



一株锰氧化细菌的分离、鉴定及其锰氧化特性

郑洁¹, 孟佑婷^{1*}, 方瑶瑶², 杨素玲¹, 王平¹

¹北京市辐射中心, 北京 100875

²北京市环境保护科学研究院, 北京 100037

摘要: 【目的】获得锰氧化细菌, 对锰矿周边土壤中生物所参与的锰氧化过程进行初探。【方法】依据细菌是否能氧化Mn(II), 形成棕褐色锰氧化物进行筛选。利用染料LBB对生成的锰氧化物进行检测。通过考察分离菌株的形态、生理特征和16S rRNA基因、*gyrB*基因、*gyrA*基因序列的同源性对分离菌株进行鉴定。分析筛选菌与所在属已知锰氧化菌的亲缘关系。利用LBB显色法检测氧化锰的动态生成, 通过扫描电镜-能谱分析和X射线衍射技术分析生物氧化锰的表征。【结果】获得1株锰氧化细菌菌株, 命名为CP133, 综合形态、生理及分子分析结果, 鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 分离菌株与多株分离自海洋及土壤的芽孢类锰氧化菌在进化上具有一定的差异。与其他菌株比较菌株CP133具有较强的锰氧化能力, 进入稳定期后可生成紧密结合在菌体周围的无定形态生物氧化锰。【结论】从锰矿周边土壤分离出1株具有较强锰氧化功能的蜡样芽孢杆菌, 丰富了土壤芽孢类锰氧化菌的资源, 同时也为锰矿周围土壤与锰氧化菌间的生物地球化学循环提供了线索及材料。

关键词: 锰氧化菌, 生物氧化锰, 蜡样芽孢杆菌, 土壤, LBB显色法

锰氧化物广泛存在于土壤、海洋及湖泊的沉积物中, 具有较高的化学反应活性和较强的吸附能力, 决定着C、N、S等大量元素及Co、Pb、Cu、Cd等微量元素的形态及迁移转化, 在地球化学循环中起着非常重要的作用^[1]。

自然界中的锰氧化物与微生物的作用密不可分^[2-4], 微生物对锰的氧化作用比非生物氧化作用

要快若干个数量级^[5], 因此大多研究者认为微生物是自然界中锰氧化物形成的主要推动者。锰氧化细菌在自然界中分布广泛, 已有研究表明, 深海金属沉积物以及水体和土壤的锰结核中都有锰氧化细菌的存在, 一些较为极端的环境, 如热泉沉积物、热液喷口和沙漠岩石也存在着锰氧化细菌, 因此有学者认为锰氧化菌存在于Mn(II)充

基金项目: 国家自然科学基金(41203059); 北京市科学技术研究院青年骨干计划(2013-014); 北京市科学技术研究院萌芽项目(201501)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-57910996; E-mail: ytmeng@gmail.com

收稿日期: 2016-01-20; 修回日期: 2016-04-05; 网络出版日期: 2016-05-05

足的环境中^[1]。目前已报道的锰氧化细菌主要分布于低(G+C)含量的厚壁菌门(*Firmicutes*)、高(G+C)含量的放线菌门(*Actinobacteria*)以及变形菌门(*Proteobacteria*)的 α -、 β -和 γ -变形菌亚纲。研究的模式菌株主要有厚壁菌门的芽孢杆菌SG1 (*Bacillus*)^[6], 变形菌门 α -变形菌纲的恶臭假单胞菌MnB1/GB-1 (*Pseudomonas putida*)^[7]和 β -变形菌纲纤发盘丝菌SS-1 (*Leptothrix discophora*)^[8]等。

生物氧化锰在地球化学循环中的重要性与其结构特征密不可分。生物氧化锰多聚集于菌体细胞的外层, 如模式菌恶臭假单胞菌MnB1和芽孢杆菌SG1所产生的生物氧化锰^[9-10]。另外, 生物氧化锰颗粒尺寸在4-100 nm^[11], 具有较大的比表面积^[12]和较高的单位结合能^[13], 因此吸附容量较高。生物氧化锰晶格结构中的Mn (II)和Mn (III)及八面体层间具有矿物晶格的缺陷, 带有大量的负电荷, 可以吸附大量带正电的金属离子^[14]。

随着人们对水体及土壤生境中锰结核资源重要性认识的加深, 锰氧化物在生物地球化学循环中的作用得到了广泛关注, 不少研究者对锰氧化物的成因及不同生境条件下锰氧化菌的多样性及群体分布特征进行了一系列的探讨^[15-17], 海底、土壤及河流等环境中的锰氧化菌具有一定的多样性及丰度, 并且通常会构成一个微群体^[16,18-19], 通过某种方式影响周边的微环境^[15]。土壤锰结核是氧化锰研究中一个重要研究对象, 有研究表明, 锰结核周边土壤中锰氧化菌丰度高于结核本身^[20], 而且其种群分布随土壤深度存在一定的差异^[21]。锰矿石富含氧化锰, 推测其周边土壤蕴含着丰富的锰氧化菌资源, 因此本研究以此土壤为材料, 从中分离鉴定了1株具有较强锰氧化性能的细菌, 分析了其属内锰氧化菌的亲缘关系, 探究了菌株锰氧化的能力以及生物氧化锰的表征, 在丰富土壤锰氧化菌种资源的同时对锰矿周边土壤中的锰氧化菌进行了初探, 以期后续地球化学循环研究的开展提供线索。

