

自然水体中铁-锰氧化细菌的研究

秦松岩¹, 马放^{1*}, 黄鹏²

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 国家城市给水排水工程技术研究中心, 天津 300074)

摘要:通过在河流中悬吊自行设计的载玻片架, 获取了具有由铁-锰氧化细菌产生的特异的铁锰氧化物结构的生物膜, 设计了 4 种培养基, 采用 2 种不同的细菌分离方法, 对生物膜上的铁细菌进行分离, 应用荧光 X 射线分析仪(XRF)分析了分离菌株产物的化学元素组成, 并对分离菌株的铁锰氧化形态进行了观察. 研究发现, 铁细菌 2 号培养基为合适的分离培养基; 采用平板涂布法分离出的 2 株氧化铁和锰的细菌, 经系统发育地位的分析确定为纤发菌属; 对运动纤发菌的产物分析确定无定形铁和锰为其主要金属元素; 形态观察确定霍氏纤发菌呈树枝状鞘结构, 而运动纤发菌呈蛛网状鞘结构. 采用原位培养法分离出 1 株具有独特铁锰氧化物结构的细菌, 经基因序列比对, 确定为丛毛菌属. 该实验获得的 3 株铁-锰氧化细菌的序列为设计针对于自然水体中的铁-锰氧化细菌 FISH 探针及 PCR 引物提供了关键数据.

关键词:铁-锰氧化细菌; 半固体培养基; 原位培养法

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1649-06

Ferrous-Manganese Oxidizing Bacteria from the Nature Water

QIN Song-yan¹, MA Fang¹, HUANG Peng²

(1. Key Laboratory of Water Resources Utilization and Environmental Pollution Control, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. The National Engineering Research Centre for Urban Water & Wastewater, Tianjin 300074, China)

Abstract: Glass slides were hanged into a canal to acquire the ferrous-manganese oxidizing bacteria settled bio-film. Two isolated methods for ferrous-manganese oxidizing bacteria with special iron-manganese oxidizing matrix from the bio-film were tested. Element component of bacteria product and sheath structure of bacteria were analyzed. With two methods, plate cultivation and the novel semi-solid *in situ* cultivation method, strains belong to Family *Leptothrix* were isolated. XRF showed that the amorphous iron and manganese were two major metal elements of the precipitation formed by one strain of *Leptothrix* spp. . Through the microscope observation, one strain of Family *Leptothrix* was determined to form branch-like structured sheath, while another strain formed spider web-like structured sheath. Those isolated bacteria provide model strains for future testing of FISH probe and PCR primer of ferrous-manganese oxidizing bacteria.

Key words: ferrous-manganese oxidizing bacteria; semi-solid agar; *in situ* cultivation method

含铁、锰过高的水, 给饮用和工业应用带来严重问题. 铁-锰氧化细菌能去除水质中高铁、高锰达到水质净化的目的. 铁-锰氧化细菌通过氧化作用, 使二价溶解态铁离子沉淀为三价铁氧化物, 锰由二价被氧化至四价^[1,2]. 国内对铁锰氧化细菌的研究以生物矿化为主, 如中度嗜热氧化亚铁细菌应用于难处理铜矿矿浸出^[3]. 对中性水体中铁锰氧化细菌的研究着重于对鞘细菌的分离, 如李惠珍等^[4]对水库中的水样直接分离得到 *Leptothrix* 及 *Sphaerotilus* 属 2 株细菌. 国外科学家已分离出 *Gallionella ferruginea* 和 *G. sphaerotilus* 等菌属^[5~7]. 在自然水体里, 除鞘铁细菌以外, 还存在着的种类丰富的铁-锰氧化细菌, 目前国内对此类细菌的研究较少.

