

研究报告

Mn(II)氧化细菌 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的分离、鉴定及氧化特性

廖凤凤^{1,2}, 单美丽¹, 牟琼丽¹, 陈莎¹, 李宗培¹, 李丁^{*1,2}

1 湖南工业大学生命科学与化学学院, 湖南 株洲 412000

2 湖南工业大学百合种质资源创新与深加工湖南省工程研究中心, 湖南 株洲 412000

廖凤凤, 单美丽, 牟琼丽, 陈莎, 李宗培, 李丁. Mn(II)氧化细菌 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的分离、鉴定及氧化特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1787-1800.

LIAO Fengfeng, SHAN Meili, MOU Qiongli, CHEN Sha, LI Zongpei, LI Ding. Isolation, identification, and characterization of an Mn(II) oxidizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* L3[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1787-1800.

摘要:【背景】Mn(II)氧化细菌是一类可以沉积和氧化 Mn(II)从而形成固态锰氧化物的细菌, 在生物地球化学和环境修复领域中引起了广泛关注, 但目前所研究的 Mn(II)氧化模式菌株中大多来源海洋, 土壤源 Mn(II)氧化细菌涉及较少。【目的】丰富土壤源 Mn(II)氧化细菌的来源与物种多样性, 同时也为方铁锰矿型 Mn_2O_3 的潜在应用提供新菌种。【方法】从湖南省株洲市已关停的清水塘冶炼工业园区内筛选得到一株具有 Mn(II)氧化能力的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) L3, 并就其分离纯化、鉴定、生长曲线、pH 变化、Mn(II)氧化特性及锰氧化物制备等方面进行系统研究。【结果】*Pseudomonas aeruginosa* L3 的菌液离心后的上清液及提取的绿脓菌素(pyocyanin, PYO)均具有 Mn(II)氧化能力, 与菌液相比, 上清液对 Mn(II)氧化的能力更强。进一步利用 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)对 *Pseudomonas aeruginosa* L3 产生的锰氧化物进行晶相分析, 发现该锰氧化物在 2θ 为 32.951° 和 55.189° 处出现了明显的特征峰, 表明其结构为弱晶态的方铁锰矿型 Mn_2O_3 。【结论】*Pseudomonas aeruginosa* L3 具有较高的 Mn(II)耐受与氧化能力, 与菌液相比, 上清液的 Mn(II)氧化能力更强。所产生的锰氧化物为弱晶态方铁锰矿型 Mn_2O_3 , 其 Mn(II)氧化过程可能与绿脓菌素相关。

关键词: Mn(II)氧化; 铜绿假单胞菌; 生物锰氧化物; Mn_2O_3

资助项目: 国家自然科学基金(32171622); 湖南省大学生创新创业训练计划(S202111535064); 湖南省科技创新计划(2022RC1128)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32171622), the Hunan Provincial College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202111535064), and the Science and Technology Innovation Program of Hunan Province (2022RC1128).

*Corresponding author. E-mail: liding@hut.edu.cn

Received: 2022-08-04; Accepted: 2022-10-21; Published online: 2022-11-23

Isolation, identification, and characterization of an Mn(II) oxidizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* L3

LIAO Fengfeng^{1,2}, SHAN Meili¹, MOU Qiongli¹, CHEN Sha¹, LI Zongpei¹, LI Ding^{*1,2}

1 School of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412000, Hunan, China

2 Hunan Provincial Engineering Research Center of Lily Germplasm Resource Innovation and Deep Processing, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412000, Hunan, China

Abstract: [Background] Mn(II)-oxidizing bacteria can precipitate and oxidize Mn(II) to form solid manganese oxides, which have attracted much attention in the field of biogeochemistry and environmental remediation. However, most of the studied Mn(II)-oxidizing model strains originated from the ocean, and fewer Mn(II) oxidizing bacteria from soil sources were involved. [Objective] To enrich the available source of soil-derived Mn(II) oxidizing bacteria, and also provide a new strain for the potential application of bixbyite-type Mn_2O_3 . [Methods] In this study, *Pseudomonas aeruginosa* L3, was isolated from a ceased smelting industrial park at Zhuzhou, Hunan Province, and a systemic assay was conducted on its isolation and purification, identification, growth curves, pH alteration, Mn(II) oxidation, and structure of manganese oxide. [Results] The cell suspension, the supernatant after centrifugation, and the pyocyanin extracted from the cell suspension all exhibited the ability to oxidize Mn(II). In particular, the supernatant showed a stronger ability for Mn(II) oxidation than the cell suspension. The X-ray diffraction (XRD) spectrum was further used to record the crystalline phase of manganese oxide produced by *P. aeruginosa* L3. The result showed that the manganese oxide had two characteristic peaks at $2\theta=32.951^\circ$ and 55.189° , indicating that its crystalline structure was the poorly-crystalline bixbyite-type Mn_2O_3 . [Conclusion] *P. aeruginosa* L3 has a high Mn(II) tolerance and oxidation ability, and the supernatant has a higher Mn(II) oxidation ability than the cell suspension. Its Mn(II) oxidation process may be associated with pyocyanin, and the Mn oxides are similar to poorly-crystalline bixbyite-type Mn_2O_3 .

Keywords: Mn(II) oxidation; *Pseudomonas aeruginosa*; biogenic manganese oxides; Mn_2O_3

20 世纪初, 学者们发现一些从深海分离出来的细菌可以沉积和氧化 Mn(II)^[1]。这些细菌因其高效吸附和氧化 Mn(II)等重金属而被广泛研究。基于 16S rRNA 基因序列, 目前已分离的 Mn(II)氧化细菌主要分布在 α -变形菌纲、 γ -变形菌纲、 β -变形菌纲和 ϵ -变形菌纲等变形菌门, 厚壁菌门和放线菌门, 相关研究主要集中在芽孢杆菌属、纤发菌属和假单胞菌属^[2-3]。此外, 在其他属种中也有相关报道。例如, Akob 等在

酸性铀矿区分离得到 2 株可在酸性条件下发生 Mn(II)氧化的菌株, 其中菌株 *Mesorhizobium australicum* T-G1 在酸性和中性 pH 下可采用 2 种不同的策略来氧化 Mn(II)^[4]。Liang 等从锰矿中分离到 2 株细菌节杆菌属(*Arthrobacter*)和鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*), 发现各自单独培养时不具备 Mn(II)氧化能力, 共同培养下却表现出 Mn(II)氧化活性^[5]。Yu 等从自来水中分离得到 2 株共生的化能自养型菌株, 分别属于硝化螺

