



## 土壤中可编码乌头酸异构酶的芽胞杆菌菌株筛选及鉴定

郑操<sup>1</sup>, 蔡鹭<sup>1</sup>, 张中强<sup>1</sup>, 王立华<sup>2</sup>, 戴余军<sup>1</sup>, 都萃颖<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>湖北工程学院生命科学技术学院, 湖北省植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖北 孝感 432000

<sup>2</sup>湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北 孝感 432000

**摘要:** 【目的】以芽胞杆菌(*Bacillus*)为筛选对象, 分离土壤中可编码乌头酸异构酶(aconitate isomerase, AI)的革兰氏阳性(Gram positive, G<sup>+</sup>)菌株, 以丰富对 AI 分布的科学认识, 为其生物学功能研究奠定理论与材料基础。【方法】采用土样高温预处理法、含反式乌头酸(*trans*-aconitic acid, TAA)唯一碳源的 ACO 固体平板培养法, 结合 16S rDNA 基因序列同源性分析, 筛选能够编码 AI 的芽胞杆菌目的菌株。【结果】共分离得到 22 株能够利用 TAA 碳源的细菌菌株, 成功鉴定了其中的 16 株, 分别为巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*) 2 株, 阿氏芽胞杆菌(*Bacillus aryabhattai*) 7 株, 短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*) 1 株, 未鉴定到种的芽胞杆菌(*Bacillus* sp.) 6 株; 且它们所含 AI 编码基因与已知 AI 基因在序列上存在差异。【结论】首次证明可编码 AI 的芽胞杆菌细菌种类具有多样性, 暗示 G<sup>+</sup>细菌广泛编码 AI 的可能性, 更新了 AI 几乎只在 G<sup>-</sup>细菌中分布的观点, 为后续深入挖掘 AI 基因及其生物学功能研究提供更多可用微生物资源。

**关键词:** 乌头酸异构酶, 芽胞杆菌, 分离鉴定, 乌头酸顺反异构体

乌头酸异构酶(aconitate isomerase, AI; EC 5.3.3.7)是介导三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环中间产物顺式乌头酸(*cis*-aconitic acid, CAA)与其异构体反式乌头酸(*trans*-aconitic acid, TAA)之间相互转化的酶(图 1)<sup>[1]</sup>。1961 年, Rao 和 Altekar 以细菌为材料首次提出 AI 的存在。原因是他们发现一些荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)可以利用 ACO 培养基中唯一的碳源组分 TAA 生长;

将这种细菌的无细胞提取液在体外与 TAA 孵育, 能检测到柠檬酸的产生, 与 CAA 孵育则能检测到 TAA 产生<sup>[2]</sup>。鉴于此种既能够催化 CAA 生成 TAA, 也能够将外源 TAA 经由 CAA 掺入 TCA 循环的双向功能(图 2), Rao 和 Altekar 将荧光假单胞菌中含有的这种新酶命名为“乌头酸异构酶”<sup>[2]</sup>。此后, 能否利用 TAA 唯一碳源生长被视为判断微生物是否能够编码 AI 的科学标准<sup>[3-4]</sup>。虽然由 AI 介导

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究计划青年人才项目(Q20182705); 国家自然科学基金(31700069); 湖北省技术创新专项(重大项目)(2018ABA098)

\*通信作者。Tel: +86-712-2345490; E-mail: ducuiying.123@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2018-10-31; 修回日期: 2019-01-16; 网络出版日期: 2019-03-19

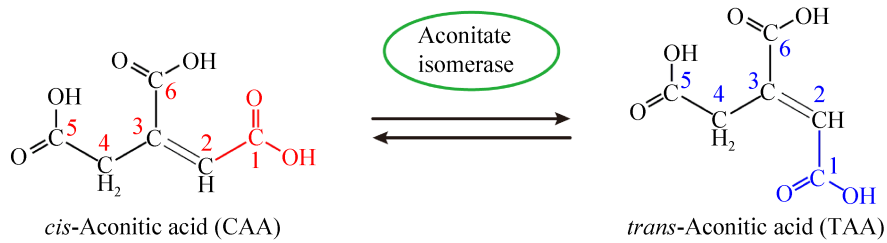


图 1. 乌头酸异构酶介导 CAA 与 TAA 之间的相互转化反应

Figure 1. The interconversion reaction mediated by aconitate isomerase between CAA and TAA.

