Keywords: Manganese resistance, *Bacillus megaterium*, Manganese oxidation, Identification, Plasmid curing

重金属锰是地壳中仅次于铁的第二大过渡金属,主要存在于海水、淡水、沉淀物及土壤矿物中^[1]。锰是人体必需的微量元素,但过量摄入可引发多种神经性疾病,含锰过高的水在工业生产中也会严重影响食品、纺织、造纸和酿造业等的产品质量^[2]。目前对于锰污染土壤的处理,主要采取在土壤中拌石灰以提高土壤 pH 值、加入某些螯合剂和利用栽培植物等途径来进行^[3];而对于锰污染水体,则主要采用传统的物理化学方法如化学沉淀、离子交换等方法^[4-5]。这些方法虽然可在一定范围内发挥作用,但由于其成本高、周期长,并且可能造成二次污染而大大影响其效果和持续性应用。因此,寻找更加有效、经济并且环保的治理途径,成为亟待解决的问题之一。

近年来,通过微生物修复技术治理重金属污染越来越受到国内外研究者的重视^[6]。微生物可以通过生物吸附、表面生物大分子吸收转运、螯合作用、沉淀作用、氧化还原反应、甲基化和去甲基化作用等,来改变重金属的化学或物理特性而影响重金属在环境中的迁移与转化^[7]。本研究从形成铁锰结核的土壤中分离具有高抗锰活性的细菌菌株,通过形态特征观察、生理生化特征测定以及 16S rDNA 序列分析对其进行了鉴定,并对其抗锰活性、锰氧化活性和相关基因的定位进行了初步分析,旨在为微生物治理金属锰污染的修复技术途径提供候选资源和研究基础。

1 材料与方法

1.1 土样

采自山东烟台的含铁锰结核和铁锰胶膜丰富的黄棕壤 A 层(0-20 cm)新鲜土壤。采集后置密封无菌塑料袋,于 4℃ 保存。

1.2 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 1000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。固体培养基加 1.5% 的琼脂; LB 培养基:胰蛋白胨 10.0 g,酵母提取物 5.0 g,

NaCl 10.0 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。固体培养基加 1.5% 的琼脂。

1.3 抗锰菌株的分离筛选

取土样稀释液涂布在牛肉膏蛋白胨平板(含 10 mmol/L Mn^{2+})上, 30℃ 培养分离单菌落后进行划线分离纯化。将纯化菌种接种到含有不同浓度 Mn (II)的 LB 平板上, 30℃ 培养 4 d 后观察其生长情况,按照文献[8]所示的方法进行分离菌株对锰最大耐受浓度(Maximal tolerant concentration, MTC)的测定。

1.4 分离菌株的鉴定

1.4.1 细菌形态特征观察与生理生化特性测定: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,以及生理生化特征的测定均按照文献[9]的方法进行。

1.4.2 G + C mol%测定:制备待测菌株的总 DNA,并用苯酚/氯仿/异戊醇混合液进行抽提纯化^[10],使其 $OD_{230} : OD_{260} : OD_{280}$ 接近于 0.454 : 1 : 0.515,然后按热变性法^[11],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 K₁₂ 菌株作为标准参考菌株,按公式 $G + C \text{ mol\%} = 51.2 + 2.08 \times (T_{m\text{-未知菌}} - T_{m\text{-K12}})(0.1 \times \text{SSC 溶液})$ 计算待测菌株的 G + C mol % 含量。

1.4.3 16S rDNA 序列分析:以制备的细菌总 DNA 为模板,用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增反应。PCR 扩增条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 90 s, 25 个循环; 72℃ 10 min。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,测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 核酸数据库中相关种属的 16S rDNA 序列进行同源性比较,然后用软件 Phylogeny 进行系统发育树构建,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 1000 次,以 Neighbor-joining 法进行遗传距离计算^[12-13]。

1.5 生长曲线测定

将等量纯培养菌株分别接种于分别含有 0 和 10 mmol/L Mn (II)的 100 mL LB 液体培养基中, 30℃ 振荡培养, 每 2 h 取样测定各自 OD_{600} 值, 绘制生长曲线。实验重复 3 次以取平均值。

1.6 内生质粒消除

将活化菌株接种至含有 10 mg/L SDS 的 LB 液体培养基中, 43℃ 振荡培养 24 h, 稀释涂布于 LB 固体平板上于 28℃ 继续培养。采用碱法小量制备质粒 DNA 并电泳检测其质粒谱带, 按文献[14]的方法进行。重复以上实验直至所挑取的分离菌株的内生质粒被消除。