旋菌门和 β -变形杆菌纲,并首次证明了从 Mn(II)氧化中获取能量进行生长代谢的化能自养型细菌在自然界中存在^[6]。

环境中 Mn(II)的氧化可分为生物氧化和化学氧化^[2,7],化学氧化在 pH<9.0 条件下很难发生,其反应速率极其缓慢,而在 pH 值为 5.5–8.0 条件下,生物氧化的速率约为化学氧化的 5 个数量级^[8–9]。因此环境中锰氧化物的形成主要归因于生物氧化,或由生物成因引起的化学氧化^[10–13]。在含重金属的废水处理过程中, Matsushita 等研究了 Mn(II)氧化细菌(manganese-oxidizing bacteria, MnOB)与甲烷氧化细菌(methane-oxidizing bacteria, MOB)的耦合作用,通过含 MOB 的下流悬挂海绵反应器富集得到了 MnOB 及其生物锰氧化物,该反应器可持续运行并同步去除废水中的 Mn(II)、Co(II)和 Ni(II)^[14]。另外,锰氧化物应用于氧化和吸附有机污染物过程中也获得了良好的去除效果,包括酚类^[15–16]、氟喹诺酮类^[17]、大环内酯类^[18]、磺胺类^[19–20]、17 α -乙基雌二醇^[21]和双氯芬酸^[22]等有机物。因此, Mn(II)氧化细菌作为一种环境治理修复剂,在重金属和有机物污染土壤或废水治理中具有广阔的应用前景。

目前,关于假单胞菌属中铜绿假单胞菌的 Mn(II)氧化研究报道相对缺乏,人们更多地关注于假单胞菌属中恶臭假单胞菌的 Mn(II)氧化特性。因此,本研究的 *Pseudomonas aeruginosa* L3 菌株可为生物锰氧化物的潜在应用提供新菌种来源,同时也可丰富土壤源 Mn(II)氧化细菌的物种多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从湖南株洲市某冶炼厂附近(113.078°E,

27.867°N)采集土壤,采集深度为表层 10–20 cm,将采集的土样充分混合后装入无菌袋后,放 4 °C 冰箱保存。其中土壤样品的基本理化性质为^[23]: pH 值为 6.62–7.08,土壤阳离子交换量(cation exchange capacity, CEC)为 71.7 mmol/kg,有机质为(3.18 \pm 0.15)%, Pb、Cr、Cd、Cu、Mn 和 Zn 的浓度分别为(1 140 \pm 70)、(87 \pm 5)、(70 \pm 3)、(437 \pm 14)、(815 \pm 21)和(1 760 \pm 98) mg/kg。

1.1.2 培养基

改良 LB 液体培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 调 pH 值至 7.0, 1.0 \times 10⁵ Pa 高压蒸汽灭菌 30 min。

LB 固体培养基:在上述配方中加入琼脂粉 15.0–20.0 g/L。

含 Mn(II)的 LB 培养基:加入 1 mol/L Mn(II)母液至不同终浓度。

1 mol/L Mn(II)母液(g/L): 四水氯化锰 197.91,经灭菌的 0.22 μ m 过滤器过滤后,4 °C 低温保存备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

氯化钠、四水氯化锰、盐酸和氯仿,国药集团化学试剂有限公司;琼脂和琼脂糖,北京索莱宝科技有限公司;蛋白胨和酵母浸粉, Oxoid 公司;白贝林蓝(leucoberberlin blue, LBB), Sigma 公司; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 \times Pfu PCR Mix、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和 pLB 零背景快速克隆试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; Top10 感受态细胞引物,湖南擎科生物技术有限公司。

紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器公司;高速离心机, Eppendorf 公司;电子天平,上海浦春计量仪器有限公司; pH 计,上海仪电科学仪器有限公司;电热式压力蒸汽灭菌器,浙江新丰医疗器械有限公司;恒温生化培养箱,

杭州绿博仪器有限公司；超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；恒温金属浴，常州朗越仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Mn(II)氧化细菌的分离纯化与鉴定

称取 1.0 g 的土壤样品，加入 9 mL 无菌水和数颗玻璃珠。充分振荡混匀后静置 30 min，吸取上清液 100 μ L 接入 100 mL 已灭菌的 LB 液体培养基中，35 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 2 d。对培养后的菌悬液进行梯度稀释，并吸取稀释后的菌悬液 200 μ L 均匀涂布在含有 50 mmol/L Mn(II)的固体 LB 培养基上，35 $^{\circ}$ C 培养 2 d。挑选单菌落接入 LB 液体培养基中，35 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜，将菌液划线于含 50 mmol/L Mn(II)的 LB 固体培养基，35 $^{\circ}$ C 培养 2 d。重复此步骤 3 次以上，直至平板上的单菌落形态完全一致。最后挑取单菌落接入 50 mL 的 LB 液体培养基中，35 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜，并用甘油进行菌种保藏。另取一环纯化后的菌液划线于含 50 mmol/L Mn(II)的固体 LB 培养基，35 $^{\circ}$ C 培养箱培养 15 d 后，利用 LBB 验证棕色菌斑中锰氧化物的生成。

用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取目标菌株的 DNA，选择通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[24]PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因片段。

PCR 反应体系：2 \times Pfu PCR Mix 12.5 μ L，引物 27F、1492R (10 μ mol/L)各 1 μ L，模板 1 μ L，加 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件：94 $^{\circ}$ C 3 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 2 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后对目的条带进行胶回收。使用 pLB 零背景快速克隆试剂盒将片段与载体相连，转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞中，利

用 PCR 鉴定重组子并将菌液送至湖南擎科生物科技有限公司测序。

1.2.2 Mn(II)氧化细菌 L3 的生长曲线和 pH 变化测定

挑取平板上的单菌落接入 50 mL 的 LB 液体培养基中，35 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养过夜。按 0.4%的接种量将菌液接入 50 mL 的 LB 液体培养基中，相同条件下摇床培养。每隔 4 h 取 2 mL 菌液测定 OD_{600} 值，每组 3 次重复。以时间为横坐标、 OD_{600} 值为纵坐标，使用 Origin 软件绘制生长曲线。同时，每隔 4 h 取 1 mL 菌液测定其 pH。以时间为横坐标、pH 值为纵坐标，用 Origin 软件绘制菌株生长过程的 pH 变化曲线。

1.2.3 不同 Mn(II)浓度下 Mn(II)氧化细菌 L3 的生长情况

配制 Mn(II)终浓度为 0、3、4、5、6 mmol/L 的 LB 液体培养基，按 0.4%的接种量将菌液接入 50 mL 的 LB 液体培养基中，35 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养。每隔 4 h 取 2 mL 菌液测定 OD_{600} 值，并绘制细菌的生长曲线。同时当菌液颜色由灰绿色转变为棕褐色后，取 100 μ L 菌液于 1.5 mL 的离心管中，加入 500 μ L 的 LBB 染液，观察溶液颜色是否变为蓝色，从而确定菌株发生 Mn(II)氧化且可使 LBB 染液变色的最低浓度。

向 LB 固体培养基加入过滤除菌后的 1 mol/L Mn(II)溶液，使 Mn(II)终浓度为 0、5、25、50、60、70、80、90 mmol/L，每组设置 3 次重复。取一环菌液在平板上划线，放入 35 $^{\circ}$ C 恒温生化培养箱倒置培养 3 d，观察细菌在平板上的生长情况，确定菌株的 Mn(II)最大耐受浓度。

