第23卷 第4期
1999年12月

水生生物学报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 23, No. 4
Dec., 1999

铁-锰氧化鞘细菌的生境条件及分离鉴定*

李惠珍 许旭萍 林跃鑫 谢华玲

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要 从水库采集不同季节和不同水层的水样及水下输水管道堵塞物进行分析和分离,结果表明,铁-锰氧化鞘细菌分布在水库不同水层的低浓度有机营养的水流和水下输水管道的堵塞物中。该菌在水库中较适的生境条件在夏秋两季,温度为21～25℃、pH6.16～6.87,总铁含量 > 0.43mg/L和微氧环境的中下层及底层。该菌的分离采用富集培养和限制营养浓度的选择培养基。富集鞘细菌以尿素—葡萄糖—无机盐培养基和Stokes培养基为较有效培养基,富集和分离铁-锰氧化鞘细菌以Winogradsky铁细菌培养基和Muder锰培养基为有效培养基,添加0.5u/mL青霉素钠可提高铁-锰氧化鞘细菌的出菌率,可选择CGY培养基进一步纯化。分离到2株:FC9771-1和FC9771-2,经形态和培养特征的初步鉴定,FC9771-1属球衣菌属(*Sphaerotilus*),FC9771-2属于纤发菌属(*Leptothrix*)。

关键词 铁-锰氧化鞘细菌、生境条件、分离、初步鉴定

含铁、锰过高的水,给饮用和工业带来严重问题,饮用水当铁含量超过0.3mg/L,锰含量超过0.05mg/L,就对人体有害。因此,水中铁、锰的清除一直是给水工程重要研究课程。铁、锰氧化鞘细菌能去除水质中高铁、高锰达到水质净化。铁和锰的氧化产物与鞘细菌大量增生的丝状物粘合在一起又会引起地下管道的阻塞和锈蚀及引起活性污泥的膨胀,以至严重影响水处理的质量。因此,铁、锰氧化鞘细菌的研究将对环保方面具有重要的理论和应用意义。由于该菌分离纯化较困难,因而研究进展受到一定阻碍,对它的形态学、生理学和分类学研究进展不大,导致环保上的应用受到一定限制。因此对水库水体铁、锰氧化鞘细菌的生境条件以及分离鉴定的研究,以及形态的研究和环保方面的应用有一定的现实意义。

1 材料和方法

1.1 水样来源 福建省某水电站水库的水样

1.2 水体理化因子分析 T:水温度法,pH:玻璃电极法,总铁:邻菲罗啉分光光度法[1,2]。

1.3 铁-锰氧化鞘细菌数 采用MPN法测定[2]。

1.4 富集培养 选择有少量絮状物和褐色沉淀物的水样及管道堵塞物进行富集培养,第

* 福建省自然科学基金项目(MC79)

1998-10-26收到;1999-05-06修回

一次采用尿素—葡萄糖—无机盐培养基，Stokes 培养基，牛肉膏—葡萄糖培养基以富集培养鞘细菌为主。在 26～28℃静止培养 24—48h，如有絮状小团飘浮于液体，可用接种针挑取少许进行镜检，若有形成鞘的丝状体，将它分别接入 Winogradsky 铁细菌培养基和 Muder 锰培养养，添加青霉素钠 0.5u/ mL，在 26—28℃，静止培养 24—72h，若在铁细菌培养基出现黄褐色或褐色，在 Muder 培养基出现棕褐色或黑褐色的沉淀物即可进行分离，可富集培养几代[3,4]。

1.5 分离培养 将在 Winogradsky 铁细菌培养液和 Muder 锰培养基出现的絮状体，用接种环挑出在几支装有无菌水的试管反复洗涤后，在已制备好的铁细菌和 Muder 琼脂平板上划线分离培养。也可采用点植法或稀释法进行分离培养[3,4]。

1.6 单菌落分离纯化 将初步分纯到的菌株转接入 CGY 平板培养基，挑取光滑型菌落进一步纯化，经连续分离纯化即可取得纯培养[3,4]。

1.7 鉴定方法 在 26℃培养 24—48h 的菌体进行染色，然后在光学显微镜下观察形态特征。在 Stokkes 培养基、Winogradsky 铁细菌培养基、Muder 锰培养基于 26℃培养 48—72h 的特征[5]。

