



# 一株台湾红酵母(*Rhodotorula taiwanensis*)的鉴定及其除 Mn(II)性能研究

贺笑<sup>1,2,3</sup>, 岳正波<sup>1</sup>, 尹家顺<sup>1</sup>, 王绍平<sup>2</sup>, 刘文胜<sup>3</sup>, 张先昂<sup>4</sup>, 揣新<sup>2</sup>, 王进<sup>1\*</sup>

1 合肥工业大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009

2 安徽马钢矿业资源集团南山矿业有限公司, 安徽 马鞍山 243000

3 安徽马钢矿业资源集团有限公司, 安徽 马鞍山 243000

4 安徽马钢矿业资源集团生态修复科技分公司, 安徽 马鞍山 243000

贺笑, 岳正波, 尹家顺, 王绍平, 刘文胜, 张先昂, 揣新, 王进. 一株台湾红酵母(*Rhodotorula taiwanensis*)的鉴定及其除 Mn(II)性能研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 2104-2114.

HE Xiao, YUE Zhengbo, YIN Jiashun, WANG Shaoping, LIU Wensheng, ZHANG Xian'ang, CHUAI Xin, WANG Jin. Identification of a *Rhodotorula taiwanensis* strain capable of removing Mn(II)[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 2104-2114.

**摘要:** 【目的】探究一株红酵母对 Mn(II)的去除效率及其作用机制。【方法】从酸性矿山废水中分离出一株耐酸酵母菌,通过形态和 26S rRNA 基因测序对菌种进行鉴定,研究不同 pH 和 Mn(II)浓度对该菌除 Mn(II)效果的影响。采用扫描电镜、X 射线衍射分析和 X 射线光电子能谱仪进行产物表征。【结果】分离得到的酵母菌经鉴定为台湾红酵母(*Rhodotorula taiwanensis*),其在 pH 2.0、2 000 mg/L Mn(II)条件下仍能生长较好。在初始 pH 6.0、Mn(II) 300 mg/L 条件下培养 144 h 后,对 Mn(II)的去除率能达到 98.52%;然而较高浓度的 Mn(II) ( $\geq 500$  mg/L)会对细胞产生毒性,从而降低去除效果。*R. taiwanensis* MF4 在去除 Mn(II)的过程中可以将 Mn(II)氧化成锰氧化物(主要为无定型的 MnO<sub>2</sub>、Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、MnO),形成层状物质在细胞表面积累,而且能产生碱度,提升环境 pH 值,最高可达 8.4 [初始 pH 7.0, Mn(II) 100 mg/L, 144 h]。【结论】*R. taiwanensis* MF4 具有耐受低 pH 和高浓度 Mn(II)、有效去除 Mn(II)以及产碱的作用,研究结果对酸性矿山废水修复与治理的末端工艺设计具有参考价值。

**关键词:** 锰离子; 红酵母; 除锰机制; 产碱; 酸性矿山废水

资助项目: 国家自然科学基金(U20A20325); 安徽省重点研究与开发计划(2022107020015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U20A20325) and the Key Research and Development Plan of Anhui Province (2022107020015).

\*Corresponding author. E-mail: sophiawj@hfut.edu.cn

Received: 2023-10-08; Accepted: 2024-02-27; Published online: 2024-02-29

# Identification of a *Rhodotorula taiwanensis* strain capable of removing Mn(II)

HE Xiao<sup>1,2,3</sup>, YUE Zhengbo<sup>1</sup>, YIN Jiashun<sup>1</sup>, WANG Shaoping<sup>2</sup>, LIU Wensheng<sup>3</sup>, ZHANG Xian'ang<sup>4</sup>, CHUAI Xin<sup>2</sup>, WANG Jin<sup>1\*</sup>

1 School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China

2 Anhui Masteel Mining Resources Group, Nanshan Mining Co., Ltd., Ma'anshan 243000, Anhui, China

3 Anhui Masteel Mining Resources Group Co., Ltd., Ma'anshan 243000, Anhui, China

4 Ecological Restoration Technology Branch of Anhui Masteel Mining Resources Group Co., Ltd., Ma'anshan 243000, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the removal efficiency and mechanism by a strain of *Rhodotorula*. [Methods] The strain was identified based on the morphological characteristics and the phylogenetic tree based on 26S rRNA gene sequences. Then, the removal effect of the strain on Mn(II) was studied at different initial pH and Mn(II) concentrations. Finally, the products were characterized by scanning electron microscopy, X-ray diffraction analysis, and X-ray photoelectron spectroscopy. [Results] The isolate was identified as *Rhodotorula taiwanensis*, which could grow well at pH 2.0 and 2 000 mg/L Mn(II). The removal rate of Mn(II) by the strain reached 98.52% at the initial pH 6.0 and Mn(II) concentration of 300 mg/L after 144 h, while higher concentrations ( $\geq 500$  mg/L) of Mn(II) caused toxicity to the cells and weakened the removal effect. The strain could oxidize Mn(II) to manganese oxides (mainly amorphous MnO<sub>2</sub>, Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and MnO), which produced layered minerals accumulated on the cell surface. In addition, the process of removing Mn(II) by the strain increased the pH of the medium (initial pH 7.0, Mn(II) concentration of 100 mg/L) up to 8.4 after 144 h. [Conclusion] *R. taiwanensis* MF4 isolated in this study can tolerate low pH and high concentrations of Mn(II), remove Mn(II), and increase medium pH. The findings have a reference value for the end process design in the remediation and treatment of acid mine drainage.

