

利用赖氨酸芽孢杆菌产生的生物锰氧化物吸附和回收金离子

王惠¹ 裴媛筠¹ 熊丹丹¹ 廖水姣² 王革娇¹

1. 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, 武汉 430070; 2. 华中农业大学理学院, 武汉 430070

摘要 研究了1株从锰污染的土壤中分离的细菌 M14, 初步鉴定其为赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus* sp.)。该菌在生长过程中可以将 Mn(II) 氧化成不溶于水的以 Mn(IV) 为主的生物锰氧化物。再利用这种生物锰氧化物去吸附和解析溶液中的金离子, 从而达到了贵金属回收再利用的目的。该菌保藏于中国典型培养物保藏中心, 其保藏号为 CCTCC NO: M2012084。本研究结果在净化和回收采矿等废水方面具有良好的应用前景。

关键词 锰氧化细菌; 生物锰氧化物; 赖氨酸芽孢杆菌; 金吸附; 解吸

中图分类号 Q 939.9; X 172 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)05-0029-05

对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造活动产生不少含重金属(如金、银、铂、钨等)的废液, 以前因重金属含量较少且回收技术的限制, 大量含重金属的废液被排放, 不仅造成了重金属资源的浪费, 还污染了环境。目前黄金价格越来越昂贵, 而金矿资源的稀少使我们不得不开始考虑对金的回收。

目前已知, 从浸金液中回收金离子 Au(III) 的主要方法有: (1) 活性炭吸附法。活性炭吸附技术是指在浸出槽或吸附槽中加入活性炭, 利用活性炭的吸附作用从矿浆中吸附回收金。此法可直接用于从矿浆中回收金, 但这种方法的推广与应用较难^[1]。(2) 树脂吸附法^[2]。金在强碱、强碱与弱碱混合型树脂上能有效地被吸附和解吸, 此法有载金量高、用量少等优势, 但因其有强腐蚀性及毒性, 极易造成二次污染。(3) 溶剂萃取法^[3]。指利用醇类、醚类、酮类、胺类等有机试剂作为金的萃取剂, 但其对操作人员的身体不利。因此, 寻求新的回收金离子的材料和方法是当务之急。

一些锰氧化微生物(包括细菌和真菌)能够将 Mn(II) 氧化为不溶的锰氧化物。该类生物锰氧化物对重金属(如 As、Ni、Cu、Co、Cd、Cr) 等具有吸附、置换或沉淀作用^[4-8]。但目前还没有报道生物锰氧化物对金离子的吸附作用。本研究利用1株锰氧化细菌产生的生物锰氧化物来吸附和回收金离子 Au

(III)。该类生物锰氧化物在贵金属回收及污水处理治理中具有很高的应用价值。

1 材料与方法

1.1 样品采集与菌株分离

土样采集于天津市西青区玛钢厂锰原料仓库的表层土。取 100 g 土样置于 250 mL 玻璃瓶中, 向土样中添加无菌 MnCl₂ 溶液使其终质量浓度为 989.55 mg/kg, 28 °C 培养 1 周。稀释并涂布含 0.3 mmol/L MnCl₂ 的 K 选择平板(1 L 酵母膏 0.5 g, 蛋白胨 2 g, 琼脂 15 g, 人工海水(NaCl 13.14 g, KCl 0.56 g, MgSO₄·7H₂O 9.24 g, CaCl₂ 0.83 g, 用含 20 mmol/L HEPES(羟乙基呱嗪乙硫磺酸)调 pH 至 7.0)^[9] 在 28 °C 下培养 1 周。挑选表面为棕褐色的菌落, 分离得到菌株 M14。利用赵萍等^[10]的方法中 16S rRNA 基因序列, 以邻位相连法(neighbor-joining) 构建进化树。

1.2 菌株 M14 锰氧化效率的分析

细菌锰氧化效率的分析按笔者所在课题组前期的方法^[5-6, 8]进行。向 100 mL 含 0.3 mmol/L MnCl₂ 的 K 培养基中接种 1% ($D_{600\text{nm}} \approx 0.7$) M14 菌, 28 °C、160 r/min 摇床中振荡培养 1 周。用火焰原子吸收分光光度计测定样品中所含有的 Mn(II) 的浓度。每 24 h 取样 10 mL, 设置 3 次重复。