发生在德国 Oder 河内水体与土壤之间的铁锰元素循环的独特现象^[8], 为研究铁-锰氧化细菌提供了对象. Oder 河谷低洼地区地质结构中具有褐铁矿石层, 冬天河水淹没此区域时溶解吸收铁锰离子, 夏

季河水流回主河道时氧化释放铁锰离子, 因此该河流中存在完整的促进铁锰氧化还原循环的微生物体系^[9]. 迄今为止, Oder 河中的铁-锰氧化细菌还未曾被分离研究过. 因 Oder 河所在纬度和温度与中国北方相近, 通过分离 Oder 河中的铁-锰氧化细菌并对其氧化铁锰的形态进行观察, 对中国北方中性水体中铁锰元素的生物地质化学循环及饮用水除铁锰有着启示作用.

本研究通过获取 Oder 河含铁锰的生物膜, 采用新的分离方法对该生物膜进行细菌分离并测定 16S rRNA 序列, 对细菌形成的氧化物成分进行了元素分析, 并确定细菌氧化铁锰时的形态.

收稿日期: 2007-10-08; 修订日期: 2007-12-10

基金项目: 德国教育与科研部(BMBF)项目(10030265)

作者简介: 秦松岩(1978~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境生态和水污染控制, E-mail: qinsongyan@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: mafang@hit.edu.cn

1 材料与方法

1.1 培养基

选择性培养基不仅要能够成功分离目标培养物,而且要实现后续的转接及纯化.为了尽可能多地分离出 Oder 河的铁锰氧化细菌,本实验采用了 4 种培养基,为铁细菌 1 号培养基,铁细菌 2 号培养基,无机培养基,R2A 改良培养基.

铁细菌 1 号培养基(g/L): 琼脂 15; Peptone 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; $(\text{NH}_4)_3\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ 0.2; CaCl_2 0.05; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05.

铁细菌 2 号培养基(g/L): MnCO_3 2.0; 牛肉膏 1.0; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 0.2; 柠檬酸钠 0.15; 酵母膏 0.075; Vitamin B12 5.0×10^{-6} .

R2A 改良培养基(g/L): 琼脂 15; 酵母提取物 0.5; Proteose Peptone 0.5; Casamino Acids 0.5; Pyruvic Acids 0.5; glucose 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05; K_2HPO_4 0.3; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05; $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 0.2; Tween80 1 mL;

无机培养基(g/L): 琼脂 15; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1; CaCl_2 0.24; KH_2PO_4 0.3; NH_4Cl 0.3; Vitamin B₁₂ 10.0×10^{-6} ; SL9 1 mL.

培养基的配制方法为:将各个培养基除亚铁盐外的成分溶于 1 L 蒸馏水,磁转子均匀搅拌后调 pH 7.2,121℃灭菌 20 min.将亚铁盐溶液经 0.2 μm 滤膜过滤(DynaGard, USA),待培养基冷却至 50℃时加入,再次短暂搅拌后倒入平板.

1.2 含铁生物膜的获取和分离

将载玻片(7.5cm $\times$ 2.5cm)插入自制的悬吊载玻片架(圆形, D 8.5 cm, H 6.5 cm, 14 插孔),经高温灭菌后悬吊入 Oder 河中,悬挂深度为 0.5 m.1 个月取出,载玻片表面覆盖一层厚约为 1 mm 的红棕色生物膜.将载玻片插入盛满河水的 50 mL 离心管内,置于 4℃温度条件下,于 4 h 内进行分离.

采用稀释平板涂布法对生物膜细菌进行直接分离.将生物膜从载玻片上刮下,收集入 1 mL 的 EPPI 管中,加蒸馏水至 1 mL 混匀后进行梯度稀释,取 1/100及1/100 0稀释比水样 100 μL 进行平板分离.

1.3 原位培养法

本实验采用自主创新的原位培养法对菌株进行分离,其关键是使用半固态培养基,即该培养基在室温下应处于半固态半流动的状态.此方法要点为:在被割离了生物膜的相应载玻片上覆盖半固态培养基

进行原位培养,采用无菌牙签将载玻片上形成的目标菌落接入无菌的 1 $\times$ PBS,混匀,取 100 μL 进行平板涂布分离.