1 材料和方法

1.1 土样采集及基本性质检测

样品取自北京昌平锰矿旧址0-20 cm表层土, 采集后置于密封袋, 4 °C保存。依照我国农业行业标准NY/T1121.2-2006测定土壤的pH值, 依照YJ/T015-1996标准利用电感耦合等离子体原子发射光谱法 (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, ICP-AES)测定土壤中锰及铁的含量。

1.2 富集和分离

将1:10比例稀释的土壤样品接种于含10 mmol/L Mn (II)的LB的液体培养基, 28 °C富集培养5 d。梯度稀释菌悬液, 均匀涂布于含有10 mmol/L Mn (II)的LB平板, 30 °C培养, 利用Leucoberbelin Blue (LBB)显色法^[22]检测黑褐色菌斑中氧化锰的生成, 阳性菌LBB呈现蓝色的显色反应, 阴性菌LBB无明显颜色变化。将阳性单菌落划线保存并接种于含有10 mmol/L Mn (II)的LB液体培养基, 150 r/min, 30 °C培养7 d后利用LBB显色法检测氧化锰的生成, 并根据LBB检测结果初步判断菌株氧化锰的能力。

用于富集和筛选的LB培养基配方为(g/L): 酵母膏10, 蛋白胨5, 氯化钠10, 调节体系pH至7.0, 1.0×10⁵ Pa高压蒸汽灭菌20 min。用于筛选的培养基加入终浓度为10 mmol/L的Mn (II)和20 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, pH 7.0) [Mn (II)和HEPES溶液用0.22 μ m滤膜滤灭使用]。

1.3 菌株形态及生理生化特征的鉴定

利用青岛海博革兰氏染色试剂盒对菌株进行革兰氏染色, 利用光学显微镜(Olympus, BX53)观察菌体形态。选用法国家梅里埃公司的API试剂条50 CHB、过氧化物酶试剂盒和V-P试剂盒对菌株进行生理特征的鉴定, 具体操作方法见产品说明书。

1.4 16S rRNA基因、*gyrB*基因及*gyrA*基因序列的分析

挑取纯化的单菌落, 用天根细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA。利用已报道的16S rRNA基因通用引物27F、1492R^[23]进行目的基因的扩增。PCR反应条件为: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 57 °C 30 s, 72 °C 40 s, 32个循环; 72 °C 10 min。PCR产物经Axygen胶回收试剂盒纯化回收后连接pEASY-T1载体, 转化大肠杆菌*Transphage*感受态细胞, 挑取阳性克隆提取质粒, 测序由美吉桑格公司完成。根据文献报道的引物^[24]扩增*gyrA*基因, PCR反应条件为: 98 °C 2 min, 98 °C 10 s, 57 °C 40 s, 72 °C 40 s, 35个循环; 72 °C 10 min。利用文献已报道的简并引物UP-1S和UP-2Sr^[25]扩增*gyrB*基因, PCR反应条件为: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s; 60 °C 30 s; 72 °C 40 s; 35个循环, 72 °C 10 min。*gyrA*基因和*gyrB*基因扩增产物的克隆和测序方法同16S rRNA基因。

选用EzTaxon及NCBI的BLAST数据库对测序结果进行比对。利用16S rRNA基因构建系统进化树时, 选取相似度超过97%的标准菌株的相应序列进行系统进化的分析, 并选取相似性较低的杆菌属菌株(*Lysinibacillus* sp.)作为外群; 利用*gyrB*、*gyrA*基因构建系统进化树时, 以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)作为外群。利用ClustalW软件对序列进行多重比对、最终选取16S rRNA基因序列1436 bp, *gyrB*基因序列985 bp, *gyrA*基因序列862 bp构建进化树。进化树构建利用MEGA 5.0软件邻位连接法(Neighbour-Joining, NJ)的Kimura's 2-parameter模型, 重抽样法(Bootstrap test)对进化树分支点的置信度进行评价, 重复抽取次数为1000。

1.5 菌株与芽孢类锰氧化菌的进化关系

根据文献[21,26–28]获得已报道的芽孢杆菌

SG-1 (AF326373)、芽孢杆菌MB-1 (AF326359)、芽孢杆菌MB-3 (AF326362)等16S rRNA基因序列, 进化树构建方法同前文所述, 最终选取CP133 16S rRNA基因序列1098 bp用于进化树的分析。

1.6 菌株生长与锰氧化的关系

挑取纯培养的单菌落至含有0和10 mmol/L Mn(II)的LB液体培养基, 30 °C、200 r/min振荡培养, 特定间隔时间测定600 nm处吸光值, 同时利用LBB显色法检测菌液中氧化锰的生成量。实验进行3次重复取平均值。