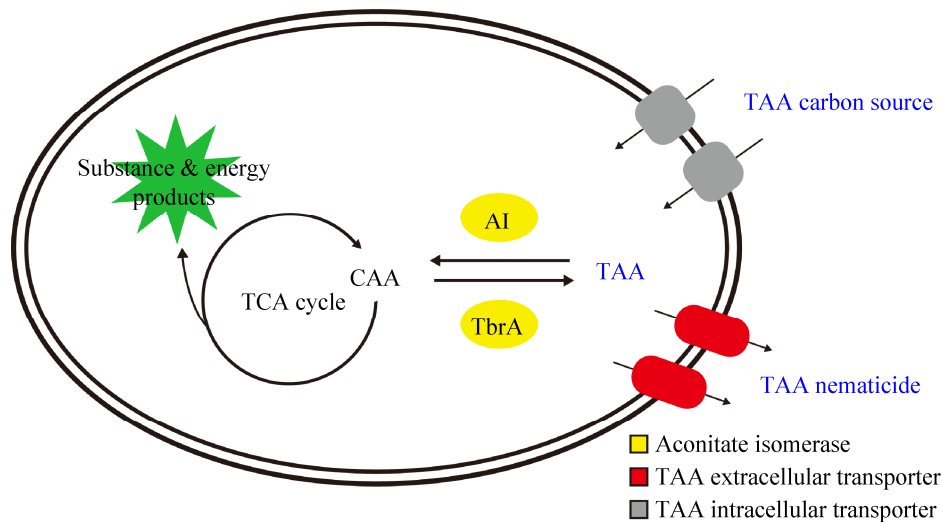


图 2. 乌头酸异构酶在编码细菌中介导的特异生理功能

Figure 2. The specific physiological functions of aconitate isomerase in bacteria.

的乌头酸异构生化反应是细胞重要 TCA 循环的支路途径，但它却是代谢非必需的<sup>[4]</sup>。而这也可能是导致迄今为止仅有极少数 AI 基因被关注和克隆的原因。

代谢层面的非必需性暗示了 AI 支路途径在编码细胞中重要的生理功能<sup>[3-5]</sup>。最近一项针对线虫病病原细菌——苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)<sup>[6-8]</sup>的研究揭示了生物体内首条 AI 基因(*tbrA*)。其编码的 TbrA 蛋白在体内专一性地行使杀线虫毒素 TAA 的生物合成功能(图 2)，是 Bt 致病机制的重要组成部分<sup>[1,9-10]</sup>，但 TbrA 并不赋予 Bt 代谢 TAA 碳源的能力<sup>[4]</sup>。TbrA 蛋白的生物学功能虽然与 AI 催化异构平衡更易朝生成 TAA 的正反应方

向进行这一体外酶学特征相吻合<sup>[1,5,11]</sup>，但人们发现，还有许多细菌能够编码 AI，且更多地被用于执行 TAA 利用的生理功能(图 2)<sup>[3-4]</sup>，即在体内专一性地介导异构逆反应，而非 Bt 案例中介导 TAA 合成的正反应。这说明除了合成毒素，AI 还具有其他未知且更普遍的重要生物学功能在等待探索。

细菌 TAA 利用能力最初在革兰氏阴性(Gram negative, G<sup>-</sup>)的荧光假单胞菌中发现。后续研究进一步表明，绝大多数能够代谢 TAA 碳源的细菌也为 G<sup>-</sup>类型。例如，在 Watanabe 等检测的 55 株 G<sup>-</sup>细菌和 19 株 G<sup>+</sup>细菌中，能够利用 TAA 的个体比例分别为 83.6%和 21.0%<sup>[3]</sup>。显著的数

值差异究竟是因所调查  $G^+$  菌株数偏少, 还是因  $G^+$  细菌类型本不倾向编码催化乌头酸异构逆反应的 AI, 即不倾向具有逆反应所赋予的相应生物学功能? 要弄清这一科学问题, 有必要检测更多  $G^+$  细菌利用 TAA 碳源的能力, 这也有利于更加深入地认识与理解目前仍知之甚少的 AI 生物学意义, 为其功能研究做好充分的前期准备工作。

芽胞杆菌是一类广泛存在于自然界中的  $G^+$  细菌, 也是一类广泛应用于农业、工业、医学等领域的重要微生物资源, 种类丰富<sup>[6,12]</sup>。截至 2016 年 6 月, 全世界发现并鉴定的芽胞杆菌已达到 813 种<sup>[13]</sup>, 且它也是目前唯一被报道能够编码 AI 的  $G^+$  细菌种类<sup>[1]</sup>。以芽胞杆菌为对象开展 TAA 代谢能力的调查研究有利于真实反映  $G^+$  细菌中的 AI 分布情况, 具备很好的科学代表性与可行性。本文以土壤为实验材料, 通过从其中分离并鉴定具有 AI 编码能力的芽胞杆菌菌株, 以期为后期全面揭示 AI 生物学功能提供更多可用微生物资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤样品采集

四份土壤样品均采集自湖北省孝感市湖北工程学院生科楼附近, 采样深度 5–10 cm, 采集后装入无菌塑料袋中 4 °C 保存备用。其基本理化性质和采集生境如下: 1 号土壤采自大楼北侧草地, 颜色均一, 呈棕色, 质地紧实, 黏度适中, 水浸液 pH 呈弱酸性(pH=6.49); 2 号土壤采自大楼东侧菜地, 呈均一深棕色, 松软, 黏度大, 碱性(pH=7.84); 3 号土壤采自大楼北侧荒地, 黄棕色, 质地紧实, 干燥, 碱性(pH=7.87); 4 号土壤采自大楼西侧石