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列测定及系统发育分析

采用 Fast DNA[®] SPIN Kit for Soil 试剂盒,进行细菌基因组 DNA 的提取.16S rDNA 的扩增采用 Pf: 27f (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), Pr: 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') 作为引物. PCR 反应体系(50 μL)为: dNTP(5 mmol/L)2.5 μL , 10 $\times$ BufferA 5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L)2 μL , Pf(20 pmol/ μL)和 Pr(20 pmol/ μL)各 1 μL , BSA(10 mg/mL)1.5 μL , 模板 DNA 1 μL , Taq 酶(1 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$)0.75 μL , PCR 高纯水 36.25 μL . PCR 程序如下: ①94℃ 5 min; ②94℃ 30 s, 58℃ 2 min, 72℃ 2 min; ③第 2 步循环 30 次; ④72℃ 10 min.使用日立 3130XL 测序仪对 PCR 产物进行测定.将测序所得的 16S rDNA 序列在 NCBI 核酸序列数据库中进行序列同源性比较,通过 BioEdit 和 MEGA 等软件进行多重序列比对分析,并以 Neighbor Joining 法构建系统发育树,分支聚类的稳定性用 Boot strap 方法进行评价.

1.5 细菌产物的化学组成分析

使用传统的扫描电镜和元素分析探测器及电子束微探针针对产物的元素组成进行分析.样品的准备步骤如下: ①样品在 3.7% 甲醛溶液 4℃下固定 1.5 h; ②固定后的样品在从 10% ~ 99.5% 共 10 个梯度,每梯度增加 10% 的丙酮溶液中进行脱水,每个梯度脱水 5 min; ③10℃下在临界点干燥仪内进行乙醇与液体二氧化碳的置换; ④85 bar, 40℃下在临界点干燥仪内干燥; ⑤将样片待检面向上粘贴在扫描电镜样品台上.制备完的样品置于干燥皿内待检.场强发射器加速电压为 20 kV,由 SAMx(IDFIX-Programm) 软件接收形成的图像.

1.6 细菌氧化铁锰的形态观察

取已形成明显铁锰氧化物的培养物 20 μL , 置于载玻片上,风干后滴加 20 μL 浓度为 10 mg/L 的 Propidium iodide, 在黑暗处染色 10 min 后,将 Propidium iodide 吸出,用高纯水清洗后风干,加入几滴 Citifluor 抗褪变剂后盖上载玻片,在 Axioskop ZEISS 荧光显微镜下观察.

1.7 取样点水质检测

对取样点进行 GPRS 定位,并对水体表面及 1 m 深处进行温度、pH、溶解氧、电导率、清澈度等物理参数进行现场测定.

2 结果与分析

2.1 取样点特征

取样点的 GPS 位点为 N53.07°, E14.20°, 为主河道一小支流末端的泵站, 主河道与该支流形成一横置丫字型, 该泵站处于丫字型的左下角. 近岸边长有以金莲花、睡莲、浮萍、水芹等水生植物, 可见水质优良, 清澈度为 0.7 m. 由表 1 水质参数可见, 该河水质为一级.

表 1 Oder 河水质参数

Table 1 Water quality parameters of river Oder

取样点参数	表面	1 m 深
电导率/ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	678	672
pH	8.08	7.86
溶解氧/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	5.30	3.49
温度/ $^{\circ}\text{C}$	25.5	24.2
氧化还原电位/mV	212	
溶解性有机碳(DOC)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	9.5	
总有机碳(TOC)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	9.7	

2.2 生物膜形态观察

显微镜放大 1000 倍下可清楚观察到载玻片上经微生物作用而形成的铁锰氧化沉淀(如图 1 所示), 其中圆形中空外围棕色是铁锰氧化沉淀聚集的微生物聚集体. 图 2 为将生物膜从载玻片上刮离后残留在载玻片上的铁细菌, 该细菌不似其它铁锰细菌在菌体内部或外围直接形成铁锰的积累沉淀, 而是以菌体为核心, 在离菌体约几 μm 的距离构建成鸟巢状的铁锰氧化物沉淀, 且铁锰氧化物与菌体毫无接触.