1.7 生物氧化锰的表征分析

用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)清洗培养14 d的细菌悬液, 2.5%戊二醛4 °C过夜固定, 按照30%–50%–70%–80%–90%–95%–100%的乙醇梯度逐级进行脱水, 每次15 min, 真空冷冻干燥后喷金, 利用日立S-4800/EX-350扫描电镜(Scanning electron microscope, SEM)和能谱仪(Energy dispersive spectrometer, EDX)进行分析。收集生物氧化锰沉淀, 无菌水洗涤后冷冻干燥, 利用X-射线衍射(X-ray diffraction, XRD)技术分析物质形态及组成。

2 结果和分析

2.1 土壤理化性质

经测定, 采集土壤样品的pH为7.36, 锰含量为 4.72×10^5 mg/kg, 铁含量为 2.06×10^4 mg/kg。

2.2 筛选菌株形态特点

通过富集培养和平板分离纯化的方法获得1株可以高效氧化Mn(II)的菌株, 命名为CP133; 菌株在LB培养基30 °C培养24 h后呈现乳白色菌落, 表面粗糙且边缘不整齐, 不透明似融蜡样, 革兰氏染色表明该菌株为杆状阳性菌。

2.3 筛选菌株生理生化特征

菌株CP133生理生化特征见表1。

表1. 分离菌株的生理生化特征

Table 1. Physiological and biological characteristics of strain CP133

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Glucose	+	Glycerinum	+
Maltose	+	Starch	+
Trehalose	+	Lactose	-
Dulcitate	-	Xylose	-
Sorbitol	-	Sucrose	+
Inositol	-	Catalase	+
Mannitol	-	V-P	+

+: positive; -: negative.

2.4 16S rRNA基因、*gyrB*基因及*gyrA*基因序列的分析

克隆菌株CP133的16S rRNA基因、*gyrB*基因和*gyrA*基因，根据Eztaxon数据库的比对结果，CP133的16S rRNA基因与芽孢杆菌属的*Bacillus cereus* ATCC 14579^T (AE016877)序列相似性最高，为99.80%，与该属的*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156)、*Bacillus mycoides*

DSM 2048^T (ACMU01000002)和*Bacillus weihenstephanensis* NBRC 101238^T (BAUY01000093)的序列相似性均在99%以上(图1)。

芽孢杆菌属细菌的16S rRNA基因极为保守，很难用于种间的鉴定。DNA促旋酶B亚基基因(*gyrB*)和DNA促旋酶A亚基基因(*gyrA*)在进化速率上较16S rRNA基因快，可用于属内种水平上的分类鉴定。将已获得的该菌株*gyrB*基因和*gyrA*基因在NCBI的BLAST数据库中进行比对，2个基因都与*Bacillus cereus* ATCC14579^T相应基因序列相似程度达到99%，系统发育结果也表明该菌株与*Bacillus cereus* ATCC 14579^T亲缘关系最近(图2、图3)。

综合形态、生理及16S rRNA基因、*gyrB*基因及*gyrA*基因的鉴定结果，分离菌株CP133鉴定为蜡样芽孢杆菌，命名为*Bacillus cereus* CP133。该菌的16S rRNA基因、*gyrB*基因和*gyrA*基因的登录号分别为KU312197、KU523898、KU523899。

2.5 菌株与芽孢类锰氧化菌的进化分析

图4显示了CP133与芽孢类锰氧化菌的亲缘关系，CP133与分离自含有高浓度Mn(II)等污染物

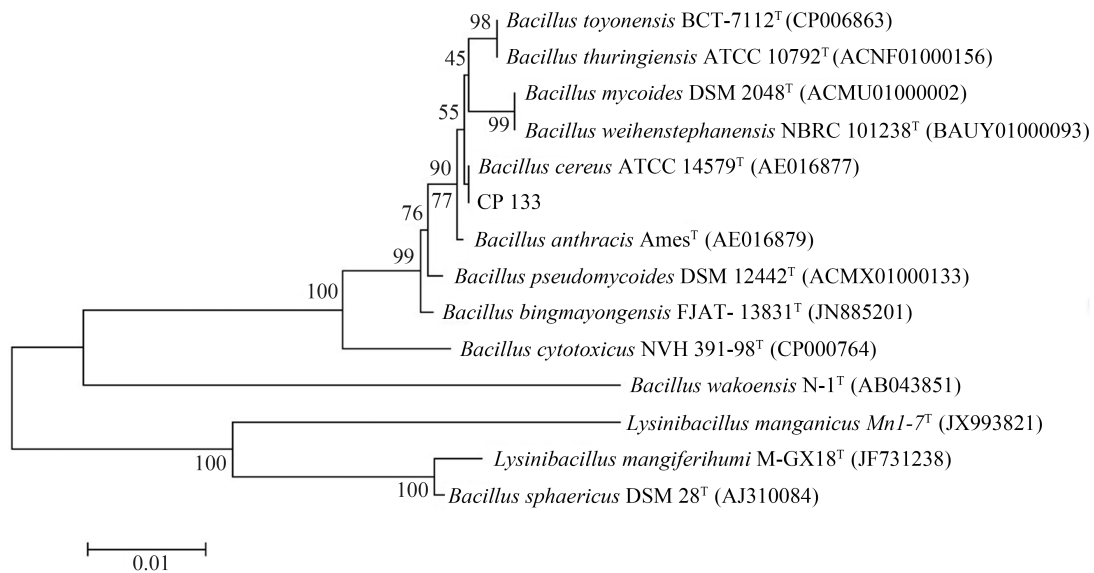


图1. 基于菌株CP133的16S rRNA基因(1436 bp)构建的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (1436 bp) of strain CP133 and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