**Keywords:** manganese ion; *Rhodotorula taiwanensis*; manganese removal mechanism; alkali production; acid mine drainage

在硫化矿物开采过程中,尾矿和弃土被堆积在露天场地,长期暴露于自然环境中,这些废弃物在空气、水和微生物的共同作用下形成了酸性矿山废水(acid mine drainage, AMD)。AMD具有低pH值,并含有大量金属离子,其中Mn(II)浓度一般在20–200 mg/L<sup>[1]</sup>,有些能达到500 mg/L<sup>[2-3]</sup>

甚至是1 000 mg/L以上<sup>[4]</sup>,再加上其特殊的化学性质使其治理难度较大<sup>[5]</sup>。首先,锰的化学中和处理方法需要较高的pH环境(pH>9.0),需要大量的碱性物质,导致处理成本高且易产生二次废物<sup>[6]</sup>;其次,水溶液中的其他金属离子会抑制Mn(II)的氧化速率<sup>[7]</sup>;再者,由于Mn(II)的硫化

物相具有较大的溶解度,使其相对于其他过渡金属更难去除<sup>[8]</sup>。

在自然环境中,微生物可以通过直接途径(酶促反应等)和间接途径(改变 pH 值、氧化还原电位等)对 Mn(II)进行氧化,该过程是控制环境中 Mn 氧化物形成和生物地球化学循环的主导因素<sup>[9]</sup>,其氧化反应速率比非生物过程高数个数量级,因此,微生物方法为废水中 Mn(II)的去除提供了新的选择,如利用细菌<sup>[10]</sup>、真菌<sup>[11]</sup>和藻类<sup>[1]</sup>等微生物实现生物脱锰。其中,酵母菌因其经济、安全和对金属离子吸附能力强等优势,具有较高的潜在应用价值<sup>[12]</sup>。

近年来,对酵母菌在 Mn(II)吸附及去除机制方面的研究逐渐深入,涉及多个酵母菌属种,不同种类的酵母对 Mn(II)的去除机制各异。研究发现,酵母细胞可以通过吸附、积累、氧化等方式对环境中的 Mn(II)进行去除<sup>[13]</sup>。酵母细胞壁中的甘露聚糖以及细胞表面蛋白质中游离的羧基、羟基、胺、磷酸盐和氢硫化物基团等均可结合金属离子,因此酵母菌是一种高效的生物吸附剂<sup>[14-15]</sup>。当金属离子穿过屏障进入细胞后,会在细胞中积累,一些酵母菌还会释放酶类物质(如多铜氧化酶、MCOs)将 Mn(II)氧化成 MnO<sub>x</sub><sup>[16]</sup>。已有报道发现,从植物中分离出的一种野生酵母 *Rhodotorula taiwanensis*,能够在低 pH 值(2.3)、高浓度汞铬化合物或 Al<sup>3+</sup> (200 mmol/L)存在的条件下生长,在极端酸性环境条件中可形成生物膜<sup>[17]</sup>。然而,关于 *R. taiwanensis* 对酸性废水中 Mn(II)的去除及其作用机制,目前仍缺乏深入的研究。这些研究表明该种在酸性、金属含量高的废水修复中具有良好的应用前景。

微生物对金属离子的去除性能与其接触的微环境密切相关,包括溶液的初始 pH 值和金属离子浓度等因素。多数真菌对重金属富集的最适 pH 值为 5.0 或 6.0;当 pH 值大于 5.0 时,酿酒

酵母的生物吸附效果最佳<sup>[18]</sup>。除此之外,溶液中重金属的浓度会直接影响微生物的生长代谢及其对重金属的吸附效率<sup>[19]</sup>。因此,本研究以从安徽某矿山酸性废水坑湖中筛选出的 *R. taiwanensis* 为研究对象,考察环境 pH 和初始 Mn(II)浓度对其除锰效率的影响,结合产物形貌、物质形态与化学组成,揭示该菌株的除锰特性,从而为深入认识该菌株在酸性矿山废水中的生物修复作用提供研究基础和科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 酵母菌的富集和分离纯化

水样采自安徽省东部某矿山酸性坑湖,该坑湖 pH 值较低(3.0–3.8),锰浓度较高,最高可达 800 mg/L<sup>[20]</sup>。取其水样 50 mL,3 000 r/min 离心 5 min 后,取 1 mL 上清液接种至 50 mL 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose, YPD)中,于 28 °C、120 r/min 富集培养 72 h。对富集后的样品在孟加拉红固体培养基(RBA) [含 Mn(II) 300 mg/L, pH 5.0]上进行分离纯化,反复划线筛选,获得一株菌株记为菌株 MF4。

### 1.2 酵母菌的形态特征和菌种鉴定

#### 1.2.1 形态鉴定

分离纯化后的菌株 MF4 在高倍显微镜下进行观察,记录真菌颜色、大小和形状。

#### 1.2.2 分子生物学鉴定

利用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取 MF4 全基因组 DNA。利用通用引物对 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 扩增其 26S rRNA 基因序列片段(25 μL 体系)。PCR 扩增体系和程序同 Miao 等<sup>[21]</sup>。扩增后采用凝胶电泳法检测扩增结果并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

测序结果提交至 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对分析, 下载亲缘关系相近种群的 26S rRNA 基因序列片段, 在 MEGA (version 6)中比对校正后, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 确定菌株 MF4 基于分子生物学的分类地位。

### 1.3 酵母菌的耐酸、耐锰特性

为了研究酵母菌的耐酸、耐锰特性, 分别将 0.082 g/L 生物量的酵母菌接种到不同 pH (2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0)和不同 Mn(II)浓度(50、100、300、500、800、1 000 和 2 000 mg/L)的培养基中, 于 30 °C、120 r/min 培养 144 h 后取样称量酵母菌干重。

### 1.4 不同初始条件下酵母菌除锰行为研究

为了评估初始 pH 对酵母菌除锰效率的影响, 将 0.082 g/L 生物量的酵母接种到含有 50 mg/L<sup>[15]</sup> Mn(II) (MnSO<sub>4</sub>)培养基中, 初始 pH 设置为 4.0、5.0、5.5、6.0、7.0, 每个实验条件设置不加菌空白对照, 于 30 °C、120 r/min 培养 144 h, 每 24 h 取样测定培养基 pH 值, 原子吸收光谱法分析上清液中 Mn(II)浓度。

在研究初始 Mn(II)浓度对酵母菌除锰效率影响的研究中, 选择在 50 mg/L Mn(II)溶液中去除效果较好的 pH 条件, 根据酵母菌的耐受特性和研究应用场景, Mn(II)初始浓度分别设置为 50、100、300、500、800 mg/L, 每个实验条件

设置不加菌空白对照, 于 30 °C、120 r/min 培养 144 h 后取样, 测定培养基 pH 值, 原子吸收光谱法分析上清液中 Mn(II)浓度。

### 1.5 产物表征

将培养完成后的菌液离心、洗涤后冷冻干燥, 并研磨获得固体粉末。固体产物采用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)分析细胞形貌特征; 采用 X 射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectrometer, XPS) (ThermoFisher Scientific)分析锰价态组成; X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析的样品在  $2\theta$  范围从 5°到 70°范围内扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 MF4 的形态特征及鉴定

