

## 细菌氧化锰的分子机制

张震<sup>2</sup>, 李林<sup>1\*</sup>, 刘凡<sup>2</sup>

华中农业大学,<sup>1</sup> 农业微生物学国家重点实验室,<sup>2</sup> 农业部亚热带农业资源与环境重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 氧化锰是在生物地球化学循环中起重要作用的一种高反应活性矿物, 而微生物对 Mn(II) 的氧化作用是自然界中氧化锰矿物形成的主要动力。目前从海水、淡水、土壤和矿石等环境中分离到的多种细菌表现出对 Mn(II) 的氧化作用, 对其相关基因与细菌锰氧化分子机制的研究已取得了一定的进展。本文简要总结了这类主要锰氧化细菌的锰氧化基因的结构与功能、基因表达的调控影响因素以及多铜氧化酶的结构和特性, 并对目前在细菌锰氧化作用的分子机制研究中存在的部分悬疑问题及未来研究方向进行了分析。

**关键词:** 锰氧化细菌, 锰氧化作用, 基因, 分子机制

中图分类号: Q939.96 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 02-0170-08

锰(Mn)是地壳中含量仅次于铁的第二大过渡金属元素, 主要存在于土壤矿物、海水与淡水及其沉淀物中。锰氧化物是 Mn(II) 经氧化后形成的、具有很高反应活性的矿物成分, 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过程中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。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。化学成因是一种自发的热力学过程, 主要通过 Mn(II) 的化学氧化、表面催化和胶体化学凝聚沉淀等过程来形成, 其成矿作用过程缓慢; 生物成因是指各种生物类群通过生物氧化作用将岩石风化后所产生的 Mn(II) 氧化成不同类型的氧化锰矿物成分, 其中微生物特别是具锰氧化活性的细菌类群往往具有特异性的酶蛋白和代谢途径, 其对 Mn(II) 的氧化速度相比化学作用要快十几万倍, 因此被认为是自然界中氧化锰矿物形成的主要成因<sup>[2-4]</sup>。

细菌对 Mn(II) 的氧化作用由 Beijerinck 于

1913 年首次报道, 现已知锰氧化细菌具有较广的分布性, 尤其在土壤、水体及其沉积物中具有较高的分布丰度<sup>[5-7]</sup>, 其对 Mn(II) 的氧化作用可分为直接作用和间接作用两种方式。直接作用是指细菌通过向胞外分泌特定的锰氧化酶来直接氧化 Mn(II), 或藉胞内代谢作用和细胞外壁的多种蛋白质、多糖或其它大分子物质, 来键合、富集和吸附 Mn(II) 或初级氧化产物, 以及通过形成金属锰蛋白、增加反应物浓度和降低反应活化能等来加快氧化反应进程等方面的作用; 而间接作用是指细菌通过代谢活动来改变细胞周围微环境的 pH 值和 Eh 值, 以及通过释放代谢末端产物来氧化 Mn(II) 或加速 Mn(II) 自发形成高锰氧化矿物的热力学过程等方面的作用<sup>[8]</sup>。细菌通过其特有的锰氧化酶可在细菌表面直接将 Mn(II) 氧化为 Mn(III) 或 Mn(IV) 氧化物<sup>[2,9]</sup>, 研究这些锰氧化酶编码基因的结构特征、表达与调控因素与生态分布性质, 对于理解氧化锰矿物形成的生物成因有着重要的意义。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(40830527)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87286952, Fax: +86-27-87280670; E-mail: lilin@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 张震(1984-), 男, 河南濮阳人, 博士研究生, 从事土壤微生物学方向的研究工作。E-mail: zhzh217@163.com