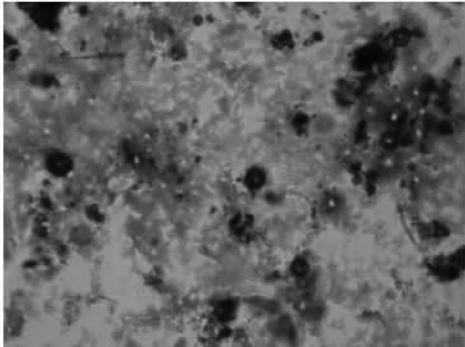


图 1 生物膜上圆形中空铁锰氧化物沉淀

Fig.1 Iron and manganese hydroxides deposition in the river bio-film

2.3 不同培养基分离效果的比较

在所有培养基中铁细菌 1 号培养基形成的菌落数最多为 243 个, 但全部为无色或蛋黄色菌落, 没有形成具有铁锰氧化特征的菌落. 其次为铁细菌 2 号

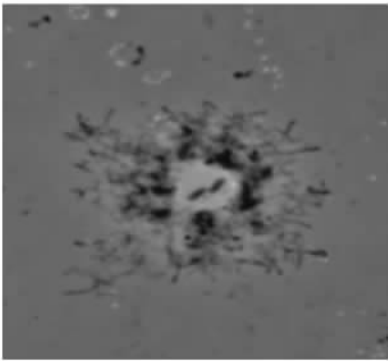


图 2 残留在载玻片上的未知铁细菌

Fig.2 Unknown iron bacteria in the object slide

培养基, 形成的菌落以棕黑色为主, 具有明显铁锰氧化特征的菌落数为 174 个. 在无机培养基上形成的红棕色铁氧化特征的菌落数为 40 个. R2A 改良培养基形成的铁锰氧化特征的菌落数为 34 个. 将铁锰氧化菌落进行相应的培养基转接, 只有铁细菌 2 号培养基能够转接成功, 菌落继续生长. 由此可确定铁细菌 2 号培养基可用于该生境下铁锰细菌的分离.

培养基所用的铁源对所收获的菌株种类及分离效率存在影响. 铁细菌 1 号培养基中铁源为三价铁离子, 在实验中没有分离出真正的铁氧化细菌, 观察到很多细菌在生长初期只形成无色菌落, 随着对柠檬酸铁铵中 C、N 的消耗利用, 逐渐显现出对铁离子的沉淀能力, 将该种类细菌转接到铁细菌 2 号培养基中, 无法再形成棕褐色铁锰氧化沉淀, 可以推断, 铁细菌 1 号培养基中形成棕色菌落的细菌, 实际上并非铁氧化细菌, 而是铁沉淀细菌.

后续的实验发现, 二价铁离子在液体培养基中容易氧化形成沉淀, 而在固体及半固体培养基中则保持稳定, 这与 Jones^[10]的实验现象一致. 本实验所得的铁锰氧化细菌在铁离子保持二价的铁细菌 2 号固体培养基中, 形成具有明显铁锰氧化物特征的棕黑色菌落.

2.4 铁细菌 2 号培养基对铁锰细菌的分离

将铁细菌 2 号培养基上的棕黑菌落小心转接到新培养基, 纯化 5 次后得到 30 株纯菌, 依据菌落形态选取其中 2 株具有较大铁锰沉淀直径的细菌, 分别为 BB1 和 BB3, 进行测续. 菌株 BB1 形态如图 3 所示, 菌株 BB3 形态见图 4.