菌株 MF4 的形态多呈球形、卵圆形, 一般为 1–5  $\mu\text{m}$  或 5–20  $\mu\text{m}$ , 无鞭毛, 不能游动(图 1A), 菌落大而厚, 菌落表面光滑、湿润、黏稠, 容易挑起, 菌落质地均匀, 红色, 正反面、边缘及中央部位的颜色均一(图 1B)。

在实验过程中, 随着培养时间的延长, 对照组[未添加 Mn(II)]培养基为橙红色(图 1C), 而实验组[添加 Mn(II)]培养基的颜色呈现棕色(图 1D)。

26S rRNA 基因序列测序比对结果如图 2 所示, 菌株 MF4 隶属于红酵母属 *Rhodotorula*, 与

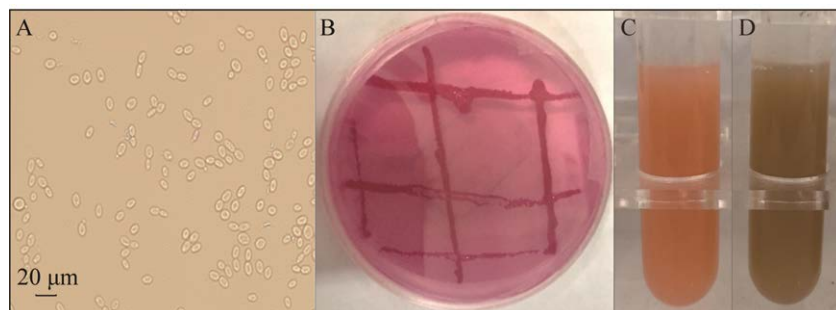


图 1 菌株 MF4 显微形态图(A)及其在孟加拉红固体培养基(B)、YPD 培养基(C)、含 Mn(II) (300 mg/L) YPD 培养基(D)中形态

Figure 1 Microphotograph of strain MF4 (A) and its morphology in RBA (B), YPD (C) and Mn(II) (300 mg/L) YPD medium (D).

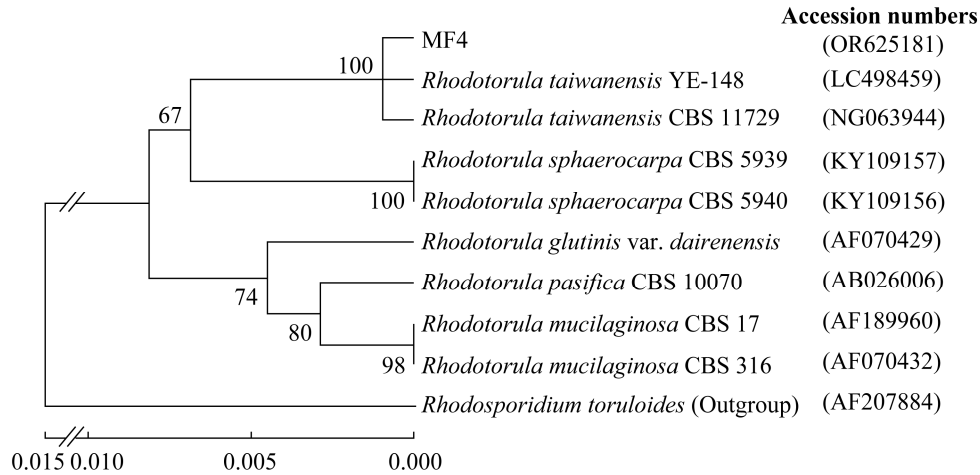


图 2 基于 26S rRNA 基因序列片段构建的 *Rhodotorula* 属系统发育树(Neighbor-joining)

Figure 2 Phylogenetic tree by neighbor-joining based on the 26S rRNA gene sequences (each accession number shows on the right) in *Rhodotorula*. Numbers above each branch indicate neighbor-joining bootstrap supports. The scale below the tree indicates genetic distance.

*R. taiwanensis* 种菌株(相似性为 100%)聚为一支, MF4 应初步鉴定为 *R. taiwanensis*, 命名为 *Rhodotorula taiwanensis* MF4。

## 2.2 *R. taiwanensis* MF4 耐酸、耐锰特性

不同 pH 条件下 *R. taiwanensis* MF4 的生长情况如图 3A 所示, 在较宽的 pH 范围内(pH 2.0–7.0) *R. taiwanensis* MF4 均可生长, pH 2.0 条

件下生物量虽然显著低于 pH 3.0–7.0 条件, 但是仍然生长较好, 7 d 后的生物量能达到 (7.38±0.24) g/L。pH≥3.0 条件下, 各组之间无显著差异, 生物量能达到(8.70±0.20) g/L。不同 Mn(II)浓度条件下 *R. taiwanensis* MF4 的生长情况如图 3B 所示, 培养 7 d 后, 红酵母均能较好地生长, 当 Mn(II)浓度为 100 mg/L 时生长最好,

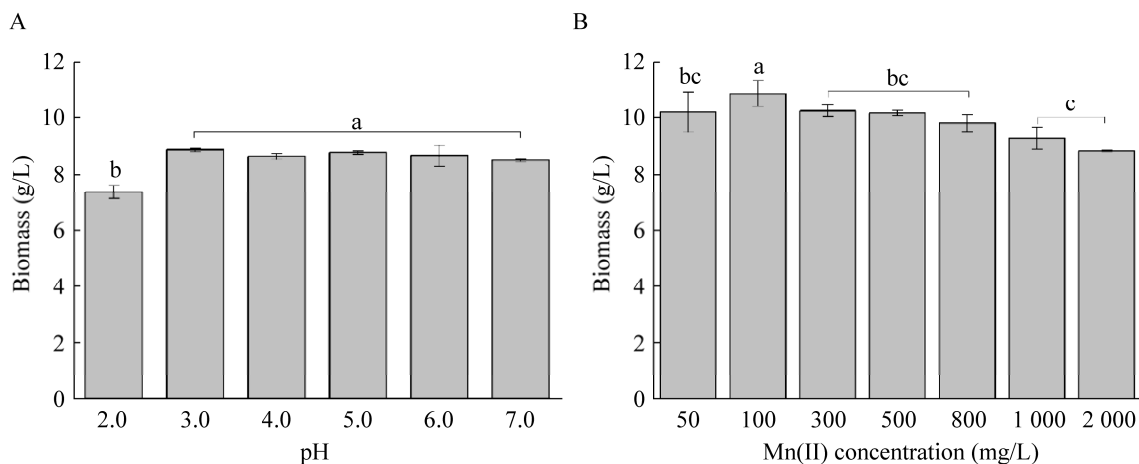


图 3 *Rhodotorula taiwanensis* MF4 在不同 pH (A)和 Mn(II)浓度(B)条件下的生长情况

Figure 3 Growth of *Rhodotorula taiwanensis* MF4 at different pH (A) and Mn(II) concentrations (B). Error bars in this figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ( $a>b>c$ ,  $P<0.05$ , Tukey's test).

