

五株产 $MnCO_3$ 细菌的除锰特性

周静晓 刘颜军 冉昊 袁媛 王革娇*

(华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 本研究从湖南省某锌锰矿矿口和天津市西青玛钢厂锰原料仓库土样中富集分离获得5株对锰有去除能力的抗锰细菌, 将其命名为 J2-3、J4-3、J12-1、JM3-2 和 JD。形态学、生理生化分析和 16S rRNA 基因测序等结果表明它们分别归属为氢噬孢菌属、分枝杆菌属、红球菌属、不动杆菌属和芽孢杆菌属。JD 和 JM3-2 菌的 Mn(II) 抗性最低抑制浓度(MIC)为 2 mmol/L, J2-3、J4-3 和 J12-1 菌为 12 mmol/L。X 射线晶体衍射分析表明这 5 株抗锰菌随生长生成了 $MnCO_3$ 沉淀而将 Mn(II) 从溶液中去掉。其中 JD 和 JM3-2 的锰去除率分别为 $94.28\% \pm 0.1\%$ 和 $93.10\% \pm 3.1\%$ 。其他菌的锰去除率也均在 85% 以上。研究发现培养基的 pH 由起始的 7.0 变为最终 8.5 以上, 推测其除锰原理可能是由于菌体代谢改变了培养基 pH 而将可溶的 $MnCl_2$ 转化为不溶的 $MnCO_3$ 沉淀。本研究证实了和以往报道的锰氧化细菌不同的新型除锰细菌。

关键词: 除锰细菌, 碳酸锰, 16S rRNA 基因, X 射线衍射

Manganese Removal Mechanisms of Five Bacterial Strains with the Abilities to Produce $MnCO_3$

ZHOU Jing-Xiao LIU Yan-Jun RAN Hao YUAN Yuan WANG Ge-Jiao*

(College of Life Science and Technology, State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Five manganese-resistant and manganese-removing bacterial strains were isolated from soil samples of a Zn-Mn mine in Hunan and manganese storage of Xi Qingma steel factory in Tianjin and named as J2-3, J4-3, J12-1, JM3-2 and JD. Based on morphological, physiological/biochemical tests and 16S rRNA gene analysis, these strains were identified as *Hydrogenophaga*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* and *Bacillus* respectively. The minimal inhibitory concentration (MIC) of JM3-2 and JD were 2 mmol/L while MIC of J2-3, J4-3, and J12-1 reached 12 mmol/L. The X-ray diffraction analysis showed that the precipitate formed by the Mn(II)-removal bacteria was $MnCO_3$. All of the 5 strains could remove manganese effectively ($> 85\%$). Strains JD and JM3-2 removed $94.28\% \pm 0.1\%$ and $93.10\% \pm 3.1\%$ Mn(II) from the medium, respectively. During the removing process, the pH increased from 7.0 to more than 8.5. This indicated the mechanism of manganese removing may caused by the metabolism of the Mn(II)-removing bacteria to transform of soluble Mn(II) into the insoluble $MnCO_3$ when pH increased. Here we report a new-type of manganese-removing bacteria, which is different from the maga-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970075); 华中农业大学生命科学技术学院学生科技创新基金(SRF)

* 通讯作者: Tel: 86-27-87281261; 信箱: gejiao@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2010-01-21; 接受日期: 2010-03-02

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

nese-oxidizing bacteria reported before.

Keywords: Mn(II)-removing bacteria, Manganese carbonate, 16S rRNA gene, X-ray diffraction analysis

锰是人体必需微量元素,但锰过多又可造成中毒神经功能紊乱。水体锰污染主要是由原生地质污染、含锰土壤的面源污染和采矿的矿山尾水污染所引起的。在自然环境中,微生物直接或者间接地成为锰循环的主要催化剂^[1]。

在 Mn(II) 的污染及治理中,微生物也成为人们首先考虑的对象。在当前的微生物治理锰污染的研究中,基础研究和应用已经有了较大进展,主要是利用锰氧化微生物氧化 Mn(II) 至 Mn(IV) 沉淀而去除水体中的锰^[2-3], 其研究主要集中在高效锰氧化微生物的筛选、锰氧化的机理、相关基因的分离与功能分析及实验室模拟实验和菌体固定化等,推进了生物除锰技术的应用。本实验室前期对深海和陆地环境锰氧化细菌的研究发现了生物锰氧化物颗粒规则、与化学合成锰氧化物属于不同的晶体类型,而且生物锰氧化物比化学合成锰氧化物对重金属的吸附去除能力更强。

