

# 铁锰结核土壤锰氧化细菌多样性及新菌属分析<sup>①</sup>

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

(1 农业微生物学国家重点实验室(华中农业大学), 武汉 430070;

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

**摘要:** 尽管细菌的锰氧化作用被认为是自然界中氧化锰矿物形成的主要成因,但目前国内外对陆地土壤环境中锰氧化细菌的种群组成与多样性方面的研究甚少。本研究对采集于山东崂山一处含铁锰结核的棕壤进行了可培养锰氧化细菌分离、活性测定与多样性调查,结果发现表层土壤(A层:0~20 cm)的可培养锰氧化细菌是最丰富的,但是高锰氧化活性的细菌主要分布在心土层(B层:20~40 cm)和底土层(C层:>75 cm)。通过对具有高锰氧化活性的分离菌株16S rRNA基因的扩增、测序和序列BLAST比对分析,发现了7个此前未见报道的具有锰氧化活性的新菌属。此外,对5株具有高锰氧化活性的分离菌株和土壤样品的进行了16S rRNA基因V3产物的变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析,结果显示此5株高锰氧化菌株并非都是土壤中的高丰度细菌。

**关键词:** 锰氧化细菌;新菌属;多样性;铁锰结核土壤;16S rRNA基因

**中图分类号:** Q939.96

锰氧化细菌(Manganese-oxidizing bacteria)是一类可将Mn(II)氧化成Mn(III)或Mn(IV)型高锰氧化物、且在系统发育上呈现较大多样性的细菌类群<sup>[1]</sup>。锰氧化物是环境中一种高活性的矿物,具有很强的氧化和吸附作用,决定着环境中许多物质的形态、迁移和转化,在元素生物地球化学循环中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。研究发现锰氧化细菌主要是分布于低GC含量的革兰氏阳性菌、放线菌及分别属于 $\alpha$ -、 $\beta$ -和 $\gamma$ -变形菌亚纲(*Proteobacteria*)等的细菌类群<sup>[3]</sup>。迄今,对分离于浅海沉积物或海水环境的3种锰氧化细菌,即芽孢杆菌*Bacillus* sp. SG-1、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) MnB1和GB-1、生盘纤发菌(*Leptothrix discophora*) SS-1和SP-6<sup>[4-7]</sup>的研究是较为深入的,已被认同为研究细菌锰氧化作用的3种模式菌株<sup>[1,3]</sup>。此外,近年来有一些新锰氧化细菌属被陆续报道,如玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)<sup>[8]</sup>、生金菌属(*Metallogenium*)<sup>[1]</sup>、微球菌属(*Micrococcus*)<sup>[9]</sup>、土微菌属(*Pedomicrobium*)菌株ACM 3067<sup>[10]</sup>、以及橙单胞菌属(*Aurantimonas manganoxydans*)菌株SI85-9A1和赤杆菌属(*Erythrobacter*)菌株SD-21<sup>[11]</sup>等,但是这些锰氧化细

菌主要分离于海洋和淡水环境,而陆地土壤环境的锰氧化细菌由于大多被土壤颗粒所吸附,对其进行分离和在实验室培养成纯培养菌落,要比水相系统中的锰氧化细菌复杂<sup>[3]</sup>,因而被报道得比较少。

土壤铁锰结核(锰氧化物)是土壤中重要的新生体,是主要在微生物作用下形成的一定时期的土壤产物。理论上铁锰结核土壤中应存在具有锰氧化活性的不同细菌类群,因而是研究土壤锰氧化细菌群落与多样性、并研究这些细菌在氧化锰矿物形成过程中所起作用的良好材料。本研究以山东崂山一处富含铁锰结核的棕壤为研究对象,调查了不同土层中锰氧化细菌的群落多样性,确定了从中所分离的7个此前未见报道的锰氧化细菌新菌属,可为土壤细菌的锰氧化作用与锰氧化矿物的生物成因机制研究提供新的菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样

土壤样品于2008年11月采集于山东省泰安市岱岳区崂山镇的一处含有铁锰结核的土壤,属于钙积潮

<sup>①</sup> 基金项目:国家自然科学基金重点项目(40830527)资助。

\* 通讯作者(lilin@mail.hzau.edu.cn)