7 d 后的生物量为(10.91±0.47) g/L; 当 Mn(II)浓度为 300–800 mg/L 时, 生物量为(10.11±0.27) g/L, 与 50 mg/L 时(10.25±0.72) g/L 的生物量之间无显著差异。当 Mn(II)浓度达到 1 000 mg/L 以后, 生物量显著降低 [(9.31±0.38) g/L,  $P<0.01$ ], Mn(II)浓度达到 2 000 mg/L 时的生物量仍然能达到较好条件下的 80% [(8.90±0.03) g/L]。结果表明红酵母是一株耐酸、耐 Mn(II)真菌, pH≥3.0 的条件更适于该酵母生长, 即使 Mn(II)浓度达到 2 000 mg/L 也能良好生长。

## 2.3 *R. taiwanensis* MF4 除锰行为特征

### 2.3.1 初始 pH 对 *R. taiwanensis* MF4 除锰效率的影响

初始 pH 对 *R. taiwanensis* MF4 除锰效率的影响研究结果如图 4 所示, 在初始 50 mg/L Mn(II)条件下, 初始 pH 值较低时(4.0 或 5.0), *R. taiwanensis* MF4 对 Mn(II)的去除作用不明显。当初始 pH≥5.5 时, 培养 48 h 后, 培养基的 pH 呈现上升趋势, 同时 Mn(II)的去除效率也在增长。当培养基 pH 值增长到 6.6 时(96 h, 初始 pH 7.0 条件下), Mn(II)的去除效率显著提高至 (64.16±7.66)%, 而在初始 pH 值为 5.5 和 6.0 的

条件下, 此时的培养基 pH 值分别为 6.0 和 6.2, Mn(II)的去除效率并没有显著提高[初始 pH 5.5 的去除率为(18.16±2.54)%, 初始 pH 6.0 的去除率为(16.80±2.93)%]。培养 120 h 后, 培养基 pH 值分别达到 7.2、7.5 和 7.4 (初始 pH 分别为 5.5、6.0 和 7.0), Mn(II)的去除效率显著提高到 (89.46±1.42)%、(88.97±0.40)%和(90.91±1.36)%, 培养后期, 锰的最大去除率能达到 93.61% (初始 pH 7.0)。空白无菌对照组的 pH 在不同时期均无明显变化, 对照组中未观察到 Mn(II)去除。

本研究中, 初始 pH 较低的条件(4.0 或 5.0), 去除效果不明显的原因可能为: 首先, 大量氢离子的存在, 使细胞表面带正电荷, 导致官能团与 Mn(II)产生静电排斥作用<sup>[22]</sup>; 其次, 氢离子与 Mn(II)同时竞争与细胞表面官能团结合的机会, 使细胞对 Mn(II)的吸附作用较弱; 再者, 已有研究表明酵母菌对 Mn(II)的去除作用与自身的代谢有关<sup>[23]</sup>, 在环境 pH 较低的情况下, 细胞代谢功能较差, 从而使生物去除作用较弱<sup>[24]</sup>, 当环境 pH 能够保持在 7.0–7.5 时, 锰的生物氧化作用更容易进行<sup>[25]</sup>。本研究中, 培养 120 h 后, 培养基 pH 分别达到 7.2、7.5 和 7.4, 去除效率显著提高(图 4)。

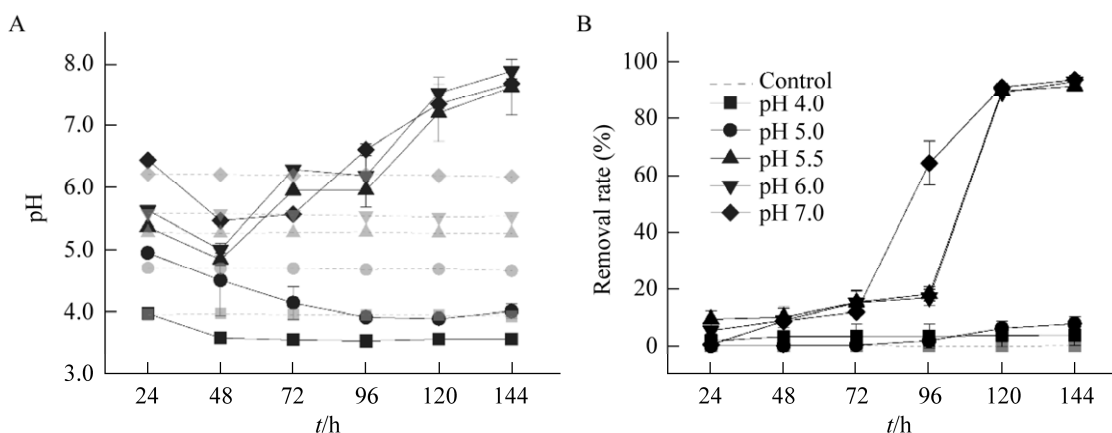


图 4 初始 Mn(II) 50 mg/L、不同初始 pH 条件下, 含 *Rhodotorula taiwanensis* MF4 的培养基 pH (A) 及 Mn(II) 去除率 (B) 的变化

Figure 4 The change of pH of medium (A) and the removal rate of Mn(II) (B) by *Rhodotorula taiwanensis* MF4 at 50 mg/L Mn(II) and different pH initially. Error bars in this figure represent standard deviation.

