

锰氧化细菌的分离鉴定及其锰氧化特性的分析

张璐 李婷婷 王芳 许旭萍*

(福建师范大学生命科学学院 工业微生物教育部工程研究中心 福建 福州 350108)

摘要: 利用选择性培养基对锰矿样品进行分离、筛选,得到一株高效锰氧化细菌(MN1405)。经形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析,将菌株 MN1405 鉴定为 *Arthrobacter echigonensis*。在培养条件下, MN1405 对培养基中的锰离子去除率可达 93.38%, 且其培养所获得的培养液也具有良好的除锰效果。

关键词: 锰氧化细菌, 分离, 鉴定, 锰氧化特性

Isolation and identification of manganese-oxidizing bacterium and its manganese oxidation characteristics

ZHANG Lu LI Ting-Ting WANG Fang XU Xu-Ping*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: The selective media were used to isolate and screen the manganese-oxidizing bacteria. A high efficiency manganese-oxidizing bacterium (MN1405) was selected from manganese ores. According to the morphological features, physiological and biochemical characteristics and the sequence analysis of 16S rRNA gene, MN1405 was identified as *Arthrobacter echigonensis*. Under the cultural conditions, the manganese removal rate in the medium by MN1405 was reached 93.38%. The culture that was obtained from the bacterium also had a good manganese removal effects.

Keywords: Manganese-oxidizing bacterium, Isolation, Identification, Manganese oxidation characteristics

地下水是人类重要的饮用水源和理想的工业水源,是水资源的重要组成部分,对于缓解我国缺水城市的水资源短缺问题起到了举足轻重的作用。锰是地下水中最常见的污染因素之一。长期饮用锰含量超过饮用水标准的水会造成慢性中毒,引发多种脑神经疾病^[1]。鉴于地下水锰污染的普遍性及其所

造成的严重危害,地下水除锰技术已成为目前的研究热点之一。地下水中的锰主要以可溶性的 Mn^{2+} 形式存在,很难被空气直接氧化^[2]。传统的地下水除锰方法主要采用化学法,即加入强氧化剂使水中的 Mn^{2+} 氧化成不溶性的高价态锰氧化物,经沉淀、过滤而除去。由于该方法需在水中加入化学药剂,因

基金项目: 福建省环保厅科技项目(No. FJHK200912)

* 通讯作者: ✉ xuxupin@163.com

收稿日期: 2010-08-26; 接受日期: 2010-12-17

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

而会对原水质造成诸多不利的影响, 危害人类健康。近年来, 人们开始研究和利用生物除铁、除锰技术, 张杰等人将此技术应用于地下水处理厂, 取得了良好的效果^[3]。锰氧化细菌可以通过直接或间接机制^[4], 在 pH 中性条件下将水中的 Mn^{2+} 快速氧化为锰氧化物沉淀, 经过滤而除去。目前, 生物除锰技术凭借其无需投加化学药剂, 运行成本低廉, 良好的除锰效果, 已成为除锰技术的发展趋势^[5]。锰氧化细菌除了在地下水净化中得到广泛应用外, 在处理重金属离子污染的工业废水以及脱硫中亦取得了良好的效果^[6]。

本实验从锰矿样品中分离出高效的锰氧化细菌, 并对其进行鉴定和锰氧化性能测定, 为后续应用于生物除锰滤池奠定基础 and 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

本实验样品采自福建省龙岩市连城县锰矿, 用数字 13、14 对样品进行编号。样品 13 采自锰矿坑上部的淤泥, 样品 14 采自锰矿坑上部的矿石。

1.2 培养基^[7]

(1) A 培养基(改良 PYCM): 蛋白胨 0.5 g, 葡萄糖 0.3 g, 酵母浸出液 0.2 g, K_2HPO_4 0.1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $NaNO_3$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.1 g, $(NH_4)_2CO_3$ 0.1 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.2 g, 蒸馏水 1 L, 调节 pH 6.8–7.0, 1.0×10^5 Pa 灭菌 15 min。固体培养基加入琼脂 2%。

(2) B 培养基: 在 A 培养基的基础上每升加入柠檬酸铁铵 0.45 g。

(3) C 培养基: NH_4NO_3 0.5 g, $NaNO_3$ 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCl_2$ 0.2 g, 柠檬酸铁铵 10 g, 蒸馏水 1 L, 调节 pH 6.8–7.0, 1.0×10^5 Pa 灭菌 15 min。固体培养基加入琼脂 2%。