1.7 分离菌株锰氧化活性的测定

分离菌株转接到含 Mn (II)的液体培养基中, 置于 28℃ 摇床培养, 当培养基中出现棕褐色沉淀时, 取 1 mL 菌液离心, 去上清, 然后往沉淀中加适量的 HEPES (10 mmol/L)悬浮菌体, 按 1 : 5 加入浓度为 0.04% 的 LBB (N, N'-dimethylamino-p, p'-triphenylmethane-o''-sulphonic acid)试剂, 25℃ 暗处反应 30 min, 其锰氧化活性的阴性/阳性结果的判定按照文献[15]进行, 并用 $KMnO_4$ 标准曲线法^[15]定量测定阳性菌株的锰氧化活性。

2 结果与分析

2.1 从铁锰结核土样中分离具抗锰活性的细菌

从已形成明显铁锰结核的土样中初筛到 12 株对浓度为 10 mmol/L 的 Mn (II)具有抗性的菌株, 经逐级提高筛选培养基中的 Mn (II)浓度并进一步分离纯化, 发现其中一株分离株对 Mn (II)的抗性较强, 其对 Mn (II)最大耐受浓度达到 130 mmol/L。本研究将该菌株用于进一步的鉴定和性能分析, 命名为 MB283。

2.2 分离菌株 MB283 的鉴定

2.2.1 MB283 菌株形态特征和培养性状: MB283 菌株在 LB 培养基上菌落形态为圆形, 乳白色不透明, 粘稠, 边缘平滑, 生长后期呈黄色。革兰氏染色呈阳性。菌株呈杆状, 末端钝圆, 单个或呈短链排列, 直径为 $(1.2\text{--}1.5)\text{ }\mu\text{m} \times (2.0\text{--}4.0)\text{ }\mu\text{m}$ 。芽胞为 $(1.0\text{--}1.2)\text{ }\mu\text{m} \times (1.5\text{--}2.0)\text{ }\mu\text{m}$, 椭圆形, 中生或次端生(图 1)。以上菌体形态特征符合文献[9]所描述的“产芽胞细菌”类型细菌的特征。

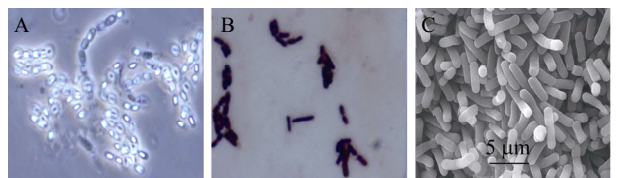


图 1 经革兰氏染色和分别用相差显微镜与扫描电镜观察的分离菌株 MB283 的形态

Fig. 1 Microscopic photograph of MB283 strain by Gram stain, contrast phase microscope and SEM observation

注: A: 革兰氏染色镜检(× 1000); B: 相差显微镜观察(× 2500); C: 扫描电镜观察(× 5000)。

Note: A: Gram stain (× 1000); B: Contrast phase (× 2500); C: SEM (× 5000).

2.2.2 生理生化特征测定: 对 MB283 菌株部分生理生化特征的测定结果见表 1。此外, MB283 菌株经半固体培养基穿刺接种和连续培养 72 h, 其培养基深部的穿刺线及附近未见生长物, 仅在培养基水平面上有生长, 且自表面向深处 2 mm–3 mm 有根丝状扩散, 说明是好氧或兼性厌氧菌, 而且具有运动性。

表 1 菌株 MB283 的部分生理生化特征 Table 1 Determined physiological and biochemical characteristics of MB283 strain		
试验项目	Test items	MB283
淀粉水解实验	Starch hydrolysis test	+
酪氨酸水解试验	Tyrosine hydrolysis test	+
分解酪素试验	Casein decomposition test	+
苯丙氨酸脱氨试验	Phenylalanine deamination test	+
硝酸盐还原	Nitrate reduction	–
硫酸盐还原	Sulfate reduction	–
明胶液化试验	Gelatin liquefaction test	+
2% NaCl 生长试验	Growth on culture medium with 2% NaCl	+
接触酶	Catalase test	+
V-P 测定	V-P test	–
柠檬酸盐利用	Citrate utilization test	+
丙二酸盐利用	Malonate utilization test	+
吲哚反应	Indole test	–
葡萄糖产酸	Acid production from glucose	+
葡萄糖产气	Gas production from glucose	–
D-甘露醇利用	D-mannitol utilization test	+

注: +: 试验阳性, 可生长或产酸; –: 试验阴性, 不生长或不产酸。

Note: +: The tested item is positive in cell growth or is acidogenic; –: The tested item is negative in cell growth or is non-acidogenic.

