

Rhodococcus sp-1 的 Mn^{2+} 生物去除能力及诱导特性

段晓东, 宋立新, 杨 宏, 熊晓丽, 李 威, 张 杰

(北京工业大学 北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100124)

摘 要: 利用传统的细菌分离方法, 从地下水生物除锰滤池中分离、纯化出 1 株细菌, 经 LBB (leucoberbelin blue) 法定性检测其具有 Mn^{2+} 氧化能力, 利用 Sherlock 细菌鉴定系统初步确定其属于红球菌属 (*Rhodococcus* sp). 对红球菌 *Rhodococcus* sp-1 菌株的生物除锰能力和诱导特性研究表明, *Rhodococcus* sp-1 菌株在达到第 1 个生长稳定期, 细菌浓度 2.3×10^8 个/mL 时, 其 Mn^{2+} 的去除量可达到 35 mg/L, 具有很强的 Mn^{2+} 生物去除能力; 同时 Fe 的存在对 *Rhodococcus* sp-1 Mn^{2+} 氧化活性的表达具有诱导作用, 在相同培养条件下, Fe^{3+} 的诱导性强于 Fe^{2+} , 其诱导速度是 Fe^{2+} 的 3~4 倍; 有机 Fe^{3+} 的诱导性强于无机 Fe^{3+} , 其诱导速度是无机 Fe^{3+} 的 1.6~2 倍.

关键词: 红球菌; Mn^{2+} 生物去除; 诱导特性

中图分类号: TU 991.26 + 5

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2010)02-0245-05

地下水源中锰过量是一个世界性的问题. 从 1874 年第 1 座除锰水厂在德国 Charlottenburg 建成至今, 地下水除锰技术的发展已经经历了 100 多年的历程. 自 20 世纪 80 年代末, 地下水生物除铁除锰技术被创造及应用以来, 地下水生物除锰技术以其处理效果好、运行状况稳定、投资费用少等特点, 受到了国内外研究者的日益关注^[1]. 本试验所用细菌是从地下水生物除锰滤池中分离、纯化得到, 具有 Mn^{2+} 氧化能力; 对该细菌的 Mn^{2+} 生物去除能力和诱导特性进行了系统研究.

1 试验材料、设备与分析方法

1.1 试验材料与设备

菌种采集于沈阳开发区水厂运行稳定的成熟除锰滤池. 设备: Minifors AG CH-4103 发酵罐; Sanyo 全恒温培养箱; Well BS-2FD 震荡培养箱; Sanyo 高压灭菌机; OLYMPUS BX41 系统显微镜; Agilent 6890N 气相色谱仪; Xin Mao 7205 可见分光光度计; AAS vario6 型原子吸收分光光度计.

1.2 分析方法

细菌的培养、富集、分离和纯化培养基采用 PYCM 培养基^[2] 和含铁的 PYCM 培养基, 其中含铁的 PYCM 培养基是在 PYCM 的基础上加入 0.2 g 柠檬酸铁铵, 采用连续梯度稀释, 反复涂布、划线的方法在 25 ℃ 下培养 7 d, 直至菌落单一, 进行革兰氏染色并用光学显微镜观察^[3-6]; 灭菌采用湿热 121 ℃ 灭菌 15 min; 细菌 Mn^{2+} 氧化活性的测定采用 LBB (leucoberbelin blue) 法^[7-9], 将 LBB 试剂滴加于菌落表面, 出现蓝色阳性反应即细菌具有 Mn^{2+} 氧化活性; 采用 MIDI Sherlock[®] 脂肪酸细菌鉴定系统, 对具有 Mn^{2+} 氧化活性的细菌进行种属鉴定, 该细菌鉴定系统是将待鉴定细菌接种于灭菌后的 TSBA 平板培养基 (Trypticase 大豆肉汤 30 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL), 28 ℃ 条件下培养 24 h 后, 提取短链脂肪酸, 通过毛细管气象色谱仪分析, 与系统库中的短链脂肪酸图谱进行对比, 鉴定出细菌的属和种; 细菌浓度采用分光光度计在波长 $\lambda = 600$ nm 处的吸光值即 OD_{600} 值来定性表征; 细菌浓度采用血球计数板法定量测定; 采用原子吸收测定原始培养基中 $\rho_{Mn^{2+}}$, 减去细菌生长过程中定时取样用 0.22 μ m 滤膜过滤去除 Mn^{4+} , 联合原子吸收测定滤

收稿日期: 2008-09-12.

