

高效生物除铁除锰工程菌 MSB - 4 的特性研究

赵 焱¹, 李 冬², 李相昆¹, 吴小莉¹, 张 杰^{1,2}

(1 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2 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 100022)

摘 要: 采用贫营养培养基,从运行多年的生物除铁除锰水厂的跌水曝气池壁上筛选获得了生物除铁除锰菌种 MSB - 4。16S rDNA 的测序表明,菌株 MSB - 4 为金黄杆菌属,同源性为 99%。MSB - 4 是具有除铁除锰功能的好氧菌,具有异染颗粒、类脂粒,易形成菌胶团。除锰最适温度为 8 ~ 12 ℃,最适 pH 值为 8,少量的 Fe^{2+} 对 Mn^{2+} 的去除具有明显的促进作用。在模拟高锰高铁地下水环境 (即水温为 12 ℃, pH 值为 7.5, Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的初始浓度分别为 5.6 mg/L 和 14 mg/L) 中,菌株 MSB - 4 于 48 h 内对 Mn^{2+} 的去除率达 94.44%,对 Fe^{2+} 的去除率达 90%。该工程菌株的获得将为高效生物除锰滤池的构建,及生物除铁除锰水厂的快速启动提供有力的技术支持。

关键词: 生物除锰; 生物除铁; 高效工程菌; 分离鉴定; 16S rDNA

中图分类号: TU991 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 4602 (2009) 01 - 0040 - 05

A Highly Effective Engineering Strain MSB-4 for Biological Removal of Iron and Manganese

ZHAO Yan¹, LI Dong², LI Xiang-kun¹, WU Xiao-li¹, ZHANG Jie^{1,2}

(1 School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2 Key Lab of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: Using poor nutrient culture media, a highly effective engineering strain MSB-4 for biological removal of iron and manganese was isolated from the wall of aeration tank in a water treatment plant with biological removal of iron and manganese which has operated for many years. The result of 16S rDNA sequencing shows that the MSB-4 belongs to *Chryseobacterium*, and the homology is 99%. The MSB-4 is an aerobe, has metachromatic granules and lipid granules, and easily forms zoogloea. The optimal temperature for manganese removal is 8 to 12 ℃, and the optimal pH value is 8. A small quantity of Fe^{2+} can promote Mn^{2+} removal. When simulating the high iron and manganese groundwater conditions, that is, 12 ℃, pH of 7.5 and the initial concentration of Mn^{2+} and Fe^{2+} being 5.6 mg/L and 14 mg/L respectively, the removal rates of Mn^{2+} and Fe^{2+} are 94.44% and 90% respectively within 48 h. The isolation of MSB-4 provides the powerful technical support for the construction of highly effective filter for biological manganese removal, and for the fast startup of water treatment plants with biological removal of iron and manganese.

Key words: biological manganese removal; biological iron removal; highly effective engineering strain; isolation and identification; 16S rDNA

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50578001)

生物固锰除锰技术自 1996年提出以来^[1,2],其在工程应用和理论研究方面都有了新的发展^[3-5]。针对不同水质,该技术均有良好的除铁除锰效果,沈阳市开发区、黑龙江省兰溪镇及佳木斯市的生物除铁除锰水厂相继采用该技术取得了满意的铁、锰去除效果,同时对滤池运行工艺参数及生物滤池中铁、锰的去除关系均有了深入研究^[6-11]。然而,由于生物除锰技术基础理论研究欠缺,其在应用上仍有局限性。现有的生物滤池在建立之初细菌培养周期长,运行中一旦出现对滤层稳定性的严重破坏,则会造成滤池生化能力恢复周期较长,致使恢复期出水水质不合格,或以降低出水量为代价来保证出水水质。按现有手段建立的生物滤层中,对 Mn^{2+} 氧化能力较强的菌种的生态优势是靠滤池长时间运行自然选择形成的,整个滤层的生化能力相对偏低。若能获得高效生物除锰功能菌种,构建复合生物除锰菌群,并将其投加到生物除铁除锰滤池中进行生物强化,必将增强生物滤层的生化能力,为建立高效的生物除锰水厂提供有力的技术支持。

笔者从运行稳定的生物除铁除锰水厂的跌水曝气池壁上取样,进行了高效除铁、除锰工程菌种的分离及除锰性能研究,以期复合功能菌群的构建及生物滤池的生物强化提供有力保证。

1 材料与方法

1.1 生物除锰菌的筛选及生理生化测试

取样点:哈尔滨市运行多年的生物除铁除锰水厂的跌水曝气池壁。筛选采用的培养基:蛋白胨为 0.8 g/L,酵母浸膏为 0.2 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 为 0.1 g/L, K_2HPO_4 为 0.1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 0.2 g/L, $NaNO_3$ 为 0.2 g/L, $CaCl_2$ 为 0.1 g/L, $(NH_4)_2CO_3$ 为 0.1 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 0.01 g/L。培养基于 121