2.2.3 G + C mol%测定结果: 分离菌株 MB283 的 G + C mol%值为 37.5%。根据文献[9]的检索表, 分离菌株 MB283 可初步鉴定到芽胞杆菌属(*Bacillus*)。

2.2.4 16S rDNA 扩增、序列测定与进化树分析: 以 MB283 的总 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 得到约 1514 bp 的扩增产物(图 2)。将扩增产物所测定的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析后发现, 与其序列相似性达到 99% 的菌株全部是芽胞杆菌属的细菌。对 BLAST 结果中具有最高相似性的近缘种群进行系统进化树分析(图 3), 结果表明, MB283 明显可归属到巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)。根据以上形态学特征、生理生化特征、G + C mol% 含量测定及 16S rDNA 序列分析的测定结果, 将分离菌株 MB283 鉴定为巨大芽胞杆菌。

2.3 分离菌株 MB283 的生长曲线

对分离菌株 MB283 分别在含有 0 和 10 mmol/L Mn (II) 的 2 种培养条件下的生长曲线进行了测定。如图 4 所示, 尽管 MB283 在不含 Mn (II) 的培养条件下较快地从延滞期进入到对数生长期, 但该菌株在含有低浓度 Mn (II) 的条件下表现出明显较快的比生长速率, 并较早进入到稳定期, 反映出低浓度 Mn (II) 能为该菌株的生长提供某种可利用的优势。

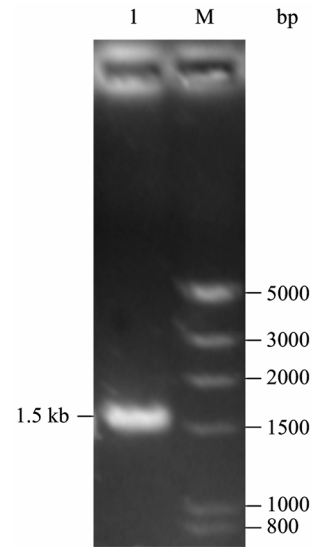


图 2 分离菌株 MB283 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis profile of PCR-amplified product (16S rDNA) from strain MB283

注: 1: 菌株 MB283 的 16S rDNA; M: DNA 分子量标准物。

Note: 1: 16S rDNA of strain MB283; M: DNA marker.