1.3 Mn^{2+} 测定

Mn^{2+} 测定采用甲醛肟分光光度法^[8], 本实验改为 10 mL 体系。

锰去除率的计算公式:

总去除率=[(总 Mn^{2+} 浓度-剩余 Mn^{2+} 浓度)/总 Mn^{2+} 浓度] $\times 100\%$

生物去除率=[(空白剩余 Mn^{2+} 浓度-剩余 Mn^{2+} 浓度)/总 Mn^{2+} 浓度] $\times 100\%$

计算公式中总 Mn^{2+} 浓度指培养基中初始 Mn^{2+} 浓度; 剩余 Mn^{2+} 浓度指培养基接菌培养后剩余的 Mn^{2+} 浓度; 空白剩余 Mn^{2+} 浓度指培养基不接菌培养后剩余的 Mn^{2+} 浓度。

1.4 锰氧化细菌的分离和筛选

1.4.1 锰氧化细菌的分离: 称取 5 g 样品于装有 50 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 25 °C、120 r/min 条件下振荡 24 h, 使样品中的细菌分散于水中, 进行梯度稀释。取稀释样液 0.2 mL 到 A 培养基、B 培养基和 C 培养基 3 种培养基平板上涂布, 25 °C 培养 2 d。从各培养皿约选 20 个分离较好的单菌落, 用牙签将其转移于另一相同配方的平板中培养, 用于初筛。

1.4.2 锰氧化细菌的筛选: 初筛(平板法): 从各培养皿挑选比较大、形态色泽各异的菌落, 用牙签分别逐个点种在 A、B、C 3 种培养基中, 选取在 3 种培养基上都能快速生长、菌落特征典型的菌株进行复筛。复筛(摇瓶法): 将初筛所得菌株接种于装有 A 培养基的试管中, 于 25 °C、120 r/min 振荡培养 6 d, 4 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液 Mn^{2+} 的含量^[8], 计算锰去除率。从中选择锰去除率较高的菌株, 再次接种于 A 培养基中, 25 °C、120 r/min 振荡培养 24 h, 用无菌水将菌液 OD_{600} 调整至 0.2, 以 5% 接种量接种到装有 A 培养基的三角瓶中, 于相同条件培养 6 d 后, 离心取上清液, 测定上清液的 Mn^{2+} 含量, 以锰去除率作为筛选的标准, 进行第 2 次复筛。第 3 次复筛同时采用 A 培养基和 B 培养基, 步骤同第 2 次复筛, 每个菌株做 3 个平行样, 得到在 A 培养基和 B 培养基中锰去除率都较高的菌株。

1.5 锰氧化细菌的鉴定

1.5.1 形态特征鉴定: 菌体进行革兰氏染色、鞭毛染色及芽孢染色后显微镜观察。

1.5.2 生理生化特征鉴定: 将菌株接种于 B 配方的斜面培养基上, 于 25 °C 培养 2 d 后, 进行生理生化鉴定。

1.5.3 16S rRNA 基因序列分析: 提取细菌基因组 DNA, 采用原核生物通用引物(上海生物工程公司):

正向引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物为 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3', PCR 扩增出细菌 16S rRNA 基因^[9]。PCR 扩增产物用大连生物工程有限公司胶回收试剂盒回收后, 通过 pMD18-T 试剂盒将目的片段与载体连接, 转化大肠杆菌。16S rRNA 基因的测序工作由上海生物工程公司完成。将测得菌株的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 研究其同源性, 选取同源性相近的细菌, 构建进化树。

1.6 锰氧化细菌在培养条件下的除锰效果

采用优化后的条件^[10]进行培养, 测定 MN1405 的除锰效果。以 A 培养基为基础配方, 添加柠檬酸铁铵, 使培养基中 Fe^{2+} 浓度为 100 mg/L, 调节 pH 6, 将 MN1405 接种到此培养基中, 在 25 °C、120 r/min 的条件下培养 6 d, 获得培养液。将培养液离心, 取上清液测定剩余的 Mn^{2+} , 计算锰去除率。

1.7 锰氧化细菌培养液的除锰实验

按照 1.6 的方法制备培养液。在试管中加入 5 mL 培养液, 再加入底物 MnSO_4 溶液, 至 Mn^{2+} 浓度分别为 10、20、30 mg/L, 作用 0.5、1.0、2.0 h, 分别取样离心除去反应形成的沉淀, 测定剩余的 Mn^{2+} 浓度, 计算锰去除率。