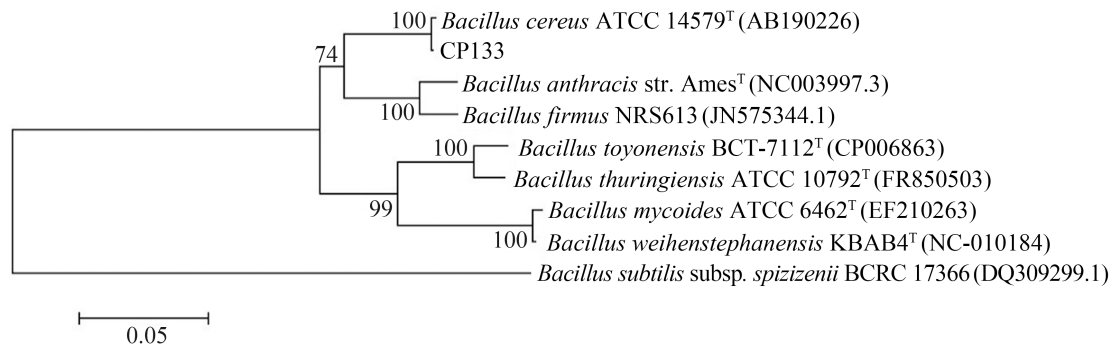


图 2. 基于菌株CP133的 $gyrB$ 基因(985 bp)构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree based on $gyrB$ gene sequence (985 bp) of strain CP133 and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

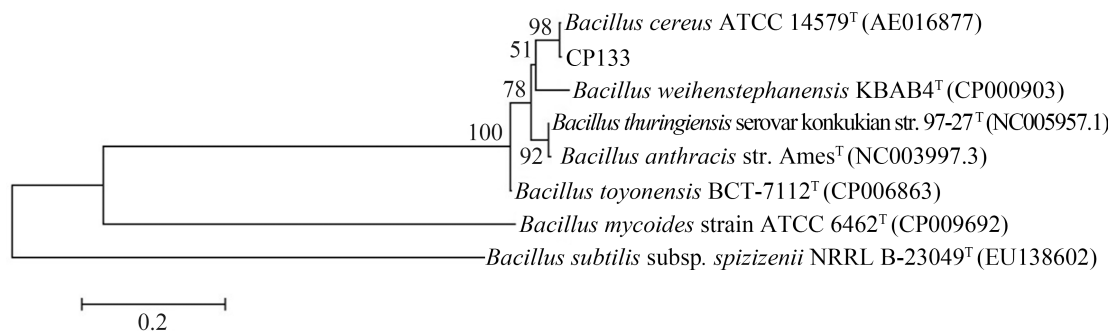


图 3. 基于菌株CP133的 $gyrA$ 基因(862 bp)构建的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on $gyrA$ gene sequence (862 bp) of strain CP133 and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

淡水池塘的*Bacillus* sp. AP5s2-M5c(KF561879)、芽孢杆菌属标准菌*Bacillus cereus* ATCC 14579^T (AE016877)和*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T(ACNF01000156)等分为一簇, 具有较近的亲缘关系。已知*Bacillus cereus* ATCC 14579^T (AE016877)分离于牛奶, *Bacillus mycooides* DSM 2048^T (ACMU01000002)分离于土壤, *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792^T (ACNF01000156)和*Bacillus anthracis* Ames^T (AE016879)分离于动物的组织。

2.6 分离菌株生长与锰氧化的关系

分离菌株CP133的生长曲线如图5所示, CP133第2天可进入稳定期, 并一直保持较为稳定的生长状态, Mn(II)的加入并未影响菌株整体生长趋势。利用LBB显色法检测生物氧化锰生成的

动态曲线(图5), 分离菌株CP133进入稳定期后可以检测到生物氧化锰的生成, 连续培养12 d后培养基中的生物氧化锰的浓度达到0.3 mmol/L。

2.7 生物氧化锰的表征

2.7.1 扫描电镜和元素分析: 利用扫描电镜及能谱分析考察生物氧化锰的表面形态及其元素分布, 图6-A为培养时不添加Mn(II)的菌株形态, 通过比较可以看出添加Mn(II)培养14 d后有大量的不溶物紧密结合在细菌细胞表面(图6-B), 利用能谱检测该物质含有锰元素(图6-C), 推测该不溶物为CP133吸附及氧化形成的生物氧化锰。