收稿日期: 2013-06-19

基金项目: 国家“863”计划项目(2012AA101402-3)和中央高校基本科研业务费专项(2013PY122)

王惠, 硕士, 研究方向: 环境微生物. E-mail: 1013386372@qq.com

通讯作者: 王革娇, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物. E-mail: gejiao@mail.hzau.edu.cn

1) 离心。以 8 000 r/min 离心 6 min, 上清用 0.22 μm 滤膜过滤。测得的 Mn(II) 的浓度称之为“剩余的 Mn(II)”。

2) 离心得到的沉淀处理。用去离子水重复 3 次洗涤离心后, 加入 4 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 CuSO_4 溶液, 用移液器将菌体打散, 以 160 r/min 的速度振荡 12 h。然后取出, 管中的菌悬液用去离子水定容至 10 mL, 8 000 r/min 离心 6 min, 保留上清液, 过滤, 将该部分溶液中存在的 Mn(II) 称之为“吸附的 Mn(II)”。

3) 剩余的沉淀处理。再次用去离子水重复 3 次洗涤后, 加入 4 mL 0.1 mol/L 盐酸羟氨母液, 用移液器将菌体打散, 以 160 r/min 的速度振荡 12 h。菌悬液用去离子水定容至 10 mL, 8 000 r/min 离心 5 min 后, 保留上清液, 过滤, 将该部分溶液中存在的 Mn(II) 称之为“氧化的 Mn(II)”。

1.3 M14 产生的生物锰氧化物吸附 Au(III) 的硫

将 M14 菌体接种于含 5 mmol/L Mn(II) 的 K 培养基, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养 10 d, 培养基总量为 3 000 mL, 待培养基中有棕黑色沉淀生成后, 以 8 000 r/min 高速离心培养物, 去掉上清, 将沉淀在 -56 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻干燥、研磨、过孔径 0.150 μm 筛。将 1.87 g 的生物锰氧化物加入到装有 100 mL 双蒸水的三角瓶中, 包上黑色塑料, 待摇匀后加入 200 μL 100 mmol/L 的氯金酸, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中, 定时取样。每次取出 3 mL 悬浮液, 过滤, 滤液置于 5 mL 离心管中, 用火焰原子吸收分光光度计测定 Au(III) 浓度。

1.4 M14 产生的生物锰氧化物吸附 Au(III) 的动力学研究

在溶液中, 固体吸附剂吸附金属离子的动力学曲线常常用伪一级反应动力学方程和伪二级反应动力学方程描述^[11], 我们将生物锰氧化物和商业二氧化锰对金的吸附过程用动力学方程进行拟合。用统计分析软件 R 软件拟合伪一级和伪二级反应动力学非线性方程。

伪一级反应动力学曲线满足方程:

$$q_t = q_e (1 - e^{-k_1 t})$$

其中, q_e 为反应达到平衡时的最大吸附量, mg/g; q_t 为 t 时刻的吸附量, mg/g; k_1 为伪一级反应动力学常数。

伪二级反应动力学曲线满足方程:

$$q_t = k_2 q_e^2 t / (1 + k_2 q_e t)$$

其中 q_e 为反应达到平衡时的最大吸附量, mg/g; q_t 为 t 时刻的吸附量, mg/g; k_2 为伪二级反应动力学常数。

1.5 M14 生物锰氧化物吸附金后的解吸

利用 M14 的生物锰氧化物对初始金离子浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液进行较完全的吸附。由于过酸过碱的环境均不利于硫脲的稳定存在, 且硫酸离子对 $\text{SO}_4^{2-} / \text{SO}_2$ 电位 (0.2 V) 低于硫脲 $\text{SCN}_2\text{H}_2 / (\text{SCN}_2\text{H}_3)_2$ 的电位 (0.42 V), 因此, SO_4^{2-} 不具有氧化性, 更有利于硫脲的稳定^[12]。先用硫酸调节 pH 值至 6.0, 再加入 400 μL 硫脲 (0.5 mol/L) 至 100 mL 吸附液中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床内进行反应, 2 h 后取出, 取样 1 mL。用火焰原子吸收分光光度计在金的空心阴极灯照射的条件下检测上清的吸光值, 利用标准加入法^[13] 分析数据, 求得解吸后上清的金离子浓度。