2 结果与分析

2.1 锰氧化细菌的分离

经过平板培养后, 以生长速度和生长特征为筛选指标, 从 A 培养基平板上分离到 44 个菌株; B 培养基平板上分离到 32 个菌株; C 培养基平板上分离到 49 个菌株, 共 125 株。

2.2 锰氧化细菌的筛选

2.2.1 锰氧化细菌的初筛: 将分离得到的 125 个菌株采用平板逐个检出法进行初筛, 以生长速度和生长特征为筛选指标, 从中筛选出 68 株在 A、B、C 培养基中都能够生长的菌株, 各菌株在 A 和 B 培养基中的菌落颜色为棕色至黑褐色; 在 C 培养基中的菌落颜色为棕红至深红色, 有些菌株菌落表面具有金属光泽。A 和 C 培养基分别是锰氧化细菌和铁氧化细菌常用的选择性培养基。本实验设计了含铁锰的 B 培养基, 并采用了平板逐个检出法, 成功地进

行了大量菌株的筛选, 提高筛选的效率。同时选择在 3 种培养基均可生长的菌株, 这些菌株在随后的复筛中都显示具有不同程度的氧化铁和氧化锰能力, 即为铁锰氧化细菌。

2.2.2 锰氧化细菌的复筛: 第 1 次复筛, 共筛选出 21 株锰氧化细菌。对 21 株锰氧化细菌进行第 2 次复筛, 得到锰去除率大于 55% 的 8 个菌株, 各菌株的锰去除率见图 1。因为铁和锰通常共存于地下水中, 为了获得氧化铁锰能力都较强的菌株, 第 3 次复筛分别使用了 A 培养基和 B 培养基。通过上述筛选, 得到一株生长速度较快、除锰除铁效果较好的菌株, 该菌株在 A 培养基中锰去除率为 82%; 在 B 培养基中锰去除率为 90.1%, 铁去除率为 100% (铁的测定方法按文献[11])。将该菌株命名为 MN1405, 用于下一步的实验。

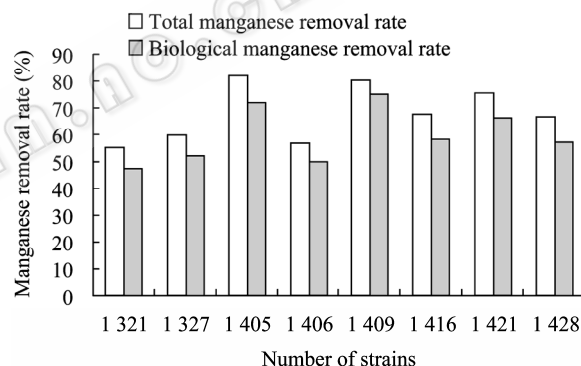


图1 不同菌株锰去除率比较

Fig. 1 The compare of manganese removal efficiency in different strains

注: 各菌株的锰去除率为 3 个平行样的平均值。

Note: The manganese removal efficiency of the strains is the average of three parallel samples.

2.3 锰氧化细菌的鉴定

2.3.1 锰氧化细菌菌体形态特征: 锰氧化细菌 MN1405 为革兰氏阳性菌。呈球杆形, 球形细胞直径约 0.4 μm –0.9 μm , 杆状约 (0.4–0.8) μm × (0.5–0.8) μm 。无芽孢, 有鞭毛, 能运动。

2.3.2 锰氧化细菌的菌落特征: 锰氧化细菌 MN1405 在 B 培养基上生长, 菌落直径为 1.8 mm–5.0 mm; 菌落呈圆形, 表面光滑, 微微隆起; 培养初期边缘整齐, 后期边缘有裂痕; 中心颜色略深呈乳黄色, 周围呈乳白色, 培养 6 d 后菌落表面变成红棕色(图 2)。

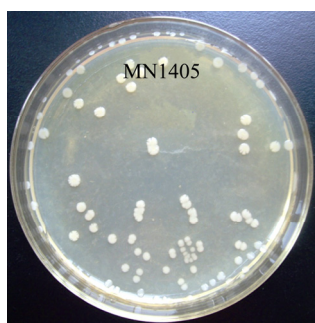


图2 MN1405 菌落特征

Fig. 2 The colony characteristics of strain MN1405

2.3.3 锰氧化细菌的生理生化特征: 经生理生化特征试验得知, 菌株 MN1405 能利用乳糖、麦芽糖、木糖、棉子糖、蔗糖等多种糖类以及甘露醇作为唯一碳源生长, 并产生尿素酶。但不能利用精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸这 3 种氨基酸及乙酰胺生长。此外,