1.2.4 绿脓菌素(pyocyanin, PYO)的提取与 Mn(II)氧化能力的验证

每 25 mL 菌液加入 15 mL 的氯仿，振荡混匀 5 min 后，4 000 r/min 离心 8 min。去上清，下层萃取液中加入 10 mL 的 0.2 mol/L 盐酸，振荡混匀 5 min，4 000 r/min 离心 8 min，上清液

即为所需 PYO^[25]。每 25 mL PYO 分装入锥形瓶中,将 pH 值分别调至 3.0、7.0、9.0。加入 1 mol/L Mn(II)储存液使其终浓度为 25 mmol/L。35 °C、180 r/min 摇床培养 3 d,用 LBB 染液鉴定是否发生 Mn(II)氧化,每组 3 次重复。

1.2.5 锰氧化物的制备

挑取单菌落接入 50 mL 的 LB 液体培养基中,35 °C、180 r/min 培养过夜。以 0.4%接种量接入 LB 液体培养基中,35 °C、180 r/min 摇床培养至 32 h 获得菌液。菌液经 8 000 r/min 离心 10 min 后去沉淀,每 50 mL 上清液分装入无菌锥形瓶中。向菌液与上清液分别加入终浓度为 25 mmol/L 的 Mn(II),35 °C、180 r/min 培养至第 4、8、12、16 h 时分别取菌液与上清液各 100 μ L 进行 LBB 染色。3 d 后将上清液以 6 000 r/min 离心 5 min 收集锰氧化物,60 °C 烘干。

1.2.6 锰氧化物的 XRD 衍射分析

将上清制备的锰氧化物研磨成粉末,经 200 目过筛,过筛后的样品进行 X 射线衍射

(X-ray diffraction, XRD)。XRD 检测分析参数: Bruker D8 advance 型 X 射线衍射仪(Cu 靶、K α 射线源、 $\lambda=0.154$ nm、Ni 滤波片)。测试条件: 2θ 扫描范围为 10°–80°,扫描速度 2°/min,工作电压 40 kV,工作电流 40 mA。

2 结果与分析

2.1 Mn(II)氧化细菌 L3 的分离纯化与表面形态

初步筛选后共得到 29 株 Mn(II)耐受菌株,进一步分离纯化得到一株 Mn(II)氧化细菌,将其编号为 L3。如图 1A 所示,纯化后的细菌 L3 在 LB 固体培养基上呈现出淡绿色,为表面湿润、边缘不整齐的扁平菌落形态。如图 1B 所示, L3 划线于 50 mmol/L Mn(II)的 LB 固体培养基上,培养 15 d 后,培养基颜色逐渐转变为棕褐色,其中菌落颜色转变为黑褐色。从图 1C 可见,图 1B 中滴加 LBB 染色液后,培养基由棕褐色转变为蓝绿色,表明培养基内有锰氧化

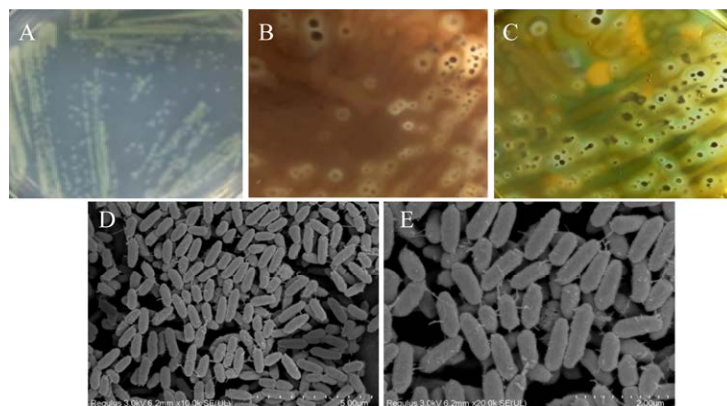


图 1 Mn(II)氧化菌 L3 的鉴定与扫描电子显微镜图(SEM) A: 细菌 L3 生长于 LB 平板. B: 细菌 L3 生长于含 50 mmol/L Mn(II)的 LB 平板. C: 细菌 L3 生长于含 50 mmol/L Mn(II)和滴加 LBB 的 LB 平板. D: 远视野下 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的 SEM 形貌. E: 近视野下 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的 SEM 形貌

Figure 1 Identification of Mn(II) oxidizing bacteria L3 and scanning electron microscope (SEM). A: The growth of L3 on the LB plate. B: The growth of L3 on the LB plate with 50 mmol/L Mn(II). C: The growth of L3 on the LB plate with 50 mmol/L Mn(II) and LBB. D: SEM image of *Pseudomonas aeruginosa* L3 at high magnification. E: SEM image of *Pseudomonas aeruginosa* L3 at low magnification.

物的生成,即培养基中的棕褐色物质为固态的锰氧化物。如图 1D 和图 1E 所示,*P. aeruginosa* L3 的扫描电镜表明菌株为两端稍钝圆的杆状,细菌表面有颗粒小突起或黏附有黏性物质,黏性物质缠绕菌体或与其他菌体相连,推测其可能是细菌分泌的黏性胞外物质。

2.2 Mn(II)氧化细菌 L3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

将测序所得 16S rRNA 基因序列经 NCBI 进行比对后,比对结果见图 2。表明该菌株与已知的假单胞菌属铜绿假单胞菌聚为一类。并且 bootstrap 置信度高达 100,说明菌株 L3 为假单胞菌属铜绿假单胞菌,命名为 *Pseudomonas aeruginosa* L3。

2.3 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的生长曲线、培养过程的 pH 变化与 Mn(II)氧化的最低浓度

图 3A 生长曲线表明:0–4 h 属于 *P. aeruginosa* L3 适应期,此时期细菌生长缓慢,生长速度增幅不大;4–36 h 为 *P. aeruginosa* L3 对数生长期,此时期细菌生长速率达到最大;36–52 h 是

P. aeruginosa L3 生长稳定期,此时期增殖数与死亡数处于动态平衡;52 h 之后是衰亡期,细菌数量略微下降。从图 3B 可知,*P. aeruginosa* L3 生长过程中 pH 逐渐变化,总体呈上升趋势。0–56 h 时菌液 pH 处于快速上升阶段,表明生长过程中 *P. aeruginosa* L3 可产生碱性代谢物,此时菌体大量繁殖,生长代谢活动加快,因此菌液 pH 变化显著。在 52 h 之后,菌液 pH 出现微小波动并趋于稳定,在整个生长过程中菌液 pH 值最高达到 9.3。从图 3C 可以看出,以未加 Mn(II)处理为对照组,*P. aeruginosa* L3 在不同 Mn(II)浓度的 LB 液体培养基中,0–12 h 生长情况相近,生长趋势基本与对照组一致。培养至 12 h 之后,与对照组相比,不同 Mn(II)浓度处理均对 *P. aeruginosa* L3 生长起抑制作用。表现为随 Mn(II)浓度的增加,抑制效果越明显,而且细菌指数生长期缩短,更快进入稳定期。在稳定期之后,不同 Mn(II)浓度下细菌数量出现明显降低,推测原因可能是 Mn(II)促进了 *P. aeruginosa* L3 生物膜的形成。生物膜通过吸附或包裹培养基中分布的细菌从而缓解 Mn(II)对菌株的胁迫,导致培