基金项目: 国家“八六三”计划资助项目 (2006AA06Z308).

作者简介: 段晓东 (1980—), 男, 河北邯郸人, 博士生.

后液中剩余的 $\rho_{\text{Mn}^{2+}}$, 从而得到在细菌生长周期过程中 Mn^{2+} 的去除量 $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$.

2 试验内容

2.1 细菌的分离、纯化和鉴定

利用 1.3 中的分析方法, 对地下水生物除锰滤池中细菌进行分离、纯化, Mn^{2+} 氧化活性测定和细菌属种鉴定.

2.2 细菌生长周期中 Mn^{2+} 氧化能力的测定

将细菌接种于含铁的 PYCM 液体培养基中摇瓶培养, 定时取样测定 OD_{600} 值和细菌浓度, 并利用 0.22 μm 滤膜和原子吸收联合的方法测定各样品中的 $\rho_{\text{Mn}^{2+}}$, 得到该细菌的生长曲线和生长周期中对应的 Mn^{2+} 的去除量 $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$.

2.3 细菌 Mn^{2+} 氧化活性表达诱导特性的确定

1) Fe、Mn 元素诱导性初步确定

利用 PYCM 和含铁 PYCM 培养基对细菌进行摇瓶培养, 取对数生长期培养液样品(细菌浓度约 2×10^8 个/mL), 采用 LBB 法检测培养液中高价锰的生成, 初步确定 Fe、Mn 元素对该细菌 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导性.

2) Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 诱导性确定

配制相同质量浓度的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 溶液各 50 mL(以 Fe 计 $\rho(\text{Fe}) = 100 \text{ mg/L}$), 分别加入对数生长期的细菌 PYCM 培养液 50 mL(细菌浓度约 2×10^8 个/mL), 定时取样, 采用 LBB 法检测培养液中高价锰的生成, 从而确定 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 对该细菌 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导性.

3) 有机 Fe^{3+} 和无机 Fe^{3+} 诱导性确定

配制相同质量浓度的有机 Fe^{3+} 和无机 Fe^{3+} 溶液各 50 mL(以 Fe^{3+} 计 $\rho(\text{Fe}^{3+}) = 100 \text{ mg/L}$), 分别加入对数生长期的细菌 PYCM 培养液 50 mL(细菌浓度约 2×10^8 个/mL), 定时取样, 采用 LBB 法检测培养液中高价锰的生成, 从而确定有机 Fe^{3+} 和无机 Fe^{3+} 对该细菌 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导性.

以上 3 种诱导特性确定试验均同时做 3 个平行试验, 以保证试验的准确性.

3 结果与分析

3.1 细菌分离、纯化和鉴定

经过分离纯化得到 1 株革兰氏阳性菌, 菌落呈不规则形状, 表面黏质, 边缘呈锯齿形; 利用 Mn^{2+} 氧化活性检测的方法, 对该菌株的 Mn^{2+} 氧化能力进行判断, LBB 显色结果呈阳性, 证明该菌株具有 Mn^{2+} 氧化能力. MIDI Sherlock 微生物鉴定系统对该细菌的鉴定结果表明, 该菌株属红球菌属, 确定为 *Rhodococcus* sp-1 菌株.