作者简介:杨伟红(1985-),女,湖北仙桃人,硕士,主要从事土壤微生物学研究。E-mail: yangchenghongbevin@163.com

湿变性土 (*Calci-Aquic Vertisols*)。分别采集表土层 (A 层: 0 ~ 20 cm), 心土层 (B 层: 20 ~ 40 cm), 底土层 (C 层: >75 cm) 的新鲜土壤, 去除石砾、植物残体后, 每种分层土样分装 3 份保存于无菌塑料袋, 于 4°C 保存, 用于可培养优势细菌的分离; 另分装 1 份土样于 -20°C 保存, 用于土壤 DNA 提取。

### 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, 琼脂 15 g (液体培养基不加琼脂), 蒸馏水 1000 ml, pH 7.2, 用于土壤中可培养细菌的分离; K 培养基<sup>[1]</sup>: 胰蛋白胨 2 g, 酵母膏提取物 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001 g, 1 mol/L MnCl<sub>2</sub> 1 ml, HEPES 缓冲溶液 (pH 7.5) 10 mmol/L, 固体培养基加 15 g 琼脂, 蒸馏水 1000 ml (其中无机盐 FeSO<sub>4</sub>、MnCl<sub>2</sub> 和 HEPES 缓冲溶液均为在培养基灭菌后通过无菌滤器加入), 用于锰氧化活性菌株的分离和锰氧化活性的测定。

### 1.3 土壤细菌的分离

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<sup>-3</sup> 稀释液 100 μl 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<sup>-4</sup> 稀释液 100 μl 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。

### 1.4 锰氧化活性的测定

将分离得到的单菌落接种至牛肉膏蛋白胨培养液活化 12 ~ 18 h 后, 按 1% 的接种量将活化菌液转接于液体 K 培养基中, 30°C, 200 r/min 培养。5 天后取各菌悬液 1 ml 离心, 去上清, 用 HEPES 缓冲液 (10 mmol/L) 重悬菌体沉淀, 并按 1:5 的比例加入 0.04% LBB (Leukoberbelin blue) 指示剂<sup>[12-13]</sup>, 测定各反应液在 620 nm 下的可见光吸光度值, 以 KMnO<sub>4</sub> 为标准曲线 (40 μmol/L KMnO<sub>4</sub> 相当于 100 μmol/L MnO<sub>2</sub>), 计算各分离菌株在 5 天的培养时间内可能生成的 MnO<sub>2</sub> 的量 (μmol/L), 并据此来确定各个菌株的锰氧化活性大小, 并按照生成的 MnO<sub>2</sub> 的量将它们分成“高” (氧化 Mn(II) 生成的 MnO<sub>2</sub> 浓度高于 50 μmol/L)、“中” (氧化 Mn(II) 生成的 MnO<sub>2</sub> 浓度高于 10 μmol/L 但低于 50 μmol/L)、“低” (氧化 Mn(II) 生成的 MnO<sub>2</sub> 浓度高于 1 μmol/L 但低于 10 μmol/L), 和“无” (氧化 Mn(II) 生成的 MnO<sub>2</sub> 浓度低于 1 μmol/L) 锰氧化活性。

### 1.5 土壤细菌 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树的构建

细菌菌株的总 DNA 制备按方法文献[14]进行。以所制备的 DNA 为模板, 用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT-CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-

TACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增反应。PCR 反应条件为 94°C 5 min 变性模板 DNA; 94°C 45 s, 53°C 45 s, 72°C 90 s; 30 个循环; 72°C 最后延伸 10 min。扩增产物由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。所获得的 16S rRNA 基因序列通过 DNAMAN 软件进行多重比对, 序列相似性 ≥ 97% 视为同一亲缘型 (phylo type), 不同亲缘性的序列用软件 CHIMERA-CHECK (<http://www.bioinformatics-toolkit.org/Help/Topics/chimera.html>) 在线分析可能的嵌合体, 将明显的 Chimera 序列去除, 并用 Blast search 在线比对, 搜寻各序列在 GenBank 数据库中最相似序列。系统进化树的构建采用 MEGA 4.0 软件, 以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, Bootstrap 检验系统树, 自展数为 1000。

