

# 异养微生物异化还原大洋多金属结核

冯雅丽<sup>1)</sup> 李浩然<sup>2)</sup>

1) 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083 2) 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

**摘要** 从太平洋海底沉积物中分离到的四株异养微生物, 进行耐酸和耐金属的驯化, 在好氧和厌氧条件下进行异养微生物异化还原大洋多金属结核的实验, 并分析了浸出机理. 结果表明: 厌氧浸出优于好氧浸出, pH 控制在 2.5~3, 浸出时间为 3 d, 浸出率可达 98%. 利用异养微生物还原浸出大洋多金属矿浸出速率高, 矿体无需通气, 投资低, 易于操作, 且环境友好, 可在回收有价值金属的同时进行固体废弃物和有机废弃物综合治理.

**关键词** 大洋多金属结核; 异养微生物; 异化还原; 浸出

**分类号** TF111.311; TF803.21; Q939.99

微生物异化还原金属氧化物是一种最新发现的代谢方式: 微生物利用有机底物异化还原金属氧化物进行生长代谢. 异化金属还原菌(dissimilatory metal-reducing microorganisms, DMRM)以金属氧化物作为其呼吸作用的最终电子受体, 形成完整的电子传递链, 为细胞提供各项生理活动所需的能量<sup>[1]</sup>. 因其可以利用不可溶的固体作最终电子受体, 为一些重要的生命科学问题提供了可能的解决线索, 例如原始生命的存在形态<sup>[2]</sup>、外星球可能存在的生命形态<sup>[3]</sup>、生物生存的上限温度<sup>[4]</sup>等. 本研究工作在菌种筛选的基础上进行了微生物异化还原试验, 为进一步的浸矿试验提供了基础.

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

大洋多金属结核由中国“大洋一号”DY105-13航次在东太平洋采得, 成分(质量分数, %)为: Co 0.26, Ni 0.84, Cu 0.89, Mn 21.24, Fe 10.4.

菌种为利用平板划线法由海底沉积物(由中国“大洋一号”DY105-11航次在东太平洋采得)中分离的混合异养菌株, 分别命名为 K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub>和 K<sub>4</sub>.

### 1.2 实验条件

反应温度 30 °C, 转速 170 r·min<sup>-1</sup>, 定期取上清液测定 pH 及 Mn<sup>2+</sup> 浓度, 取样前补充去离子水以补偿水分蒸发. 原子吸收光谱检测 Mn<sup>2+</sup> 浓度.

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 铁锰异化还原微生物的筛选分离

铁锰氧化物还原细菌分布十分广泛, 但许多菌的分离纯化却很困难. 本研究主要从深海沉积物中分离培养, 然后进行金属抗性的驯化. 表 1 为铁锰还原菌培养基.

筛选菌种用含有多种重金属离子的有机废水选择, 经过多代培养和分离, 共获得 10 种异养微生物, 通过初步筛选鉴定, 并通过形状和生理生化分析, 选择图 1 所示的四种菌: K<sub>1</sub>(enterobacter spp.) 红色细菌, 菌落表面光滑; K<sub>2</sub>(penicillium simplicissimus) 绿色真菌, 菌落表面粗糙, 粉末状; K<sub>3</sub>(aspergillus niger) 黑色真菌, 白色菌丝, 底部为黄色放射状褶皱; K<sub>4</sub>(achromobacter spp.) 白色细菌, 菌落表面光滑.

### 2.2 异养型铁锰还原菌金属耐性和耐酸性的驯化

金属耐性主要是通过提高浸出体系的矿浆浓度, 或采用含大量重金属的废旧电池粉末进行驯化, 使其金属耐性达到与自养嗜酸菌相当的水平. 待菌适应并能正常生长后, 即可将其转移到含有更高矿浆浓度的培养基中培养. 由于电池粉末中既有氧化性二氧化锰, 又有 Zn, Hg, Cd 等高毒性金属离子, 通过提高矿浆浓度得到满足还原二氧

收稿日期: 2005-09-28 修回日期: 2005-10-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20476009, No. 20576137); 国家长远发展专项(No. DY105-04-01-08); 国家“973”计划资助项目(No. 2003CB716001)

作者简介: 冯雅丽(1967-), 女, 副教授

表1 铁锰还原菌培养基的组成

Table 1 Culture medium composition of ferrimanganic reduction bacteria

培养基一		培养基二		培养基三		培养基四(固体)	
成分	质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	成分	质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	成分	质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	成分	质量浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )
葡萄糖	10	葡萄糖	10	葡萄糖	10	葡萄糖	10
MgSO <sub>4</sub>	1	MgSO <sub>4</sub>	0.5	MgSO <sub>4</sub>	0.5	MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaHCO <sub>3</sub>	2.5	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	KCl	0.1
KCl	0.1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05	KCl	0.05	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	酵母浸膏	0.5
柠檬酸	4	H <sub>2</sub> O	1000	H <sub>2</sub> O	1000	H <sub>2</sub> O	1000
H <sub>2</sub> O	1000					琼脂	6