2 结果和讨论

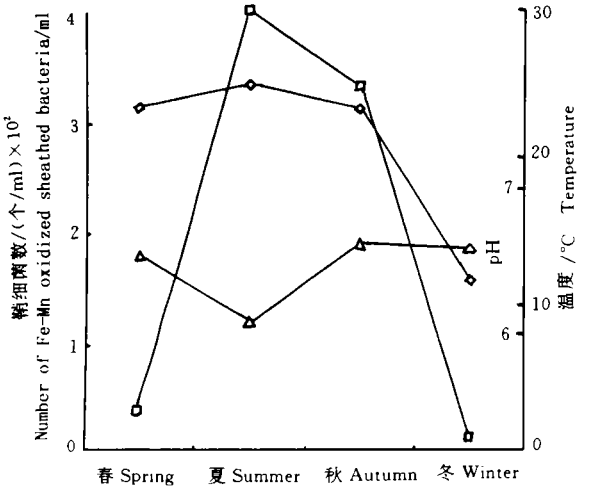


图 1 不同季节水体的温度和 pH 对铁锰氧化鞘细菌生长的影响

Fig.1 Effect of water temperature and pH on growth of Fe-Mn oxidizer sheated bacteria

—□— 铁锰鞘细菌数 Number of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria —△— pH —○— 温度 Temperature

2.1 水库水体中铁-锰氧化鞘细菌的生境条件

2.1.1 不同季节水体的温度和 pH 值对铁-锰氧化鞘细菌生长的影响

图 1 表明，水体温度对铁-锰氧化鞘细菌的消长具有显著的影响。一年中，从春季到夏季，随着平均水温升高，水体中平均铁-锰氧化鞘细菌数也逐渐升高，至夏季均达高峰。秋季随着水温逐渐下降，该菌开始下降，至冬季降到最低值，一年四季中铁-锰氧化鞘细菌数量多少顺序是夏 > 秋 > 春 > 冬。夏秋两季平均水温为 23—25℃，该菌为 3.15×10^2—4×10^2 / mL，这与文献中报道的鞘细菌最适生长温度为 20—28℃相符。不同季节水体 pH 值变化较小，一年四季水体 pH 值范围在 6.16—6.87，据文献报道，该 pH 范围均适合该菌的生长[5,6]。

2.1.2 水体中含铁量对铁 -锰氧化鞘细菌生长的影响

水体中总铁含量对该菌数量的消长具有显著的影响。一年中，从春季到夏季含铁量逐渐升高，水体中铁-锰氧化鞘细菌数也逐渐增高，至夏季达到高峰，夏季过后转入秋季，

含铁量减少，铁-锰氧化鞘细菌数也逐渐减少，至冬季降到最低值。这说明铁-锰氧化鞘细菌的数量与相对应铁的含量间一种相关性(图 2)。

2.1.3 不同水层对水体中铁-锰氧化鞘细菌生长的影响

从表 1 说明夏秋两季在表层水面下 0.5m 该菌数极少(< 10 / mL)，在上层水面下 10m 随着深度的增加，该菌数也逐渐增加；在中上层水深 10—20m，该菌数反而随着深度的增加而减少，在中下层水深 20—30m 又随着深度逐渐增加，至底层在 30m 以下达到最高值。表层 0.5m 的水体因受紫外线等外界环境因子的影响，所以该菌数极少。在上层与中下层水体处，该菌数以秋季最高；而在中上层及底层水体处，又以夏季最高。夏秋两季在不同水层水温均在 22—30℃ 范围，30—40m 处，水温为 21—22℃，总铁含量最高，为 0.43—0.49mg/ L。该处又是微氧环境，氧分压较低，这与该菌虽然是好气菌，但是对氧含量要求不高，在低氧分压的条件下，生长更好，但不能在完全缺氧条件下生长相一致。

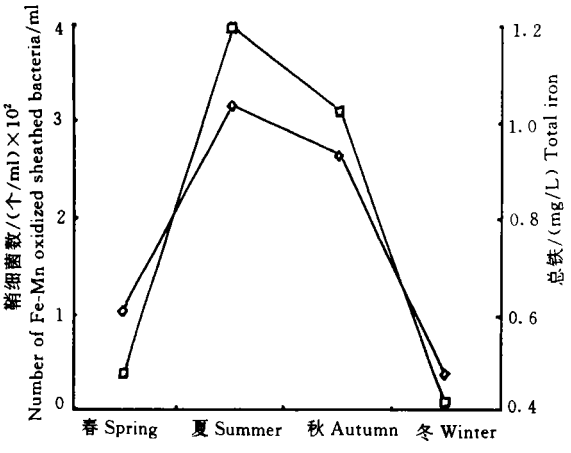


图2　水体中含铁量对铁锰氧化鞘细菌生长的影响

Fig.2　Effect of water iron concentrations on growth of Fe-Mn oxidizer sheathed bacteria