### 1.6 土壤总 DNA 的提取及细菌 16S rRNA 基因 V3 片段的 PCR 扩增

土壤细菌的总 DNA 提取采用溶菌酶和 SDS 裂解的方法<sup>[15]</sup>, 抽提得到的总 DNA 用于总 16S rRNA-V3 片段扩增的模板。同时选取土壤里普遍存在的而且同源性相差较大的 5 株高锰氧化活性菌株扩增 16S rRNA-V3, 将扩增产物混合, 作为土壤 16S rRNA-V3 产物变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 的人工 Ladder。扩增引物为 GC-338F (5'-CGCCCCCGCGCGCGGC-GGGCGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGAGCAGCAG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')<sup>[16]</sup>, 扩增程序均为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 45 s; 30 反应循环; 最后 72°C 延伸 10 min。

### 1.7 变形梯度凝胶电泳 (DGGE)

用 25 μl 的 16S rRNA-V3 扩增产物进行 DGGE, 所用仪器为 Bio-Rad 公司的 Dcode<sup>TM</sup> 基因突变检测系统。DGGE 参数为: 变性剂梯度 (化学变性剂为 100% 尿素 7 mol/L 和 40% (v/v) 的去离子甲酰胺) 为 50% ~ 70%, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 8%, 胶厚度为 1 mmol/L, 电泳缓冲液为 0.5 × TAE buffer, 60°C、200 V 电压下电泳 5 h, 拍照, 并采用 Quantity One 软件 (Bio-Rad) 对 DGGE 图谱进行数字化处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤细菌的分离及锰氧化活性的测定

通过锰富集培养法分别从 A、B 和 C 层土壤分离到细菌菌株 192 株、160 株和 151 株, 分别编号为 A<sub>1-192</sub>、B<sub>1-160</sub> 和 C<sub>1-151</sub>。用 LBB 指示剂法对所有分离菌株进行锰氧化活性的测定, 并按其锰氧化活性进一步将所有分离菌株分为高锰氧化活性菌株 (50

株)、中锰氧化活性菌株(78株)、低锰氧化活性菌株(216株)和无锰氧化活性菌株(159株),其中50株具有高锰氧化活性分离菌株的测定结果见表1。

表1显示各层分离菌株的平均锰氧化量随着土层的加深而增高,但最高锰氧化活性的分离菌株来自于A层(A<sub>94</sub>)。

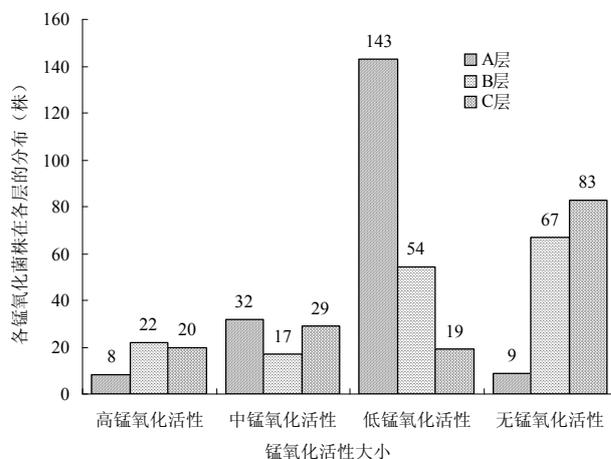
表1 高锰氧化活性细菌的锰氧化活性(μmol/L)  
Table 1 Mn(II)-oxidizing activities of determined high active isolates

A层(8株)		B层(22株)		C层(20株)	
编号	Mn(II) 氧化量	编号	Mn(II) 氧化量	编号	Mn(II) 氧化量
A <sub>94</sub>	240.2	B <sub>76</sub>	187.7	C <sub>30</sub>	178.9
A <sub>47</sub>	119.9	B <sub>138</sub>	171.5	C <sub>31</sub>	168.3
A <sub>56</sub>	71.0	B <sub>47</sub>	163.6	C <sub>86</sub>	167.4
A <sub>101</sub>	67.0	B <sub>159</sub>	151.4	C <sub>99</sub>	165.8
A <sub>59</sub>	61.1	B <sub>84</sub>	144.4	C <sub>93</sub>	156.1
A <sub>8</sub>	53.3	B <sub>93</sub>	144.2	C <sub>60</sub>	150.5
A <sub>15</sub>	52.1	B <sub>36</sub>	143.3	C <sub>95</sub>	141.3
A <sub>86</sub>	51.3	B <sub>160</sub>	106.3	C <sub>85</sub>	140.7
		B <sub>150</sub>	105.0	C <sub>43</sub>	134.8
		B <sub>81</sub>	98.1	C <sub>19</sub>	128.2
		B <sub>73</sub>	87.3	C <sub>61</sub>	121.0
		B <sub>113</sub>	85.6	C <sub>8</sub>	120.1
		B <sub>107</sub>	83.2	C <sub>92</sub>	116.5
		B <sub>35</sub>	78.3	C <sub>94</sub>	71.5
		B <sub>37</sub>	77.9	C <sub>39</sub>	66.8
		B <sub>23</sub>	66.7	C <sub>96</sub>	66.6
		B <sub>122</sub>	66.0	C <sub>77</sub>	62.6
		B <sub>86</sub>	65.4	C <sub>13</sub>	59.8
		B <sub>46</sub>	62.3	C <sub>25</sub>	56.2
		B <sub>109</sub>	61.5	C <sub>88</sub>	52.4
		B <sub>89</sub>	59.8		
		B <sub>56</sub>	53.9		
平均	89.5	平均	102.9	平均	116.3