2.7.2 X射线衍射: 对菌株CP133培养基中的氧化锰进行X射线衍射分析, 检测不到明显的晶体特征峰(图7), 说明菌株CP133产生的生物氧化锰为无定形态或短程有序的物质。

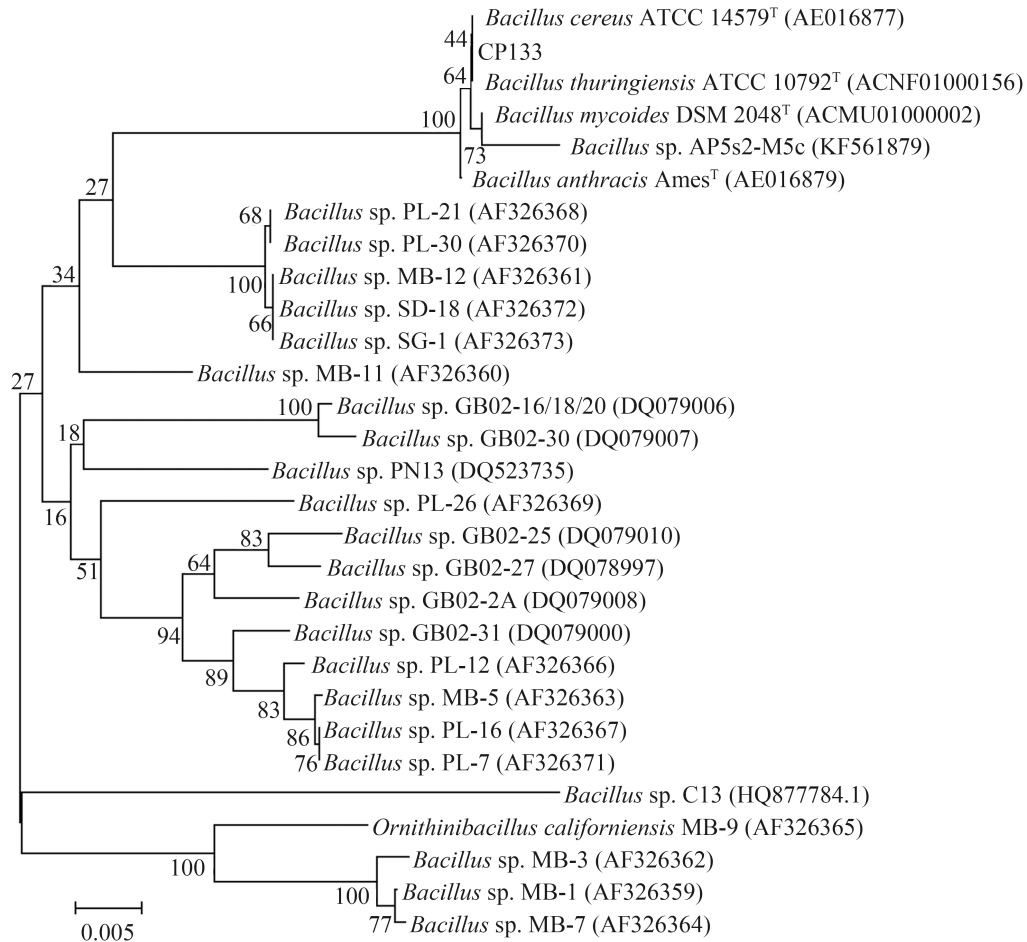


图 4. 基于菌株CP133的16S rRNA基因(1098 bp)构建的系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (1098 bp) of strain CP133 and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

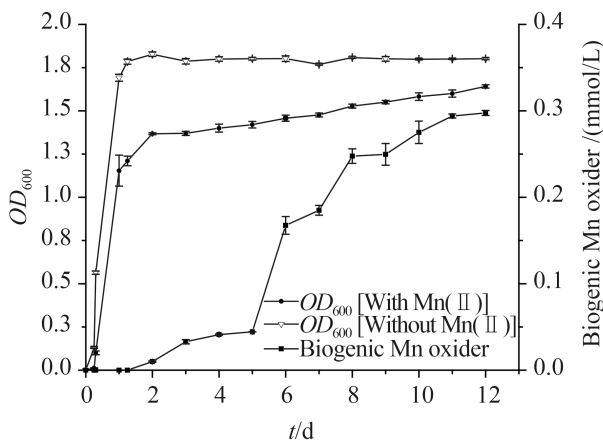


图 5. CP133在添加及不添加Mn(II)培养基中的生长曲线、生物氧化锰生成动态图

Figure 5. Growth curve of CP133 in medium with or without Mn(II), kinetics of biogenic Mn oxide formation.