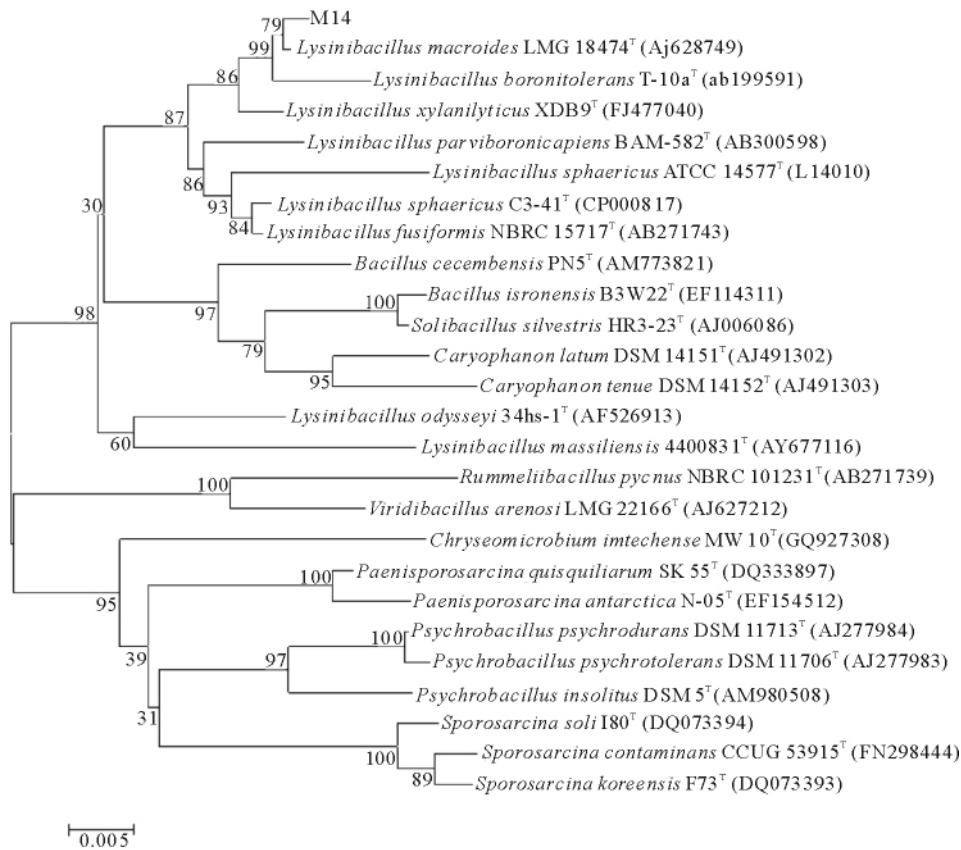
2 结果与分析

2.1 锰氧化细菌 M14 的鉴定

M14 菌体短杆状, 为革兰氏阳性菌, 适宜生长温度 28 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$, 适宜 pH 7.0 ~ 7.5, 在不含 MnCl_2 的 K 固体培养基上, 菌落成圆形、乳白色、凸起、表面湿润、边缘不整齐。在含 0.3 mmol/L 的 MnCl_2 K 培养基上, 菌落表面为棕褐色。将得到的 1 395 bp 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 文库中已有序列进行比对 (图 1), 初步确定该菌属于赖氨酸芽孢杆菌属, 命名为 *Lysinibacillus* sp. M14。

2.2 菌株 M14 锰氧化效率的分析

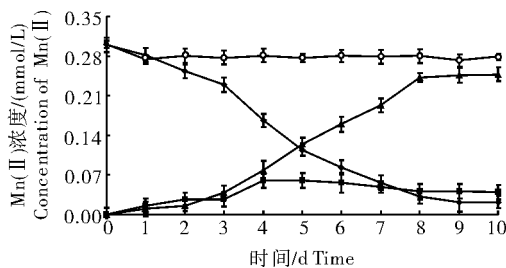
在 M14 菌对 Mn(II) 的氧化去除试验中, 选择的 Mn(II) 初始浓度为 30 mmol/L。图 2 为 M14 菌氧化去除 Mn(II) 的曲线图, 可以看到, M14 菌株对锰的去除率随着时间的推移不断加大, 尤其是在 3 ~ 7 d 时, 去除速率最快, 溶液中剩余的 Mn(II) 不断减少, 但“氧化的 Mn(II)”却不断增加, 而吸附的 Mn(II) 并没有大幅度增加, 说明绝大部分的 Mn(II) 被氧化了, 在 10 d 时, M14 菌氧化效率达到最高, 约为 82.7%。可能是由于这期间菌株开始氧化溶液中的 Mn(II), 产生锰氧化物, 在 10 d 时, “剩余的 Mn(II)”浓度达到最低, 去除率达到 92.62%。反应开始就有 Mn(II) 被吸附在菌体或锰氧化物表面, 5 d 前呈不断增大趋势, 但 5 d 后则有所降低, 可能是有部分被吸附的 Mn(II) 被氧化, 最终, “吸附的 Mn(II)”浓度约为 0.04 mmol/L。