## 2.2 锰氧化细菌的土层分布

各锰氧化细菌的土层分布如图1所示。整体上看,低锰氧化活性和无锰氧化活性的分离菌株是占大多数的,它们分别占到了整个分离菌株总数的42.9%和31.6%;其次是中锰氧化活性菌株,占15.5%;高锰氧化活性菌株的数目最少的,仅占9.9%。从各个土层来看,A层具有最多的锰氧化活性菌株(包括高、中、低锰氧化活性),它们占到了A层所有分离菌株的95.3%,然而具有高锰氧化活性的菌株主要分布在B层和C层,中锰氧化活性菌株主要分布在A层和C层,低锰氧化活性的菌株数目随土层的加深而减少,无锰氧化活性菌株却正好相反。此外,各层土壤的锰氧化物含量经测定分别为:2.01 g/kg(A层),2.25 g/kg(B层),0.94 g/kg(C层);而铁氧化物的含量分别为:56.34 g/kg(A层),64.89 g/kg(B层),63.91 g/kg(C层)。对比表1和图1的结果可见,B层和C层土壤的铁锰含量较高,

而这2层土壤中的高锰氧化细菌的分布比较多。



(柱形图上的数字表示分离细菌的数量)

图1 锰氧化细菌的土层分布

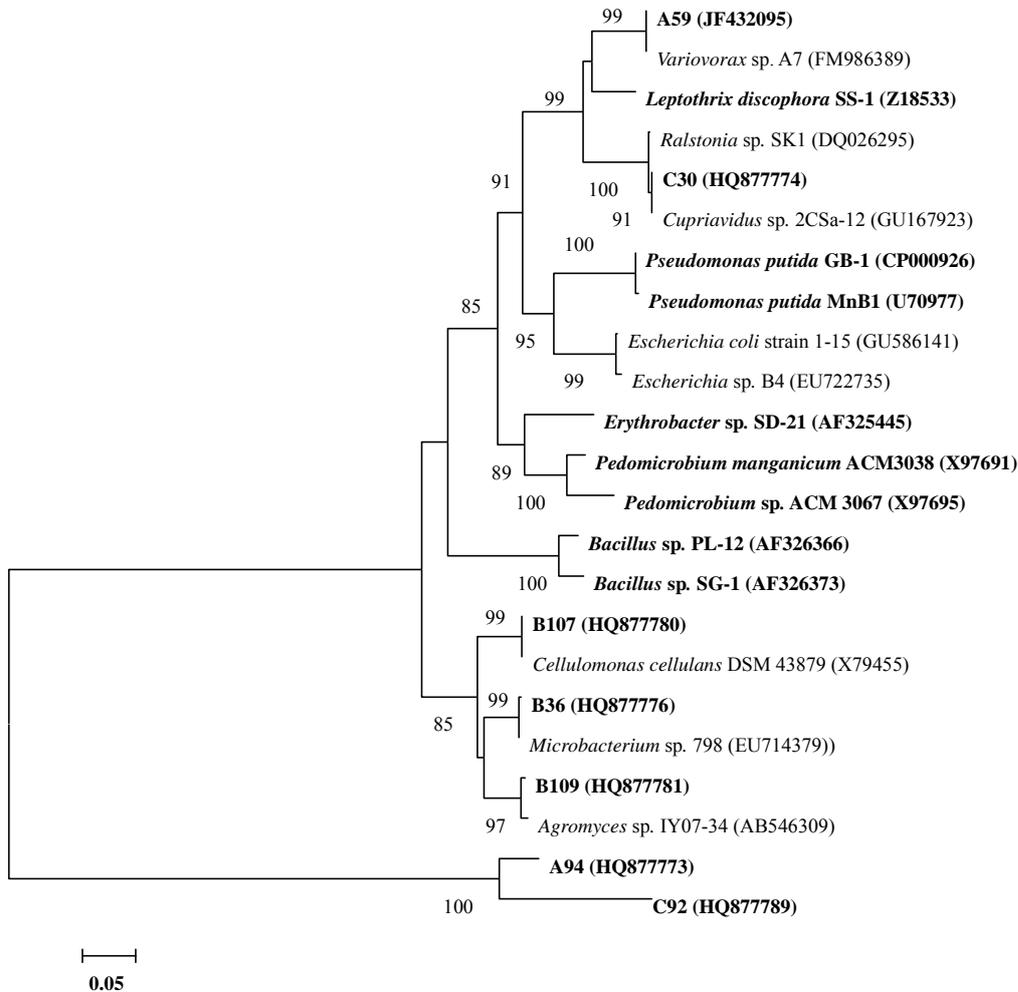
Fig. 1 Distribution of Mn(II)-oxidizing bacteria in different-depth soils