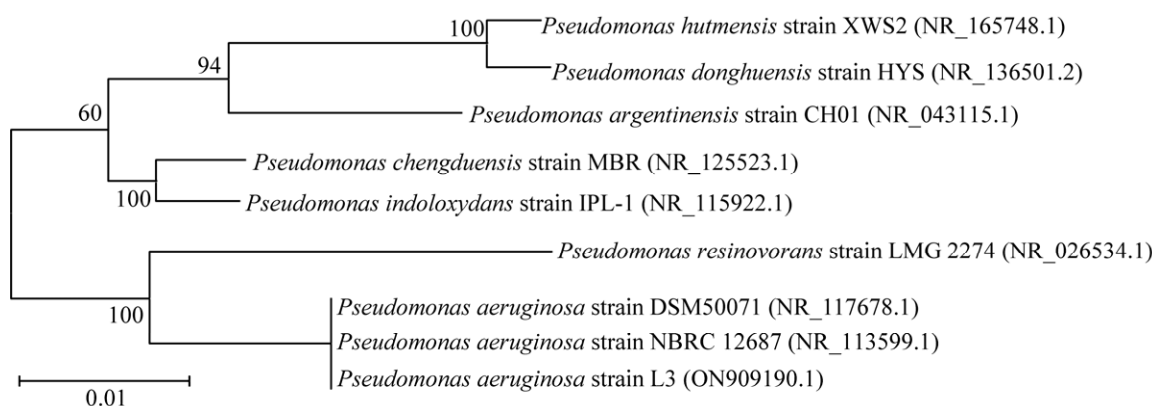


图 2 菌株 L3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支点上的数值代表这一分支的可信度;标尺代表进化距离;括号内序列为 GenBank 登录号

Figure 2 Phylogenetic tree of strain L3 based on 16S rRNA gene sequence. The number on the branch point represents the credibility of this branch; The scale represents the evolutionary distance; Numbers in parentheses represent the sequences accession numbers in GenBank.

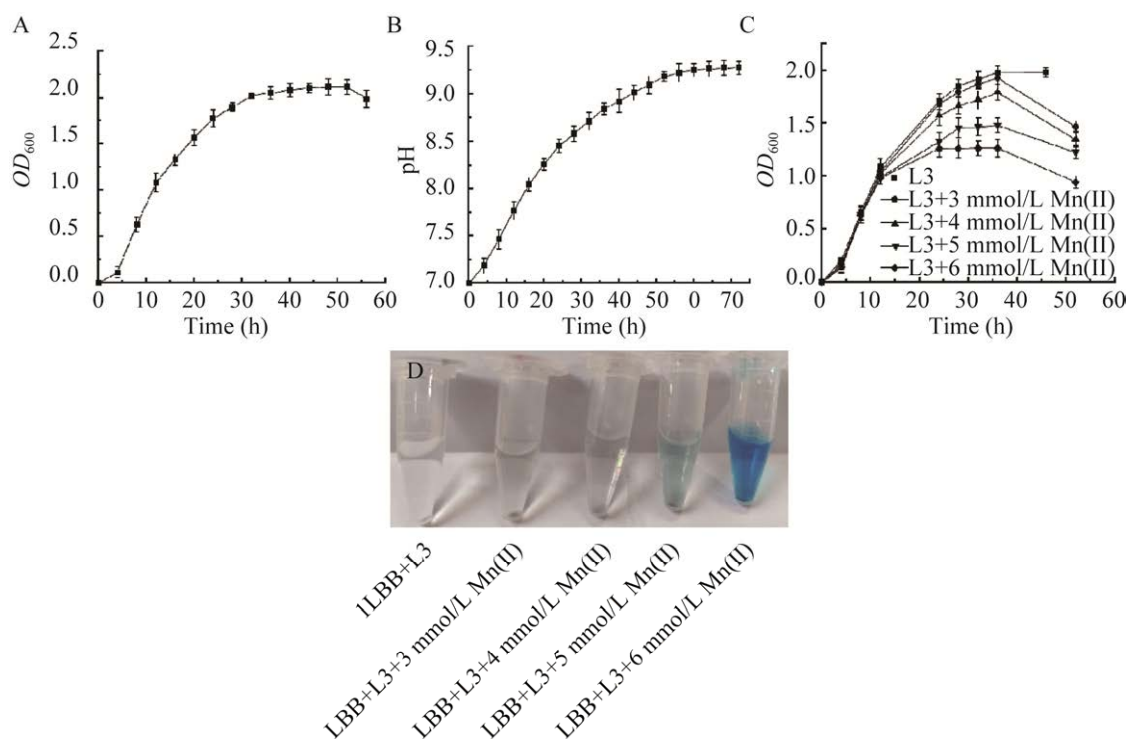


图 3 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的生长曲线、pH 变化曲线与 LBB 染色图 A: *Pseudomonas aeruginosa* L3 的生长曲线. B: *Pseudomonas aeruginosa* L3 生长过程中 pH 的变化. C: 不同 Mn(II)浓度下 L3 的生长曲线. D: LBB 染色方式下 L3 发生 Mn(II)氧化的最低浓度

Figure 3 The growth curves, pH curves and LBB staining results of *Pseudomonas aeruginosa* L3. A: The growth curve of *Pseudomonas aeruginosa* L3. B: The pH curve of L3 during cell growth. C: Growth curves of L3 at different Mn(II) concentrations. D: LBB staining occurred at the minimum concentration of Mn(II).

培养基中分散的细菌数目减少, 出现吸光值下降的现象。从图 3D 的 LBB 染色结果可知, 可检测到 *P. aeruginosa* L3 发生 Mn(II)氧化的最低 Mn(II)浓度为 5 mmol/L。

2.4 不同 Mn(II) 浓度下 *Pseudomonas aeruginosa* L3 在固体培养基上的生长情况

图 4A 表明, 5 mmol/L Mn(II)可轻微促进 *P. aeruginosa* L3 的 PYO 分泌。在含 25 mmol/L Mn(II)的 LB 固体培养基上, *P. aeruginosa* L3 的 PYO 分泌量达到最高, 蔓延并渗透至整个培养基中, 并最终在培养至第 3 天时形成生物膜 (图 4B)。说明该浓度下不仅促进 *P. aeruginosa*