本研究发现了一类和前期报道的锰氧化细菌不同的能将 2 价锰离子转化为碳酸锰的除锰细菌,研究围绕着这类微生物的分离及相关性质的鉴定展开,并对它们的分类、锰去除特性等进行了分析,为微生物除锰研究提供了新型菌种和一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集与除锰菌的分离鉴定

土样于 2007 年 6 月下旬采集于湖南省锌锰矿矿口 and 天津市西青玛钢厂锰原料仓库。样品为表层至 10 cm 深度的土壤,土样过 2 mm 孔径筛子。分别测定土样 pH 值^[6]、湿度^[7]和锰含量^[8]。

取 100 g 的土样用 MnCl₂ 富集,将锰终浓度调至 989.55 μg/g,于 28°C 静置培养 1 周。取 10 g 富集后的土样装入含有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,置 28°C 摇床中振荡 30 min,梯度稀释后涂布含 20 mmol/L HEPES (pH 7.0) 和 2 mmol/L MnCl₂ 的 J 培养基平板^[9],28°C 培养 1 周。挑取使培养基成棕褐色的菌落,将菌株经多次划线得到单克隆。

对分离的除锰菌进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增^[4],PCR 产物纯化后送交北京三博远志公司测序。测序得到的 16S rDNA 序列通过 BLASTn 程序与 GenBank 文库中已有序列比对(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast),用 ClustalW 软件进行同源性分析,再用 MEGA3.1(http://www.megasoftware.net)构建系统发育树。生理生化实验方法参照微生物学实验^[10]。

1.2 除锰菌锰抗性实验

用含不同浓度 MnCl₂ 的 J 培养基对锰去除菌的最低抑制浓度(MIC)进行测定。MnCl₂ 浓度为 0–30.0 mmol/L,每 0.5 mmol/L 一个梯度,分别接种后于 28°C、150 r/min 摇床培养,72 h 后用分光光度法测定细胞密度(*OD*₆₀₀)。

1.3 除锰菌的除锰能力测定

用三角瓶配制液体 J 培养基 150 mL,1 × 10⁵ Pa 高压灭菌 30 min。灭菌后的培养基在无菌条件下加入已过滤除菌的 pH 值为 7.0 的 HEPES 缓冲液,使其终浓度为 20 mmol/L,同时加入 30 μL 浓度为 1 mol/L 的无菌 MnCl₂ 母液,使其终浓度为 0.2 mmol/L,接着以 1% 的接种量往培养基中接种对数期的菌液,并做好空白对照。手动振荡混匀后,在无菌条件下取出 10 mL 培养基于 50 mL 离心管中,作为第 1 次取样。此后每隔 24 h 取样 1 次。取样后的三角瓶置于 28°C、150 r/min 条件下振荡培养。

每次取样的 10 mL 液体测 pH 值并记录,在常温下 10000 r/min 高速离心 5 min,离心得到的上清液用孔径为 220 μm 滤膜过滤,滤液中 Mn 浓度,即培养基内剩余 Mn 浓度用原子吸收分光光度计(985A,北京普析)检测。同时检测滤液的 pH 值并用分光光度计测定菌体浓度(*OD*₆₀₀)。锰去除效率(%) = $(Mn_{\text{初始}} - Mn_{\text{溶解的}}) / Mn_{\text{初始}} \times 100\%$ 。

1.4 X 射线晶体衍射分析

首先培养 1000 mL 的菌体进行反应,待产物生成后,10000 r/min 高速离心培养物,去掉上清,将沉淀充分干燥作为待测样品。将干燥后的样品置于样品槽上,涂布均匀并用玻璃压成平整的片状,然后进行衍射分析^[11](Y-2000 型 XRD 仪,丹东奥公司)。

分析条件为: 入射波 1.543 Å, 电压 30 kV, 扫描范围 5° – 90° , 扫描速度 0.08/S。

2 结果

2.1 除锰菌的分离、鉴定及锰抗性

实验测定湖南及天津土样中富集、分离到近 50 株抗锰菌, 其中 5 株的主要特征是菌落周围或整个培养基成棕褐色, 分别命名为 J2-3、J4-3、J12-1、JM3-2 和 JD, 其中 J12-1 和 JM3-2 分离自湖南省锌锰矿土样; J2-3、J4-3 和 JD 分离自天津市西青玛钢厂锰原料仓库土样。