—□— 铁锰鞘细菌数　Number of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria —○— 总铁　Total iron

根据以上试验说明在自然界有许多微生物对铁、锰的生物转化起着重要作用，作者认为该水库水体主要为铁-锰氧化鞘细菌。因为在天然水体中，对铁、锰的氧化，在不同 pH 条件下有着不同的微生物起作用[7—10]。当 pH < 5 时，对氧化亚铁硫杆菌最为适宜，当 pH>6 时，是嘉氏铁柄杆菌(*Gallionella* spp.)和鞘细菌。嘉氏铁柄杆菌为化能自养厌氧菌。鞘细菌为化能异养好氧菌[9]，并结合铁细菌培养液的微生物涂片镜检，可确定该水库水体对铁锰氧化主要微生物为鞘细菌。该菌分布在水库不同水层中流动的低浓度有机营养的水体

表1　不同水层对水体铁锰氧化鞘细菌生长的影响

Tab.1　Fe-Mn oxidizd sheathed bacteria in different water layers

水　深(m) Water depth	铁锰氧化鞘细菌数(个/mL) Number of Fe-Mn oxidize sheathed bacterica/mL			
	春 Spring	夏 Summer	秋 Autumn	冬 Winter
0—0.5	2	1	2	4
0.5—10	18	14	130	10
10—20	12	13	10	12.5
20—30	10	140	300	13
30—40	5	770	670	5

中，它不断吸收流水中的低营养进行生长繁殖及代谢活动。在水库自然生境条件下，它的最适生长条件，在夏、秋两季，温度为 21—25℃，pH6.16—6.87，含铁量高于 0.43mg/ L，并在低氧环境的中下层及底层处生长。

2.2 水体中铁-锰氧化鞘细菌的分离培养和鉴定

2.2.1 分离培养 富集鞘细菌以尿素—葡萄糖—无机盐培养基和 Stokes 培养基较易形成大量的丝状体，出菌效果好。富集铁-锰氧化的鞘细菌采用 Winogradsky 铁细菌培养基和 Muder 锰培养基效果较好，因培养基含有柠檬酸铁铵和 $MnSO_4$，能氧化铁、锰的鞘细菌可将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 并形成 $Fe(OH)_3$ 褐色沉淀。$MnSO_4$ 的 Mn^{2+} 可氧化成 $Mn^{4+}O_2$，生成黑褐色沉淀。铁-锰氧化鞘细菌分离遇到问题就是鞘上伴生菌较多，较难纯化，应选用限制营养浓度的培养基，也可添加 0.5u/ ml 青霉素钠盐抑制 G^+ 菌生长，提高氧化铁-锰鞘细菌的出菌率，还可选择 CGY 培养基，由于铁-锰氧化鞘细菌在固体选择培养基较不易取得单个细胞形成的单菌落，CGY 培养基含有营养丰富的蛋白胨、酵母膏、甘油有机营养成分，能形成由大量游离的单个细胞繁殖而成的边缘光滑单菌落以排除部分伴生杂菌，取得纯培养效果较好[6—10]。采用上述方法已分离到 2 株铁-锰氧化鞘细菌：FC9771-1来自水体底层处，FC9771-2来自水下输水管道堵塞物。

2.2.2 初步鉴定

形态特征 FC9771-1由杆状细胞排列成链，外由一层鞘包裹，当鞘内的菌体游离出来，形成空鞘，鞘的宽度平均为 1.8μm，具有假分枝。菌体为杆状。革兰氏阴性，无芽孢，内含聚β-羟丁酸(PHB)，有鞭毛、鞭毛为偏端生，单个菌体能活跃活动，在鞘内的菌体不见鞭毛游离出来。菌体大小平均为 1.3 × 2.5μm。