L3 分泌 PYO, 而且有助于生物膜的形成。50–70 mmol/L Mn(II)浓度范围内, *P. aeruginosa* L3 的生长未受到明显影响, 未表现明显抑制作用, 该浓度范围同样可促进 *P. aeruginosa* L3 分泌 PYO。含 80 mmol/L Mn(II)的 LB 固体培养基上, *P. aeruginosa* L3 生长出现明显抑制, 菌落形态也发生改变, 表现为菌落明显缩小, 且不呈现蔓延趋势。90 mmol/L Mn(II)培养基中, 该浓度对 *P. aeruginosa* L3 的生长抑制更为明显, 培养基上仅生长极少数的单菌落。因此, *P. aeruginosa* L3 在固体培养基上对 Mn(II)的最大耐受浓度为 90 mmol/L。

2.5 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的 PYO 提取与 Mn(II) 氧化验证

所提取的 PYO 在 pH 3.0、7.0、9.0 时, 分别加入终浓度为 25 mmol/L 的 Mn(II), 摇床反应 3 d, 结果见图 4C。PYO (pH 3.0)+25 mmol/L Mn(II) 溶液颜色为粉红色, PYO (pH 7.0)+25 mmol/L Mn(II) 溶液颜色为较深的黄绿色且在瓶身形成一圈棕色涂层, PYO (pH 9.0)+25 mmol/L Mn(II) 溶液颜色为黄绿色。经 LBB 染色鉴定后, PYO (pH 3.0)+25 mmol/L Mn(II) 溶液不变色, 而 PYO (pH 7.0)+25 mmol/L Mn(II)、PYO (pH 9.0)+

25 mmol/L Mn(II) 溶液变蓝, 表明有锰氧化物产生, 说明 *P. aeruginosa* L3 分泌的 PYO 在中性与碱性情况下也具有 Mn(II) 氧化能力, 并参与了细菌 L3 对 Mn(II) 氧化的过程。

2.6 *Pseudomonas aeruginosa* L3 菌液与上清液的 Mn(II) 氧化验证

L3 菌液与上清液分别加入 25 mmol/L Mn(II) 摇床培养, 不同时间点取样进行 LBB 染色。L3 菌液染色结果如图 5A 所示。加入 Mn(II) 溶液培养至 4 h 时, 经 LBB 染色后, L3 菌液颜色不变, 表明菌液未开始氧化 Mn(II) 产生锰氧

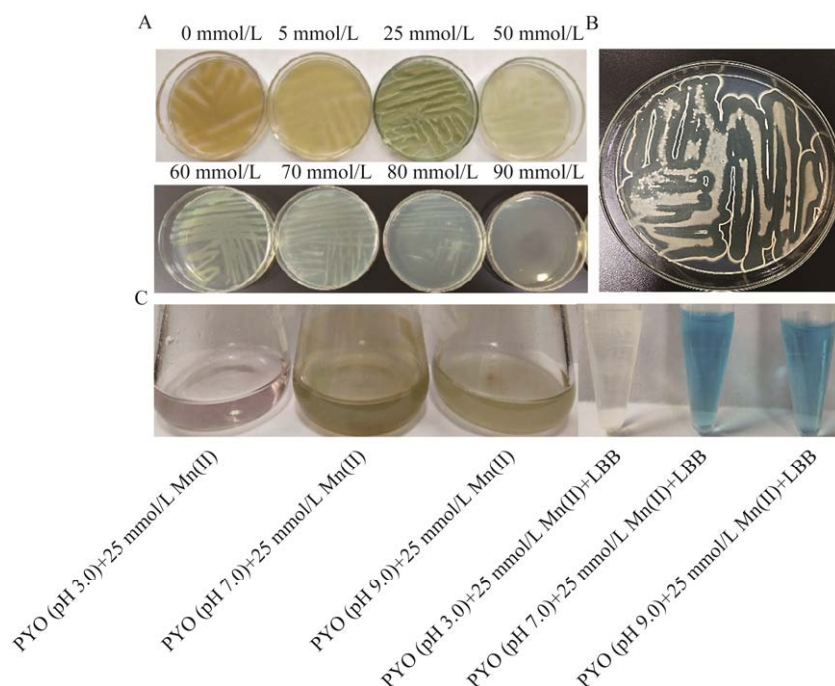


图 4 *Pseudomonas aeruginosa* L3 的最大 Mn(II) 耐受浓度和 PYO 的 Mn(II) 氧化 A: *Pseudomonas aeruginosa* L3 在不同 Mn(II) 浓度 LB 固体培养基上的生长情况. B: *Pseudomonas aeruginosa* L3 在 25 mmol/L Mn(II) 的 LB 固体培养基上形成的生物膜. C: 不同 pH 条件下 PYO 与 Mn(II) 的氧化反应和 LBB 染色示意图

Figure 4 The maximum Mn(II) tolerance concentration of *Pseudomonas aeruginosa* L3 and Mn(II) oxidation of PYO. A: Growth of *Pseudomonas aeruginosa* L3 on the LB plate at different Mn(II) concentrations. B: Biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* L3 on the 25 mmol/L Mn(II) of LB plate. C: Mn(II) oxidation by PYO at different pH and LBB staining results.

化物。培养至 8 h 时,培养基中开始产生锰氧化物。L3 上清液染色结果如图 5B 所示:在加入 Mn(II)溶液培养至 4 h 时, L3 上清液可被染为蓝色,表明溶液中已有锰氧化物的生成,随后进一步积累锰氧化物。因此,从产生锰氧化物的时间来看, L3 上清液对 Mn(II)的氧化比 L3 菌液更迅速。从染色后的颜色深浅来看, L3 上清液在氧化过程中产生了更多的锰氧化物,氧化 Mn(II)能力更强。

2.7 制备的锰氧化物与 XRD 表征

由上清液制备的锰氧化物见图 6A,可知其为黑色光泽的块状固体并具有磁性。经研磨过筛后,锰氧化物的 XRD 分析结果表明(图 6B),在 2θ 为 32.951° 和 55.189° 处有明显的特征峰,但衍射峰强度低。同时经 Jade 软件对比分析,各峰位与标准卡片库中的 PDF #41-1442 基本吻合,推断出该生物锰氧化物为方铁锰矿型锰氧化物,主要物相成分为 $\alpha\text{-Mn}_2\text{O}_3$ 。以上结果表明,利用 *P. aeruginosa* L3 上清液制备的锰氧化物为 $\alpha\text{-Mn}_2\text{O}_3$ 。

3 讨论与结论

目前,假单胞菌属中铜绿假单胞菌的 Mn(II)氧化研究报道相对缺乏,人们更多地关注假单胞菌属中恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)

的 Mn(II)氧化特性。*P. putida* 的 Mn(II)氧化菌株包括 GB-1、MnB1 和 EC112^[26]等,主要采用的培养基为 PYCM^[27]、LEP^[28]、LP^[29]、PYG^[30]、LD^[31]。它们的培养温度通常为 25–30 °C。培养约 24 h 后这些菌株开始产生锰氧化物,其结