收稿日期: 2010-07-08; 修回日期: 2010-09-07

## 1 锰氧化细菌种类与细菌锰氧化基因(簇)

目前已报道的具有锰氧化活性的细菌类群主要有低 G + C 含量厚壁菌门(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*)、大肠杆菌属(*Escherichia*)、副球菌属(*Paracoccus*)、海洋螺菌属(*Oceanospirillum*)、*Geobacter* 属和 *Caldimonas* 属;以及属于其它类群的梭杆菌属(*Fusobacterium*)、螺旋体属(*Spirochaetes*)、丝状杆菌属(*Fibrobacter*)、奇异球菌属(*Deinococcus*)、硝化螺菌属(*Nitrospira*)、热脱硫杆菌属(*Thermodesulfobacteria*)、栖热袍菌属(*Thermotoga*)、网球菌属(*Dictyoglomus*)、脱铁杆菌属(*Deferribacter*)、绿硫杆菌属(*Chlorobium*)、*Aquifica* 属和衣原体属(*Chlamydia*)等。其中,从海洋中分离到的芽胞杆菌 SG-1 菌株、恶臭假单胞菌(*P. putida*) MnB1/GB-1 菌株和生盘纤发菌(*L. discophora*) SS-1 菌株,是已被确证携带有特异性的锰氧化基因簇的样本菌株,它们所编码的酶蛋白可催化在细胞或者芽胞表面形成锰氧化物多聚体<sup>[8]</sup>。近年来,作者实验室对从国内采集的氧化锰矿物土样中,陆续鉴定出贪铜菌属(*Cupriavidus*)、多噬菌属(*Variovorax*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和雷尔氏菌属(*Ralstonia*)等尚未报道的锰氧化细菌类群,对氧化锰土层和铁锰结核进行了细菌多态性分析,发现锰氧化细菌在氧化锰土壤与铁锰结核中的分布较为广泛,部分细菌还具有锰氧化与锰抗性双重活性<sup>[10-13]</sup>(部分结果待发表)。

### 1.1 芽胞杆菌的 Mn(II) 氧化相关基因簇

芽胞杆菌 SG-1 菌株于 1980 年分离自浅海沉积物,对其锰氧化活性及氧化机理已开展了较多的研

究<sup>[14]</sup>。van Waasbergen 等通过转座子 Tn917 在 SG-1 菌株的插入失活突变,筛选到多个丧失锰氧化活性的突变株,其转座子插入位点是在同一个基因簇 *mnx* 内<sup>[15]</sup>。基因簇 *mnx* 由 1 个启动子和 7 个结构基因(*mnxA, B, C, D, E, F* 和 *G*)组成(图 1),其中由 *mnxG* 编码的 MnxG 蛋白有 4 个铜结合位点,是一种典型的多铜氧化酶(Multicopper oxidases, MCO)<sup>[9]</sup>。另外,基因 *mnxC* 的编码蛋白含有一种特定的 CXXXC 型结构,是一种具有氧化还原反应活性的结构域<sup>[16]</sup>,这些结构特征反映出 *mnx* 基因簇与 Mn(II) 的氧化直接相关。

Dick 等对芽胞杆菌 MB-7 和 PL-12 菌株的外膜蛋白用 SDS-PAGE 分离后,再用 LBB (Leucoberbelin blue) 显色法检测电泳谱带对 Mn(II) 的氧化反应活性,发现部分电泳谱带呈现显色反应。用质谱直接测定这些显色反应活性谱带的部分氨基酸序列,结果从 MB-7 菌株中检测出 5 个与 MnxG 同源的氨基酸序列,而从 PL-12 中也检测出 4 个与 MnxG 同源的氨基酸序列和 1 个与 MnxF 相同的氨基酸序列,因此这 2 株芽胞杆菌的 Mn(II) 氧化基因亦可归属于 *mnx* 基因簇<sup>[4]</sup>。

### 1.2 恶臭假单胞菌的 Mn(II) 氧化相关基因

已对 2 株具有 Mn(II) 氧化活性的恶臭假单胞菌菌株 MnB1 和 GB-1 进行了较深入的研究<sup>[6,17]</sup>。Brouwer 等利用 Tn5 转座子构建了 GB-1 菌株的转座突变文库,发现其中的 2 个发生锰氧化酶分泌阻滞的转座突变株,其插入突变位点的序列与恶臭假单胞菌 WCS358 中的 *xpc* 基因家族同源<sup>[18]</sup>。在另外一些不能合成 Mn(II) 氧化蛋白的突变株中, Tn5 是插入在细胞色素 c 成熟操纵子(*ccm*)位点<sup>[19]</sup>。根据对 *ccm* 操纵子的研究, GB-1 的 Mn(II) 氧化过程可能是与细胞色素 c 的合成和分泌途径相耦联,与 Mn(II) 到 O<sub>2</sub> 的电子传递相关。该操纵子中的 1 个或 2 个铜氧化酶基因也是 Mn(II) 氧化过程中的相关因子,这些基因的中断亦可导致 Mn(II) 氧化活性的丧失<sup>[19]</sup>。在另 1 个转座突变株中, Tn5 插入位点的基因(*cumA*)编码 1 个与 MCO 同源的蛋白质<sup>[20]</sup>。进一步研究表明,位于 *cumA* 基因下游的 *cumB* 基因与 *cumA* 基因属于同一操纵子,都与 Mn(II) 氧化相关(图 1)。