通过近全长 16S rRNA 基因鉴定, J2-3、J4-3、J12-1、JM3-2 和 JD 的近缘菌分别是 *Hydrogenophaga* (DQ497237, 同源性 98%)、*Mycobacterium* (EU167969, 99%)、*Rhodococcus opacus* (AY027585, 98%)、*Acinetobacter* (EU073077, 98%) 和 *Bacillus* (EF173317, 99%)。通过形态、生理生化(表 1)和 16S rRNA 基因等鉴定, 分别被归为氢噬孢菌属、分枝杆菌属、红球菌属、不动杆菌属和芽孢杆菌属。以 16S rRNA 基因序列为基础构建系统发育树(图 1)。

2.2 除锰菌除锰特性研究

图 2 为 5 株除锰菌在含 0.2 mmol/L MnCl_2 的 J 培养基中的除锰曲线, 在培养 1 d 后 5 株菌均有棕色沉淀生成, 溶液中 Mn(II) 浓度开始降低, 6 d 后基本达到平衡。JD 和 JM3-2 对 Mn(II) 的去除率很高, 分别为 $94.28\% \pm 0.1\%$ 和 $93.10\% \pm 3.1\%$ 。不同之处在于 JD 菌在第 3 天基本达到平衡, 而 JM3-2 在第 5 天达到。另外 3 株菌, J2-3、J4-3 和 J12-1 的除锰率分别为 $86.63\% \pm 0.3\%$ 、 $85.60\% \pm 0.6\%$ 和 $86.77\% \pm 0.2\%$ 。没有接菌含锰 J 培养基中 MnCl_2 浓度基本没改变。

图 3、4 为 JM2-3 菌在 27 d 内分别在加锰与不加锰条件下的菌体形态、生长曲线、锰浓度变化伴随 pH 值变化的曲线。结果显示, 加 MnCl_2 对 JM2-3 菌的生长没有明显的促进作用, 但加 MnCl_2 后, Mn(II) 的去除伴随着菌体的生长, 且溶液的 pH 值由最初的 7.0 上升到 8.5 以上。另外, 电镜结果表明两种情况下的菌体形态大小都没有明显变化(数据未显示), 能谱分析测得细胞表面没有锰的存在(数据未显示)。

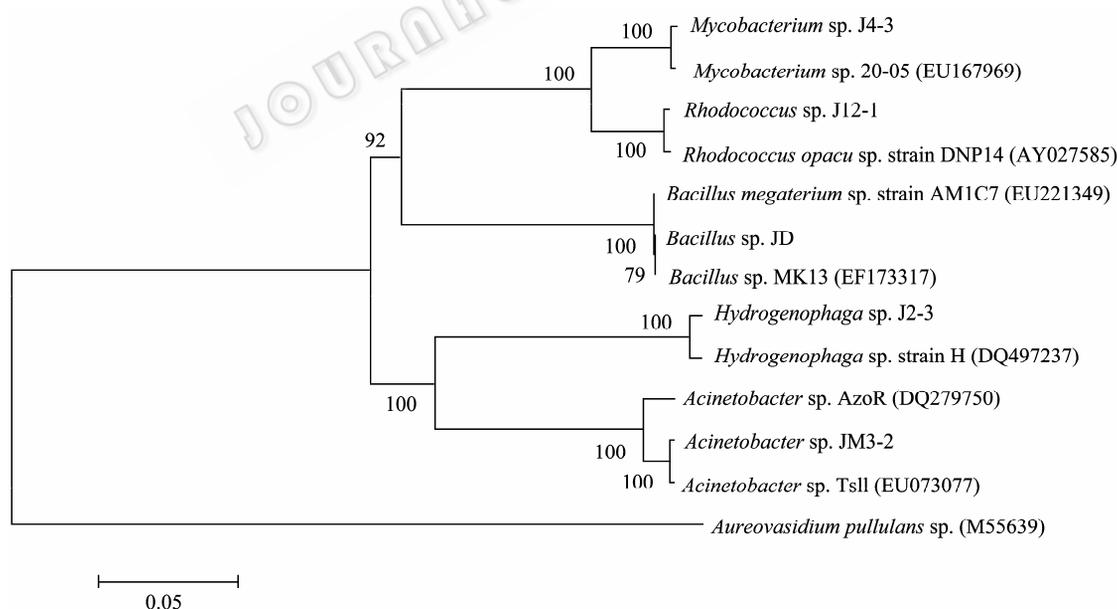


图 1 五株除锰菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 1 16S rRNA gene phylogenetic tree of the five Mn(II) -removing bacteria