另一方面,即使在合适 pH 条件下( $\geq 5.5$ ), *R. taiwanensis* MF4 对 Mn(II) 的去除率在培养 96 h 后(初始 pH 7.0)才开始显著提高,表明 *R. taiwanensis* MF4 的吸附活性和氧化活性在生长过程中可能发挥着不同的作用<sup>[26]</sup>,接触时间的延长有利于 Mn(II) 的去除。在生长初期, *R. taiwanensis* MF4 未对环境作出反应,氧化活性低,只发生了少量的吸附作用,导致 Mn(II) 的去除率较低,当酵母细胞适应环境后,不断输送酶类物质参与 Mn(II) 氧化,从而提高了 Mn(II) 的去除效率<sup>[27]</sup>。本研究中,随着培养时间的延长, Mn(II) 去除率相比于红酵母属另一菌株 *R. mucilaginosa* 在同等条件下对 Mn(II) 去除效率高了近 9 倍<sup>[12]</sup>。以上结果表明 *R. taiwanensis* MF4 在初始 50 mg/L Mn(II)、初始 pH $\geq 5.5$  条件下,对 Mn(II) 具有较好的去除效果。

### 2.3.2 初始 Mn(II) 浓度对 *R. taiwanensis* MF4 除锰效率的影响

培养 144 h 后,在去除效果较好的初始 pH (pH $\geq 5.5$ ) 和不同初始 Mn(II) 浓度培养条件下,红酵母对 Mn(II) 的去除效率如图 5 所示。总体而言,该菌株对 Mn(II) 具有较好的耐受性和去除效率。当 Mn(II) 浓度 $\leq 300$  mg/L 时,该菌株在不同初始 pH (5.5、6.0、7.0) 条件下对 Mn(II) 的去除率无显著差异,均可超过 90.00%,最大值为 98.52% [初始 Mn(II) 300 mg/L, 初始 pH 6.0]。当初始 Mn(II) 浓度为 500 mg/L、初始 pH 7.0 条件下, *R. taiwanensis* MF4 对 Mn(II) 的去除效率 [(62.79 $\pm$ 0.91)%] 显著高于酸性条件下 [(8.73 $\pm$ 4.74)%,  $P < 0.05$ ]。当 Mn(II) 为 800 mg/L 时,该菌株在中性和酸性条件下的去除效果均较差 (<10%)。

如图 5 所示,初始 Mn(II) 浓度 $\leq 300$  mg/L 时,各组对 Mn(II) 的去除效果无显著差异。当 Mn(II) 初始浓度从 300 mg/L 分别升高至 500 mg/L 和 800 mg/L 时, *R. taiwanensis* MF4 对 Mn(II) 的去

除率从 (94.72 $\pm$ 2.55)% 分别降低至 (26.75 $\pm$ 28.15)% ( $P < 0.05$ ) 和 (5.42 $\pm$ 3.41)% ( $P < 0.05$ ),这与芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) HM-5 对锰的去除行为类似<sup>[28]</sup>。结果表明, *R. taiwanensis* MF4 对低浓度 Mn(II) (<300 mg/L) 具有较好的耐受性和较高的去除率,而高浓度的 Mn(II) 会对细胞产生毒性,进而抑制了对 Mn(II) 的去除作用。

本研究培养基终点的 pH 如图 6 所示,除初始 Mn(II) 浓度为 800 mg/L 组,其余各组培养终点的 pH 值均高于初始值。当初始 Mn(II) 浓度为 50–300 mg/L 时,初始 pH 值对培养终点的 pH 值无显著影响(均值 7.8 $\pm$ 0.3),最高可达到 8.4 [初始 pH 7.0, Mn(II) 100 mg/L], 最高增长率为 52% [初始 pH 5.5, Mn(II) 100 mg/L, 终点 pH 8.4], 显著高于初始 Mn(II) 浓度为 500 mg/L (均值 6.7 $\pm$ 1.3) 和 800 mg/L (均值 4.7 $\pm$ 0.6) 培养基的 pH 值。结果表明, *R. taiwanensis* MF4 在积累 Mn(II) 的过程中会产生碱度,提升环境 pH 值,而较高

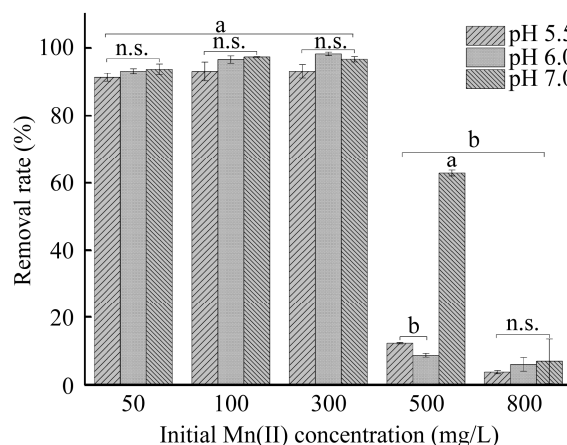


图 5 不同初始 Mn(II) 浓度对 *Rhodotorula taiwanensis* MF4 除锰效果的影响

Figure 5 The effects of manganese removal on different initial Mn(II) concentrations by *Rhodotorula taiwanensis* MF4. Error bars in this figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ( $a > b$ ,  $P < 0.05$ , Tukey's test). n.s.: No significance.

的 Mn(II)浓度会影响酵母菌的代谢活动从而使产碱能力下降。Amorim 等<sup>[23]</sup>在研究 *Meyerozyma* 属 2 个菌株对锰的耐受性和吸附实验中观察到了酵母菌产碱的现象。酵母在生长前期,会产生有机酸,使培养基 pH 值降低(图 4),发酵后期, pH 值的升高可能与培养基中有机物的组成[碳氮比(C/N)]有关<sup>[29]</sup>。

#### 2.4 *R. taiwanensis* MF4 生物脱锰机制初探

如图 5 所示,初始 Mn(II)<300 mg/L 时,酵母菌 *R. taiwanensis* MF4 对锰具有较好的去除效果,且培养后期含 Mn(II)培养基的颜色变成棕色(图 1D),表明 *R. taiwanensis* MF4 在去除 Mn(II)的过程中可能产生了生物氧化作用,形成了生物锰氧化物<sup>[30]</sup>。利用扫描电镜(SEM)观察 300 mg/L Mn(II)试验组的固相产物,如图 7A 所示,细胞表面形成层状物质,类似于在对其他细菌和真菌的生物氧化固相产物中观察到的层状锰氧化物<sup>[31]</sup>。