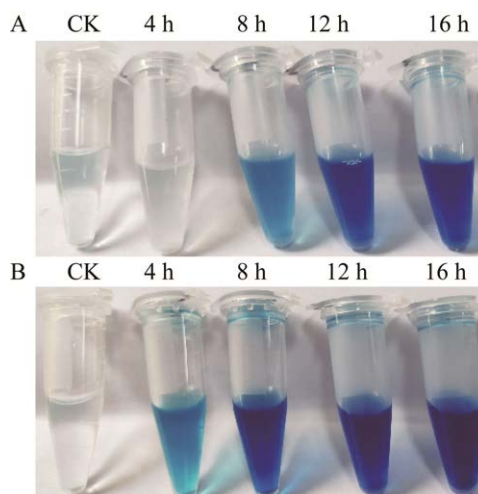


图 5 Mn(II)氧化过程中 LBB 染色示意图 A: *Pseudomonas aeruginosa* L3 菌液. B: *Pseudomonas aeruginosa* L3 上清液

Figure 5 The LBB staining during Mn(II) oxidation. A: The cell suspension of strain *Pseudomonas aeruginosa* L3. B: The supernatant after centrifuging the cell suspension of strain *Pseudomonas aeruginosa* L3.

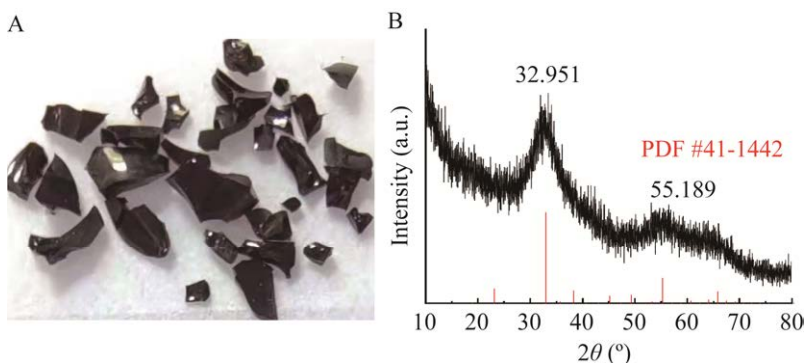


图 6 锰氧化物体与 XRD 图谱

Figure 6 The appearance of Mn oxides produced by the supernatant after centrifuging the cell suspension of *Pseudomonas aeruginosa* L3 and XRD pattern of the Mn oxides.

构主要是层状型 δ - MnO_2 ^[28,32]。*P. aeruginosa* L3 与 *P. putida* 菌株的主要生理区别在于：(1) L3 培养温度为 35 °C，高于 *P. putida* 菌株的培养温度(25–30 °C)；(2) 菌株 L3 发生 Mn(II)氧化较为迅速，约 4 h 即能生成锰氧化物，氧化产物结构为低价态的 Mn_2O_3 。

对恶臭假单胞菌 *P. putida* 而言，*cumA* 被报道参与了 GB-1 的 Mn(II)氧化^[33]。虽然在铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) ATCC 15692 和金色假单胞菌(*P. aureofaciens*) ATCC 13985 中也存在 *cumA* 基因，但它们并不能氧化 Mn(II)。推测 CumA 可能未形成具活性的蛋白复合物，或行使了其他不同的功能^[34]。因此，*P. aeruginosa* L3 的 Mn(II)直接氧化可能与 CumA 存在联系，但还具有其他 Mn(II)氧化途径的可能性。在氨基杆菌(*Aminobacter* sp.) H1^[35]与霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) DS02Eh01^[36]的研究中，Mn(II)氧化活性表现为菌液>菌体>菌液上清液，研究者们认为 Mn(II)氧化因子在细胞外和菌体表面发挥了作用；而在 *P. aeruginosa* L3 的 Mn(II)氧化过程中，Mn(II)氧化活性表现为上清液>菌液。这说明 Mn(II)的氧化可能源于菌株 *P. aeruginosa* L3 分泌至培养基中的某种 Mn(II)氧化活性因子的直接氧化，或碱性代谢物导致 pH 值升高的间接氧化，并非菌体接触式的直接氧化。此外，相关研究表明大多数微生物菌体内部对 Mn(II)并无氧化作用^[37-38]。

生盘纤发菌(*Leptothrix discophora*)的无鞘突变株 SP-6(sl)产生的上清液其 Mn(II)氧化活性是菌液的 4 倍，研究者认为细胞的存在可能抑制了 Mn(II)的氧化活性，但抑制机制未得到解释^[39]。*P. aeruginosa* L3 现象与 SP-6(sl)相似，其菌液对 Mn(II)的氧化较上清液更为缓慢，原因可能有两方面：(1) 菌株介导了氧化态 PYO 的还原：PYO 是一种氧化还原功能的小分子物

质，具有接受和给出电子的能力^[40]。氧化型 PYO 可接受菌株细胞或 NAD(P)H 提供的 2 个电子被还原，还原型 PYO 可将电子传递给目标电子受体而发生氧化；当目标电子受体为 Fe(III)或被螯合的 Fe(III)时，还原产生的 Fe(II)被吸收利用并进一步刺激菌株形成生物膜，增强自身毒力，降低 Mn(II)带来的毒害^[41-42]。当目标电子受体为 O_2 可诱导氧化应激产生超氧化物与 H_2O_2 。值得注意的是，过量的 H_2O_2 可引起 PYO 发生不可逆的氧化，甚至失活或被降解^[43]，从而使菌液中的 PYO 含量降低。(2) 菌株分泌铁载体荧光嗜铁素(pyoverdine, PVDs)：为形成更厚的生物膜及产生毒力因子，在缺铁情况下，菌株通过产生铁载体以摄取铁^[44-46]。但铁载体对于其他金属离子同样具有很强的螯合能力，因此 PVDs 可通过螯合 Mn(III)形成强络合物来影响菌株对铁的吸收并抑制 Mn(II)的氧化。

关于细菌氧化 Mn(II)研究的模式菌株大多来源于海洋或淡水湖泊，包括恶臭假单胞菌(*P. putida*) MnB1 和 GB-1^[47]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) SG-1^[1]、生盘纤发菌(*Leptothrix discophora*) SS-1^[48]和 SP-6^[49]等。其中，*P. putida* MnB1 和 GB-1 的 Mn(II)氧化发生在细胞外膜，锰氧化物沉积在细胞表面。*Bacillus* sp. SG-1 氧化因子位于孢子外膜或外生孢子上，锰氧化物沉积于孢子表面。*Leptothrix discophora* SS-1 和 SP-6 的氧化发生在胞外。与液相环境的 Mn(II)氧化细菌相比，土壤环境的 Mn(II)氧化细菌的研究相对较少，两者之间的 Mn(II)氧化机制也存在差异。液相中 Mn(II)氧化细菌所采用的策略主要是向胞外分泌 Mn(II)氧化酶为主(酶促途径)，而土壤源细菌除了酶促途径以外，还发现了如 *P. aeruginosa* L3 可通过分泌 PYO 以及 *Providencia manganooxydans* LLDRA6 可通过产生胞外超氧化物^[50-51]等非酶促途径将 Mn(II)氧化成 Mn(IV)的