3.2 *Rhodococcus* sp-1 菌株生长周期中 Mn^{2+} 生物去除量

对接种于含铁的 PYCM 液体培养基中 *Rhodococcus* sp-1 菌株进行生长曲线和生长周期中对应的 Mn^{2+} 去除量 $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$ 进行测定, 绘制 *Rhodococcus* sp-1 菌株生长周期与 $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$ 曲线, 见图 1 所示.

由图 1 可以看出, 该菌株在接种培养 12 h 后进入对数生长期, 20 h 左右进入生长稳定期, 稳定期的细菌浓度约 2.3×10^8 个/mL. 随着 *Rhodococcus* sp-1 的生长, 培养液中 $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$ 逐渐升高, 当达到生长稳定期后, $\Delta\rho_{\text{Mn}^{2+}}$ 也趋于稳定, 约为 35 mg/L. 同时图 1 也表明, 在 *Rhodococcus* sp-1 生长的适应期和对数期阶段, 呈现出了较高的 Mn^{2+} 去除量, 这是由于随着细菌浓度的扩增, 对 Mn^{2+} 存在的吸附和氧化作用所致.

3.3 *Rhodococcus sp-1* 菌株 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导特性

1) Fe 、 Mn 元素诱导性初步确定

将 *Rhodococcus sp-1* 菌株分别接种于 PYCM 和含铁 PYCM 液体培养基, 取达到生长稳定期的 2 种细菌培养液(细菌浓度约 2×10^8 个/mL, pH = 7.25), 利用 LBB 法检测培养液中高价锰的生成, 结果显示 PYCM 培养样品显色结果呈阴性, 含铁 PYCM 培养样品显色结果呈阳性. 从而得出结论: 铁元素的存在对 *Rhodococcus sp-1* 菌株 Mn^{2+} 氧化活性的表达具有诱导作用.

2) Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 诱导性确定

对处于生长稳定期的 *Rhodococcus sp-1* 菌株(细菌浓度约 2×10^8 个/mL) Mn^{2+} 氧化活性的表达进行 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 诱导性试验, 试验结果见表 1 所示.

表 1 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 诱导性试验 LBB 显色结果
Table 1 Results of LBB color test about the induction experiments of Fe^{2+} and Fe^{3+}

平行试验 样品名称	t/h										
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Fe ³⁺ 样品 1	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Fe ³⁺ 样品 2	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
Fe ³⁺ 样品 3	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Fe ²⁺ 样品 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Fe ²⁺ 样品 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Fe ²⁺ 样品 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+

注: “+”LBB 显色结果呈阳性, “-”表示 LBB 结果呈阴性.

为了排除在 pH $\geq$ 8.5 条件下^[2] Mn^{2+} 发生空气自然氧化对诱导性试验阳性显色结果的干扰, 对出现阳性显色结果的样品进行 pH 值测定, 测定结果见表 2 所示.

对 LBB 阳性显色结果样品的 pH 值测定结果表明, 表 1 中使 LBB 显色结果呈阳性的高价锰并非由于碱性条件下空气自然氧化所带来, 而是由 *Rhodococcus sp-1* 菌株的生物氧化生成的高价锰所致.

综合表 1 和表 2 结果, 可以推断: 在细菌浓度为 1×10^8 个/mL 条件下, 50 mg/L 的 Fe^{3+} 对 *Rhodococcus sp-1* 菌株 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导需要 12 ~ 16 h; 50 mg/L 的 Fe^{2+} 对 *Rhodococcus sp-1* 菌株 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导需要 36 ~ 40 h, 即 Fe^{3+} 对 *Rhodococcus sp-1* 菌株 Mn^{2+} 氧化活性表达的诱导作用要强于 Fe^{2+} , 其诱导速度比约为 3:1 ~ 4:1.

3) 有机 Fe^{3+} 和无机 Fe^{3+} 诱导性判断

对处于生长稳定期的 *Rhodococcus sp-1* 菌株(细菌浓度约 2×10^8 个/mL) Mn^{2+} 氧化活性的表达进行有机 Fe^{3+} 和无机 Fe^{3+} 诱导性确定试验, 试验结果如下表 3 所示.