楠树根系附近, 棕色, 质地紧实, 湿润, 弱碱性(pH=7.30)。

### 1.2 引物

本研究采用扩增细菌 16S rDNA 基因的通用引物鉴定分离得到的芽胞杆菌菌株<sup>[14–15]</sup>。引物名称及序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCACCC-3'<sup>[16]</sup>。用于扩增芽胞杆菌 *tbrA* 基因 ORF 的引物名称及序列为 *tbrA*-1: 5'-ATGAAAATACCTTGTTTTGT-3', *tbrA*-2: 5'-AGGTATTATTAATTCGCCTTT-3'<sup>[11]</sup>。用于扩增假单胞菌 *ais* 基因不含信号肽部分的 ORF 的引物名称及序列为 *ais*-1: 5'-GCGCAACCCGTCACCAC-3', *ais*-2: 5'-CGGCTGGGCGGAACC-3'<sup>[15]</sup>。设置上述所有 PCR 反应的退火温度为 52 °C, 35 个循环, 延伸时间依据产物长度设置为 1.0–1.5 min。

### 1.3 培养基配方

LB 培养基(1 L 配方): NaCl, 10 g; 酵母提取物, 5 g; 蛋白胨, 10 g; 调节 pH 至 7.0–7.5, 定容。121 °C 高温高压灭菌 30 min。固体培养基需添加 1.6%–1.8% 的琼脂粉。

ACO 培养基(含 TAA 唯一碳源)(1 L 配方)<sup>[3]</sup>: TAA, 7.5 g (用 NaOH 调节 pH 至 7.0, 过滤除菌, 单独添加); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1 g; 调节 pH 至 6.5, 定容。121 °C 高温高压灭菌 30 min。相应固体培养基需添加 1.6%–1.8% 的琼脂粉。

### 1.4 试剂与耗材

PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase, DNA Ladder Marker 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Biotek 公司。

常用化学药品购自国药集团化学试剂有限公司, TAA 标准品购自 Sigma 公司。引物合成与 DNA 测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

### 1.5 ACO 平板法筛选能够编码乌头酸异构酶的芽胞杆菌

碾磨土壤样品至细粉状, 置于 80 °C 烘箱中 10 min 以杀死不产芽胞的细菌; 称取 1 g 粉末状土壤, 接种至 20 mL 液体 LB 培养基中, 置于 28 °C 恒温摇床复苏培养 2 h; 将离心后的培养液涂布 ACO 固体平板, 置于 28 °C 恒温培养箱倒置培养 2–3 d; 将长出的形态上疑似芽胞杆菌的单菌落挑出, 在 LB 固体培养基上复壮; 最后将菌落转接至 ACO 固体平板, 以复证其 TAA 利用能力, 并保存于 -80 °C、终浓度为 20% 的甘油中。对四份实验土壤均施用上述相同操作。

### 1.6 分离菌株的分子生物学鉴定

分离得到的菌株基因组 DNA (gDNA) 的提取操作参照细菌总 DNA 抽提试剂盒说明书。以 gDNA 为模板特异性扩增 16S rDNA 基因片段, 回收扩增产物并测序, 将获得序列在 GenBank 数据

库中利用 BLAST 在线比对工具获取分离菌株的种属信息。

## 2 结果和分析

### 2.1 从土壤样品中分离可编码乌头酸异构酶的芽胞杆菌菌株

芽胞杆菌在自然环境中一般以抗逆性强的芽胞形式存在<sup>[6]</sup>。这一特性使得可以通过对土壤高温预处理以杀死对热敏感的无芽胞细菌, 而大比例分离到具有潜在 AI 编码能力的芽胞杆菌目的菌株。作者前期发现, 如果待检测细菌处于休眠的芽胞期, 即使基因组编码 AI 也不能使菌体表现出 TAA 利用能力。这说明 ACO 培养基无法促使芽胞萌发, 因此, 在丰富营养条件下的复苏培养环节十分必要。结果表明, 从 1–4 号土壤样品中分别筛选到 16 株、1 株、2 株、3 株, 共 22 个形态疑似芽胞杆菌的单菌落, 其中以来自草地生态环境的 1 号土壤样品含有的目标菌落数最多。随后, 将 22 个单菌落复点在 ACO 平板上进行 TAA 利用能力复证(图 3), 相应菌落形态观察结果及与土壤样品编号的对应关系见表 1。