侧金盏花醇及多粘菌素 B 试验均呈阴性。

2.3.4 锰氧化细菌 16S rRNA 基因序列分析: PCR 扩增获得 MN1405 菌株的 16S rRNA 基因大小约为 1 500 kb, 其在 GenBank 中基因登录号为 GU326383。在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 研究其同源性, 选取同源性相近的细菌, 构建进化树。

通过 MEGA 软件绘制的系统进化树可知, MN1405 与 *Arthrobacter echigonensis* 的进化关系最近, 置信度为 100%。经过 BLAST 比对, MN1405 与 *Arthrobacter echigonensis* (AB248531) 的 16S rRNA 基因序列相似性为 98%。MN1405 的菌体形态特征和生理生化特征与节杆菌属的特征相吻合, 可以将锰氧化细菌 MN1405 鉴定为 *Arthrobacter echigonensis* (图 3)。节杆菌属这一种类具有锰氧化能力的菌株在国内文献中尚未见报道。

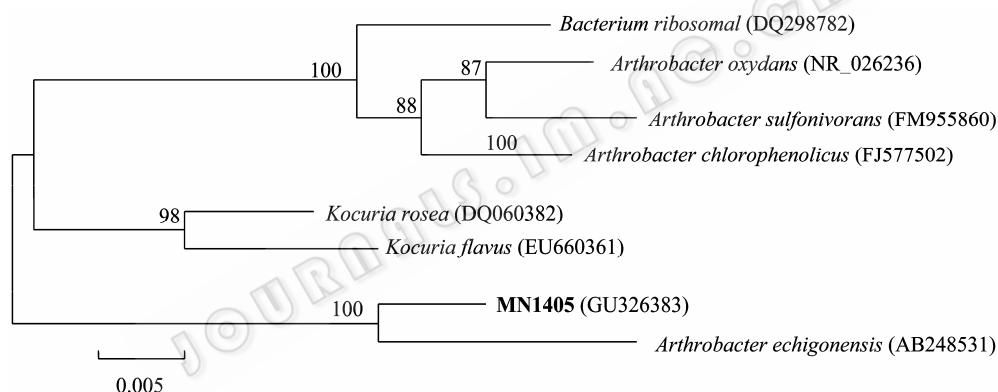


图3 MN1405 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain MN1405

2.4 MN1405 在培养条件下的除锰效果

分别研究了接种量、装液量、温度等理化因素对 MN1405 除锰效果的影响, 并对影响较大的 4 个因素(温度、pH、初始 Fe^{2+} 浓度、装液量)进行了正交实验。结果表明, 接种量在 2%–10% 之间, 对锰去除率影响不大; 而装液量在 50–100 mL、温度在 15 °C–35 °C、pH 在 5–9、初始 Fe^{2+} 浓度在 0–100 mg/L 之间变化, 都对锰去除率有不同程度的影响^[10]。通过正交实验确定在含锰培养基中, 菌株 MN1405 最佳除锰条件为: 培养温度 25 °C、pH 为 6、 Fe^{2+} 初始浓度为 100 mg/L、装液量为 250 mL 三角瓶装 100 mL 培养基。按此条件(即 1.6 所述条件)对 MN1405 进行

培养, 当培养基中初始 Mn^{2+} 浓度为 65 mg/L, 初始 Fe^{2+} 浓度为 100 mg/L 时, 经过 6 d 时间, 锰去除率可达到 93.38%, 铁去除率为 100%。与刘颜军等人^[12]分离到的锰氧化细菌 *Bacillus* sp. MK3-1 相比, MN1405 在初始 Mn^{2+} 浓度高出 8 倍的培养液中锰去除率与之相近, 除锰时间更短, 说明 MN1405 具有较强的除锰能力。

2.5 MN1405 培养液的除锰实验

由表 1 可知, 随着 Mn^{2+} 浓度从 10 mg/L 增至 30 mg/L, 锰去除率从 100% 逐步减小至 84%。在同一 Mn^{2+} 浓度条件下, 随着作用时间的延长, 锰去除率呈现升高的趋势。通过显著性分析, 发现在 3 种

表 1 Mn^{2+} 浓度和作用时间对培养液除锰的影响
Table 1 The effect of concentration of Mn^{2+} and time of operation to manganese removal efficiency of culture