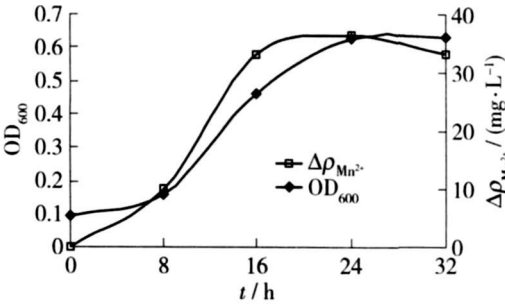


图 1 *Rhodococcus sp-1* 生长周期与 $\Delta\rho_{Mn^{2+}}$ 曲线

Fig. 1 Growth and Mn^{2+} removal amount curve of *Rhodococcus sp-1*

表 2 LBB 阳性样品 pH 值测定结果
Table 2 pH of positive samples about LBB color test

平行试验 样品名称	t/h			
	12	16	36	40
Fe^{3+} 样品 1	7.30			
Fe^{3+} 样品 2		7.35		
Fe^{3+} 样品 3	7.32			
Fe^{2+} 样品 1			6.80	
Fe^{2+} 样品 2			6.84	
Fe^{2+} 样品 3				6.96

表 3 有机 Fe³⁺ 和无机 Fe³⁺ 诱导性确定试验 LBB 显色结果

Table 3 Results of LBB color test about the induction experiments of organic Fe³⁺ and inorganic Fe³⁺

平行试验 样品名称	t/h						
	0	4	8	12	16	20	24
有机 Fe ³⁺ 样品 1	-	-	-	+	+	+	+
有机 Fe ³⁺ 样品 2	-	-	-	-	+	+	+
有机 Fe ³⁺ 样品 3	-	-	-	-	+	+	+
无机 Fe ³⁺ 样品 1	-	-	-	-	-	+	+
无机 Fe ³⁺ 样品 2	-	-	-	-	-	-	+
无机 Fe ³⁺ 样品 3	-	-	-	-	-	-	+

为了排除在 pH≥8.5 条件下^[2] Mn²⁺ 发生空气自然氧化对诱导试验阳性显色结果的干扰,对出现阳性显色结果的样品进行 pH 值测定,测定结果见表 4.

对 LBB 阳性显色结果样品的 pH 值测定结果表明,表 4 中使 LBB 显色结果呈阳性的高价锰并非由于碱性条件下空气自然氧化所带来,而是由 *Rhodococcus* sp-1 菌株的生物氧化生成的高价锰所致.

综合表 3 和表 4 结果可以推断,在细菌浓度为 1×10⁸ 个/mL 条件下,50 mg/L 的有机 Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导需要 12~16 h;50 mg/L 的无机 Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导需要 20~24 h,即有机 Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导作用要强于无机 Fe³⁺,其诱导速度比约为 1.6:1~2:1.

4 结论

1) 利用传统的细菌分离方法,从地下水生物除锰滤池中分离、纯化出一种细菌,利用 LBB 对高价锰的定性检测,确定出该菌种具有 Mn²⁺ 氧化能力;利用 MIDI Sherlock[®] 脂肪酸细菌鉴定系统,对该细菌进行初步的菌种鉴定,确定其属于红球菌属,命名为 *Rhodococcus* sp-1 菌株.

2) 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株生长周期中 Mn²⁺ 去除量的测定结果表明,该菌株在进入生长稳定期细菌浓度达 2.3×10⁸ 个/mL 后,Mn²⁺ 的去除量趋于稳定,可以达到 35 mg/L 左右,具有很强的 Mn²⁺ 生物去除能力.

3) Fe 元素的存在对于 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达具有诱导作用.

4) 相同条件下,Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导作用要强于 Fe²⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导作用,Fe³⁺ 诱导速度是 Fe²⁺ 诱导速度的 3~4 倍.