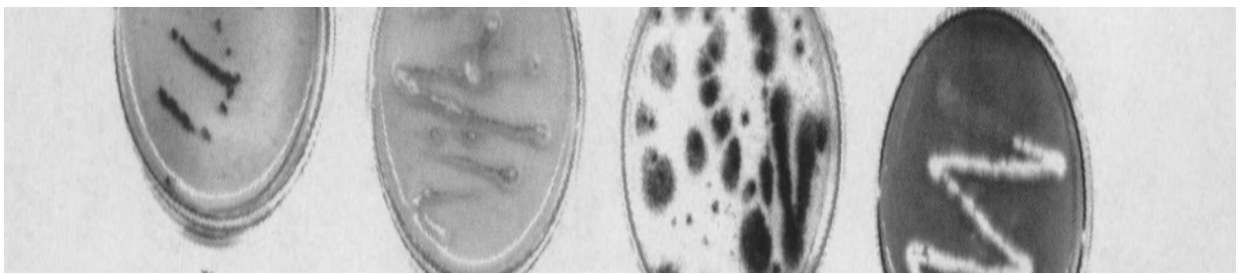


图1 从深海沉积物中分离到异养微生物

Fig 1 Heterotrophic microbes separated from sediment in deep sea bed

化锰和降解有机废水条件的适用范围广的菌株。表2为异养菌金属耐性驯化过程。图2和图3为两次驯化过程中菌液的pH值变化与时间的关系曲线。

表2 异养微生物金属耐性驯化过程

Table 2 Acclimatization process of heterotrophic microbes for metallic tolerance

重金属矿 浆浓度/ (g·L <sup>-1</sup> )	细菌进入对数生长期的天数/d			
	驯化前 细菌	第一次 转移	第二次 转移	第三次 转移
100	7	6	4	4
200	10	8	5	4
300	11	9	8	7
400	13	10	9	8
500	—	—	10	9
600	—	—	—	10

以上驯化过程既有人为调节因素,也有细菌产有机酸导致pH下降的因素。由驯化过程的曲线可以看出:驯化时间约为6~9d。获得的异养菌可在pH=2~3的范围生长,具备了与自养型嗜酸硫杆菌共同培养的嗜酸性能和金属抗性。

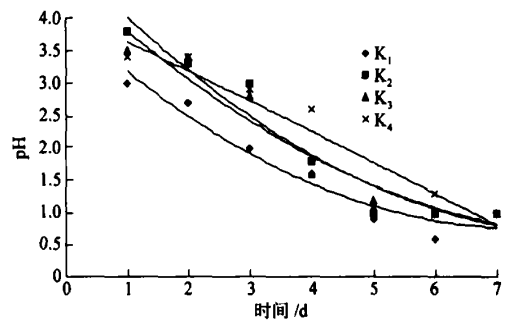


图2 异养微生物耐酸性第一次驯化实验

Fig. 2 The first acclimatization experiment on acid tolerance for heterotrophic microbes

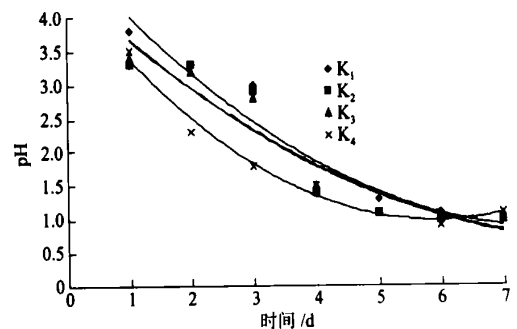


图3 异养微生物耐酸性第二次驯化实验

Fig. 3 The second acclimatization experiment on acid tolerance for heterotrophic microbes

### 2.3 异养微生物异化还原大洋多金属结核实验

微生物浸出大洋多金属结核的实验条件: 糖蜜  $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 大洋多金属矿  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . 厌氧、好氧条件下进行摇瓶实验, 反应温度  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 摇床转速  $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 定期取上清液测定 pH 和  $\text{Mn}^{2+}$  浓度, 取样前补充去离子水以补偿水分蒸发. 原子吸收光谱检测  $\text{Mn}^{2+}$  浓度.

$\text{Mn}^{2+}$  只有在酸性条件下才能溶解, 在中性或碱性条件下, 被还原的锰可能会以  $\text{MnCO}_3$  沉淀的形式存在于矿渣中. 微生物还原作用在厌氧条件下进行, 还原过程中溶液 pH 值始终保持在 3 左右, 异养菌微生物对  $\text{MnO}_2$  的还原作用如图 4 所示.