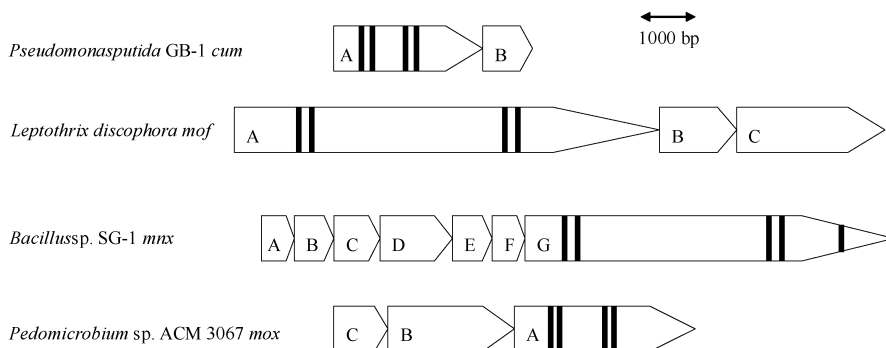


图1 四种细菌的锰氧化相关基因簇结构示意图

Fig.1 A diagrammatic representation of the operon structure for the manganese oxidation genes of *P. putida* GB-1 (*cumA*, *B*), *L. discophora* (*mofA*, *B*, *C*), *Bacillus* sp. SG-1 (*mxnA-G*) and *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 (*moxA*, *B*, *C*)

最近,对恶臭假单胞菌 *cumA* 中断突变株的研究发现, *cumA* 基因在野生菌株中的敲除突变并不直接影响其对  $Mn(II)$  的氧化活性<sup>[21]</sup>。但是,由于 Tn5 的转座插入造成了下游的 *mxnS1* 基因(位于一个编码二元调控系统的操纵子中)的移码突变,导致了对  $Mn(II)$  氧化活性的丧失。这个二元调控系统由 1 个组氨酸激酶和一个反应调节子组成,可以通过激酶的自磷酸化将外界环境的信号传输给下游基因,从而增强细胞对外界环境的适应能力<sup>[21]</sup>。

Caspi 等利用类似的方法构建了恶臭假单胞菌 MnB1 的突变文库,发现无  $Mn(II)$  氧化活性的突变株根据插入位点的不同大致上可以分为 3 组:第 1 组是转座子插入细胞色素 c 合成操纵子;第 2 组是转座子插入了编码 TCA 循环的不同酶的基因中,包括编码琥珀酸脱氢酶不同亚基的基因和编码异柠檬酸脱氢酶的基因等;第 3 组是转座子插入了编码与色氨酸合成相关的酶的  $\alpha$  亚基的基因<sup>[6]</sup>。虽然这些插入突变位点都不是直接编码氧化  $Mn(II)$  的酶的基因,但是都与  $Mn(II)$  氧化作用相关。

### 1.3 生盘纤发菌的 $Mn(II)$ 氧化相关基因

生盘纤发菌是一种有鞘的革兰氏阴性细菌,从不同环境中分离到的多个菌株都具有  $Mn(II)$  氧化活性<sup>[22-23]</sup>,其中 SS-1 是从池塘的铁锰结膜表面分离到的 1 个分离株,在实验室中培养 18 个月,失去了鞘结构但是仍然具有  $Mn(II)$  氧化的能力<sup>[24]</sup>。Corstjens 等通过构建 SS-1 菌株的基因组表达文库,从中筛选和鉴定出编码  $Mn(II)$  氧化蛋白重要组成部分的 *mofA* 基因<sup>[25]</sup>。对 *mofA* 基因编码蛋白的分析表明,该基因编码一个具有铜离子结合位点的 MCO,其下游的 *mofB* 基因编

码含有肽基脯氨酰顺反异构酶(Peptidyl-prolyl-*cis-trans* isomerase)位点的蛋白,而 *mofC* 基因编码含有血红素结合位点的蛋白,这 3 个基因位于同一个操纵子中<sup>[26]</sup>(图 1)。