3 讨论

本研究采集北京锰矿旧址周边土壤为材料, 分离出1株具有锰氧化功能的蜡样芽孢杆菌, 命名为*Bacillus cereus* CP133。芽孢杆菌是自然界中较为常见的一类细菌, 它们可形成芽孢, 具有较强的环境适应性, 是海洋锰氧化菌类的1个主要分支。在研究早期阶段, 研究者从海洋环境中分离出了多株芽孢类锰氧化菌, 其中包括分离自浅海沉积物的芽孢杆菌SG1^[6]、分离自海湾的芽孢杆菌MB-1、芽孢杆菌PL-12^[27]和分离自热泉的芽孢杆菌GB02-5^[26]。近来从海底玄武岩中获得的1株锰氧化菌*Bacillus rigiliprofundii* sp. nov., 被鉴定为芽

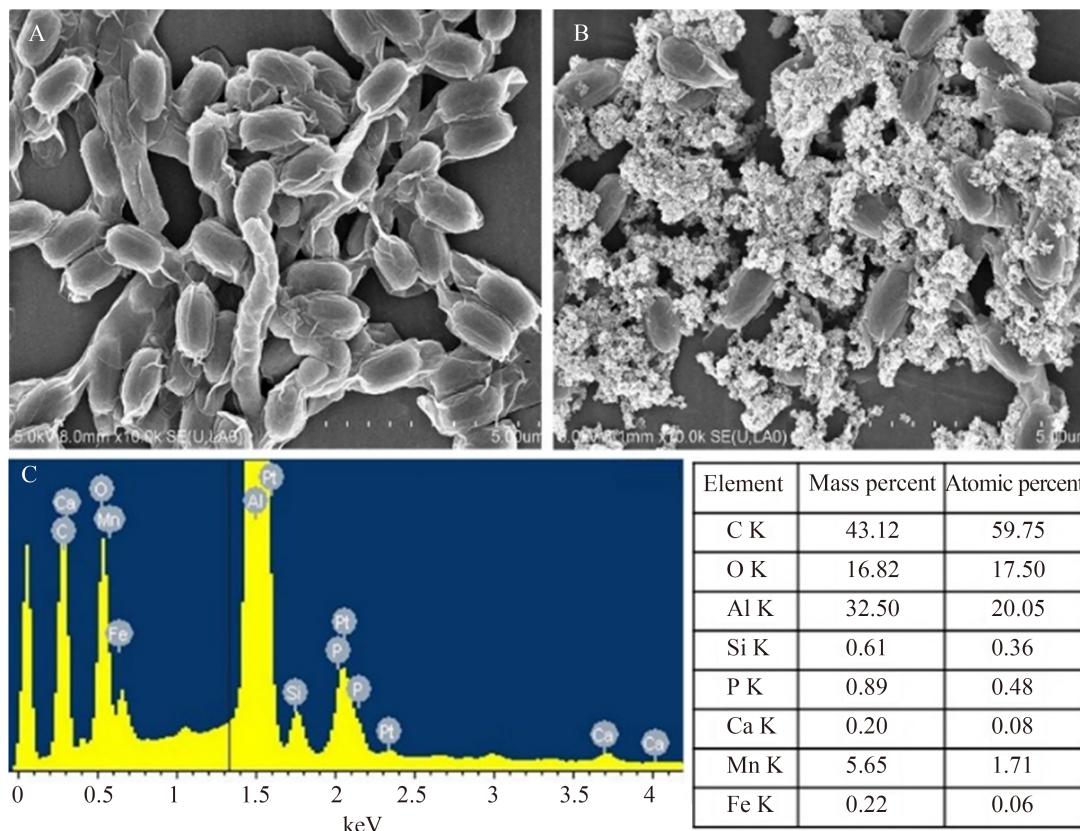


图 6. 生物氧化锰扫描电镜和能谱图

Figure 6. SEM-EDX analysis of biogenic Mn oxide by strain CP133.

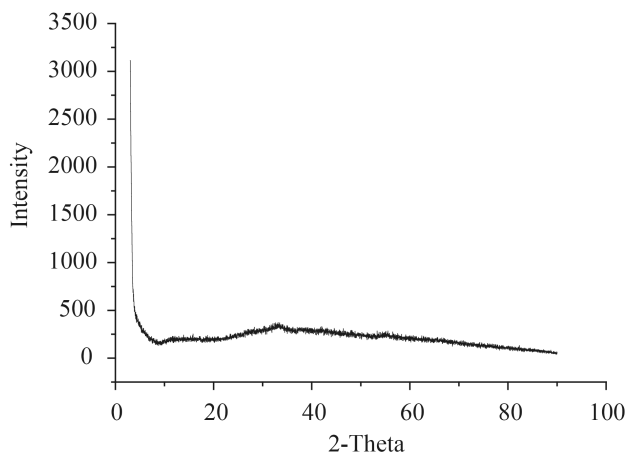


图 7. 分离菌株CP133生成的生物氧化锰的XRD图谱

Figure 7. XRD patterns of biogenic Mn oxides formed by strain CP133.

孢杆菌属新种^[23]。近些年, 土壤锰氧化菌逐渐成为研究热点, 研究人员调查了山东土壤锰铁结核及周边土壤中锰氧化菌的多样性及丰度, 发现在

0–20 cm深度土层中芽孢杆菌为优势菌群^[21], 这与CP133分离结果相吻合。湖北20–40 cm深度硅酸盐土壤中芽孢杆菌则仅出现在锰铁结核中^[18]。湖南、湖北、武汉等4处的锰铁结核及周边0–30 cm的黄棕红壤则以变形菌为主要菌群, 芽孢杆菌丰度不高^[20]。因此, 锰氧化菌在不同土壤及锰铁结核间的多样性及丰度存在着一定的差异。