进一步通过 XRD 衍射分析初步考察产物表面物质组成。真菌锰氧化物通常包含层状结

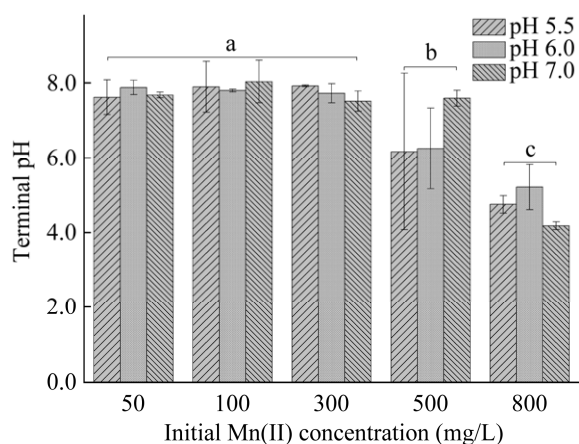


图 6 不同初始 Mn(II)浓度对培养基终点 pH 的影响  
Figure 6 The effects of ultimate pH on different initial Mn(II) concentrations. Error bars in this figure represent standard deviation and different letters indicate significant difference (a>b>c,  $P<0.05$ , Tukey's test).

构的锰酸盐  $\delta$ -MnO<sub>2</sub>、 $\alpha$ -MnOOH 和一些固体伴生锰(II)<sup>[8]</sup>。不同种类的 Mn(II)氧化真菌会产生结构多样性的矿物质。由于真菌源性锰氧化物晶型较差,在图谱中的衍射峰均不显著(图 7B),在  $2\theta$  处, 22.4°、34.5°、37.0°、38.4°、40.8°、42.4°、56.0°、57.6°和 65.7°的衍射峰与 MnO<sub>2</sub> (JCPDS: 12-0713)的晶相对应。在  $2\theta$  为 23.2°、26.8°、33.0°、35.7°、38.2°、40.7°、43.0°、49.5°、53.5°、64.2°和 65.7°处的峰分别对应于 Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (JCPDS: 02-0902)的(211)、(220)、(222)、(321)、(400)、(411)、(420)、(431)、(521)、(541)和(622)晶格面。在  $2\theta$  为 34.9°、40.5°、58.7°处的衍射峰对应于 MnO (JCPDS: 06-0592)的(111)、(200)、(220)晶格面。因此 XRD 图谱比对氧化物中存在的物质主要有 MnO<sub>2</sub>、Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和少量的 MnO。

XPS 光谱分析结果表明(图 7C、7D), C、N、O 和 Mn 是酵母细胞表面的主要元素,大量 O 和 Mn 的存在表明细胞表面有 MnO<sub>x</sub> 的沉积<sup>[12]</sup>,在 Mn 2p 高分辨率光谱中,在 642 eV 处的峰归属于 Mn 2p<sub>3/2</sub>,氧化产物为混价态锰化合物;在 640.81 eV 的峰归属于 Mn(II),其占比为 14.85%;在 641.88 eV 的峰归属于 Mn(III),其占比为 54.23%,在 643.40 eV 的峰归属于 Mn(IV),其占比为 30.92%,在 647.25 eV 处的峰是卫星峰。

以上表征结果表明 *R. taiwanensis* MF4 与锰氧化细菌类似<sup>[27]</sup>,能够氧化 Mn(II)形成锰氧化物沉积在细胞表面。这些锰氧化物具有较大的比表面积,通常与金属离子具有较高的亲和力<sup>[32]</sup>,可以通过共沉淀、吸附、氧化还原过程,在许多重金属污染物的迁移和转化过程中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。然而由于真菌对锰的氧化还原反应是复杂的,涉及多个过程,如通过细胞酶的活性<sup>[34]</sup>、