### 2.3 高锰氧化活性菌株的 16S rRNA 基因序列测定与系统进化亲缘关系分析

对所分离的高锰氧化活性菌株的 16S rRNA 基因进行了测序和序列比对，发现这些高锰氧化细菌主要分布在 13 个属，分别是：节杆菌属 (*Arthrobacter*) (18 株)、芽孢杆菌属 (8 株)、中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) (6 株)、假单胞菌属 (5 株)、微杆菌属 (*Microbacterium*) (3 株)、大肠埃希氏菌属 (*Escherichia*) (2 株)、*Cupriavidus* 菌属 (2 株)、贪噬菌属 (*Variovorax*) (1 株)、纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*) (1 株)、副球菌属 (*Paracoccus*) (1 株)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia*) (1 株)、红球菌属 (*Rhodococcus*) (1 株) 和 *Agromyces* 菌属 (1 株)。其中节杆菌属的分离菌株最多，其次是芽孢杆菌属，再次是中华根瘤菌属和假单胞菌属。经检索相关文献后可知，本文所分离的微杆菌属 (B<sub>36</sub>、B<sub>81</sub> 和

B<sub>150</sub>)、大肠埃希氏菌属 (A<sub>94</sub> 和 A<sub>47</sub>)、*Cupriavidus* 菌属 (C<sub>30</sub>和B<sub>23</sub>)、贪噬菌属 (A<sub>59</sub>)、纤维单胞菌属 (B<sub>107</sub>)、*Agromyces* (B<sub>109</sub>) 及罗尔斯通氏菌属 (C<sub>92</sub>) 共 7 个属是首次报道有锰氧化活性的细菌属。

将以上 7 个新菌属中锰氧化活性较高的 B<sub>36</sub>、A<sub>94</sub>、C<sub>30</sub>、A<sub>59</sub>、B<sub>107</sub>、B<sub>109</sub> 和 C<sub>92</sub> 共 7 株分离菌株的 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号分别为：HQ877780、HQ877773、HQ877774、JF432095、HQ877780、HQ877781、HQ877789) 与 NCBI 上比对出来的最相似序列及已经报道的锰氧化细菌——芽孢杆菌属 SG-1、生盘纤发菌 SS-1、恶臭假单胞菌 GB-1 和 MnB1、赤杆菌属 D-21、土微菌属 ACM 3067 等的 16S rRNA 基因序列一起用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树 (图 2)。从图中可以看出 A<sub>59</sub>、C<sub>30</sub> 和生盘纤发菌 SS-1 聚类在一起，归类为锰氧化细菌系统发育中的 β-变形



(图中粗体数字表示本实验分离的细菌，粗体表示已经发表的锰氧化细菌，常规字体表示和分离细菌最相似的 NCBI 序列，括号内为 GenBank 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 (%)；左下方标尺刻度表示核苷酸序列为 5% 的差异)

图 2 7 株新分离的高锰氧化细菌的 16S rRNA 基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of 16S rRNA gene sequences from seven newly-identified isolates with high Mn(II)-oxidizing activity