通过 NCBI 检索得到和菌株 BB1、BB3 相近的相关参比菌株, 利用 BIOEDIT 和 PHYLIP 等软件, 以 Neighbor Joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树, 如图 5

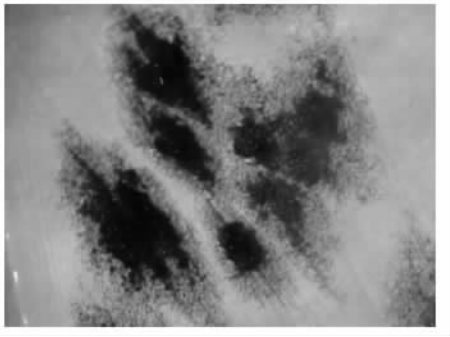


图 3 BB1 菌落形态
Fig.3 Colony morphology of strain BB1

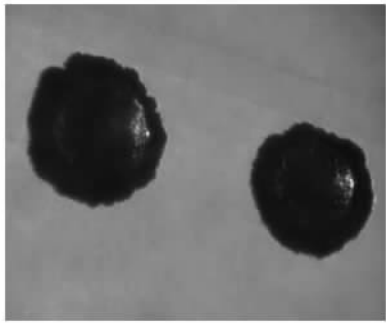


图 4 BB3 菌落形态
Fig.4 Colony morphology of strain BB3

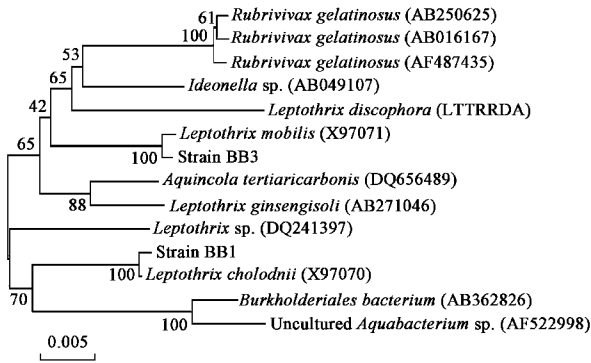


图 5 基于 16S rDNA 序列同源性用邻位法构建的菌株 BB1、BB3 和亲源性接近的及其他细菌的系统发育树
Fig.5 Unrooted phylogenetic trees based on the partial 16S rDNA sequences of strain BB1, BB3 and related bacteria

所示.从中可以看出,菌株 BB1 和 *Leptothrix cholodnii* 在同一发育分支中,二者的 16S rDNA 序列的相似性为 99%,菌株 BB3 和 *Leptothrix mobilis* 在同一发育分支中,二者的 16S rDNA 序列的相似性为 99.16%.

2.5 菌株 BB3 的氧化物化学组成分析

将菌株 BB1 和 BB3 转接入铁细菌 2 号培养基中进行培养,24 h 后在培养液内形成菌膜,溶液由棕

黄色变为红棕色.48 h 后在培养瓶壁上黏附棕色胞外聚合物,有明显黑棕色沉淀出现.72 h 后,培养液已变成深棕色,同时大量的棕黑色沙状物质沉淀在瓶底.取 BB3 的氧化沉淀物进行元素组成分析.

从图 6 可以看出,棕黑色沉淀物主要由细菌及其胞外聚合物组成.从图 7 的 XRF 分析可知,胞外聚合物的元素组成主要为铁和锰,但在 XRF 图谱上没有形成明显的晶体峰^[11],故推测铁锰氧化物为无定形.即 2 株菌可同时催化氧化二价可溶铁锰至棕黑色沉淀,氧化物以 $\text{Fe}(\text{OH})_4^{-2}$ 和 $\gamma\text{-MnOOH}$ 形式存在^[12],这和研究者^[13,14]研究结论相一致.