分析菌株的亲缘关系有助于预测菌株潜在的功能和在地球化学循环中的作用。为了探究分离菌株CP133与已报道芽孢类锰氧化菌亲缘关系的远近, 本文利用MEGA 5.0软件对它们进行了建树分析, 结果表明CP133只与分离自污水池塘的芽孢杆菌AP5s2-M5c (HQ877784.1)归为一簇, 分离自山东锰铁结核土壤的芽孢杆菌C13 (HQ877784.1)和芽孢杆菌PN13 (DQ523735)与海洋锰氧化菌亲

缘关系更为紧密。地理隔离对于菌株的亲缘关系具有较大的影响,取自于相同环境条件下的菌株大多进化上距离较小,如分离自海洋生境的锰氧化菌群可分成SG-1簇、“halo”簇和“PL-12”簇^[27]。但是,分离自相同土壤生境条件下的芽孢杆菌C13(HQ877784.1)和芽孢杆菌PN13(DQ523735)却具有相对较大的进化距离。为了更加准确的分析,本研究将锰氧化菌鉴定至“种”水平,但目前用作参考菌株的锰氧化菌大多只鉴定至“属”一级,菌株所属的种类未知对建树结果的分析存在一定的影响,因此,芽孢类锰氧化菌在进化角度上的准确定位有待于进一步加深菌株的鉴定精度。

多铜氧化酶(Multicopper oxidase, MCO)是芽孢类锰氧化菌研究中重要的一类蛋白, *mnxG*基因编码1个多铜氧化酶,可通过孢子直接参与Mn(II)的氧化^[29]。近些年*mnxG*基因逐渐成为锰氧化菌进化分析中的“分子标尺”^[26-27]。为深入研究分离菌株CP133的锰氧化机制,探明锰氧化相关蛋白及基因,我们对其进行了全基因组的测序,计划从功能蛋白的角度对CP133与其余芽孢类锰氧化菌在进化上进行更加全面的比较分析。有研究者推测锰结核中锰氧化菌群落的差异是细菌环境适应性不同的结果,生存环境中有机质、锰氧化物的含量都是影响因素^[20],对锰矿石及周边土壤理化性质的深入分析和土样中微生物群落多样性和丰度的分析也是探究锰氧化菌地球生物化学循环的关键。生物氧化锰结构上的特点不仅影响着生物地球化学循环,其环境友好性使其具有良好的工程应用潜力,可作为纳米级的生物吸附剂,在污水处理领域具有一定的应用前景。根据目前已有研究,生物氧化锰可吸附多种重金属元素(As、Cd、Co、Hg、Ni、Pb、Pu、U和Zn)^[30],对于污染源中重金属的吸附能力优于其余锰氧化物^[31-32],例如恶臭假单胞菌MnB1生成的生物氧化锰对Pb(II)、Cd(II)和Zn(II)的吸附量是化学合

成氧化锰吸附量的7-8倍^[33]。分离菌株CP133所产生的生物氧化锰具有无定形态,通过预实验发现其对重金属Cd(II)具有较好的吸附效果,因此在环境修复领域同样具有应用潜力。

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] Carmichael MJ, Carmichael SK, Santelli CM, Strom A, Bräuer SL. Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River Basin. *Geomicrobiology Journal*, 2013, 30(9): 779-800.
- [3] Okibe N, Maki M, Sasaki K, Hirajima T. Mn(II)-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. strain MM1 is involved in the formation of massive Mn sediments around Sambe Hot Springs in Japan. *Materials Transactions*, 2013, 54(10): 2027-2031.
- [4] Sujith PP, Mourya BS, Krishnamurthi S, Meena RM, Bharathi PAL. Mobilization of manganese by basalt associated Mn(II)-oxidizing bacteria from the Indian Ridge System. *Chemosphere*, 2014, 95(218): 486-495.
- [5] Hastings D, Emerson S. Oxidation of manganese by spores of a marine *Bacillus*: kinetic and thermodynamic considerations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1986, 50(8): 1819-1824.
- [6] de Vrind JPM, de Vrind-de Jong EW, de Voogt JWH, Westbroek P, Boogerd FC, Rosson RA. Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(5): 1096-1100.
- [7] 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.
- [8] Adams LF, Ghiorse WC. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(3): 1279-1285.
- [9] 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(14): 2649-2662.
- [10] Webb SM, Tebo BM, Bargar JR. Structural characterization of biogenic Mn oxides produced in seawater by the marine