下灭菌 20 min。菌种的初筛:TMPD法^[12]。菌种的生理生化试验参考文献[13]。菌种的形态特征观察:普通光学显微镜与原子力显微镜相结合。

1.2 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的测定方法

Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 浓度分别采用过硫酸铵法和二氮杂菲法^[14]测定。

1.3 生物除锰菌的 16S rDNA 测序方法

采用纯菌基因组 DNA 小量提取试剂盒提取总 DNA,以真菌的 16S rDNA 通用引物 BSF8/20 和 BSR1541 扩增该菌的 16S rDNA 后,将其连接到 pMD18 - T 载体中,转化至大肠杆菌 DH5 α ,氨苄抗

性及 PCR 扩增证明目的片段已与载体整合并转化到受体中后,提取质粒进行测序。

通过 Blast 软件,将获得的序列与 GenBank 进行比对,并下载最相近的序列,以 phylip 软件包同已经获得的序列按最小相邻法 (NJ) 构建系统进化树,以 TreeView 输出。通过 RDP 数据库寻找最相近的种属,进一步进行生理生态学分析。

2 试验结果

采用平板划线法与平板涂布法相结合,通过 TMPD 法^[12]对分离所得菌种进行初筛,获得具有除锰能力的菌株 MSB - 4。

2.1 菌株 MSB - 4 的鉴别特征

2.1.1 MSB - 4 的形态特征

该菌株细胞单个或成簇排列生长,短杆状,两端钝圆,长为 1.5 ~ 2 μm ,宽为 0.8 ~ 1.1 μm 。该菌种常多个细菌聚集,链状排列,易形成菌胶团,具有共同的荚膜;具有异染颗粒和类脂粒,无芽胞, TMPD 染色呈阳性。其单个细胞形态分别见图 1 和图 2。

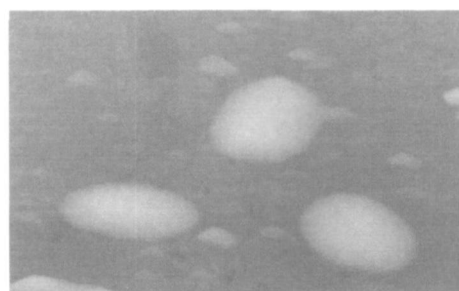


图 1 菌株 MSB - 4 的原子力显微镜二维照片

Fig 1 Two-dimensional view of strain MSB-4 measured with atomic force microscope

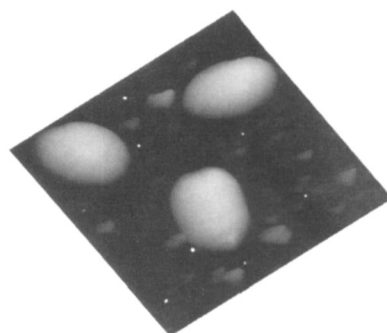


图 2 菌株 MSB - 4 的原子力显微镜三维照片

Fig 2 Three-dimensional view of strain MSB-4 measured with atomic force microscope

2.1.2 MSB - 4 的生理生化特征

生理生化试验表明,菌株 MSB - 4 是典型的好

细菌,在 4~37℃ 下均可生长,最适生长温度为 20℃;可在偏碱性环境 (pH 值为 7~10) 中生长,最佳生长 pH 值为 8;具有氧化酶和淀粉酶,分解利用脂肪、葡萄糖的能力较差;具有硝酸盐还原酶,即该菌可能具有将硝酸盐还原为亚硝酸盐或氮的能力。

2.2 MSB - 4 的除铁除锰代谢特征

2.2.1 温度对 MSB - 4 去除锰的影响

向 200 mL 的 MSB - 4 培养液中加入 15 mg/L 的 Mn^{2+} ,分别在 4、9、15、25、35℃ 下培养 48 h,离心后测定上清液中的 Mn^{2+} 浓度,结果见图 3。