现象。但关于土壤细菌介导 Mn(II)氧化的过程机理仍有待进一步完善。

综上所述,更广泛地分离鉴定土壤 Mn(II)氧化细菌并研究它们的氧化特征,不仅有助于了解细菌氧化 Mn(II)的共性,也有助于补充海洋细菌 Mn(II)氧化机制之外的认识,以及有助于揭示细菌介导的 Mn 元素的地球化学循环过程。

本研究以一株 Mn(II)氧化细菌 *P. aeruginosa* L3 为对象,在分离纯化、鉴定、生长曲线、pH 变化、Mn(II)氧化特性,以及锰氧化物制备等方面进行了系统研究。主要得出以下结论: (1) 50 mmol/L Mn(II)的 LB 培养基中,细菌的菌落颜色为黑褐色, LBB 染色表明该菌株是一株 Mn(II)氧化细菌。经 16S rRNA 基因序列比对后,表明其为假单胞菌属铜绿假单胞菌,命名为 *Pseudomonas aeruginosa* L3。(2) 一般细菌的 Mn(II)氧化发生在稳定期前期,而 *P. aeruginosa* L3 生长曲线表明,要获得锰氧化物,菌株应预先培养 32 h,再添加 Mn(II)溶液。(3) *P. aeruginosa* L3 具有较高的 Mn(II)耐受与氧化能力,在固体培养基中对 Mn(II)的最大耐受浓度为 90 mmol/L。利用 LBB 染色法可检测到 *P. aeruginosa* L3 发生 Mn(II)氧化的最低 Mn(II)浓度为 5 mmol/L。(4) 5–50 mmol Mn(II)浓度处理均会促进 *P. aeruginosa* L3 分泌 PYO,其中 25 mmol/L Mn(II)促进 PYO 分泌最为显著,而且可形成清晰可见的生物膜。当 pH 为中性和碱性时,菌液中提取的 PYO 也具备 Mn(II)氧化能力,表明 *P. aeruginosa* L3 的 Mn(II)氧化过程与 PYO 有关。(5) 与菌液相比,菌液离心后的上清液对 Mn(II)溶液的氧化速度更快,氧化能力更强。所得生物锰氧化物为黑色光泽且具磁性的块状固体, XRD 分析结果表明其为弱晶态的方铁锰矿型 Mn_2O_3 。生物源锰氧化物通常具有缺陷空位结构,因此具备了较高

的吸附能力和强氧化性等特点。该菌株产生的锰氧化物在重金属污染修复和有机污染物的氧化降解等方面具有潜在的应用前景。

REFERENCES

- [1] de VRIND JP, de VRIND-de JONG EW, de VOOGT JW, WESTBROEK P, BOOGERD FC, ROSSON RA. Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(5): 1096-1100.
- [2] 段国文, 耿新燕, 魏绪宇, 赵国琰. 锰氧化细菌的生理生态功能与作用机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(9): 3039-3053.
DUAN GW, GENG XY, WEI XY, ZHAO GY. Advances in physiological and ecological functions of manganese oxidizing bacteria and the underlying molecular mechanisms[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(9): 3039-3053 (in Chinese).
- [3] 丁哲旭. 土壤细菌 *Providencia* sp. LLDRA6 Mn(II)间接氧化模式的研究[D]. 株洲: 湖南工业大学硕士学位论文, 2021.
DING ZX. Study on Mn(II) indirect oxidation mode by a soil-borne bacterium—*Providencia* sp. LLDRA6[D]. Zhuzhou: Master's Thesis of Hunan University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [4] AKOB DM, BOHU T, BEYER A, SCHÄFFNER F, HÄNDEL M, JOHNSON CA, MERTEN D, BÜCHEL G, TOTSCHKE KU, KÜSEL K. Identification of Mn(II)-oxidizing bacteria from a low-pH contaminated former uranium mine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(16): 5086-5097.
- [5] LIANG JS, BAI YH, MEN YJ, QU JH. Microbe-microbe interactions trigger Mn(II)-oxidizing gene expression[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(1): 67-77.
- [6] YU H, LEADBETTER JR. Bacterial chemolithoautotrophy via Manganese oxidation[J]. *Nature*, 2020, 583(7816): 453-458.
- [7] TEBO BM, JOHNSON HA, MCCARTHY JK, TEMPLETON AS. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(9): 421-428.
- [8] NEALSON KH, TEBO BM, ROSSON RA. Occurrence and mechanisms of microbial oxidation of Manganese[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1988, 33: 279-318.
- [9] TEBO BM. Manganese(II) oxidation in the suboxic zone of the Black Sea[J]. *Deep Sea Research Part A*

- Oceanographic Research Papers, 1991, 38: S883-S905.
- [10] 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[J]. American Mineralogist, 2005, 90(1): 143-154.
- [11] 阮小芳. 土壤细菌 *Providencia* sp. LLDR6 及其生物锰氧化物降解有机物的研究[D]. 株洲: 湖南工业大学硕士学位论文, 2021.
- RUAN XF. Study on degradation of organic compounds by soil-bacteria *Providencia* sp. LLDR6 and biogenic Mn oxides[D]. Zhuzhou: Master's Thesis of Hunan University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [12] 张震. 大肠杆菌多铜氧化酶介导的 Mn(II)氧化作用的分子机制与应用[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2015.
- ZHANG Z. Molecular mechanism and application of surface-orientated Mn(II) oxidation actuated by multicopper oxidase of *Escherichia coli*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [13] 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[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 66-73.
- LIU F, FENG XH, CHEN XH, QIU GH, TAN WF, HE JZ. Advances in the study of biological genesis of manganese oxide minerals and their characteristics[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 66-73 (in Chinese).
- [14] MATSUSHITA S, KOMIZO D, CAO LTT, AOI Y, KINDAICHI T, OZAKI N, IMACHI H, OHASHI A. Production of biogenic manganese oxides coupled with methane oxidation in a bioreactor for removing metals from wastewater[J]. Water Research, 2018, 130: 224-233.
- [15] SAPUTRA E, MUHAMMAD S, SUN HQ, ANG HM, TADÉ MO, WANG SB. Manganese oxides at different oxidation states for heterogeneous activation of peroxymonosulfate for phenol degradation in aqueous solutions[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2013, 142/143: 729-735.
- [16] SHAIKH N, TAUJALE S, ZHANG HC, ARTYUSHKOVA K, ALI AM S, CERRATO JM. Spectroscopic investigation of interfacial interaction of manganese oxide with triclosan, aniline, and phenol[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(20): 10978-10987.
- [17] ZHANG HC, HUANG CH. Oxidative transformation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines by manganese oxide[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(12): 4474-4483.
- [18] FEITOSA-FELIZZOLA J, HANNA K, CHIRON S. Adsorption and transformation of selected human-used macrolide antibacterial agents with iron(III) and manganese(IV) oxides[J]. Environmental Pollution, 2009, 157(4): 1317-1322.
- [19] BIALK HM, SIMPSON AJ, PEDERSEN JA. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents[J]. Environmental Science & Technology, 2005, 39(12): 4463-4473.
- [20] GAO J, HEDMAN C, LIU C, GUO T, PEDERSEN JA. Transformation of sulfamethazine by manganese oxide in aqueous solution[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(5): 2642-2651.
- [21] de RUDDER J, van de WIELE T, DHOOGHE W, COMHAIRE F, VERSTRAETE W. Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2)[J]. Water Research, 2004, 38(1): 184-192.
- [22] LIU WB, LANGENHOFF AAM, SUTTON NB, RIJNAARTS HHM. Application of manganese oxides under anoxic conditions to remove diclofenac from water[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, 6(4): 5061-5068.
- [23] LI D, LI RY, DING ZX, RUAN XF, LUO J, CHEN JY, ZHENG J, TANG JX. Discovery of a novel native bacterium of *Providencia* sp. with high biosorption and oxidation ability of manganese for bioleaching of heavy metal contaminated soils[J]. Chemosphere, 2020, 241: 125039.
- [24] 李如意. 普罗威登斯属细菌的重金属吸附行为及转录组测序分析[D]. 株洲: 湖南工业大学硕士学位论文, 2019.
- LI RY. Heavy metal adsorption behavior and transcriptome sequencing analysis of *Providencia* bacteria[D]. Zhuzhou: Master's Thesis of Hunan University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [25] 王婷婷. 高产电活性的铜绿假单胞菌工程菌株的构建[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017.
- WANG TT. The construction of *Pseudomonas aeruginosa* engineering strains with high bioelectricity activity[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2017 (in Chinese).
- [26] SNYDER M, WANG YT. Mn(II) oxidation by batch cultures of *Pseudomonas putida* strain EC112[J]. Journal of Environmental Engineering, 2015, 141(3): 04014066.
- [27] 黄馨. 铁锰对 *Pseudomonas putida* 降解单苯环非甾体