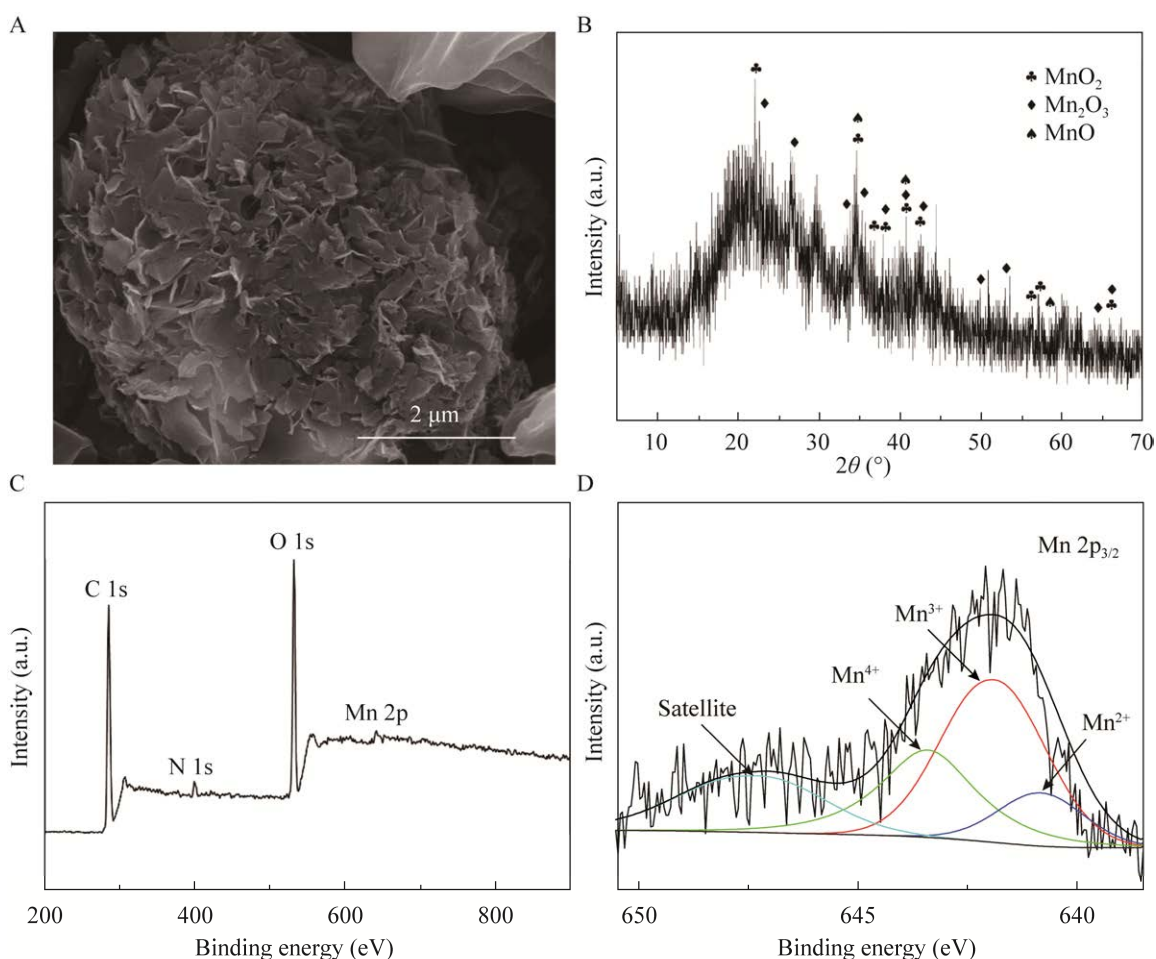


图 7 300 mg/L Mn(II)培养后细胞的 SEM 图(A)、XRD 结果(B)、XPS 光谱图(C)、Mn 2p<sub>3/2</sub> XPS 光谱图(D)

Figure 7 SEM images (A), XRD pattern (B), XPS wide survey (C), and Mn 2p<sub>3/2</sub> XPS spectra of the cells treated with 300 mg/L Mn(II) (D).

胞外电子<sup>[35]</sup>或者非酶蛋白(如 boxA)<sup>[36]</sup>均能参与氧化过程,所以目前仍不知道这种氧化作用是如何产生的,有待深入解析。

### 3 结论

本研究分离筛选出一株耐酸红酵母菌株 *R. taiwanensis* MF4, 该酵母对 Mn(II)具有较好去除效果, 在初始 pH 6.0、Mn(II) 300 mg/L 条件下, 对 Mn(II)的去除率能达到 98.52%。该酵母通过吸附和氧化的方式对溶液中的 Mn(II)进行去除, 将 Mn(II)氧化成锰氧化物(主要为无定型的

MnO<sub>2</sub>、Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、MnO), 形成层状物质在细胞表面积累, 同时产生碱性物质, 提高环境 pH, 最高可达 8.4。本研究结果表明 *R. taiwanensis* MF4 在去除酸性废水中的 Mn(II)、提高水环境 pH 方面具有潜在应用价值, 可以为酸性矿山废水的修复和治理工作提供参考。

### 参考文献

- [1] DU T, BOGUSH A, MASEK O, PURTON S, CAMPOS LC. Algae, biochar and bacteria for acid mine drainage (AMD) remediation: a review[J]. *Chemosphere*, 2022, 304: 135284.

- [2] WANG C, WANG J, HE X, CHUAI X, WANG S, YUE Z. Effective removal of Mn(II) from acidic wastewater using a novel acid tolerant fungi *Aspergillus* sp. MF1 via immobilization[J]. Journal of Hazardous Materials Advances, 2023, 10: 100301.
- [3] PAN X, YUE Z, SHE Z, HE X, WANG S, CHUAI X, WANG J. Eukaryotic community structure and interspecific interactions in a stratified acidic pit lake water in Anhui Province[J]. Microorganisms, 2023, 11(4): 979.
- [4] YAMAN NB, AYTAR ÇELIK P, MUTLU MB, ÇABUK A. A combinational analysis of acidophilic bacterial diversity of an iron-rich environment[J]. Geomicrobiology Journal, 2020, 37(10): 877-889.
- [5] 陈明珠, 张林义, 岳正波, 潘鑫, 王绍平, 李伟, 罗长海, 刘兵, 王进. 酸性矿山废水中锰氧化菌的分离鉴定及其对  $Mn^{2+}$  的去除作用[J]. 环境科学学报, 2022, 42(9): 30-39.
- CHEN MZ, ZHANG LY, YUE ZB, PAN X, WANG SP, LI W, LUO CH, LIU B, WANG J. Isolation and identification of manganese oxidizing bacteria from acid mine wastewater and its effect on the removal of  $Mn^{2+}$ [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2022, 42(9): 30-39 (in Chinese)
- [6] CHEN H, XIAO T, NING Z, LI Q, XIAO E, LIU Y, XIAO Q, LAN X, MA L, LU F. *In-situ* remediation of acid mine drainage from abandoned coal mine by filed pilot-scale passive treatment system: performance and response of microbial communities to low pH and elevated Fe[J]. Bioresource Technology, 2020, 317: 123985.
- [7] HALLBERG KB, JOHNSON DB. Biological manganese removal from acid mine drainage in constructed wetlands and prototype bioreactors[J]. Science of the Total Environment, 2005, 338(1/2): 115-124.
- [8] XU T, ROEPKE EW, FLYNN ED, ROSENFELD CE, BALGOOYEN S, GINDER-VOGEL M, SCHULER CJ, SANTELLI CM. Aqueous Co removal by mycogenic Mn oxides from simulated mining wastewaters[J]. Chemosphere, 2023, 327: 138467.
- [9] WANG Y, BAI Y, SU J, ALI A, GAO Z, HUANG T, CAO M, REN M. Advances in microbially mediated manganese redox cycling coupled with nitrogen removal in wastewater treatment: a critical review and bibliometric analysis[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 461: 141878.
- [10] AL-ABED SR, PINTO PX, MCKERNAN J, FELD-COOK E, LOMNICKI SM. Mechanisms and effectivity of sulfate reducing bioreactors using a chitinous substrate in treating mining influenced water[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 323: 270-277.
- [11] LIU S, GARCIA-PALACIOS P, TEDERSOO L, GUIRADO E, van der HEIJDEN MGA, WAGG C, CHEN D, WANG Q, WANG J, SINGH BK, DELGADO-BAQUERIZO M. Phylotype diversity within soil fungal functional groups drives ecosystem stability[J]. Nature Ecology and Evolution, 2022, 6: 900-909.
- [12] RUAS FAD, AMORIM SS, LEAO VA, GUERRA-SA R. *Rhodotorula mucilaginosa* isolated from the manganese mine water in Minas Gerais, Brazil: potential employment for bioremediation of contaminated water[J]. Water Air Soil Pollution, 2020, 231(10): 527.
- [13] FADEL M, HASSANEIN NM, ELSHAFEI MM, MOSTAFA AH, AHMED MA, KHATER HM. Biosorption of manganese from groundwater by biomass of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. HBRC Journal, 2019, 13(1): 106-113.
- [14] WANG M, XU Z, HUANG Y, DONG B. Static magnetic field enhances *Cladosporium* sp. XM01 growth and fungal Mn(II) oxidation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 437: 129332.
- [15] van NGUYEN P, THI HONG TRUONG H, PHAM TA, CONG T, LE T, THI NGUYEN KC. Removal of manganese and copper from aqueous solution by yeast *Papiliotrema huenov*[J]. Mycobiology, 2021, 49(5): 507-520.
- [16] HUANG Y, HUANGFU X, MA C, LIU Z. Sequestration and oxidation of heavy metals mediated by Mn(II) oxidizing microorganisms in the aquatic environment[J]. Chemosphere, 2023, 329: 138594.
- [17] TKAVC R, MATROSOVA VY, GRICHENKO OE, GOSTINCAR C, VOLPE RP, KLIMENKOVA P, GAIDAMAKOVA EK, ZHOU CE, STEWART BJ, LYMAN MG, MALFATTI SA, RUBINFELD B, COURTOT M, SINGH J, DALGARD CL, HAMILTON T, FREY KG, GUNDE-CIMERMAN N, DUGAN L, DALY MJ. Prospects for fungal bioremediation of acidic radioactive waste sites: characterization and genome sequence of *Rhodotorula taiwanensis* MD1149[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2528.
- [18] MAPOLELO M. Trace enrichment of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Talanta, 2004, 64(1): 39-47.
- [19] HUANG HM, ZHAO YL, XU ZG, DING Y, ZHANG W, WU L. Biosorption characteristics of a highly Mn(II)-resistant *Ralstonia pickettii* strain isolated from Mn ore[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0203285.
- [20] 张露, 邵锐, 潘鑫, 王绍平, 王广成, 李伟, 岳正波, 王进. 一株耐酸微藻的分离鉴定及其对锰离子胁迫