注: 分支旁的数字为 Bootstrap 1000 次的置信度(%); 标尺表示 5% 的核苷酸序列差异; 括号内为 GenBank 序列登录号。

Note: Numbers near the branches are bootstrap probability values (%) with 1000 replicates. Scale bar represents 2% difference in nucleotide sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

表1 五株除锰菌的形态学、生理生化特性
Table 1 Morphological, physiological / biochemical characteristics of the five manganese-removing bacteria

菌株名称 Strain name	J2-3	J4-3	J12-1	JM3-2	JD
菌落形态 Colony morphology	标点、无色、光滑 湿润、透明	圆状、乳黄、光滑 湿润、不透明	标点、浅粉、光滑 湿润、不透明	圆状、无色、光滑 湿润、透明	圆状、乳白色、光 滑湿润、透明
加锰培养(平板) Cultured on the plate with Mn ²⁺	平板棕黑色	菌体周围棕褐色	菌体周围棕褐色	平板棕黑色	菌体周围棕褐色
革兰氏染色 Gram staining	-	+	+	-	+
D-半乳糖苷 D-Galactopyranoside	+	+	+	-	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	-	-
山梨糖 Sorbose	+	+	+	-	-
肌醇 Inositol	+	+	+	+	+
乙酸钠 Sodium acetate	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	-	+
L-精氨酸 L-Arginine	+	-	+	+(少)	+
乙醇 Ethanol	+	+	+	-	+
D(+)-木糖 D(+)-Xylose	+	-	+(少)	++	+
对羟基苯甲酸 P-Hydroxybenzoic acid	-	-	+	-	-
甘氨酸 Glycine	+	-	+	-	-
葡萄糖酸 Gluconate	-	-	-	-	-
甲醇 Methanol	-	-	-	-	-
柠檬酸 Citric acid	-	-	-	-	-
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	-	+	-	-
L-酪氨酸 L-Tyrosine	+	-	++	+	-
丙三醇 Glycerol	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	-	+	-	+
D-果糖 D-Fructose	+	+	+	+	+
肌酸 Creatine	+	-	-	-	+
马尿酸 Hippuric acid	-	-	-	-	-
明胶 Gelatin	-	+	+	+	+
氯化铵 Ammonium chloride	+	+	+	+	+
硝酸钾 Potassium nitrate	+	+	++	+	+
亚硝酸钠 Sodium nitrite	-	-	++	-	-
M.R.试验 Methyl red	-	-	+	-	+
V.P.试验 V-P test	-	-	+	+	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	-	-	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	+	-	+
产氨试验 Ammonia producing test	-	-	+	+	-
糖/醇/糖苷分解 Sugar/alcohol/glycosides decomposition	+	-	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	-	-	-
H ₂ O ₂ 酶试验 Test for H ₂ O ₂ enzyme activity	+	+	+	++	++

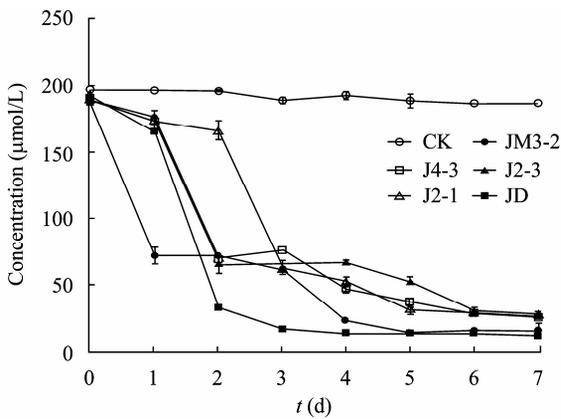


图2 五株除锰菌在 J 培养基中对 $Mn(II)$ 的去除曲线(数据为三重)

Fig. 2 $Mn(II)$ removal curve of five manganese-removing bacteria in J medium (Triplicates)

注: CK: 无菌空白对照.

Notes: CK: Blank, 0.2 mmol/L $MnCl_2$ J medium without bacterial inoculation.