FC9771-2：由杆状细胞排列成链，外由一层鞘包裹，当鞘内的菌体游离出来，形成空鞘，鞘的宽度平均为 2.0μm。菌体为杆状，革兰氏阴性，无芽孢，内含聚β-羟丁酸(PHB)，有鞭毛，鞭毛为端生，单个菌体能活跃活动，在鞘内的菌体不见鞭毛游离出来，菌体大小平均为 1.0 × 2.6μm。

培养特征 FC9771-1：在 Stokes 固体培养基上，菌落扁平，无光泽，边缘有卷曲的丝状体伸出，较粗糙，在试管的液体培养基形成菌膜，摇动时不易破裂，培养一定时间下沉试管底部。在 Winogradsky 铁细菌固体培养基形成红褐色圆型隆起菌落，在液体培养基试管形成红褐色沉淀。在 Muder 锰固体培养基上能形成白色菌落。不能形成黑褐色菌落，在试管的液体培养基形成白色菌膜，不能形成棕褐色菌膜。

FC9771-2：在 Stokes 固体培养基上，菌落扁平，无光泽，边缘有卷曲的丝状体伸出，较粗糙，在试管的液体培养基形成菌膜，摇动时不易破裂，培养一定时间下沉试管底部。在 Winogradsky 铁细菌固体培养基形成红褐色圆型隆起菌落，在试管的液体培养基形成红褐色沉淀。在 Muder 锰固体培养基上能形成褐色菌落。在试管的液体培养基能形成棕褐色菌膜，随着培养时间的延长能产生黑褐色含锰沉积物。

按伯杰氏细菌鉴定手册第 9 版[11]初步鉴定，FC9771-1和 FC9771-2为鞘细菌类，FC9771-1为球衣细菌属(*Sphaerotilus*)，FC9771-2为纤发菌属(*Leptothrix*)。

参　考　文　献

[1] 国家环保局．水和废水监测分析方法．北京：中国环境科学出版社，1989
[2] 宋仁元等译．水和废水标准检验法．北京：中国建筑工业出版社 1985，866—918
[3] 陈绍铭等．水生微生物学实验法．北京：海洋出版社，1985，102—104
[4] 翁稣颖等．球衣细菌(sphaerotilus)的研究——球衣细菌的纯种分离、鉴定和保存．微生物学报，1980，**20**(4)：351—355
[5] 翁稣颖等．环境微生物学．北京，科学出版社．1985，69—80
[6] 周群英等．活性污泥球衣细菌生态特征的研究．生态学杂志．1984，(2)：17—20．
[7] 鲍志成等．铁、锰氧化还原细菌研究概况．1996，**23**[1]：48—50
[8] 王银善等．异养微生物还原氧化铁的研究．微生物学通报．1997，**24**(3)：156—158
[9] 朴克三等．鞘铁菌(Siderocapsa)固锰的生化分析．吉林大学自然科学学报，1991，(3)：107—110．
[10] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed. Baltimore: The williams & wilkins Co, 1994, 477—482

ISOLATION IDENTIFICATION AND HABITAT CONDITIONS OF Fe-Mn OXIDIZED SHEATHED BACTERIA

Li Huizhen, Xu Xuping Lin, Yuexin and Xie Hualing

(*Bioengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou,* 350007)

Abstract The water samples obtained in different water layers of a reservoir and in plugs of water pipes were collected for the investigation of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria. The bacteria were found in plugs and the layers where the organic nutrition was considered low. It is indicated that the best seasons for the growth of bacteria are summer and autumn, and the suitable growing place is in the lower layer and bottom of the reservoir where the temperature is 21～25℃, pH 6.16～6.87 Fe > 0.43mg / L, and oxygenic concentration is low. The selective media with limited nutrient concentrations and enriched culture were used for isolation of the bacteria. The results showed that urea-glucose-inorganic salt medium and Stokes medium are suitable for the enrichment of the sheathed bacteria and Winogradsky iron bacteria medium and Muder managanese medium are more effective for the enrichment and isolation of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria. The addition of 0.5u / ml of sodium penicilline in the medium can increase the growth rate of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria. CGY medium can be used to purify the bacteria: Two strains of Fe-Mn oxidized sheathed bacteria, FC9771-1 and FC9771-2, were finally purified. According to their morphological and culture features, FC9771-1 was preliminarily identified as genus in the *Sphaerotilus*, FC9771-2 as *Leptothrix* genus.

Key words Fe-Mn oxidized sheathed bacteria, Isolation, Identification, Habitat condition