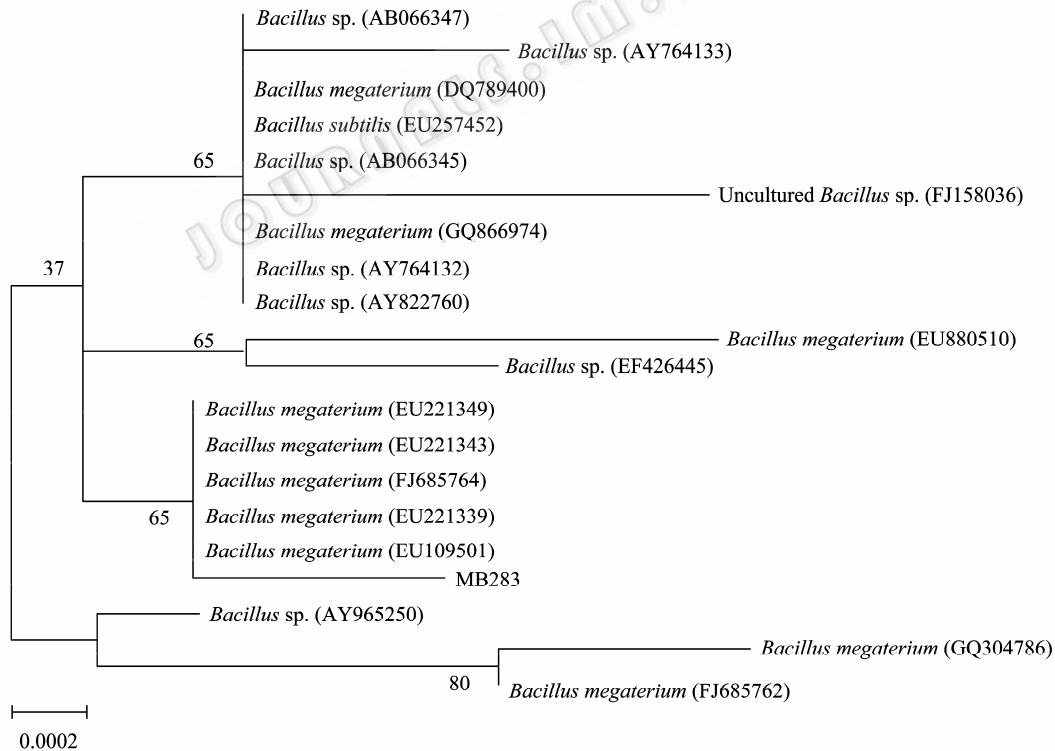


图 3 基于 MB283 菌株的 16S rRNA 序列的系统进化树

Fig. 3 A phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain MB283

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 1000 次时的置信度(%); 左上方标尺刻度表示核苷酸序列为 0.02% 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 1000 replicates. Scale bar represents 0.02% differences in nucleotide sequences.

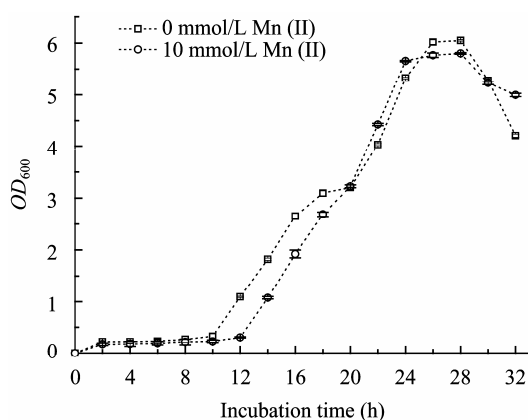


图4 分离菌株 MB283 在不同锰浓度条件下的生长曲线
Fig. 4 Growth curves of MB283 in different Mn (II) concentrations

2.4 MB283 内生质粒的消除与突变株的抗锰活性

对 MB283 菌株的总质粒进行了检测, 发现该菌株含有数条大小不等的内生质粒(图 5)。为考察 MB283 菌株的抗锰活性是否与其内生质粒相关, 对该菌株的内生质粒进行了消除。经连续多轮高温培养和添加 SDS 处理, 最终筛选到 1 株突变株, 其总质粒制备产物在电泳图谱上未见有明显的内生质粒谱带(图 5), 命名为 MB287。

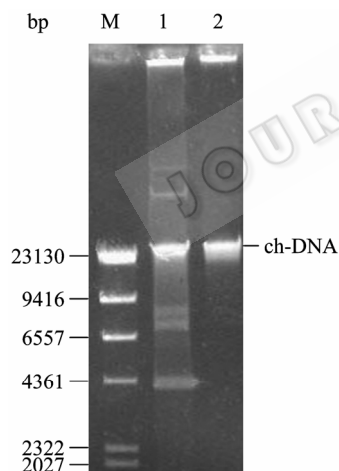


图5 野生菌株 MB283 和其突变株 MB287 的质粒电泳图谱

Fig. 5 Electrophoresis analysis of the resident plasmids prepared from wild-type strain MB283 and its mutant strain MB287

注: M: DNA 分子量标准物; 1: 野生菌株 MB283; 2: 突变株 MB287; ch-DNA: 染色体 DNA。

Note: M: DNA marker; 1: MB283; 2: MB287; ch-DNA: Chromosomal DNA.

将 MB283 及其突变株 MB287 分别接种于含有 20–130 mmol/L 不同 Mn (II) 浓度的培养基中, 发现两菌株在实验范围内均生长良好, 未见明显生长差

异。该结果反映出野生菌株 MB283 的抗锰活性很可能是受染色体的直接控制, 其相关的抗锰基因可能是定位于染色体而非质粒上。

2.5 MB283 及其突变株 MB287 的锰氧化活性

通过 LBB 显色反应检测, MB283 菌株与其突变株 MB287 均呈明显的阳性显色反应, 表明两菌株均具有锰氧化活性, 且质粒消除并未导致 MB287 菌株锰氧化活性的改变(图 6)。进一步通过 KMnO_4 标准曲线法测定, MB283 菌株的锰氧化活性约为 $3.3 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 而 MB287 菌株的锰氧化活性约为 $3.1 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 二者没有显著性差异。这些结果也反映出 MB283 菌株的锰氧化活性可能与其内生质粒无关, 其锰氧化基因可能是定位于染色体上。

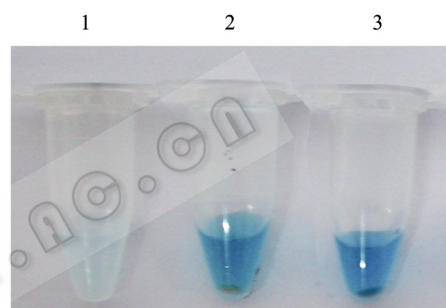


图6 MB283 菌株及突变株 MB287 的锰氧化活性的 LBB 检测反应结果

Fig. 6 LBB analysis of manganese-oxidizing activities of strain MB283 and its mutant strain MB287

注: 1: 阴性对照; 2: 野生菌株 MB283; 3: 突变株 MB287。

Note: 1: The negative control; 2: MB283; 3: MB287.