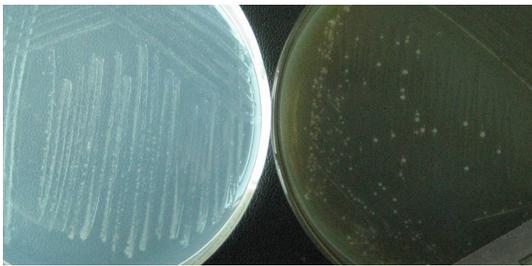


图3 JM3-2 在不含 $MnCl_2$ (左)和含 $MnCl_2$ J 培养基上(右)的菌落形态

Fig. 3 Morphological characteristics of JM3-2 in J medium plate without (Left) and with $MnCl_2$ (Right)

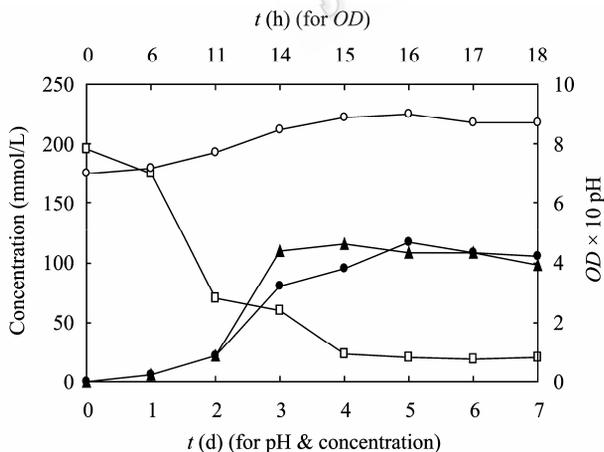


图4 JM3-2 生长曲线、锰去除曲线及 pH 值变化线

Fig. 4 Curves of bacterial growth, manganese removing and pH changes

注: \square : 锰去除曲线; \circ : pH 变化曲线; \bullet : 不加锰的生长曲线; \blacktriangle : 加锰的生长曲线.

Notes: \square : The remained $MnCl_2$ concentration; \circ : pH; \bullet : Growth without $MnCl_2$ in medium; \blacktriangle : Growth with $MnCl_2$ in medium.

2.3 X 射线晶体衍射分析

衍射实验结果(图 5)表明, 菌株 J4-3 生成的棕褐色沉淀在 2θ 分别为 $a = 31.421^\circ$ 、 $b = 34.504^\circ$ 、 $c = 63.874^\circ$ 和 $d = 65.330^\circ$ 等处出现衍射峰, 且分别对应碳酸锰(104)、(006)、(101)和(208)晶面的特征衍射峰; J12-1 生成的棕褐色沉淀在 2θ 分别为 $e = 31.469^\circ$ 、 $f = 60.225^\circ$ 和 $g = 68.363^\circ$ 等处出现衍射峰, 且分别对应碳酸锰(104)、(107)和(300)晶面的特征衍射峰; JM3-2 生成的棕褐色沉淀在 2θ 分别为 $i = 31.575^\circ$ 、 $j = 41.587^\circ$ 、 $k = 51.790^\circ$ 和 $l = 60.235^\circ$ 等处出现衍射峰, 且分别对应碳酸锰(104)、(165)、(108)和(122)晶面的特征衍射峰; J2-3 生成的棕褐色沉淀在 2θ 分别为 $m = 31.579^\circ$ 、 $n = 37.67^\circ$ 、 $o = 45.331^\circ$ 和 $p = 51.784^\circ$ 等处出现衍射峰, 且分别对应碳酸锰(104)、(110)、(202)和(018)晶面的特征衍射峰; JD 生成的棕褐色沉淀 2θ 分别为 $q = 24.422^\circ$ 、 $r = 31.466^\circ$ 和 $s = 59.006^\circ$ 等处出现衍射峰, 且分别对应碳酸锰(012)、(104)和(211)晶面的特征衍射峰, 各峰位置与相对峰强度与随机附带的标准卡片 JCPDS No 86-0172 的图谱大致吻合。表明反应得到的沉淀物质为 $MnCO_3$ 。进而说明 J2-3、J4-3、J12-1、JM3-2 和 JD 是通过将可溶 $MnCl_2$ 转化为不溶 $MnCO_3$ 沉淀的方式, 以达到将锰从污水中去除的效果。