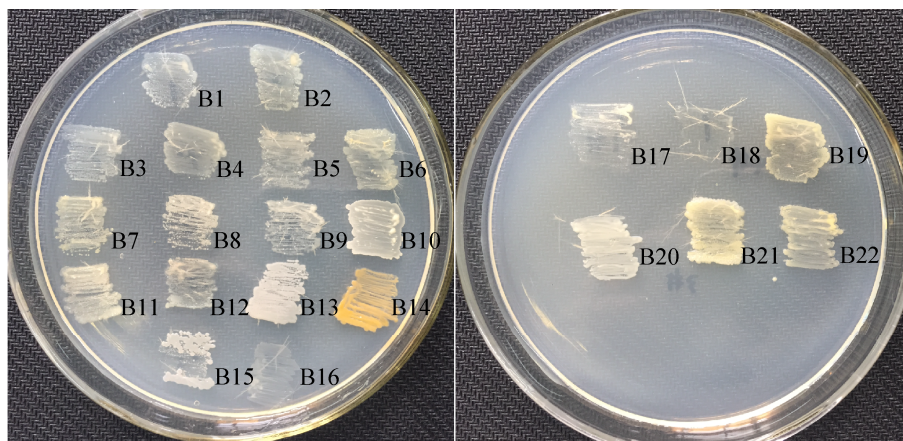


图 3. ACO 平板法复证筛得土样菌株的 TAA 利用能力

Figure 3. Verification of TAA utilizing ability of the soil bacterial isolates by second-round ACO plate test. Strains B1–B16, B17, B18–B19 and B20–B22 were isolated from 1#–4# soil samples, respectively.

表 1. 筛得土样菌株的菌落形态观察与样品来源

Table 1. Colony morphology observation and sample source of the soil bacterial isolates

Strain number	Soil source	Colony color	Transparency	Glossiness	Humidity
B1	1# (grassland, north)	white	Low	Low	Low
B2	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B3	1# (grassland, north)	white	Low	Low	Low
B4	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B5	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B6	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B7	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B8	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B9	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B10	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B11	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B12	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B13	1# (grassland, north)	white	Low	Low	Low
B14	1# (grassland, north)	orange	Low	High	High
B15	1# (grassland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B16	1# (grassland, north)	slight white	Low	Low	Low
B17	2# (vegetable field, east)	slight yellow	Low	Low	Low
B18	3# (wasteland, north)	slight yellow	Low	Low	Low
B19	3# (wasteland, north)	yellow	Low	Low	Low
B20	4# ( <i>Photinia serrulata</i> rhizosphere, west)	slight white	Low	Low	Low
B21	4# ( <i>Photinia serrulata</i> rhizosphere, west)	yellow	Low	Low	Low
B22	4# ( <i>Photinia serrulata</i> rhizosphere, west)	yellow	Low	Low	Low

## 2.2 目的菌株的鉴定

分别抽提上述 22 株目的菌株的总 DNA 并用 PCR 反应模板, 利用通用引物对 27F/1541R 进行 16S rDNA 基因扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 除了 B9 和 B20 菌株的总 DNA 模板未获得扩增产物, 其余 20 株细菌均成功扩增, DNA 产物大小约 1.5 kb。依次纯化 20 个 16S rDNA 基因扩增产物, 交付北京擎科新业生物技术有限公司进行 DNA 序列测定。结果显示, B3、B10、B12、B16 菌株测序失败。

将测序成功的 16 株细菌的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中经 BLAST 比对分析显示, 16 株细菌均隶属于芽胞杆菌属(*Bacillus* genus) (表 2)。其中 B14 菌株能够产生明显的橘黄色色素, 与之最

为相近的种是 *Bacillus* sp. BZ69, 这一结果与已报道的 *Bacillus* sp. BZ-SZ-XJ18 菌株同样产生橘黄色色素的性状相一致<sup>[17]</sup>。具体鉴定结果见表 2。

## 2.3 目的菌株中所含乌头酸异构酶基因的初步分析

目前, *tbrA* 是 G<sup>+</sup>细菌中唯一已知的 AI 编码基因, 克隆自 Bt 菌株 CT-43<sup>[4]</sup>。为了验证上述鉴定株是否含有该基因, 我们设计了覆盖 *tbrA* ORF 全长(1071 bp)的 PCR 扩增实验。如图 4-A 所示, 16 株芽胞杆菌鉴定株对应的扩增结果均为阴性, 说明它们含有的目的基因在序列上与 *tbrA* 存在差异。但由于可供参考的 AI 基因数量实在太少, 我们无法进一步确定这种差异究竟是 *tbrA* 同源序列间的差异还是来自不同进化起源即新型 AI 基因间

的差异, 只能等待后续克隆得到更多 AI 基因并分析其序列特征后才能有所定论。此外, *ais* 是 G<sup>-</sup>细菌中唯一已知的 AI 编码基因, 克隆自 *Pseudomonas* sp. WU-0701 菌株<sup>[5]</sup>。该 AI 蛋白全长

261 aa, N 端 1–22 aa 为 G<sup>-</sup>细菌周质空间定位信号肽。利用覆盖 23–261 aa 区域的引物对 16 株芽胞杆菌鉴定株总 DNA 进行扩增, 结果也均为阴性 (图 4-B)。