### 1.4 其它细菌的 $Mn(II)$ 氧化相关基因

近年来更多的细菌锰氧化相关基因被陆续报道(表 1)。尽管如此,目前尚有许多细菌的锰氧化基因尚未被分离或还有待于证实。例如,SD-21 是 1 株分离于海湾沉积物表面的  $\alpha$ -变形细菌中的赤细菌属的细菌,但该菌对  $Mn(II)$  氧化能力却与同属的其它细菌明显不同。研究发现该菌的 1 种血红素过氧化氢酶和 1 种溶血素型钙结合蛋白,可能与其对  $Mn(II)$  的氧化活性相关<sup>[30]</sup>。在另 1 株分离自 125 米深水的锰氧化橙单胞菌(*Aurantimonas manganoxydans*) SI85-9A1 菌株的全基因组序列中,检测到 39 个调控元件可调控细胞对外界锰离子的反应,但是其中并没有发现在其它细菌中所常见的 MCO<sup>[28]</sup>。另 1 株  $\alpha$ -变形细菌 AzwK-3b 在光照条件下其活细胞和细胞提取物的  $Mn(II)$  氧化速率明显较黑暗条件高,推测其在黑暗条件下对  $Mn(II)$  的氧化作用可能是氧化酶的直接氧化作用,而在光照条件下则是通过将光化学的活性代谢和氧化酶的氧化过程相耦联来进行的<sup>[7]</sup>,因此,该菌的锰氧化活性可能与较多的基因相关。另外,对 1 株具有  $Mn(II)$  氧化活性的根瘤菌(*Rhizobium*) M4 的研究证实,多糖在这个菌株对  $Mn(II)$  的氧化过程中可能起着重要作用<sup>[31]</sup>。对这些细菌的锰氧化相关基因的分析表明,细菌锰氧化过程往往不是由单一基因编码控制,而是受较多基因的编码控制,而不同的细菌可能存在完全不同的机制。

表 1 已鉴定的不同细菌的锰氧化相关蛋白及基因

Table 1 Currently identified bacterial Mn( II )-oxidizing proteins and their encoding genes

Bacteria	Mn( II )-oxidizing proteins	Mn( II )-oxidizing genes	Gene function	Gene ( cluster) structure	References
<i>Bacillus</i>	MCO	<i>mnxA-mnxG</i>	Mn oxidation	An operon with 7 genes ( <i>mnxA, B, C, D, E, F, G</i> )	[3, 9]
<i>Pseudomonas</i>	Prepilin	<i>pilD/xcp</i>	Protein secretion	Single	[18, 27]
	Cytochrome c maturation operon	<i>ccm</i>	Protein secretion/Mn oxidation	An operon with 5 or more genes	[6, 19]
	MCO	<i>cumA-cumB</i>	Mn oxidation	Single	[20]
	Two-component regulatory pathway	<i>mnxS1-mnxS2-mnxR</i>	Response to environmental Mn concentration signal	An operon with 3 genes	[21]
	TCA cycle enzymes	<i>sdhABC, aceA, icd</i>	Linked to the electron transfer chain of Mn oxidation	An operon with <i>SdhABCD</i>	[6]
	Anthranilate synthetase	<i>trpE</i>	Linked to the electron transfer chain of Mn oxidation	Single	[6]
<i>L. discophora</i>	MCO	<i>mofA-mofC</i>	Mn oxidation	An operon with 3 genes	[25]
<i>Aurantimonas</i>	MCO	<i>moxA</i>	Mn oxidation	Single	[28]
<i>Pedomicrobium</i>	MCO	<i>moxCBA</i>	Protein secretion/Mn oxidation	An operon with 3 genes	[29]
<i>Erythrobacter</i>	Heme peroxidase	<i>mopA</i>	Mn oxidation	Single	[30]

## 2 细菌锰氧化基因的表达调控与锰氧化活性的影响因子

研究表明,细菌对锰的氧化受金属离子、光照、氧气和培养基等因素的影响。由于不同细菌对 Mn( II )的氧化机制不同,使其对外界影响因素的反应也不尽相同。

芽胞杆菌 SG-1 对 Mn( II )的氧化发生在其芽胞期,并将氧化锰沉淀包裹在其芽胞周围<sup>[32]</sup>。在 *mnxD* 中插入 *lacZ* 基因,检测  $\beta$ -半乳糖苷酶活性的变化,证明 *mnx* 基因簇的表达是在芽胞形成的中期到晚期启动的。除了 SG-1、MB-7 和 PL-12 外,在其它具有 Mn( II )氧化活性的芽胞杆菌中也发现存在 *mnxG* 基因,而不同芽胞杆菌中的 *mnxG* 并非是基因水平转移所造成,而是在生物进化过程逐渐形成的<sup>[15,33]</sup>。恶臭假单胞菌 MnB1 和 GB-1 细胞都是在对数生长期的末期到稳定期前期将 Mn( II )氧化为 Mn( III, IV ),并附着在细胞的表面<sup>[34]</sup>。其中, MnB1 是在对数生长期后期产生胞内锰氧化蛋白,于稳定期分泌到细胞外催化 Mn( II )氧化。这种蛋白对热敏感,其最佳的反应 pH 值为 7.0;而 GB-1 在稳定期对 Mn( II )的氧化活性与对数生长期末期的 O<sub>2</sub> 浓度相关,且酶活性受 NaN<sub>3</sub> 和 HgCl<sub>2</sub> 抑制<sup>[35]</sup>。