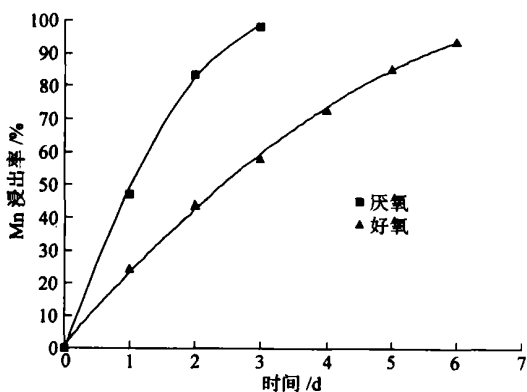


图 4 好氧和厌氧条件下混合异养微生物还原大洋多金属结核

Fig. 4 Marine nodules reduced by mixed heterotrophic microbes under aerobic and anaerobic conditions

无氧条件下,  $\text{MnO}_2$  是异氧微生物代谢呼吸链的最终电子受体, 还原后的金属离子溶于培养液中. 大洋多金属矿中的锰主要以不溶的  $\text{MnO}_2$  形式存在, 在微生物呼吸过程中, 还原生成可溶性二价锰离子, 伴随  $\text{MnO}_2$  晶格的破坏过程, 矿物中的其他元素如 Co, Ni 等有价金属也溶浸于溶液中. 接入异养微生物后, 有机物的聚集促使锰较快速的还原, 四价锰还原过程中以有机碳作为电子供体,  $\text{MnO}_2$  为电子受体, 细菌把氧化有机碳产生的还原能力传递给  $\text{MnO}_2$ , 生成  $\text{Mn}(\text{OH})_2$  或  $\text{MnCO}_3$ , 由于酸性条件及细菌还原酶的作用形成可溶性  $\text{Mn}^{2+}$ .

$\text{MnO}_2$  的生物还原是混合菌在厌氧条件下呼吸作用的一个形式<sup>[5-9]</sup>. 这一机理可由厌氧条件下还原锰的速度快、还原率高证实(图 4). 厌氧、好氧对比实验结果表明在好氧条件下, 微生物对锰的还原效果差, 证实了四价 Mn 作为电子受体参与微生物的氧化还原反应. 体系中的溶解氧从

两方面影响浸矿效果, 反应初期体系中高价态的锰与溶解氧并存时, 二者竞争有机物分解所产生的还原力, 即图 5 中 1 和 2 两个生物反应同时存在; 反应后期四价 Mn 大部分被还原, 以  $\text{Mn}^{2+}$  状态存在, 易于被氧化, 体系中高电位溶解氧氧化  $\text{Mn}^{2+}$ , 生成三价或四价锰, 如图 5 中化学反应 3. 因此溶解氧一方面与  $\text{MnO}_2$  竞争电子受体, 另一方面使反应体系中的锰由低价态再次转变为高价态, 降低有机物的利用效率. 提高混合异养菌还原浸出大洋多金属矿中锰的效率即要抑制副反应 2 和 3, 强化反应 1. 驯化微生物可以加强微生物对矿物的耐受性并提高其与二氧化锰的作用速度, 使生化反应 1 在与反应 2 的竞争中处于优势; 控制反应体系中的溶解氧含量, 则可以同时抑制浸出体系中的副反应 2 和 3, 提高还原浸出的效率.

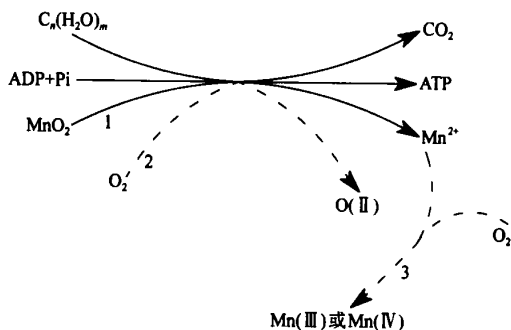


图 5 异养微生物浸出大洋多金属结核过程中的生物-化学反应

Fig. 5 Bio-chemical reaction in the process of bio-leaching marine nodules by heterotrophic microbes