- Bacillus* sp. strain SG-1. *American Mineralogist*, 2005, 90(8/9): 1342–1357.
- [11] Kim HS, Pastén PA, Gaillard JF, Stair PC. Nanocrystalline todorokite-like manganese oxide produced by bacterial catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(47): 14284–14285.
- [12] Villalobos M, Bargar J, Sposito G. Trace metal retention on biogenic manganese oxide nanoparticles. *Elements*, 2005, 1(4): 223–226.
- [13] Nelson YM, Lion LW, Ghiorse WC, Shuler ML. Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 175–180.
- [14] Villalobos M, Lanson B, Manceau A, Toner B, Sposito G. Structural model for the biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas putida*. *American Mineralogist*, 2006, 91(4): 489–502.
- [15] Blöthe M, Wegorzewski A, Müller C, Simon F, Kuhn T, Schippers A. Manganese-cycling microbial communities inside deep-sea manganese nodules. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(13): 7692–7700.
- [16] Anderson CR, Davis RE, Bandolin NS, Baptista AM, Tebo BM. Analysis of *in situ* manganese(II) oxidation in the Columbia River and offshore plume: linking *Aurantimonas* and the associated microbial community to an active biogeochemical cycle. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(6): 1561–1576.
- [17] Yuan LX, Sun LG, Fortin D, Wang YH, Yin XB. Microscale characterization and trace element distribution in bacteriogenic ferromanganese coatings on sand grains from an intertidal zone of the East China Sea. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119080.
- [18] He JZ, Zhang LM, Jin SS, Zhu Y, Liu F. Bacterial communities inside and surrounding soil iron-manganese nodules. *Geomicrobiology Journal*, 2008, 25(1): 14–24.
- [19] Zhang DC, Liu YX, Li XZ. Characterization of bacterial diversity associated with deep sea ferromanganese nodules from the South China Sea. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(9): 598–605.
- [20] Zhang GY, He JZ, Liu F, Zhang LM. Iron-manganese nodules harbor lower bacterial diversity and greater proportions of *Proteobacteria* compared to bulk soils in four locations spanning from north to south China. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(7): 562–577.
- [21] Yang WH, Zhang Z, Zhang ZM, Chen H, Liu J, Ali M, Liu F, Li L. Population structure of manganese-oxidizing bacteria in stratified soils and properties of manganese oxide aggregates under manganese-complex medium enrichment. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73778.
- [22] Krumbein WE, Altmann HJ. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1973, 25(2): 347–356.
- [23] Sylvan JB, Hoffman CL, Momper LM, Toner BM, Amend JP, Edwards KJ. *Bacillus rigiliprofundus* sp. nov., an endospore-forming, Mn-oxidizing, moderately halophilic bacterium isolated from deep seafloor basaltic crust. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(6): 1992–1998.
- [24] Chun J, Bae K. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78(2): 123–127.
- [25] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1104–1109.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Santelli CM, Chaput DL, Hansel CM. Microbial communities promoting Mn(II) oxidation in Ashumet Pond, a historically polluted freshwater pond undergoing remediation. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(7): 605–616.
- [29] Dick GJ, Torpey JW, Beveridge TJ, Tebo BA. 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.
- [30] Hennebel T, De Gussem B, Boon N, Verstraete W. Biogenic metals in advanced water treatment. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2): 90–98.
- [31] Meng YT, Zheng YM, Zhang LM, He JZ. Biogenic Mn oxides for effective adsorption of Cd from aquatic environment. *Environmental Pollution*, 2009, 157(8/9): 2577–2583.
- [32] 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(1): 287–328.

[33] Zhou DH, Kim DG, Ko SO. Heavy metal adsorption with

biogenic manganese oxides generated by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, 24: 132–139.

Isolation and characterization of a manganese-oxidizing bacterium from soils

Jie Zheng¹, Youting Meng^{1*}, Yaoyao Fang², Suling Yang¹, Ping Wang¹

¹ Beijing Radiation Center, Beijing 100875, China

² Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection, Beijing 100037, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate and characterize manganese (II)-oxidizing bacteria from surrounding area of manganese mine. [Methods] Mn (II)-oxidizing strains were isolated based on the ability to produce brown Mn oxides on agar plates. The presence of Mn oxides was confirmed by using the leucoberbelin blue (LBB) assay. The isolate was identified by morphological and physiological characterization and sequence analyses of 16S rRNA gene, *gyrB* gene and *gyrA* gene. The phylogenetic relationship between the isolated strain and reported Mn (II) oxidizers was also analyzed. LBB assay was used to indicate the kinetics of Mn (II) oxides formation. The Mn oxides morphology and chemical contents were determined by scanning electron microscope with energy dispersive spectrometer and X-ray diffraction. [Results] An isolate, named strain CP133, with high manganese oxidizing activity was obtained and identified as *Bacillus cereus*. There were some phylogenetic differences between strain CP133 and other Mn (II)-oxidizing *Bacillus* species isolated from deep sea and soils. Strain CP133 produced amorphous manganese oxides that adhered to spore surface after the stationary phase of the cell culture. About 0.3 mmol/L manganese oxides was obtained after 12 days. [Conclusion] A Mn (II)-oxidizing *Bacillus cereus* was successfully isolated. Our results suggest the diversity of Mn (II)-oxidizing *Bacillus* species, and help understanding biogeochemical cycles in manganese mine and surrounding soils.

Keywords: manganese oxidizing bacteria, biogenic manganese oxides, *Bacillus cereus*, soil, LBB assay

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41203059), by the "Young Key Member" Project of Beijing Academy of Science and Technology (2013-014), and by the "Sprout" Project of Beijing Academy of Science and Technology (201501)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-57910996; E-mail: ytmeng@gmail.com

Received: 20 January 2016; Revised: 5 April 2016; Published online: 5 May 2016