Cu<sup>2+</sup> 的微量增加可以显著提高芽胞杆菌 SG-1、恶臭假单胞菌 MnB1 和 GB-1 的 Mn( II )氧化活

性<sup>[20]</sup>,但对菌体的生长没有影响。Cu<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup> 均对生盘纤发菌 SS-1 的 Mn( II )氧化活性有影响,但不影响 *mofA* 基因的表达水平<sup>[26,36]</sup>,反映出 MCO (需要 Cu<sup>2+</sup> 的作用)可能直接参与该菌的锰氧化过程。

在芽胞杆菌、恶臭假单胞菌、生盘纤发菌、橙单胞菌和赤细菌中,锰氧化蛋白的活性都不受 2% SDS 的抑制。在 SDS-PAGE 后移除 SDS,这些氧化酶仍然具有锰氧化活性<sup>[4,25,30]</sup>。多数的锰氧化细菌如假单胞菌和赤细菌的氧化活性都会受到叠氮化合物、KCN、EDTA 和 Tris 等的抑制,而且对热敏感,说明这些蛋白可能是含金属的酶类<sup>[35,36]</sup>。此外,光照对  $\alpha$ -变形细菌 AzwK-3b 菌株的锰氧化活性是有促进作用的,但对赤细菌 SD-1 的锰氧化活性则有抑制作用<sup>[7,30]</sup>。

## 3 细菌 MCO 的结构特征和生物学功能

细菌的 MCO 是一组含铜的、利用铜离子作为辅助因子来氧化多种有机和无机化合物的氧化还原酶类。目前所分离的细菌锰氧化基因,如芽胞杆菌 SG-1 的 *mnxG*、恶臭假单胞菌 GB-1 的 *cumA* 等,都表现出与细菌的 *mco* 基因存在序列相似性的特征,反映出细菌 MCO 可能在锰氧化过程中起重要作用。

不同来源的 MCO 的氨基酸序列之间的同源性很低(<20%),但都含有保守性很高的铜结合位点

序列,以及由较多由 $\beta$ -折叠构成的桶状结构域。MCO中的铜结合位点多由组氨酸残基按一定规则排列而成。根据铜结合位点的不同,可以将MCO分为多种不同的类型,其中锰氧化相关MCO的铜结合位点都是两两配对,构成两个铜氧化亚家族的结构域<sup>[37]</sup>。研究较多的与锰氧化相关的酶MnxG, CumA和MofA都具有这种典型的铜结合位点,并形成2个 $\beta$ -桶结构域,而每个结构域内有4个铜结合位点用于结合铜离子,作为外来电子的受体(图2)。作者实验室对所克隆的1种细菌 $mco$ 基因分别进行了位点特异性突变和删除1个 $\beta$ -桶结构域的突变,结果所获得突变MCO催化活性和热稳定性得到较大提高<sup>[38]</sup>,且无论是在融合状态下还是在固定于细胞壁的状态下均显示了氧化有机底物的活性<sup>[39]</sup>。最近,我们将从另1株土壤锰氧化细菌所

克隆的 $mco$ 基因在2种不同细菌受体菌的细胞表面进行定位表达,结果发现重组菌产生了氧化Mn(II)形成Mn(IV)化合物的活性,而在这些细菌细胞内表达该MCO、或经体外纯化的MCO均无锰氧化活性。这是目前首次发现异源表达的细菌MCO在特定条件下具有氧化Mn(II)的活性(结果待发表)。

MCO的生物学功能包括有对金属的抗性、黑色素的产生、对UV的抵御作用以及金属离子的氧化作用等。研究证实这些酶作用过程都需要金属离子的参与,而这与细菌的锰氧化作用需要铜离子参与的作用方式很类似。不同细菌来源的MCO的作用底物有较大的差异性,从其分子结构与作用方式推测这些细菌MCO可能既可作用于有机底物,也具有氧化金属离子的活性。

MofA	303 N I H L H G G 384 W Y H D H T I 1172 T H P V H F H L L 1276 V W H C H I L G H E E
MnxG	526 G M H I H F V 572 F F H D H L F 280 T H V F H Y H V H 332 I I H C H L Y P H F G
MCO	98 T I H W H G L 138 W Y H P H T H 458 L H P F H I H G T 513 M A H C H L L E H E D
McoIII	99 T L H W H G L 139 W F H P H Q H 442 L H P F H I H G T 497 M A H C H L L E H E D
Hcp	118 T F H S H G I 178 I Y H I H I D 993 L H T V H F H G H 1037 L L H C H V T D H I H
CumA	94 T I H W H G I 136 W Y H P H V S 390 Q H P I H L H G M 440 M F H C H V I D H M E
MoxA	128 T I H W H G Q 170 M Y H P H A D 264 N H P I H M H G Y 316 A I H C H K S H H T M
Lac	76 S I H H H G I 121 W W H S H S S 423 A H P F H L H G S 487 I F H C H I Q W H M E