5) 相同条件下,有机 Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导作用要强于无机 Fe³⁺ 对 *Rhodococcus* sp-1 菌株 Mn²⁺ 氧化活性表达的诱导作用,有机 Fe³⁺ 诱导速度是无机 Fe³⁺ 诱导速度的 1.6~2 倍.

参考文献:

[1] 张杰,李冬,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,2005:1-27.
[2] 鲍志戎,孙书菊,王国彦,等.自来水厂除锰滤砂的催化活性分析[J].环境科学,1997,1(18):38-41.

- BAO Zhi-rong, SUN Shu-ju, WANG Guo-yan, et al. Mn^{2+} -Oxidizing bacteria and the Mn^{2+} -Removing activity of the filter sand used in water plants[J]. Environment Science, 1997, 1(18): 38-41. (in Chinese)
- [3] 安娜, 傅金祥, 张丹丹. 除铁除锰菌的分离及其氧化性能的实验[J]. 沈阳建筑大学学报: 自然科学版, 2006, 22(6): 989-994.
- AN Na, FU Jin-xiang, ZHANG Dan-dan. Separation and oxidizability property of iron removing and manganese removing bacteria[J]. Journal of Shenyang Jianzhu University: Natural Science, 2006, 22(6): 989-994. (in Chinese)
- [4] 李慧珍, 许旭萍, 林跃鑫, 等. 铁-锰氧化鞘细菌的生境条件及分离鉴定[J]. 水生生物学报, 1999, 23(4): 311-315.
- LI Hui-zhen, XU Xu-ping, LIN Yue-xin, et al. Isolation identification and habitat conditions of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(4): 311-315. (in Chinese)
- [5] 张杰, 杨宏, 徐爱军, 等. Mn^{2+} 氧化细菌的微生物学研究[J]. 给水排水, 1997, 23(1): 19-23.
- ZHANG Jie, YANG Hong, XU Ai-jun, et al. Study on microbiology of Mn^{2+} oxidative bacteria[J]. Water & Wastewater Engineering, 1997, 23(1): 19-23. (in Chinese)
- [6] 郝瑞霞, 吕鉴. 水质工程学实验与技术[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2006: 92-109.
- [7] DEPALMA S R. Manganese oxidation by *pesudomonas putida*[D]. Cambridge, Massachusetts: Harvard University, 1993.
- [8] KRUMBEIN W H J, ALTMANN. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms[J]. Helgoland Wiss Meeres, 1973, 25: 347-356.
- [9] BOOGERD F C, de VRIND J P M. Manganese oxidation by *leptothrix discophora*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(2): 487-494.

Study on the Capacity and Induction of *Rhodococcus sp-1* Biological Mn^{2+} Removal

DUAN Xiao-dong, SONG Li-xin, YANG Hong, XIONG Xiao-li, LI Wei, ZHANG Jie
(Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering,
Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: A strain bacteria had been separated, purified from the removal of manganese bio-filter treated with groundwater by traditional microbiology method. The strain bacteria could oxidate Mn^{2+} tested by the LBB method. It had been identified to belong to *Rhodococcus sp.* by the MIDI Sherlock bacteria identification system. Studied on the capacity and induction of *Rhodococcus sp-1* biological manganese removal, the results shown: the removal amount of Mn^{2+} was 35 mg/L when *Rhodococcus sp-1* reached the first stabilization period, and its order was 2.3×10^8 n/mL. It had the strong capacity of biological Mn^{2+} removal. In addition Fe element could induct *Rhodococcus sp-1* to oxidize Mn^{2+} . Under the same conditions, Fe^{3+} was stronger than Fe^{2+} , the induction speed ratio was 3 ~ 4: 1; organic Fe^{3+} was stronger than inorganic Fe^{3+} , the induction speed ratio was 1.6 ~ 2: 1.

Key words: *Rhodococcus sp.*; biological Mn^{2+} removal; induction

(责任编辑 郑筱梅)