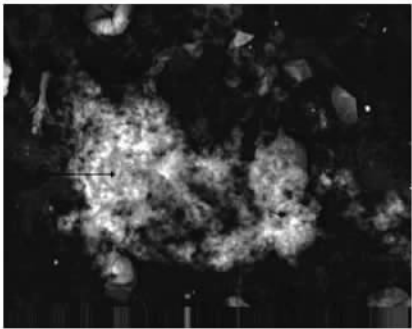


图 6 BB3 生成的沉淀扫描电镜图
Fig.6 SEM photo of precipitation produced by BB3

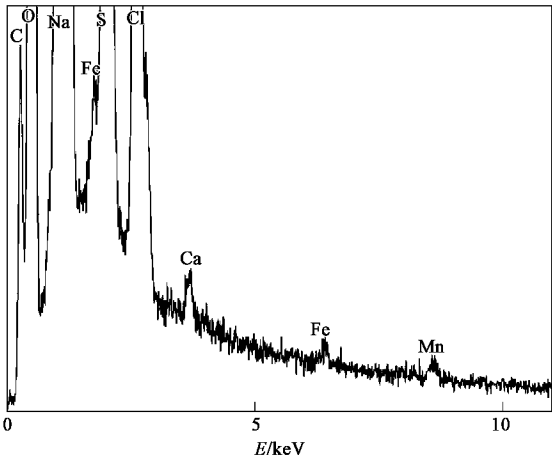


图 7 BB3 生成的沉淀 XRF 分析图谱
Fig.7 Chemical spectrum of precipitation produced by BB3

2.6 菌株 BB1 和 BB3 氧化铁锰的形态

图 8 为 BB1 在铁细菌 2 号培养基中培养 72 h 的光学显微镜相片:从中可见,BB1 形成了复杂有组织的由若干分支单元相连的网状结构,绝大多数分支单元由 4 个鞘分支组成,似树枝状,并且大部分分支单元上已覆盖铁锰氧化物,在光学显微镜下看不到游离的细菌.但从图 9 中却可清楚看到,在新形成

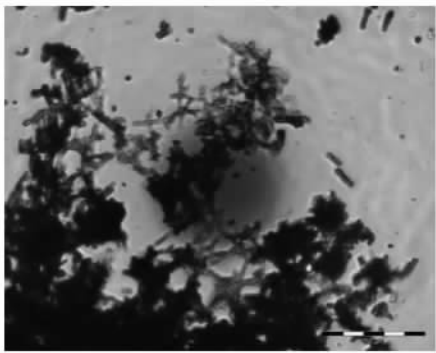


图 8 BB1 光学显微镜相片
Fig.8 Phase-contrast image of BB1

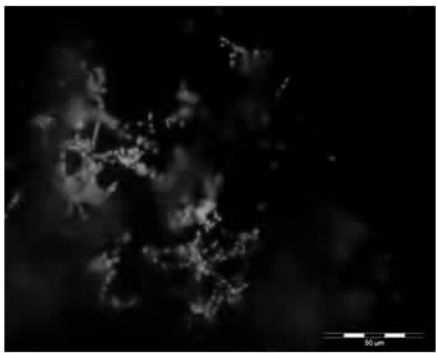


图 9 BB1 的 Propidium iodide 染色相片
Fig.9 Propidium iodide staining image of BB1

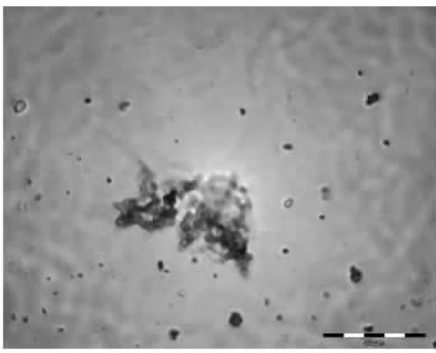


图 10 BB3 光学显微镜相片
Fig.10 Phase-contrast image of BB3

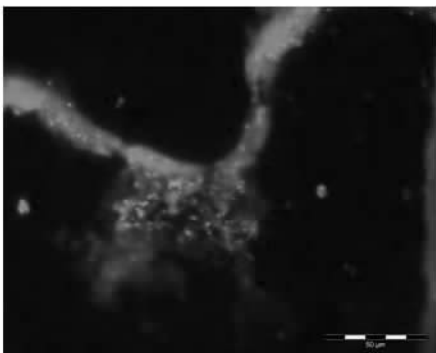


图 11 BB3 的 Propidium iodide 染色相片
Fig.11 Propidium iodide staining image of BB3

的正在进行铁锰氧化的鞘分支内生存着链状短杆菌.在铁锰氧化物覆盖的鞘内没有观察到细菌有 2 种可能,第 1 种可能为铁锰氧化物阻挡了 Propidium iodide 穿过鞘进入细菌内,从而无法和细菌的 DNA 相结合发出荧光;另 1 种可能为覆盖铁锰氧化物的鞘体为老龄鞘体,细菌完成铁锰氧化后游离出鞘.图 10 为 BB3 在铁细菌 2 号培养基中培养 72 h 的光学显微镜相片,从中可以看出 BB3 产生的铁锰氧化物明显少于 BB1,且形成的鞘结构类似蛛网状,完全不同于 BB1.从图 11 中可见,细菌并未以链状相连,而是以短杆状单细胞存在于鞘内.