图2 不同微生物中MCO的铜结合位点的比对分析

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of the copper-binding sites in different bacterial multicopper oxidases. MofA, *L. discophora* SS-1 strain (GenBank accession no. Z25774); MnxG, *Bacillus* sp. SG-1 strain (GenBank: U31081); MCO, *A. hydrophila* WL-11 strain (GenBank: FJ797682); MCO III, *E. coli* DH1 III type multicopper oxidases (GenBank: cp001637); Hcp, human ceruloplasmin (GenBank: M13699); CumA, *P. putida* GB-1 strain (GenBank: AF086638); MoxA, *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 strain (GenBank: AM049177); Lac, *R. glutinis* lactase (GenBank: AB434421)

#### 4 目前存在的问题及未来工作展望

尽管人们从不同细菌中鉴定出的Mn(II)氧化蛋白已达十几类,对其活性及其机制也开展了许多研究,但是,目前还存在很多悬疑问题:

(1)迄今还没有一种体外纯化的细菌MCO被发现在细胞外可催化对Mn(II)的氧化作用,且从多种锰氧化细菌中所分离的 $mco$ 基因在进行异源表达时,也并未表现锰氧化活性。因此,细菌MCO是否直接参与其锰氧化作用过程依然是有争议的。即便是对同一种恶臭假单胞菌,有的研究认为MCO起重要的作用<sup>[34]</sup>,而另一研究则认为MCO没有作用<sup>[21]</sup>。此外,尽管一般认为芽胞杆菌的锰氧

化作用与MCO有关,但研究发现某些具有Mn(II)氧化活性的芽胞杆菌菌株并不产生MCO<sup>[5,33]</sup>。

(2)既然多种非锰氧化活性细菌也产生MCO蛋白,而细菌MCO具有较低的基质反应特异性,那么细菌MCO对Mn(II)的氧化作用是一种直接的氧化作用,还是间接作用目前还是未知的。

(3)目前研究比较深入的锰氧化细菌都是分离于海水或淡水环境中,而对土壤锰氧化细菌的报道较少。迄今所有对土壤锰氧化细菌的研究工作,均未能分离到类似海洋细菌所携带的锰氧化基因簇。那么,土壤和海水以及淡水环境中锰氧化细菌的氧化机制是否相同?

(4)在海洋细菌体内存在多个基因与锰氧化相

关,是否说明锰氧化的过程并不是由一种酶直接完成的,而是多种酶分别参与这个过程?如上所述,研究发现细胞色素 C 合成酶系也与锰氧化作用相关,这样是否说明细菌锰氧化的过程只是某一生化过程的副产物而已,而不是由某一酶或酶系(包括细菌 MCO)来专一性控制的?

尽管还存在许多疑问,但现有的研究进展使人们认识到细菌对 Mn(II)氧化反应过程至少应该包含 2 个关键环节:一个是在细胞内合成催化 Mn(II)氧化反应的酶蛋白或者复合物,这可能是由 1 个或多个酶蛋白组成;另一个环节是在胞内合成的锰氧化蛋白经专门分泌系统或是借助其它的分泌途径分泌到细胞外表面,再经过糖基或其它细胞膜组分的修饰,或者在其它细胞壁(膜)组分的参与下完成对 Mn(II)的氧化作用,并在细胞表面形成特定的氧化锰胶膜。

基于目前锰氧化细菌研究工作的进展,我们预期细菌锰氧化作用的研究工作将来可能集中在以下方面:(1)土壤锰氧化细菌类群与活性。有关细菌锰氧化作用的研究重心可能从海洋沉积物等特殊生境的细菌类群转移到常见的土壤细菌类群,尤其是针对其直接与间接氧化活性、锰氧化基因及其表达调控因素与锰氧化反应机制等的工作;(2)细菌锰氧化的信号传导作用,这方面的工作是目前所缺乏的;(3)细菌锰氧化酶的鉴定与作用方式的深入研究。目前主要采用体内的转座作用或基因敲除方式,或体外通过 LBB 法测定细胞蛋白的方式来鉴定锰氧化因子,这样只能证实某个单一基因是否参与锰氧化过程,而不能证明多种因子的共同作用,且 LBB 法也不能测定是直接氧化还是间接氧化。将来可运用功能基因组学、蛋白质组学和生物信息学等技术来探究细菌锰氧化酶及其作用方式;(3)代谢网络的建立。既然细菌的锰氧化作用不是一个单一反应,细胞内就可能存在一个相关的代谢网络,利用该网络细菌可将锰氧化过程与某些代谢作用耦联,从而使细菌从氧化锰的反应过程中获益;(4)土壤生境的细菌生态学与宏基因组学研究;(5)生物成矿作用。通过研究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等,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。总之,尽管目前人们对细菌锰氧化作用的认识还很有限,但通过深入研究细菌的锰氧化