分支旁的数字为 bootstrap 1 000 次的置信度 (%) ; 括号内为 GenBank 序列登录号。Numbers near the branches are bootstrap probability values (%) with 1 000 replicates; Numbers in parentheses represent the accession number of each strain in the GenBank.

图 1 锰氧化菌 *Lysinibacillus* sp. M14 的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 1 A phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *Lysinibacillus* sp. M14 and its relatives in the GenBank



◆ Mn(II) 去除曲线 Mn(II) -removal curves; Mn(II) 吸附曲线 Mn(II) -adsorption curves; ▲ Mn(II) 氧化曲线 Mn(II) -oxidation curves; ○ 没有加 Mn(II) 的菌体培养对照 Bacterial controls without Mn(II) .

图 2 M14 菌对 Mn(II) 的锰氧化、去除曲线

Fig. 2 Oxidation and removal curves of Mn(II) by the strain M14

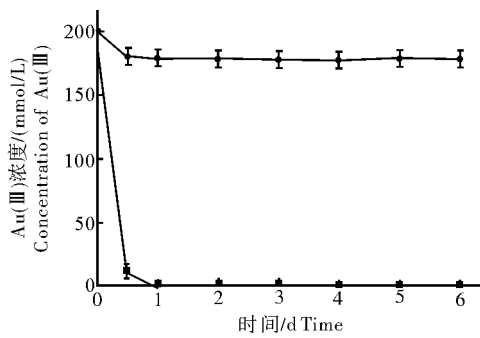
2.3 M14 菌产生的生物锰氧化物吸附 Au(III) 的速率

M14 菌生成的生物锰氧化物收集、预处理后对 Au(III) 的吸附见图 3。在含金溶液中没有添加任何生物锰氧化物 ,Au(III) 的初始浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$,6 h 内溶液中 Au(III) 的浓度始终处于较稳定状

态 ,没有明显的降低。加生物锰氧化物后 ,0.5 h 内 Au(III) 吸附量快速上升 ,1 h 后生物锰氧化物对 Au(III) 的吸附达到平衡 ,吸附效率接近 100% (图 3)。M14 的细胞扫描电镜图(图 4)显示 ,M14 细胞成短杆状 ,长约 0.5 ~ 1.0 μm ,宽约 0.5 μm 。加 Mn(II) 培养后 ,生成的生物锰氧化物包裹着 M14 菌体 ,长约 0.8 ~ 1.5 μm ,宽约 0.5 ~ 0.8 μm ,无明显层状结构。吸附了 As(III) 后 ,可以看出生物锰氧化物的表面变得不光滑 ,边缘呈不规则的粗糙结构形态。

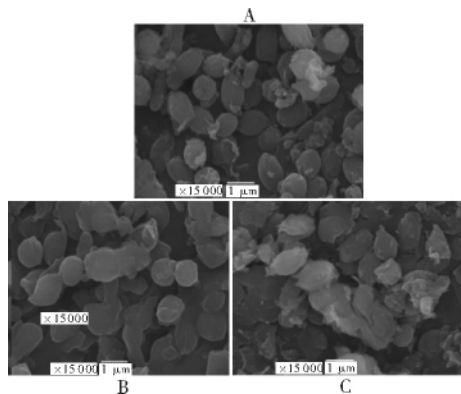
2.4 M14 菌产生物锰氧化物吸附 Au(III) 的动力学研究

采用 origin 软件 ,利用伪一级和伪二级反应动力学方程来拟合 M14 菌产生的生物锰氧化物吸附 Au(III) 的动力学过程 ,其结果如图 5 所示。可以看出 ,伪一级反应动力学方程模型 ($k_1 = 2.6 \times 10^{-4}$, $R^2 = 0.999$) 和伪二级模型 ($k_2 = 4.3 \times 10^{-3}$, $R^2 = 0.998$) 上的各反应点均在曲线上 ,2 个反应动力学方程的 R^2 值均接近 1.0 ,都能描述其动力学特征 ,



■加入生物锰氧化物后溶液中 Au(III) 浓度的变化曲线 Au(III) remained in the solution; ● 不加生物锰氧化物空白对照 Controls without the addition of the biogenic manganese oxides.