2.7 半软性铁细菌 2 号培养基的分离效果

将已刮下生物膜的载玻片用 20℃ 的半软性培养基覆盖培养,以期培养出图 2 所示的未知铁细菌.经过 72 h 在载玻片表面形成很多棕黑色单菌落.在体视显微镜下观察,有红棕色中空外圆的铁氧化沉淀菌落出现,如图 12 所示.该菌落的形态及形成菌体外远距离铁氧化物沉淀与图 2 所示的未知铁细菌有相似之处,将其进一步分离得到如图 13 所示单菌

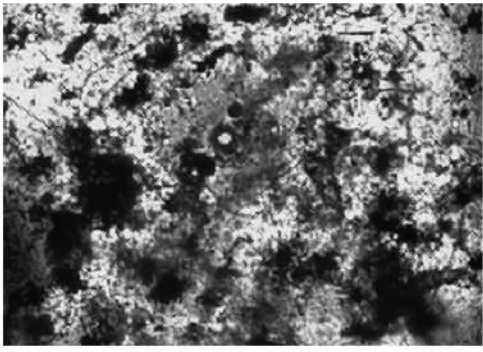


图 12 半固体培养基原位培养出的未知菌落形态
Fig.12 Unknown colonies under *in situ* cultivation method with semi-solid medium

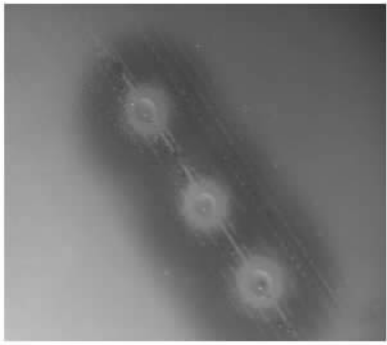


图 13 在图 12 中所示细菌的纯培养物形态
Fig.13 Pure culture of the unknown colony in Fig.12

落,命名为 BB11.经 16S rDNA 测序后通过 NCBI 数据库 blastn 得知菌株 BB11 与丛毛单胞菌科 *Comamonadaceae bacterium* MWH55 相似性为 98%.

Comamonadaceae bacterium MWH55 是 1 株尚未确定种的新菌种,所以推测 BB11 也是 1 株新菌种,但 BB11 是否为图 2 所示细菌还有待进一步确定.虽然 BB11 可在培养基表面离菌体一定距离外形成规则的圆形铁锰沉淀区域,但在液体培养基内却无法培育出图 2 所示氧化铁锰的状态,怀疑或者是实验室无法营造出自然界河流内部的微环境,或者是它们为不同细菌,虽有着相似的铁锰氧化状态却不同的氧化机理.图 13 所示细菌可能产生胞外酶使菌体外围三价铁氧化物溶解,而图 2 所示细菌则可能将二价铁离子氧化后先形成移动态三价铁离子作为初级产物,而移动态三价铁离子离开菌体后在河流内部自然生态环境下被沉淀^[14].

可以确定的是图 2 及图 13 所示细菌均非鞘细菌,不能像文中所述的鞘细菌纤发菌属那样随着鞘的延伸氧化铁锰^[15].但它们是如何在体外氧化铁锰还需进行深入研究,这对能够在细胞外部形成特定氧化物聚集体外壳的细菌具有重要意义,因为在研究中已经发现,某些固相梯度氧化的微生物形成的氧化物聚集体外壳最终成为自己坟墓,这或许是此类细菌必须克服的来自生境的挑战^[16].