作用时间 Time (h)	锰去除率(%) Manganese removal rate (%)					
	Mn^{2+} 浓度 10 mg/L Concentration of Mn^{2+} is 10 mg/L		Mn^{2+} 浓度 20 mg/L Concentration of Mn^{2+} is 20 mg/L		Mn^{2+} 浓度 30 mg/L Concentration of Mn^{2+} is 30 mg/L	
	0	Aa	0	Aa	0	Aa
0	0	Aa	0	Aa	0	Aa
0.5	95.8±2.34	Bb	88.76±2.34	Bb	78.40±2.98	Bb
1.0	100.00±3.35	Cc	92.85±2.34	Cc	82.20±3.01	Cc
2.0	100.00±2.34	Cc	92.50±2.48	Cc	84.00±1.83	Dd

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$).
Note: The data with different little letters in same column show significant difference ($P<0.05$); The data with different capital letters in same column show extremely significant difference ($P<0.01$).

不同的 Mn^{2+} 浓度条件下, 作用 1 h 和 2 h 的锰去除率高于作用 0.5 h 的锰去除率, 差异达到极显著水平。当 Mn^{2+} 浓度为 10 mg/L 和 20 mg/L 时, 作用 1 h 和 2 h 的锰去除率没有差异。当 Mn^{2+} 浓度为 30 mg/L 时, 作用 1 h 的锰去除率与作用 2 h 的锰去除率差异极显著。实验结果显示该菌不仅在培养条件下有很强的除锰能力, 而且培养获得的培养液可以直接用于除锰, 对于含 Mn^{2+} 低于 10 mg/L 的离子溶液, 在 1 h 内就可以使 Mn^{2+} 完全氧化去除。锰污染普遍存在于我国许多地区的地下水中, 约有 20% 的地下水锰含量超过饮用水标准, 尤其在东北地区, 地下水锰含量可高至 5 mg/L^[13], 说明该菌株在地下水处理工程及工业废水的净化上将有广阔的应用前景和具大的潜力。

3 结论

本研究通过采用多种选择性培养基, 成功地从锰矿样品中分离到 1 株锰氧化细菌 MN1405。MN1405 的形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析结果, 根据伯杰氏细菌鉴定手册(第 9 版), 将其鉴定为 *Arthrobacter echigonensis*。在 pH 为 6、 Mn^{2+} 初始浓度为 65 mg/L、 Fe^{2+} 初始浓度为 100 mg/L 的培养基中, 25 °C 振荡培养 6 d, 锰去除率为 93.38%, 铁去除率为 100%。MN1405 培养液可直接用于除锰, 具有去除率高、速度快、去除效果稳定等特点。

参 考 文 献

[1] 王悦, 段春礼, 张海燕, 等. 氯化锰对大鼠中脑多巴胺能神经元毒性的研究[J]. 神经解剖学杂志, 2001, 17(1):

57-61.
[2] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 75-78.
[3] 高洁, 李冬, 张杰. 生物除铁除锰滤池构造及过滤方式研究[J]. 低温建筑技术, 2006(5): 123-125.
[4] 杨宏, 纪娟, 钟洁, 等. 生物除锰技术研究进展与应用[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(8): 38-43.
[5] Francis CA, Tebo BM. *CumA* multicopper oxidase genes from diverse Mn (II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4272-4278.
[6] 齐魏, 王向东, 蒋文举, 等. 铁、锰氧化细菌在环境污染治理中的应用[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(6): 76-79.
[7] 张杰, 李东, 杨宏, 等. 生物固锰除锰机理与工程技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2005: 146-147.
[8] 国家环境保护总局. HJ/T 344-2007 水质锰的测定甲醛肟分光光度法(试行)[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007: 1-7.
[9] 滕懿群. 16S rRNA 基因 PCR 对细菌感染的分子生物学研究[J]. 国外医学: 流行病学. 传染病学分册, 1997, 24(2): 60-64.
[10] 王芳, 许旭萍, 郑晓丹, 等. 锰细菌氧化锰的影响因素研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2010, 26(2): 111-114.
[11] 国家环境保护总局. HJ/T 345-2007 水质铁的测定邻菲罗啉分光光度法(试行)[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007: 1-3.
[12] 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): 473-478.
[13] 张杰, 李东, 杨宏, 等. 生物固锰除锰机理与工程技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2005: 16-17.