图 3 M14 产生的生物锰氧化物对 Au(III) 的吸附曲线
Fig. 3 Au(III) adsorption curves using the biogenic manganese oxides



A: M14 细胞 Cells of M14; B: 被生物锰氧化物包裹的 M14 细胞 The cells with the coated biogenic Mn oxides; C: 吸附了金后的生物锰氧化物 The biogenic Mn oxides adsorbed Au.

图 4 M14 扫描电镜观察结果
Fig. 4 SEM images of cells of M14

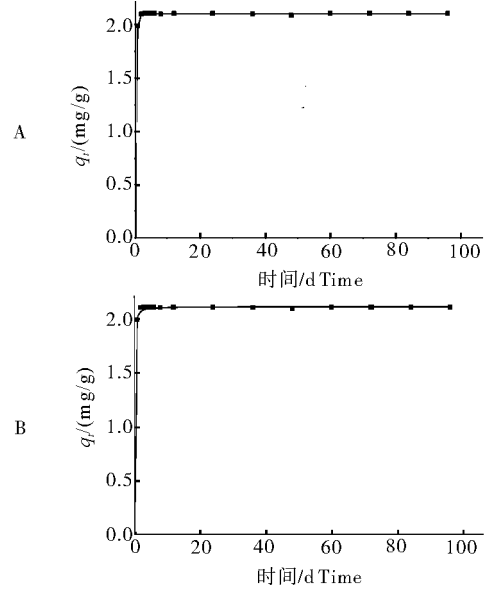
但伪一级反应动力学方程拟合较伪二级动力学反应动力学方程拟合中 k 更小, R^2 更大, 说明伪一级反应动力学方程对生物锰氧化物吸附 Au(III) 的过程拟合效果好于伪二级。

2.5 生物锰氧化物吸附的金解吸

利用硫脲解吸后的 Au 含量用 C_x 表示, Au(III) 母液的浓度用 C_0 表示。分别向其中加入不同体积的 Au(III) 母液得到梯度浓度 C_x 、 C_x+C_0 、 C_x+2C_0 、 C_x+3C_0 、 C_x+4C_0 、 C_x+5C_0 。取 1.5 mL 稀释至 10 mL, 用火焰原子分光光度计测定其中 Au 的含量, 结果见图 6。可求得解吸后溶液中含 Au 浓度约为 43.6 $\mu\text{mol/L}$, 解吸率约为 87.2%。

3 讨论

研究结果表明, 菌株 *Lysinibacillus* sp. M14 具



A: 伪一级反应动力学模型 Pseudo-first order reaction kinetics mode; B: 伪二级反应动力学模型 Pseudo-second order reaction kinetics model.

图 5 生物锰氧化物吸附 Au(III) 过程的动力学模型拟合
Fig. 5 Adsorption of Au(III) fitting by different kind of dynamic models

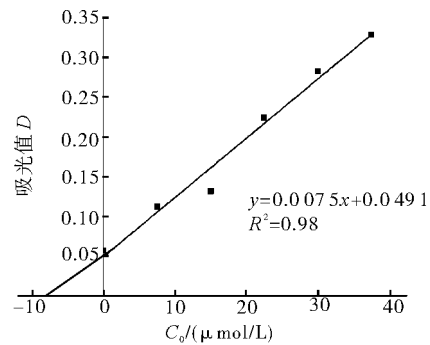


图 6 标准加入曲线

Fig. 6 Transformation of standard addition curve 有很强的氧化 Mn(II) 的能力。氧化产生的生物锰氧化物可以吸附和解析溶液中的金离子。M14 菌产生的生物锰氧化物附着于菌体表面呈不规则结构, 为高活性锰氧化物, 在 Au(III) 吸附试验中展现了很高的效率, 为含金废液中金的提取提供了新的尝试。由于本研究的生物锰氧化物收集后未经过纯化处理, 直接用于吸附金离子的试验中, 因此生物体、部分杂质与生物锰氧化物的紧密附着占据了一定的吸附位点, 可能部分影响了该试验中生物锰氧化物对 Au(III) 的吸附效果。对于金的解吸, 利用硫脲与金发生络合反应从而解吸金取得了较好的结果, 但前期在 pH 高于 6 时, 硫脲解吸金的过程中可明显观察到溶液颜色由灰黑色变为乳白色。因此该解