- 抗炎药的影响[D]. 天津: 天津理工大学硕士学位论文, 2017.
- HUANG X. Effects of Fe and Mn on single benzene ring nonsteroidal anti-inflammatory drugs degradation by *Pseudomonas putida*[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [28] 张慧琴, 李艳, 李岩, 丁竑瑞, 鲁安怀. *Pseudomonas putida* MnB1 氧化 Mn^{2+} 实验研究[J]. 地球与环境, 2013, 41(4): 346-352.
- ZHANG HQ, LI Y, LI Y, DING HR, LU AH. Study on the oxidation of Mn^{2+} by *Pseudomonas putida* MnB1[J]. Earth and Environment, 2013, 41(4): 346-352 (in Chinese).
- [29] 田静. 生物氧化锰对 Pb(II)/Zn(II) 的吸附及对 As(III)/Cr(III) 的氧化[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013.
- TIAN J. The adsorption of Pb(II)/Zn(II) and the oxidation of As(III)/Cr(III) of biogenic manganese oxide[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [30] 李泽. 基于微生物培养组学分离新型锰氧化细菌及锰氧化机理研究[D]. 沈阳: 辽宁大学硕士学位论文, 2022.
- LI Z. Isolation and Manganese oxidation mechanism of novel Mn^{II} -oxidizing bacteria based on microbial culturomics[D]. Shenyang: Master's Thesis of Liaoning University, 2022 (in Chinese).
- [31] 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[J]. Molecular Microbiology, 2003, 47(4): 993-1006.
- [32] LEE SW, PARKER DL, GESZVAIN K, TEBO BM. Effects of exogenous pyoverdines on Fe availability and their impacts on Mn(II) oxidation by *Pseudomonas putida* GB-1[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 301.
- [33] 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^{2+} oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1762-1768.
- [34] FRANCIS CA, TEBO BM. *cumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4272-4278.
- [35] 何智敏. 锰氧化细菌的选育及其生物氧化锰对土霉素降解特性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2013.
- HE ZM. Mn(II)-oxidizing bacteria screening and the degradation characteristics of OTC by biogenic manganese oxides[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [36] LI HL, WU Y, TANG YK, FANG B, LUO PH, YANG LL, JIANG QM. A manganese-oxidizing bacterium-*Enterobacter hormaechei* strain DS02Eh01: capabilities of Mn(II) immobilization, plant growth promotion and biofilm formation[J]. Environmental Pollution, 2022, 309: 119775.
- [37] ADAMS LF, GHIORSE WC. Oxidation state of Mn in the Mn oxide produced by *Leptothrix discophora* SS-1[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1988, 52(8): 2073-2076.
- [38] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4793-4799.
- [39] 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]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12): 4001-4010.
- [40] WANG Y, NEWMAN DK. Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr)oxides and molecular oxygen[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(7): 2380-2386.
- [41] COX CD. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin[J]. Infection and Immunity, 1986, 52(1): 263-270.
- [42] BANIN E, VASIL ML, GREENBERG EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(31): 11076-11081.
- [43] RESZKA KJ, O'MALLEY Y, MCCORMICK ML, DENNING GM, BRITIGAN BE. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2004, 36(11): 1448-1459.
- [44] PARKER DL, LEE SW, GESZVAIN K, DAVIS RE, GRUFFAZ C, MEYER JM, TORPEY JW, TEBO BM. Pyoverdine synthesis by the Mn(II)-oxidizing bacterium

- Pseudomonas putida* GB-1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 202.
- [45] KRAMER J, ÖZKAYA Ö, KÜMMERLI R. Bacterial siderophores in community and host interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 152-163.
- [46] LI JH. Real-time observation of pyoverdine dissolving ferric hydroxide[J]. *Chinese Journal of Chemical Physics*, 2017, 30(1): 117-122.
- [47] CASPI R, TEBO BM, HAYGOOD MG. C-type cytochromes and Manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3549-3555.
- [48] EL GHERIANI IA, BOCIOAGA D, HAY AG, GHORSE WC, SHULER ML, LION LW. Iron requirement for Mn(II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1229-1235.
- [49] SARATOVSKY I, WIGHTMAN PG, PASTÉN PA, GAILLARD JF, POEPELMEIER KR. Manganese oxides: parallels between abiotic and biotic structures[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(34): 11188-11198.
- [50] CHEN S, DING ZX, CHEN JY, LUO J, RUAN XF, LI ZP, LIAO FF, HE J, LI D. A soil-borne Mn(II)-oxidizing bacterium of *Providencia* sp. exploits a strategy of superoxide production coupled to hydrogen peroxide consumption to generate Mn oxides[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(3): 168.
- [51] LI ZP, LIAO FF, DING ZX, CHEN S, LI D. *Providencia manganoxydans* sp. nov., a Mn(II)-oxidizing bacterium isolated from heavy metal contaminated soils in Hunan Province, China[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2022, 72(8): 005474.