菌门。B<sub>36</sub>、B<sub>107</sub>和 B<sub>109</sub> 聚类到一起, 归类为锰氧化细菌系统发育中的放线菌门, 而 A<sub>94</sub>、C<sub>92</sub> 成为单独的分支, 与已报道的锰氧化细菌有着不同的进化关系。

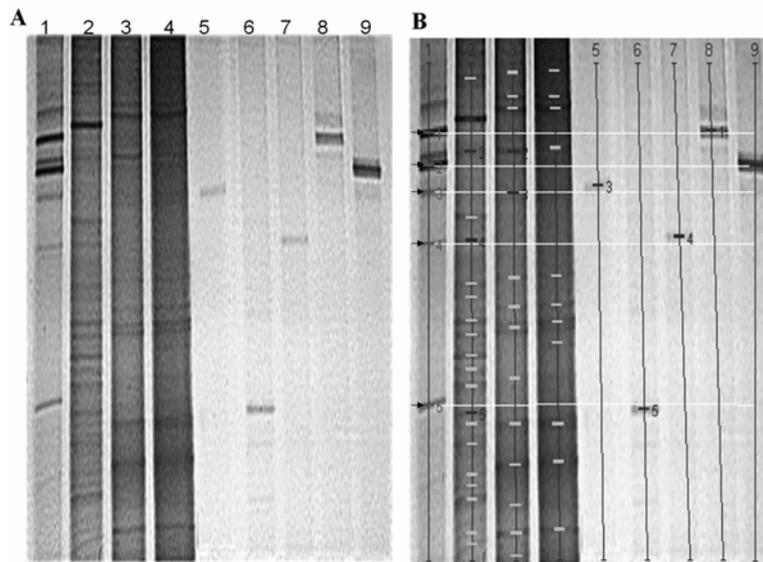
#### 2.4 分离菌株与土壤总 DNA 的 PCR-DGGE 分析

选择作为 DGGE 人工 Ladder 的 5 株高锰氧化活性菌株分别是 A<sub>94</sub> (大肠杆菌属)、A<sub>101</sub> (芽孢杆菌属)、B<sub>84</sub> (中华根瘤菌属)、C<sub>19</sub> (假单胞菌属) 和 C<sub>43</sub> (节杆菌属) (指在 NCBI 里最相似的属)。为验证所选择的人工 Ladder 的有效性, 将 5 株细菌的 16S rRNA 基因的 V3 片段 PCR 扩增产物分别进行 DGGE, 检查其谱带是否和人工 Ladder 中的条带在同一电泳位置, 结果如图 3 所示 (图 3A 为 DGGE 电泳图谱, 图 3B 是基于原始图用 Quantity One 软件分析后的数据示意图)。

在图 3A 和图 3B 各自泳道 1 的人工 Ladder 有 5 个明显的条带, 分别编号为条带 1~5, 分别代表了所选取的 5 株高锰氧化细菌 (C<sub>43</sub>、A<sub>94</sub>、B<sub>84</sub>、A<sub>101</sub>、C<sub>19</sub>),

在图 3B 中它们以箭头指出为标准条带。图 3B 泳道 2~9 中能匹配条带的条带以黑色表示, 不匹配的条带为白色。从图 3B 可见, 泳道 5~9 中的单一条带能比较好地与标准条带对应或匹配, 说明泳道 1 中的人工 Ladder 是有效的。A 层土壤 (泳道 2) 有 4 个条带和人工 Ladder 匹配, 但由于分析误差的存在, 仅条带 4 是显示为匹配的, 表示位于泳道 7 的高锰氧化细菌 A<sub>101</sub> 在 A 层中是非常丰富的。同样 B 层土壤 (泳道 3) 中有条带 3 是匹配的, 即泳道 5 的高锰氧化细菌 B<sub>84</sub> 在 B 层中非常丰富。而 C 层土壤没有可以匹配的条带, 说明所选择的 C<sub>19</sub>、C<sub>43</sub> 在 C 层中的丰度不大, 因而 DGGE 没能检测到。

由此可见, 这 5 类高锰氧化细菌虽然在土壤中广泛分布, 但并非都是丰度高的分布。这除了与细菌自身特性有关外, 还与它们所处的土壤环境有关。至于中、低或无锰氧化活性细菌是否是它们所处土层的高丰度细菌还有待于进一步的研究。