表 2. 16 株目的菌株的种属鉴定表

Table 2. Species identification of the 16 bacterial isolates

Strain number	Identified species of isolated strains by BLAST	Coverage/%	Identity/%
B1	<i>Bacillus megaterium</i> L24	97	99
B2	<i>Bacillus aryabhatai</i> isolate PSB56	98	99
B4	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L42	98	99
B5	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L21	99	99
B6	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L21	99	99
B7	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L21	99	99
B8	<i>Bacillus</i> sp. NBGD33	98	99
B11	<i>Bacillus megaterium</i> GC61	98	99
B13	<i>Bacillus</i> sp. SZ087	96	99
B14	<i>Bacillus</i> sp. BZ69	99	99
B15	<i>Bacillus</i> sp. SZ087	97	99
B17	<i>Bacillus</i> sp. ADJ17	99	99
B18	<i>Bacillus</i> sp. 7B-635	99	99
B19	<i>Bacillus aryabhatai</i> L21	99	99
B21	<i>Bacillus aryabhatai</i> IHB B 7132	99	99
B22	<i>Bacillus pumilus</i> GC43	99	99

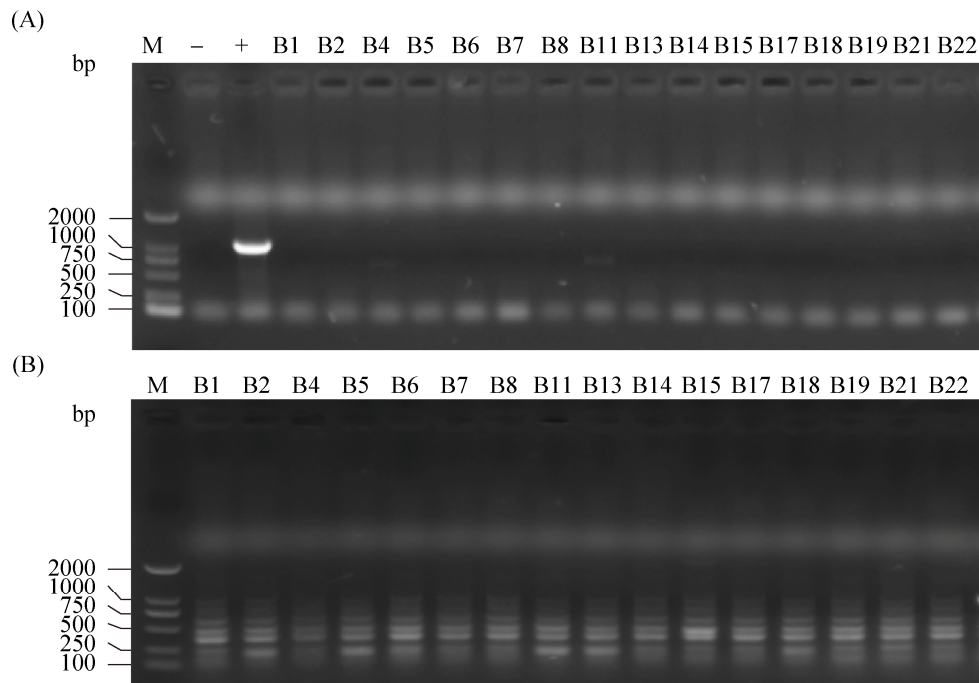


图 4. PCR 验证 16 株芽胞杆菌鉴定株含有 *tbrA* 基因(A)和 *ais* 基因(B)的情况

Figure 4. PCR verification of the existence of *tbrA* (A) and *ais* (B) genes in 16 identified *Bacillus* strains. -: the negative control using ddH<sub>2</sub>O as template; +: the positive control using Bt CT-43 gDNA as template.

虽然以上分析未能为所分离菌株中 AI 基因的后续解析提供明确的指导性信息, 但它强烈地说明了需要加强细菌中 AI 基因鉴定工作力度的必要性。而本研究所获的这 16 株芽胞杆菌就为今后这项工作的开展提供了宝贵菌株材料。

### 3 讨论

本文从 4 份采集地理位置相对集中的土壤样品中均分离获得了可编码 AI 的芽胞杆菌菌株。这其中包含的 3 种芽胞杆菌(*B. megaterium*, *B. aryabhattai*, *B. pumilus*), 5 株有可能隶属于其他种的芽胞杆菌(*Bacillus* sp. ADJ17, *Bacillus* sp. NBGD33, *Bacillus* sp. SZ087, *Bacillus* sp. BZ69, *Bacillus* sp. 7B-635), 再结合已明确报道能高效利用 TAA 的贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)<sup>[4]</sup>, 共同说明了芽胞杆菌属中可编码 AI 的细菌种类具有多样性。本研究结果与 21 年前由 Watanabe 等建立的只有极少数 G<sup>+</sup>细菌如丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 才具有 AI 编码能力的观点<sup>[3]</sup>有所不同, 扩展了能够编码 AI 的 G<sup>+</sup>细菌范围; 同时, 此类 G<sup>+</sup>细菌成员数量的增加也暗示了 G<sup>+</sup>细菌有可能同 G<sup>-</sup>细菌一样, 出于某种未知的功能目的而广泛编码 AI。本研究的发现能够极大促进人们对于 AI 分布及其所介导生物学功能的科学认识, 也说明了选择芽胞杆菌作为筛选对象的科学性与可行性。