作用这一自然环境中发生的生物-无机物-有机物的复杂反应,对于揭示土壤等陆地地表生系统中锰氧化物的形成特点和行为,促进土壤学、地生物学和环境科学等学科的交叉渗透将具有十分重要的意义。

## 参考文献

- [ 1 ] Tebo BM, Johnson HA, McCarthy JK, Templeton AS. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 421-428.
- [ 2 ] 刘凡,冯雄汉,陈秀华,邱国红,谭文峰,贺纪正. 氧化锰矿物的生物成因及其性质的研究进展. *地学前缘 (Earth Science Frontiers)*, 2008, 15(6): 66-73.
- [ 3 ] He J, Zhang L, Jin S, Zhu Y. Bacterial communities inside and surrounding soil iron-manganese nodules. *Geomicrobiology Journal*, 2008, 25: 14 - 24.
- [ 4 ] Dick GJ, Torpey JW, Beveridge TJ, Tebo BM. Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1527-1534.
- [ 5 ] Dick GJ, Lee YE, Tebo BM. Manganese(II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin hydrothermal sediments and plumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3184-3190.
- [ 6 ] Caspi R, Tebo BM, Haygood MG. c-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3549-3555.
- [ 7 ] Hansel CM, Francis CA. Coupled photochemical and enzymatic Mn(II) oxidation pathways of a planktonic *Roseobacter*-like bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3543-3549.
- [ 8 ] Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, Dick GJ, Murray KJ, Parker D, Verity R, Webb SM. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2004, 32: 287-328.
- [ 9 ] van Waasbergen LG, Hildebrand M, Tebo BM. Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(12): 3517-3530.
- [ 10 ] Zhang L, Liu F, Tan W, Feng X, Zhu Y, He J. Microbial DNA extraction and analyses of soil iron-manganese nodules. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40: 1364-1369.

- [11] Tan W, Liu F, Feng X, Huang Q, Li X. Adsorption and redox reactions of heavy metals on Fe-Mn nodules from Chinese soils. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 284:600-605.
- [12] Feng XH, Zhai LM, Tan WF, Liu F, He JZ. Adsorption and redox reactions of heavy metals on synthesized Mn oxide minerals. *Environmental Pollution*, 2007, 147:366-373.
- [13] 王伟, 李林, 张震, 刘凡. 一株抗锰土壤芽胞杆菌的分离鉴定与生物学活性分析. *微生物学通报 (Microbiology China)*, 2010, 37(9):1287-1292.
- [14] Francis CA, Tebo BM. Enzymatic manganese ( II ) oxidation by metabolically dormant spores of diverse *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2):874-880.
- [15] van Waasbergen LG, Hoch JA, Tebo BM. Genetic analysis of the marine manganese-oxidizing *Bacillus* sp. strain SG-1: protoplast transformation, Tn917 mutagenesis, and identification of chromosomal loci involved in manganese oxidation. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(23):7594-7603.
- [16] Tebo BM, Ghiorse WC, van Waasbergen LG, Siering PL, Caspi R. Bacterially mediated mineral formation; insights into manganese ( II ) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 1997, 35:225-266.
- [17] Villalobos M, Toner B, Bargar J, Sposito G. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, 67:2649-2662.
- [18] Brouwers GJ, de Vrind JPM, Corstjens PLAM, de Vrind-de Jong EW. Involvement of genes of the two-step protein secretion pathway in the transport of the manganese-oxidizing factor across the outer membrane of *Pseudomonas putida* strain GB-1. *American Mineralogist*, 1998, 83:1573-1582.
- [19] de Vrind JP, Brouwers GJ, Corstjens PL, den Dulk J, de Vrind-de Jong EW. The cytochrome c maturation operon is involved in manganese oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10):3556-3562.
- [20] Brouwers GJ, de Vrind JP, Corstjens PL, Cornelis P, Baysse C, de Vrind-de Jong EW. *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4):1762-1768.
- [21] Geszvain K, Tebo BM. Identification of a two-component regulatory pathway essential for Mn ( II ) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 76(4):1224-1231.
- [22] Adams LF, Ghiorse WC. Influence of manganese on growth of a sheathless strain of *Leptothrix discophora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(3):556-562.
- [23] 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(12):4001-4010.
- [24] Adams LF, Ghiorse WC. Physiology and ultrastructure of *Leptothrix discophora* SS-1. *Archives of Microbiology*, 1986, 145:126-135.
- [25] Corstjens PLAM, de Vrind JPM, Goosen T, de Vrind-de Jong EW. Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 *mofA* gene, a gene putatively encoding a manganese-oxidizing protein with copper domains. *Geomicrobiology Journal*, 1997, 14(2):91-108.
- [26] Brouwers GJ, Corstjens PLAM, de Vrind JPM, Verkamman A, de Kuyper M, de Vrind-de Jong EW. Stimulation of Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Leptothrix discophora* SS-1 by Cu<sup>2+</sup> and sequence analysis of the region flanking the gene encoding putative multicopper oxidase MofA. *Geomicrobiology Journal*, 2000, 17:25-33.
- [27] de Vrind J, de Groot A, Brouwers GJ, Tommassen J, de Vrind-de Jong E. Identification of a novel Gsp-related pathway required for secretion of the manganese-oxidizing factor of *Pseudomonas putida* strain GB-1. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(4):993-1006.
- [28] Dick GJ, Podell S, Johnson HA, Rivera-Espinoza Y, Bernier-Latmani R, McCarthy JK, Torpey JW, Clement BG, Gaasterland T, Tebo BM. Genomic insights into Mn ( II ) oxidation by the marine alphaproteobacterium *Aurantimonas* sp. strain SI85-9A1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(9):2646-2658.
- [29] 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. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4):944-953.
- [30] Anderson CR, Johnson HA, Caputo N, Davis RE, Torpey JW, Tebo BM. Mn ( II ) oxidation is catalyzed by heme peroxidases in "*Aurantimonas manganooxydans*" strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. strain SD-21. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75:4130-4138.