3 讨论

本研究发现, 这 5 株除锰菌去除锰的过程不像传统的锰氧化微生物那样将 2 价锰氧化为 4 价的锰氧化物沉淀, 而是通过某种代谢过程将 2 价的锰离子转化为碳酸锰。由此我们推测这种除锰菌可能是由微生物代谢改变培养基的理化性质或者是分泌一些物质促使 2 价锰的反应, 其中 Eh 和 pH 是首先要考察的^[12]。从热力学计算中, 在不同的 Eh 和 pH 条件下, 锰可以呈 MnO_2 、 $Mn(OH)_2$ 、 $MnCO_3$ 等形式的沉淀。当水溶液的 pH 大于 8 时, CO_3^{2-} 的活度为 4.4×10^{-6} mol/L, Eh < 0.418V 时, 锰会以 $MnCO_3$ 的形式沉淀^[5]。因此这可能是一个生物与化学反应共同起作用的结果。由于我们发现培养基的 pH 由起始的 7.0 变为 8.0 以上, 且有 X 射线衍射的数据支持, 因此推测其除锰原理可能是由于菌体自身代谢反应, 改变了培养基 pH 促使 $Mn^{2+} + HCO_3^- + OH^- = MnCO_3 + H_2O$ 的发生。培养基中添加了终浓度为 2 mmol/L 的碳酸氢钾, 这可为碳酸锰的形成提供足