3 讨论

重金属锰在环境中蓄积并诱发的污染近年来开始受到人们的关注, 而采用生物学方法来进行锰污染治理被寄予很大的期望。本研究选取铁锰结核的土壤样品来分离筛选抗锰活性的细菌菌株, 结果得到一株抗锰芽孢杆菌分离株, 其对 Mn (II) 的高抗性 (130 mmol/L), 目前在国内外文献报道中罕见。研究还证实所分离菌株也具有明显的锰氧化活性, 能将可溶性的 Mn (II) 离子转化为不溶的锰沉淀, 这一性质或许能部分解释该菌株高抗锰活性的机制。有趣的是, 与目前所报道的重金属抗性基因多定位在质粒上^[17–20]有所不同的是, 该菌株对锰的抗性与对锰的氧化作用可能与其内生质粒无关, 而是由其染色体的基因(簇)来控制。该菌株的抗锰活性和锰氧化活性均十分稳定也印证了这一结论。不过, 鉴于在

巨大芽胞杆菌中往往存在有拷贝数较少、但十分稳定的大质粒^[21],而目前常规方法对这些质粒的检测难以准确进行,因此,该菌株的锰抗性基因的准确定位有待于深入研究。

高抗锰活性菌株可望在金属锰污染的微生物修复实践中发挥重要作用。一方面,这种高抗性菌株可借助于其生物氧化作用,来直接作用于环境中尤其是水体中的可溶性Mn(II),使其形成不溶性沉淀,发生沉降作用;另一方面,高抗性菌株也是一种优良的工程菌受体菌株,可用于构建细菌表面展示系统来进行表面展示金属硫蛋白类的重金属吸附蛋白,应用于污染环境中可达到清除重金属污染的目的。当然,高抗性菌株本身也提供了抗重金属和重金属生物氧化的重要基因资源,通过克隆相关基因并实现异源高效表达,将可拓宽高抗性菌株的使用领域。目前,作者实验室正在进一步开展这些方面的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Ghiorse WC. Biology of iron and manganese-depositing bacteria. *Ann Rev Microbiol*, 1984, **38**(10): 515–550.
- [2] 周鹏. 地下水中铁和锰的危害及去除方法. 山西建筑, 2008, **34**(23): 189–190.
- [3] 王英辉, 祁士华, 陈学军. 金属矿山废弃地重金属污染的植物修复治理技术. 中国矿业, 2006, **15**(10): 67–71.
- [4] Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ Int*, 2004, **30**(2): 261–278.
- [5] 孟多, 周立岱, 于常武. 水体重金属污染现状及处理技术. 辽宁化工, 2006, **35**(9): 534–536.
- [6] Valis M, Atrian S, de Lorenzo V, *et al.* Engineering a mouse metallothionein on the surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(6): 661–665.
- [7] Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2000, **45**(3): 198–207.
- [8] Hassan MT, van der Lelie D, Springael D, *et al.* Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 1999, **238**(2): 417–425.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 43–64, 349–370.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997: 241–245.
- [11] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*, 1962(5): 109–118.
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406–425.
- [13] Fitch WM. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Syst Zool*, 1971(20): 406–416.
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 27–30.
- [15] Johnson HA, Tebo BM. *In vitro* studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation. *Arch Microbiol*, 2008, **189**(1): 59–69.
- [16] Krumbein WF, Altmann HJ. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoland Wiss Meeres*, 1973(25): 347–356.
- [17] 窦敏娜, 呼庆, 齐鸿雁, 等. 重金属抗性菌HQ-1生物吸附镉与银的比较研究. 微生物学通报, 2007, **34**(6): 1097–1103.
- [18] Park JS, Lee SJ, Rhie HG, *et al.* Characterization of a chromosomal nickel resistance determinant from *Klebsiella oxytoca* CCUG 15788. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(6): 1040–1043.
- [19] McIntosh D, Cunningham M, Ji B, *et al.* Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother*, 2008, **61**(6): 1221–1228.
- [20] Wasi S, Jeelani G, Ahmad M. Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain. *Chemosphere*, 2008, **71**(7): 1348–1355.
- [21] Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, *et al.* *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(5): 957–967.