3 结论

(1)采用铁细菌 2 号培养基可以成功分离出 2 株菌,经 16S rDNA 序列及系统发育地位分析确定为 *Leptothrix chlodonii*(99%)及 *Leptothrix mobilis*(99%),2 株菌序列为设计针对 Oder 河 *Leptothrix* 菌属的 FISH 探针及 PCR 引物提供了关键数据.

(2)通过 XRF 对 *Leptothrix mobilis* 的氧化物进行元素分析,证明 *Leptothrix mobilis* 可氧化生成无定形的铁和锰氧化物.

(3)对 *Leptothrix chlodonii* 和 *Leptothrix mobilis* 在液体培养基中培养物观察确定 *Leptothrix chlodonii* 形成树枝状分支鞘结构,而 *Leptothrix mobilis* 形成蛛网状分支鞘结构,为后续的 Oder 河生物膜形态观察提供理论依据.

(4)原位培养法可以有效分离具有特定铁锰氧化物结构的铁细菌.基于此法,1 株序列与 *Comamonadaceae bacterium* MWH55 相似的细菌被成

功分离.

致谢:感谢德意志学术交流中心(DAAD)对人员费用的资金支持,及德国教育与科研部(BMBF)对该项目科研费用的投入.感谢柏林工业大学的同事们对作者在德国期间工作上的帮助.

参考文献:

- [1] Nortimer P S, Heinz S, Hans G T, et al. The Prokaryotes A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1997, 4102-4107.
- [2] Ghiorse W C. Biology of iron and manganese depositing bacteria [J]. Ann Rev Microbiol, 1984, 38(10): 515-550.
- [3] 骆海朋,杨秀山.中度嗜热氧化硫细菌及中度嗜热氧化亚铁细菌在难处理铜精矿浸出中的应用[J].湿法冶金,2003,22(2): 79-81.
- [4] 李惠珍,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.
- [5] Emerson D, Revsbech N P. Investigation of an iron-oxidizing microbial mat community located near Aarhus, Denmark: field studies [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(11):4022-4031.
- [6] Dmitri S, Eric E R. Suboxic Deposition of Ferric Iron by Bacteria in Opposing Gradients of Fe(II) and Oxygen at Circumneutral pH [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(3):1328-1334.
- [7] Saroj K S, Branislav P, Schippers J C. Biological iron removal from groundwater: a review [J]. Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA, 2005, 4: 239-246.
- [8] Hopf Silke. Biofilme des Auengebietes "Unteres Odertal" und deren Beeinflussung durch Arzneimittel [D]. Berlin: Technical University of Berlin, 2004. 1-2.
- [9] Szewzyk U. Umweltbiotechnologie Unteres Odertal [D]. Berlin: Technical University of Berlin, 2005. 4-5.
- [10] Jones J G. A note on the isolation and enumeration of bacteria which deposit and reduce ferric iron [J]. J Appl Bact, 1983, 54: 305-310.
- [11] Barbic F, Comic L, Pljakic E. Iron and manganese bacteria populations in groundwater sources [J]. European Wat Management 2000, 3: 26-30.
- [12] Ralph D E, Stevenson J M. The role of bacteria in well clogging [J]. Wat Res, 1995, 29: 365-369.
- [13] Ioannis A K, Anastasios I Z. Biological treatment of Mn(II) and Fe(II) containing groundwater: kinetic considerations and product characterization [J]. Water Res, 2004, 38(7):1922-1932.
- [14] Diem D, Stumm W. Is dissolved Mn²⁺ being oxidized by O₂ in the absence of Mn-Bacteria or surface catalysts? [J]. Geochim Cosmochim Acta, 1984, 48: 1571-1573.
- [15] Zakharova Y R, Parfenova V V. A method for cultivation of microorganisms oxidizing iron and manganese in bottom sediments of Lake Baikal [J]. Biology Bulletin, 2007, 34(3): 236-241.
- [16] Emerson D, Moyer C. Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH [J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(12):4784-4792.