- 的生理响应[J]. 微生物学报, 2021, 61(6): 1371-1382.
- ZHANG L, SHAO R, PAN X, WANG SP, WANG GC, LI W, YUE ZB, WANG J. Isolation and identification of an acid-tolerant microalgae and its physiological response to manganese ion stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1371-1382 (in Chinese)
- [21] MIAO Z, TIAN X, LIANG W, HE Y, WANG G. Bioconversion of corncob hydrolysate into microbial lipid by an oleaginous yeast *Rhodotorula taiwanensis* AM2352 for biodiesel production[J]. *Renewable Energy*, 2020, 161: 91-97.
- [22] USLU G, TANYOL M. Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: effect of temperature[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2006, 135: 87-93.
- [23] AMORIM SS, RUAS FAD, BARBOZA NR, de OLIVEIRA NEVES VG, LEAO VA, GUERRA-SA R. Manganese (Mn<sup>2+</sup>) tolerance and biosorption by *Meyerozyma guilliermondii* and *Meyerozyma caribbica* strains[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2018, 6(4): 4538-4545.
- [24] PENG H, LI D, YE J, XU H, XIE W, ZHANG Y, WU M, XU L, LIANG Y, LIU W. Biosorption behavior of the *Ochrobactrum* MT180101 on ionic copper and chelate copper[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 235: 224-230.
- [25] BURGER MS, MERCER SS, SHUPE GD, GAGNON GA. Manganese removal during bench-scale biofiltration[J]. *Water Research*, 2008, 42(19): 4733-4742.
- [26] WANG M, XU Z, DONG B, ZENG Y, CHEN S, ZHANG Y, HUANG Y, PEI X. An efficient manganese-oxidizing fungus *Cladosporium halotolerans* strain XM01: Mn(II) oxidization and Cd adsorption behavior[J]. *Chemosphere*, 2022, 287(1): 132026.
- [27] LI D, LI R, DING Z, RUAN X, LUO J, CHEN J, ZHENG J, TANG J. 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.
- [28] XU ZG, DING Y, HUANG HM, WU L, ZHAO YL, YANG GY. Biosorption characteristics of Mn(II) by *Bacillus cereus* strain HM-5 isolated from soil contaminated by manganese ore[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2018, 28(1): 463-472.
- [29] MEISTER P, HERDA G, PETRISHCHEVA E, GIER S, DICKENS GR, BAUER C, LIU B. Microbial alkalinity production and silicate alteration in methane charged marine sediments: implications for porewater chemistry and diagenetic carbonate formation[J]. *Frontiers in Earth Science*, 2022, 9: 756591.
- [30] CALDERON-TOVAR IL, RIETVELD LC, ARAYA-OBANDO JA, QUESADA-GONZALEZ A, CABALLERO-CHAVARRIA A, ROMERO-ESQUIVEL LG. Autochthonous tropical groundwater bacteria involved in manganese(II) oxidation and removal[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2020, 6(11): 3132-3141.
- [31] FERRIER J, CSETENYI L, GADD GM. Fungal transformation of natural and synthetic cobalt-bearing manganese oxides and implications for cobalt biogeochemistry[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(2): 667-677.
- [32] HOLGUERA JG, ETUI ID, JENSEN LHS, PENA J. Contaminant loading and competitive access of Pb, Zn and Mn(III) to vacancy sites in biogenic MnO<sub>2</sub>[J]. *Chemical Geology*, 2018, 502: 76-87.
- [33] YANG P, POST JE, WANG Q, XU W, GEISS R, MCCURDY PR, ZHU M. Metal adsorption controls stability of layered manganese oxides[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(13): 7453-7462.
- [34] SOLDATOVA AV, ROMANO CA, TAO L, STICH TA, CASEY WH, BRITT RD, TEBO BM, SPIRO TG. Mn(II) oxidation by the multicopper oxidase complex Mnx: a coordinated two-stage Mn(II)/(III) and Mn(III)/(IV) mechanism[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(33): 11381-11391.
- [35] CHERNEV P, FISCHER S, HOFFMANN J, OLIVER N, ASSUNCAO R, YU B, BURNAP RL, ZAHARIEVA I, NURNBERG DJ, HAUMANN M, DAU H. Light-driven formation of manganese oxide by today's photosystem II supports evolutionarily ancient manganese-oxidizing photosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-10.
- [36] LIANG J, BAI Y, MEN Y, QU J. Microbe-microbe interactions trigger Mn(II)-oxidizing gene expression[J]. *International Society for Microbial Ecology*, 2016, 11(1): 67-77.