既然身为代谢非必需的生化途径, AI 蛋白究竟在编码菌中介导了何种生物学功能, 使得众多 G<sup>-</sup>、G<sup>+</sup>细菌都需要编码这种活性蛋白质? 从 Watanabe 等的研究和本文中不难看出, 绝大多数具有 AI 编码能力的细菌都是植物相关细菌 (plant-associated bacteria) 或是从植物生境中分离

获得(表 1), 而 TAA 本身又是一种较广泛存在尤其是在草料中大量存在的分泌性植物碳源<sup>[18-23]</sup>。有理由推测, TAA 利用能力很可能是这些编码细菌多元碳源同化机制中的一条新途径, 用以满足自身在特定环境中生长时对碳源营养的需求。的确有研究表明, 多元碳源利用能力有助于细菌在含有相应碳源的植物环境中获得明显的生长、定殖与竞争优势<sup>[24]</sup>。例如, 葡萄病原菌——葡萄土壤杆菌(*Agrobacterium vitis*)由于携带了酒石酸代谢功能基因区段 *TARI*、*TARII* 和 *TARIII*, 而能够以葡萄宿主中丰富的酒石酸成分为碳源进行旺盛的生长繁殖<sup>[25-26]</sup>; 细菌中草酸或鼠李糖单一成分利用能力的缺失可显著削弱其在植物根表单独定殖与混合定殖时的生物量<sup>[27-28]</sup>。因此, 本研究认为 AI 蛋白很可能具有帮助编码细菌获取多元植物碳营养, 用以强化自身宿主环境适应性的重要生物学功能, 后期可以通过构建 AI 基因缺失突变株并测定其生长、定殖、竞争等适应性表型的变化进行验证。前述提到, 在线虫病原芽胞杆菌中, AI 并不介导碳源利用功能, 而是特异性地催化异构正反应, 即杀线虫毒素 TAA 的生物合成。这些结果共同描绘出了 AI 蛋白能够针对不同类型细菌产生灵活且特异的环境适应能力的功能轮廓, 为其后续细致的生物学功能研究指明了方向。

AI 虽为重要的功能性蛋白, 但一直未收获足够的科学重视。目前, 仅有两条 AI 基因被克隆, 一条是 G<sup>+</sup>细菌中用于介导 TAA 合成表型的 *tbrA*, 其所编码的 TbrA 蛋白含有 357 个氨基酸, 属于 PrpF 异构酶超家族, 定位于细胞质中<sup>[4]</sup>; 另一条是 2015 年由日本学者 Yuhara 等在 G<sup>-</sup>型 *Pseudomonas* sp. WU-0701 细菌中分离得到的 *ais*<sup>[5]</sup>, 其编码蛋白既能催化细胞合成 TAA 也能够

介导 TAA 利用表型,但保守结构域分析表明该序列不含任何已知的催化功能模块,暗示 AI 蛋白很可能存在新型的化学异构机制。同时,该蛋白属于 type 2 periplasmic binding protein 超家族,定位于细胞周质空间,并与假单胞菌 *P. psychrotolerans* 和白纹黄单胞菌(*Xanthomonas albilineans*)中一种负责富集环境中钼或钨等微量金属元素并泵入胞内的钼离子 ABC 转运子底物结合蛋白(molybdenum ABC transporter substrate-binding protein)分别具有 90%和 74%相似性,极强地暗示了 AI 介导环境营养利用的假定功能,与上述本研究所推测的 AI 功能方向相一致。前期利用 tBLASTn 比对,我们发现 *tbrA* 基因广泛分布在 *Bt*、*B. cereus* 等芽胞杆菌细菌中(coverage 100%, identity 100%)<sup>[1]</sup>,但不存在于本文的 16 株芽胞杆菌鉴定株中(图 4-A),暗示新型 AI 序列存在的可能性;来源于 G<sup>-</sup>细菌的 *ais* 基因序列则不存在于任何目前已测序的芽胞杆菌基因组中,因此容易理解 PCR 扩增未能获得相应产物条带的实验结果(图 4-B)。值得注意的是, TbrA 与 AI 氨基酸序列之间相似度极低(coverage 18%, identity 50%)<sup>[4]</sup>,说明乌头酸异构酶基因在 G<sup>+</sup>与 G<sup>-</sup>细菌中也可能具有特异的起源方式,预示着新型 AI 的发现和鉴定仅仅通过序列比对可能很难有所进展。为了获得序列更加多元、催化活性更强的 AI 蛋白,以方便 AI 功能性应用及丰富对 AI 序列保守性或进化的科学认识,后续研究可扩大筛选范围,直接分离能利用 TAA 的土壤细菌或其他生态环境中的细菌甚至真菌,系统性地建立菌株与基因资源库。