(A 中泳道 1 表示人工 Ladder, 即 5 株高锰氧化细菌的混合样品; 泳道 2、3、4 分别表示 A、B、C 层土壤; 泳道 5、6、7、8、9 分别表示高锰氧化细菌 B<sub>84</sub>、C<sub>19</sub>、A<sub>101</sub>、C<sub>43</sub>、A<sub>94</sub>; B 中箭头所指的条带表示标准条带, 黑色条带表示匹配条带, 白色条带表示不匹配条带, 白色横线表示 DGGE 条带在同一电泳位置)

图 3 5 株分离细菌和土壤样品的 16S rRNA 基因 V3 扩增片段的 DGGE 图谱

Fig. 3 DGGE profiles of PCR-amplified 16S rRNA gene V3 segments of five isolates with high Mn(II)-oxidizing activities and original soils

### 3 讨论

本研究对采集于山东烟台一处铁锰结核棕壤的分层土壤进行了可培养锰氧化细菌分离、活性测定与多样性调查。目前, 国内外相关细菌锰氧化作用研究的

细菌菌株多分离自海洋环境, 而对陆地土壤环境的锰氧化细菌的研究较少, 也尚未能分离到类似海洋细菌所携带的锰氧化基因簇, 因而对土壤锰氧化细菌的作用机制还缺乏认识, 亟需通过对特定土壤微生物区系

中锰氧化细菌的种群结构与多样性方面的研究, 分离鉴定一批有特色的锰氧化细菌种群, 来用于深入开展土壤锰氧化细菌相关的研究工作。有别于海洋环境的是, 土壤环境可因氧化锰矿物和氧化铁矿物的富集而形成明显的铁锰结核<sup>[17]</sup>, 而在此过程中锰氧化细菌可发挥重要作用, 因而铁锰结核土壤是分离锰氧化细菌较为理想之处。本研究以暖温带的山东铁锰结核土壤为研究对象, 采用活体分离培养和土壤总细菌 DNA 所包涵的细菌种群进行 DGGE 分析相结合的方法, 来调查不同土层锰氧化细菌的多样性, 发现了 7 个此前未见报道的具有锰氧化活性的新菌属, 从而不仅拓宽了锰氧化细菌种群范围, 也为相关研究工作贮备了新菌种资源。从这些新菌属的归类上看, 它们依旧归属于海洋锰氧化细菌主要的三大门类中的变形菌门和放线菌门<sup>[3]</sup>, 这一方面说明了土壤环境和水相环境的锰氧化细菌系统进化的相似性, 另外一方面也间接反映了这些细菌在土壤锰结核形成过程中的积极意义。另外, 本研究发现高锰氧化细菌中的放线菌所占比例比较多, 这是有别于近年来文献报道的锰氧化细菌种群组成的一个新特性。鉴于放线菌是土壤微生物中的一大类, 以及锰氧化细菌在元素生物地球化学循环中的重要作用, 那么该土壤中是否存在大量的放线菌类锰氧化细菌? 进一步深入研究这类土壤锰氧化细菌的活性、产物及其迁移转化形式和对元素地球化学循环的作用等方面, 将对揭示它们在土壤圈中氧化锰矿物形成过程的作用具有重要意义。

本研究发现铁锰结核土壤中的锰氧化细菌确实是很丰富的, 尤其是表土层 (A 层), 由于受生物气候或人类活动影响比较大, 有机质含量比较高, 比较适合好氧异养的锰氧化细菌的生长。B 层是含氧化铁、氧化锰、氧化钙、其他盐类和腐殖质等物质聚积的淀积层, 而 C 层为母质层, 这两层所含矿物比较多, 会比较适合金属耐受性的细菌生长。此外, 本实验分离的细菌都能在含 1 mmol/L Mn(II) 的 K 培养基上很好地生长, 该 Mn 浓度远超过自然环境中会对细菌产生毒性的锰的浓度<sup>[18]</sup>, 说明了分离菌株是非常耐受锰的。B 层和 C 层的高锰氧化细菌比较多, 它们对锰的具体耐受程度还有待研究。另外, 从表 1 可以发现, 这些分离细菌的锰氧化活性是很高的, 平均达到了 20.58  $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{d})$ , 相比部分报道的锰氧化细菌的锰氧化度要高<sup>[5]</sup>, 已初步表现出一定的应用潜能。目前, 本实验室正对这些特色菌株所携带的锰氧化基因 (簇)、锰氧化作用特性及其作用机制等方面开展相关的研究工作。