吸过程的最佳 pH 值为 6, 避免了沉淀的生成。虽然解吸率较高, 但未能达到 100%, 可能是部分吸附过程中产生的化学键能强于络合反应的键能, 使得部分 Au(III) 离子不能洗脱下来。若需进一步得到单质金, 可尝试加入锌、铁等进行置换反应。本研究结果在净化和回收采矿等含金废水方面具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] RAO M M, RAMESH A, RAO G P C, et al. Removal of copper and cadmium from the aqueous solutions by activated carbon derived from ceiba pentandra hulls [J]. *J Hazard Mater*, 2006, 129: 123-129.
- [2] DINIZ C V, DOYLE F M, CIMINELLI V S T. Effect of pH on the adsorption of selected heavy metal ions from concentrated chloride solutions by the chelating resin dowex M-4195 [J]. *Sep Sci Technol* 2002, 37: 3169-3185.
- [3] CHENG F, ZHANG Z M, GU G B. The research of Au (I) extraction from thiourea leaching solution with petroleum sulfoxide [J]. *Rare Metals*, 1994, 18(3): 179-182.
- [4] TANI Y, OHASHI M, MIYATA N, et al. Sorption of Co(II), Ni(II) and Zn(II) ions on biogenic manganese oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2 [J]. *J Environ Sci Health A*, 2004, 39: 2641-2660.
- [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 [J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 1-6.
- [6] 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. strain Mn32 [J]. *Microbiology*, 2009, 155(6): 1989-1996.
- [7] TEBO B M, BARGAR J R, CLEMENT B G, et al. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation [J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 2004, 32: 287-328.
- [8] LIAO S, ZHOU J, WANG H, et al. Arsenite oxidation using biogenic manganese oxides produced by a deep-sea manganese-oxidizing bacterium, *Marinobacter* sp. Mn17-9 [J]. *Geomicrobiol J* 2013, 30: 150-159.
- [9] VAN-WAASBERGEN L G, HILDEBRAND M, TEBO B M. Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1 [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(12): 3517-3530.
- [10] 赵萍, 邹正中, 王革娇. 1 株来自陕西盐湖的极端嗜盐古菌的分离及鉴定 [J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(5): 573-576.
- [11] GHASSABZADEH H, MOHADESPOUR A, TORAB-MOSTAEDI M, et al. Adsorption of Ag, Cu and Hg from aqueous solutions using expanded perlite [J]. *J Haz Mater* 2010, 177: 950-955.
- [12] 刘约权, 李敬慈, 王志, 等. 现代仪器分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 53-54.
- [13] 吴骏, 陈亮, 邱丽娟, 等. 废电路板硫脲提金研究 [J]. *分析与环保* 2008, 29(6): 55-58.

Adsorption and recovery of gold ion using biogenic Mn oxides produced by *Lysinibacillus* sp. M14

WANG Hui¹ PEI Yuan-jun¹ XIONG Dan-dan¹ LIAO Shui-jiao² WANG Ge-jiao¹

1. College of Life Science and Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Strain M14 was isolated from manganese polluted soil and identified as *Lysinibacillus* sp. This strain was able to oxidize Mn(II) to biogenic Mn oxide pellets (major in the form of Mn(IV)). The adsorption and desorption analysis of gold ion Au(III) were conducted using the biogenic Mn oxides. Results showed that the biogenic Mn oxides could successfully remove and recover the precious gold ion. This strain has been stored in China Center for Type Culture Collection (CCTCC NO: M2012084). The results of current study will be valuable for the recycling of gold and bioremediation of gold-polluted wastes.

Key words manganese-oxidizing bacterium; biogenic Mn oxides; *Lysinibacillus*; adsorption of Au(III); desorption

(责任编辑: 张志钰)