综上所述,本研究以土壤为实验材料,通过以 TAA 为唯一碳源的营养筛选法成功分离和鉴定了 16 株能够编码 AI 的芽胞杆菌菌株,直观地丰

富了人们对于 AI 在 G<sup>+</sup>细菌中的分布认识。后续可通过蛋白质逐级分离纯化或序列比对等策略鉴定这些菌株中的 AI 蛋白。另一方面,也可通过 LC-MS 技术检测这些蛋白能否介导 TAA 毒素合成,从而有可能应用于现状窘迫的植物寄生线虫防治<sup>[29-33]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Du CY, Cao SY, Shi XY, Nie XT, Zheng JS, Deng Y, Ruan LF, Peng DH, Sun M. Genetic and biochemical characterization of a gene operon for *trans*-aconitic acid, a novel nematicide from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(8): 3517–3530.
- [2] Rao MRR, Altekhar WW. Aconitate isomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1961, 4(2): 101–105.
- [3] Watanabe K, Katsuhara M, Nakao H, Sato M. Detection and molecular analysis of plant- and insect-associated bacteria harboring aconitate isomerase involved in biosynthesis of *trans*-aconitic acid as antifeedant in brown planthoppers. *Current Microbiology*, 1997, 35(2): 97–102.
- [4] 都萃颖. 小分子杀线虫毒素反式乌头酸生物合成途径及该毒素应用于植物根结线虫防治的研究. 华中农业大学博士学位论文, 2017.
- [5] Yuhara K, Yonehara H, Hattori T, Kobayashi K, Kirimura K. Enzymatic characterization and gene identification of aconitate isomerase, an enzyme involved in assimilation of *trans*-aconitic acid, from *Pseudomonas* sp. WU-0701. *The FEBS Journal*, 2015, 282(22): 4257–4267.
- [6] Ruan LF, Crickmore N, Peng DH, Sun M. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? *Trends in Microbiology*, 2015, 23(6): 341–346.
- [7] Peng DH, Lin J, Huang Q, Zheng W, Liu GQ, Zheng JS, Zhu L, Sun M. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(3): 846–862.
- [8] Ruan LF, Wang HH, Cai G, Peng DH, Zhou H, Zheng JS, Zhu L, Wang XX, Yu HQ, Li S, Geng C, Sun M. A two-domain protein triggers heat shock pathway and necrosis pathway both in model plant and nematode. *Environmental*