在异养微生物还原大洋多金属结核的过程中, 系统 pH 控制在 2.5~3 为宜(图 6). 使用单

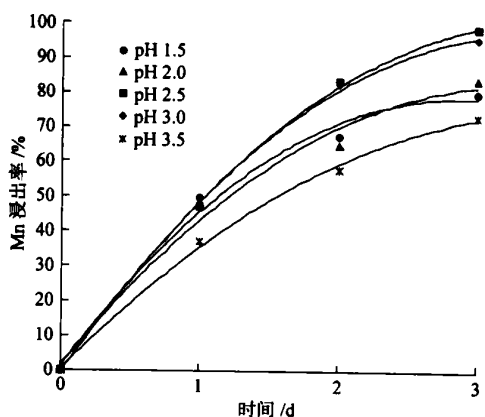


图 6 pH 值对混合异养微生物还原大洋多金属结核的影响

Fig. 6 Effect of pH on marine nodules reduced by heterotrophic microbes

一菌种时,生物浸出的反应时间为5d,而使用混合微生物可以提高浸出率,浸出时间缩短到3d,最终还原率可达98%以上(图7)。自养型嗜酸硫杆菌在无铁硫体系中不能发育,而上述四种微生物的混合菌种在此体系中相当稳定,经过多次的菌种转接培养后,在生物浸出过程中菌种的性状仍能保持一致。

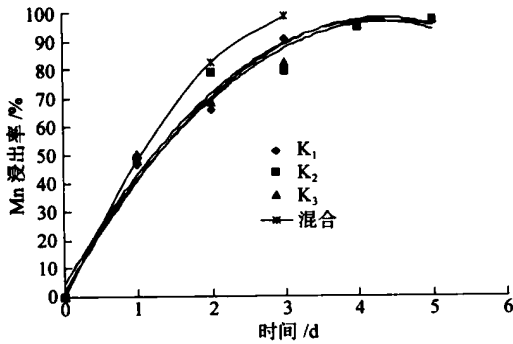


图7 异养菌 K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> 及混合菌还原大洋多金属结核  
Fig. 7 Marine nodules reduced by heterotrophic microbes K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> and their mixture

由于大洋多金属矿在此过程中作为电子受体,所以过量通入空气反而使高价锰还原速度降低,导致浸出率下降。异养微生物还原浸出大洋多金属矿,浸出速度较快,浸出率高,浸矿体系无需通气,投资低,易于操作,环境友好。除可以利用废糖蜜等食品工业有机废弃物还原 MnO<sub>2</sub> 外,还可以在有机碳源中混入一定量的难降解染料废水,加强共代谢作用,在回收有价金属的同时进行固体废弃物和有机废弃物综合治理<sup>[7]</sup>。

### 3 结论

(1) 从深海沉积物中分离的异养微生物,经耐酸和耐金属驯化后,具备了与自养型嗜酸硫杆菌共同培养的嗜酸性能和金属抗性;

(2) 异养微生物还原大洋多金属结核的过程中,厌氧浸出优于好氧浸出,pH控制在2.5~3为宜,浸出时间为3d,浸出率达98%;

(3) 异养微生物还原浸出大洋多金属矿,浸出速率高,矿体无需通气,投资低,易于操作,环境友好。可在回收有价金属的同时进行固体废弃物和有机废弃物综合治理。

### 参 考 文 献

[1] Neelson K H, Little B. Microbial metal-ion reduction and marine extraterrestrial expectation. *Curr Opin Microbiol*, 2002(5): 296

[2] Lovley D R. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Ind Microbiol*, 1995, 114: 85

[3] Boon M, Heijnen J J. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, 1998, 48: 27

[4] Schrenk M O, Edwards K J. Distribution of Thiobacillus ferrooxidans; implication for generation of acid mine drainage. *Science*, 1998, 278: 1519

[5] Schippers A, Bo Barker. Biogeochemistry of pyrite and iron sulfide oxidation in marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta*, 2002, 66(1): 85

[6] Mort S L, Dear-Ross D. Biodegradation of phenolic compounds by sulfate-reducing bacteria from contaminated sediments. *Microb Ecol*, 1994(1): 67

[7] 郑红, 汤鸿霄. 锰矿砂对取代酚的光氧化作用研究. *环境科学学报*, 1999, 19(5): 550

## Dissimilatory reduction of marine nodules with heterotrophic microbes

FENG Yali<sup>1)</sup>, LI Haoran<sup>2)</sup>

1) Civil and Environmental Engineering School, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

2) State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

**ABSTRACT** Four heterotrophic microbes were separated from deep sea floor sediment of the Pacific Ocean. The dissimilatory reduction principles of these heterotrophic microbes were explored after their acclimatization to acid and metals. The results indicate that anaerobic leaching is better than aerobic condition, the optimum pH range is 2.5 to 3, the leaching time is 3 d, and the leaching rate is up to 98%. It shows that dissimilatory reduction of marine nodules with heterotrophic microbes has such advantages as higher leaching rate, no ventilation, lower investment, easier operation and better environment. The solid and organic waste can be treated at the same time coupling valuable metal recovery.

**KEY WORDS** marine nodules; heterotrophic microbe; dissimilatory reduction; leaching