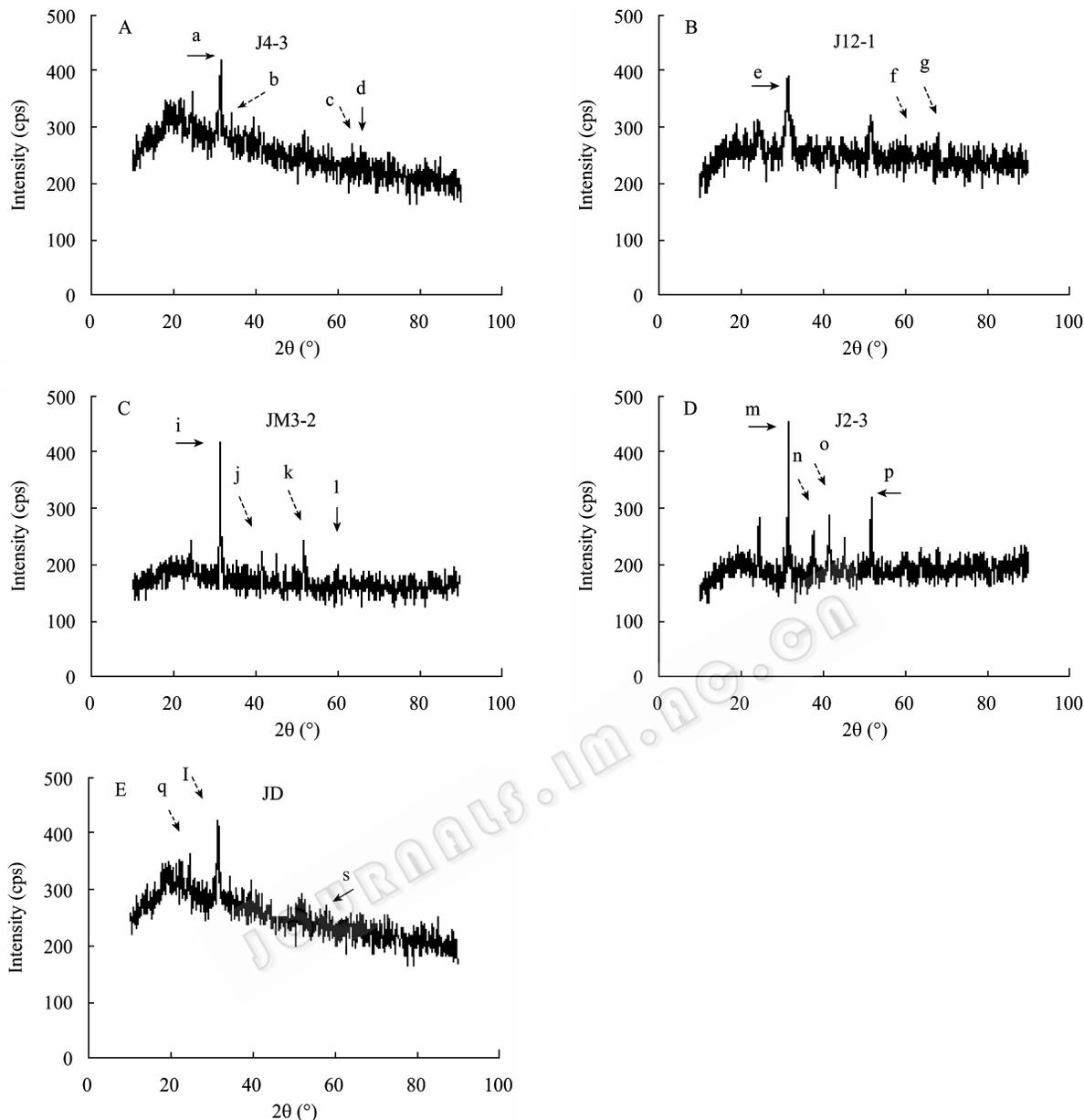


图5 除锰菌产生沉淀的X射线衍射图

Fig. 5 XRD patterns of the precipitate formed by the Mn(II)-removal bacteria

注: A、B、C、D和E分别为J4-3、J12-1、JM3-1、J2-3和JD菌株产生沉淀的X射线衍射图。

Notes: A, B, C, D, E are the XRD patterns of the precipitate formed five bacteria of J4-3, J12-1, JM3-2, J2-3 and JD, respectively.

够的碳酸根离子。当然我们也不排除菌体在生长过程中在结构上产生了胞外多糖和蛋白质聚合物而催化溶液的化学反应^[13]。

从菌落的形态来看,生成碳酸锰沉淀后,菌体颜色不变而培养基变成了棕褐色,这可能是一种分泌到胞外的物质作用。并且通过电镜扫描可以看到,细胞形态在锰去除前后没有明显的变化,能谱分析也证实其菌体表面没有锰的存在,这些都说明形成

的碳酸锰沉淀离心后沉积在菌体周围,但没有和菌体紧密结合,而我们前期报道的锰氧化菌与菌体紧密结合,菌体表面有锰的存在^[3-5]。

从锰的去除效果来看,以JD和JM3-2的去除效率和最终的去除效果最好,实际应用时虽然需要添加碳酸盐,但仍是一种可选择的污水处理方案,可以进一步用于固定化的研究,应用于水体污染的净化。

参 考 文 献

- [1] 郝瑞霞. 锰的微生物地球化学. 北京: 冶金工业出版社, 2000: 40-41.
- [2] Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, *et al.* Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 2004(32): 287-328.
- [3] 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**(9): 4272-4278.
- [4] Wang W, Shao Z, Liu Y, *et al.* Removal of multi-heavy metals using biogenic manganese oxides generated by a deep-sea sedimentary bacterium-*Brachybacterium* sp. Mn32. *Microbiology*, 2009(155): 1989-1996.
- [5] 刘颜军, 周静晓, 王革娇. 锰氧化菌 *Bacillus* sp. MK3-1 的 Mn(II)氧化特性和除锰能力研究. 微生物学通报, 2009, **36**(4): 473-478.
- [6] 李强, 赵秀兰, 胡彩荣. ISO10390: 2005 土壤质量 pH 的测定. 污染防治技术, 2006(1): 53-55.
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 122-241.
- [8] 杨艳芳, 刘凤枝, 蔡彦明. 土壤样品的王水回流消解重金属测定方法的研究. 监测分析, 2005, **4**(2): 44-45.
- [9] Nealson KH. The isolation and characterization of marine bacteria which catalyze manganese oxidation//WE Krumbain (ed.). *Environmental biogeochemistry and geomicrobiology: Methods, metals and assessment*. Ann Arbor, Mich: Ann Arbor Science, 1978: 847-858.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 1999: 141-158.
- [11] Saratovsky I, Sarah J, Gurr, *et al.* The structure of manganese oxide formed by the fungus *Acremonium* sp. strain KR21-2. *Geochim Cosmochim Acta*, DOI: 10.1016/j.gca.2009.03.005(online).
- [12] Francis CA, Casciotti KL, Tebo BM. Localization of Mn(II)-oxidizing activity and the putative multicopper oxidase, MnxG, to the exosporium of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Arch Microbiol*, 2002(178): 450-456.
- [13] 卜文瑞, 石学法. 大洋铁锰矿床形成过程中的生物作用. 海洋科学, 2001, **25**(11): 13-15.

征订启事

2010 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所 B401
	收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量