- Microbiology*, 2015, 17(11): 4547–4565.
- [9] 曹诗云. 苏云金芽胞杆菌中一种新毒素 CT-A 的结构鉴定及合成关键基因的定位. 华中农业大学硕士学位论文, 2012.
- [10] 刘要. 苏云金杆菌芽胞中华亚种中一种具有杀线虫活性新毒素的初步鉴定及其与苏云金素的代谢关系. 华中农业大学硕士学位论文, 2009.
- [11] Klinman JP, Rose IA. Purification and kinetic properties of aconitate isomerase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 1971, 10(12): 2253–2259.
- [12] Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423–431.
- [13] Liu GH, Liu B, Wang JP, Che JM, Zhu YJ, Ge CB, Chen Z. Advances in taxonomy and application of *Bacillus*. *Microbiology*, 2017, 44(4): 949–958. (in Chinese)  
刘国红, 刘波, 王阶平, 车建美, 朱育菁, 葛慈斌, 陈铮. 芽胞杆菌分类与应用研究进展. 微生物学通报, 2017, 44(4): 949–958.
- [14] Long W, Chen CS. Application of 16S rRNA sequence in bacteria indication. *Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition)*, 2006, 24(5): 10–12. (in Chinese)  
龙雯, 陈存社. 16S rRNA 测序在细菌鉴定中的应用. 北京工商大学学报(自然科学版), 2006, 24(5): 10–12.
- [15] Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 1996, 142(1): 3–16.
- [16] Li XY, Huang HD, Lu XZ, Yang HP, Wang YS, Cao XJ. Screening of dominant bacteria for PHA accumulation in activated sludge and structure analysis of its product. *Environmental Science & Technology*, 2009, 32(9): 124–128. (in Chinese)  
李晓雁, 黄海东, 卢显芝, 杨红澎, 王燕森, 曹晓娟. 活性污泥中 PHA 合成优势菌的筛选及产物结构分析. 环境科学与技术, 2009, 32(9): 124–128.
- [17] Zhang SS, Li ZJ, Yan YC, Zhang CL, Li J, Zhao BS. *Bacillus urumqiensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(6): 2305–2312.
- [18] Orioli GA, Thompson JF. Aconitate accumulation in wheat seedlings. *Botanical Gazette*, 1990, 151(1): 30–37.
- [19] Stout PR, Brownell J, Bureau RG. Occurrences of *trans*-aconitate in range forage species. *Agronomy Journal*, 1966, 59(1): 21–24.
- [20] Thompson JF, Schaefer SC, Madison JT. Determination of aconitate isomerase in plants. *Analytical Biochemistry*, 1990, 184(1): 39–47.
- [21] Thompson JF, Schaefer SC, Madison JT. Role of aconitate isomerase in *trans*-aconitate accumulation in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(9): 3684–3688.
- [22] Bureau R, Stout PR. *Trans*-aconitic acid in range grasses in early spring. *Science*, 1965, 150(3697): 766–767.
- [23] Jaitz L, Mueller B, Koellensperger G, Huber D, Oburger E, Puschenreiter M, Hann S. LC-MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 400(8): 2587–2596.
- [24] Savka MA, Farrand SK. Modification of rhizobacterial populations by engineering bacterium utilization of a novel plant-produced resource. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(4): 363–368.
- [25] Salomone JY, Crouzet P, de Ruffray P, Otten L. Characterization and distribution of tartrate utilization genes in the grapevine pathogen *Agrobacterium vitis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, 9(5): 401–408.
- [26] Salomone JY, Szegedi E, Cobanov P, Otten L. Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(8): 836–838.
- [27] Koch M, Delmotte N, Ahrens CH, Omasits U, Schneider K, Danza F, Padhi B, Murset V, Braissant O, Vorholt JA, Hennecke H, Pessi G. A link between arabinose utilization and oxalotrophy in *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2092–2101.
- [28] Oresnik IJ, Pacaryuk LA, O'Brien SAP, Yost CK, Hynes MF. Plasmid-encoded catabolic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(12): 1175–1185.
- [29] Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(9): 946–961.
- [30] Zasada IA, Halbrendt JM, Kokalis-Burelle N, LaMondia J, McKenry MV, Noling JW. Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*, 2010, 48: 311–328.
- [31] de Waele D, Elsen A. Challenges in tropical plant

- nematology. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 457–485.
- [32] 孙明, 曹诗云, 都萃颖, 聂相涛, 施祥雨, 彭东海, 阮丽芳. 反式乌头酸产生菌及应用. 中国: CN103421703B. 2015-05-20.
- [33] 孙明, 曹诗云, 聂相涛, 都萃颖, 彭东海, 阮丽芳. 反式乌头酸在防治农业有害生物中的应用. 中国: CN103416400A. 2013-12-04.

## Isolation and identification of soil *Bacillus* strains that encode aconitate isomerase

Cao Zheng<sup>1</sup>, Lu Cai<sup>1</sup>, Zhongqiang Zhang<sup>1</sup>, Lihua Wang<sup>2</sup>, Yujun Dai<sup>1</sup>, Cuiying Du<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science and Technology, Hubei Province Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei Province, China

<sup>2</sup> Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei Province, China

**Abstract:** [Objective] Purpose of this work was to specifically screen the Gram positive ( $G^+$ ) bacteria of *Bacillus* that could encode the aconitate isomerase (AI) enzyme, to enrich our understanding of the distribution of AI and to provide theoretical and material basis for further research. [Methods] Through heat pretreatment of soil sample, plate cultivation by using ACO solid medium containing *trans*-aconitic acid (TAA) as the sole carbon source and the 16S rDNA sequences homologous analysis, the *Bacillus* target strains that encode AI can be isolated. [Results] We totally isolated 22 bacterial strains that could utilize TAA carbon from the ACO plate, and 16 of which were successfully classified as: 2 strains of *Bacillus megaterium*, 7 strains of *Bacillus aryabhatai*, one *Bacillus pumilus* strain, and 6 undetermined *Bacillus* sp. strains; besides, we found that the AI-coding genes of these 16 *Bacillus* isolates were different from the already cloned ones in DNA sequence. [Conclusion] The species diversity of *Bacillus* bacteria encoding AI enzyme is rich, indicating the encoding ability in more  $G^+$  bacteria and updating the old opinion that considered AI distribution mainly in  $G^-$  hosts. Our research provided available microbial resource for further studies on the identification of AI gene as well as its biological significance.

**Keywords:** aconitate isomerase, *Bacillus*, isolation and identification, *cis-trans* aconitate isomers

(本文责编: 李磊)

Supported by the Research Project of Hubei Provincial Department of Education (Q20182705), by the National Natural Science Foundation of China (31700069) and by the Major Science and Technology Special Project of Hubei Province (2018ABA098)

\*Corresponding author. Tel: +86-712-2345490; E-mail: ducuiying.123@webmail.hzau.edu.cn

Received: 31 October 2018; Revised: 16 January 2019; Published online: 19 March 2019