#### 参考文献:

- [1] Neilson KH. The manganese-oxidizing bacteria. *Prokaryotes*, 2006, 5: 222-231
- [2] 张震, 李林, 刘凡. 细菌锰氧化的分子机制. *微生物学报*, 2011, 51: 170-177
- [3] Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, Dick GJ, Murray KJ, Parker D, Verity R, Webb SM. Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. *Annu. Rev. Earth PL. Sc.*, 2004, 32: 287-328
- [4] Francis CA, Tebo BM. *cumA* Multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67: 4 272-4 278
- [5] Bargar JR, Tebo BM, Bergmann U, Webb SM, Glatael P, Chiu VQ, Villalobos M. Biotic and abiotic products of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *American Mineralogist*, 2005, 90: 143-154
- [6] El Gheriany IA, Bocioaga D, Hay AG, Ghiorse WC, Shuler ML, Lion LW. Iron requirement for Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 1 229-1 235
- [7] Kati G, Tebo BM. Identification of a two-component regulatory pathway essential for Mn(II) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 76: 1 224-1 231
- [8] Hansel CM, Francis CA. Coupled photochemical and enzymatic Mn(II) oxidation pathways of a planktonic *Roseobacter*-Like bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72: 3 543-3 549
- [9] HariMuraleedharan I, Kalaigandhi V, Kannapiran E. Microfouling of manganese-oxidizing microorganisms in Rameswaram coastal waters. *Nature Precedings*, 2009
- [10] Ridge JP, Lin M, Larsen EI, Fegan M, McEwan AG, Sly LI. A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environ. Microbiol.*, 2007, 9: 944-953
- [11] Anderson CR, Johnson HA, Caputo N, Davis RE, Torpey JW, Tebo BM. Mn(II) Oxidation is catalyzed by heme peroxidases in "*Aurantimonas manganoxydans*" strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. strain SD-21. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75: 4 130-4 138
- [12] Krumbein WE, Altmann HJ. A new method for the detection and enumeration of manganese-oxidizing and -reducing microorganisms. *Helgol Wiss Meeresunters*, 1973, 25: 347-356
- [13] Boogerd FC, de Vrind JPM. Manganese oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. *J Bacteriol.*, 1987, 169: 489-494
- [14] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG,

- Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997
- [15] Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, Clerc S, Bernillon D, Gall FL, Jeannin P, Nesme X, Simonet P. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 5 409-5 420
- [16] Muyzer GE, de Waal C, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 695-700
- [17] 李永华, 王五一, 谭文峰, 刘凡. 土壤铁锰结核中生命有关元素的化学地理特征. *地理研究*, 2001, 20: 609-615
- [18] Chapnick SD, Moore WS, Neelson KH. Microbially mediated manganese oxidation in a freshwater lake. *Limnol Oceanogr*, 1982, 27: 1 004-1 014

### Identification of Mn(II)-oxidizing Bacteria and Novel Genera from Stratified Fe-Mn Nodule Forming Soils

YANG Wei-hong<sup>1</sup>, ZHANG Zhen<sup>2</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-ming<sup>1</sup>, LIU Fan<sup>2</sup>

(1 *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

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

**Abstract:** Although Mn(II)-oxidizing bacteria are generally regarded as the major contributors of naturally occurred manganese oxides, only little effort has been devoted to investigate the community composition and diversity of Mn(II)-oxidizing bacteria in the terrestrial soil environment so far. In the current study, the stratified soils with iron-manganese nodules were sampled to isolate the culturable Mn(II)-oxidizing bacteria and to determine their Mn(II)-oxidizing activities as well as to identify their community diversity. The results showed that most culturable Mn(II)-oxidizing bacteria occurred in the A-horizon (0-20 cm) soil, whereas most Mn(II)-oxidizing bacteria with high activities occurred in B- (20-40 cm) and C-horizon (>75 cm) soils. 7 novel Mn(II)-oxidizing bacterial genera were found in this study from the isolates with high Mn(II)-oxidizing activity through 16S rRNA gene sequencing and related phylogenetical affiliation analysis. Moreover, PCR-DGGE profiles revealed that five randomly selected high Mn(II)-oxidizing bacteria were not abundant in the corresponding soil, which provided an insight of possible relationship between Mn(II)-oxidizing bacteria and their survival soil environment.

**Key words:** Mn(II)-oxidizing bacteria, Novel bacterial genera, Diversity, Fe-Mn nodule forming soil, 16S rRNA gene