- [31] Moy YP, Neilan BA, Foster LJ, Madgwick JC, Rogers PL. Screening, identification and kinetic characterization of a bacterium for Mn ( II ) uptake and oxidation. *Biotechnology Letters*, 2003, 25 : 1407-1413.
- [32] Bargar JR, Tebo BM, Bergmann U, Webb SM, Glatzel 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*, 2003, 90 : 143-154.
- [33] Mayhew LE, Swanner ED, Martin AP, Templeton AS. Phylogenetic relationships and functional genes: distribution of a gene ( *mnxG* ) encoding a putative manganese-oxidizing enzyme in *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 ( 23 ) : 7265-7271.
- [34] Francis CA, Tebo BM. *cumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn( II )-oxidizing and non-Mn( II )-oxidizing *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 ( 9 ) : 4272-4278.
- [35] Okazaki M, Sugita T, Shimizu M, Ohode Y, Iwamoto K, de Vrind-de Jong EW, de Vrind JP, Corstjens PL. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 ( 12 ) : 4793-4799.
- [36] El Gheriany IA, Bocioaga D, Hay AG, Ghiorse WC, Shuler ML, Lion LW. Iron requirement for Mn ( II ) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 ( 5 ) : 1229-1235.
- [37] Nakamura K, Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62 ( 18 ) : 2050-2066.
- [38] Shao X, Gao Y, Jiang M, Li L. Deletion and site-directed mutagenesis of laccase from *Shigella dysenteriae* results in enhanced enzymatic activity and thermostability. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 44 : 274-280.
- [39] Shao X, Jiang M, Yu Z, Cai H, Li L. Surface display of heterologous proteins in *Bacillus thuringiensis* using a peptidoglycan hydrolase anchor. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8 ( 1 ) : 48.

## Molecular mechanism of bacterial manganese ( II ) oxidation-A review

Zhen Zhang<sup>2</sup>, Lin Li<sup>1\*</sup>, Fan Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, <sup>2</sup> Key Laboratory of Subtropical Agricultural Resource and Environment, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** Manganese oxides are a type of high-reactive minerals that play an important role in biogeochemical cycling of many major and trace elements. Bacteria are crucial in bio-catalyzing the formation of most naturally occurring Mn minerals. Currently, a variety of bacterial strains isolated from various habitats such as oceans, fresh waters, soils and ores have exhibited the distinctive bio-oxidation activities to convert the soluble Mn( II ) oxides to the insoluble Mn( IV ) ones. Here we review the research advances regarding the structures and characterization of several classes of bacterial manganese( II )-oxidizing genes, their expression regulations, the structures as well as functions of multicopper oxidases they encoded. Some raised mechanistic questions and the future research prospects are also discussed.

**Keywords:** Manganese-oxidizing bacteria, Mn( II ) oxidation, Gene, Molecule mechanism

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China ( 40830527 )

\* Corresponding author. Tel: + 86-27-87286952; Fax: + 86-27-87280670; E-mail: lilin@ mail. hzau. edu. cn

Received: 8 July 2010 / Revised: 7 September 2010