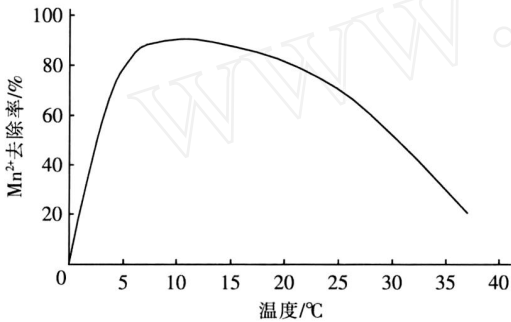


图 3 温度对 MSB - 4 除锰效果的影响

Fig 3 Influence of temperature on manganese removal by MSB-4

由图 3 可知,菌株 MSB - 4 在低温下的除锰效果较好,在 8~12℃ 时 MSB - 4 对 Mn^{2+} 的去除率较高 (>90%),这可能与低温条件下除锰菌所产生的某些抗低温物质有关。

2.2.2 pH 对 MSB - 4 去除锰的影响

向 200 mL 的 MSB - 4 培养液中加入 15 mg/L 的 Mn^{2+} ,改变培养液的 pH,培养 48 h 后测定上清液中的 Mn^{2+} 浓度,结果见图 4。

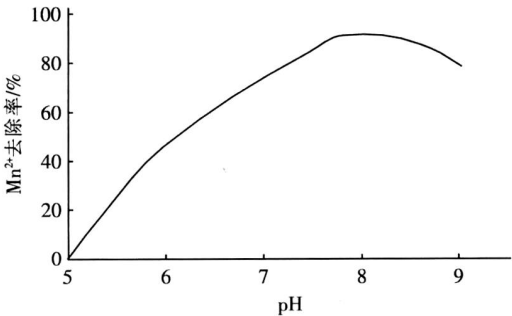


图 4 pH 对 MSB - 4 除锰效果的影响

Fig 4 Influence of pH value on manganese removal by MSB-4

由图 4 可知,随着 pH 的升高,菌株 MSB - 4 对锰的去除率先升高后降低,在 pH 值为 8 时除锰效

果最好 (除锰率达 90% 左右)。由此可知,该除锰菌的最适 pH 值略高于地下水的。

2.2.3 金属离子对 MSB - 4 去除锰的影响

向 MSB - 4 培养液中分别加入 5 mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 和 Hg^{2+} ,同时设正常培养为对照,在 pH 值为 7.5、温度为 12℃ 的条件下培养 48 h 后测定上清液中的锰离子浓度。结果表明, Zn^{2+} 和 Hg^{2+} 对除锰过程无直接影响, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 和 Mg^{2+} 对 MSB - 4 的除锰效果具有一定的促进作用,其中 Fe^{2+} 的促进作用最为明显 (见图 5)。

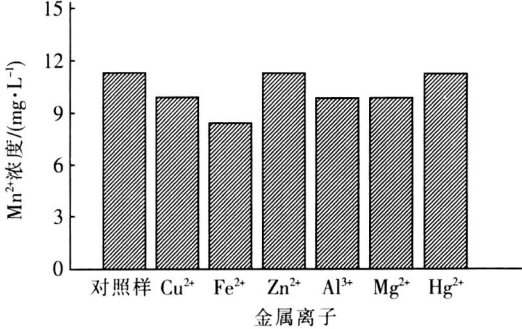


图 5 金属离子对 MSB - 4 除锰效果的影响

Fig 5 Influence of metal ion on manganese removal by MSB-4

2.2.4 模拟地下水环境中的同步去除铁、锰

在上述研究结果的基础上,模拟高铁高锰地下水水质,采用低温、中性、偏碱贫营养培养基培养 MSB - 4,考察其除铁除锰性能。将 MSB - 4 在贫营养选择培养基为 12℃ (pH 值为 7.5) 下培养 48 h 后,分别向培养液中加入 5.6 mg/L 和 14 mg/L 的 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} ,每隔 12 h 取一次水样,监测 72 h 内对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 的去除情况,结果分别见图 6、7。

由图 6 可知,随着培养时间的延长,MSB - 4 菌株对 Mn^{2+} 的去除率不断升高,至 24 h 时对 Mn^{2+} 的去除率达 80% 左右;培养 48 h 后 Mn^{2+} 去除率趋于稳定 (最高去除率达 94.44%)。由图 7 可知,在 12 h 内,MSB - 4 对 Fe^{2+} 的去除率迅速升高 (Fe^{2+} 去除率高达 81%), Fe^{2+} 浓度由 14 mg/L 降至 2.66 mg/L;培养 48 h 时,对 Fe^{2+} 的去除率达到最高 (90% 左右);而后随着培养时间的延长,对 Fe^{2+} 的去除率却不断降低。分析认为此时培养体系中营养消耗殆尽,细胞生长整体处于衰退期,细菌的繁殖能力和活性均较差,同时,铁、锰氧化形成的沉淀物像“壳”一样将细菌包裹起来,阻碍了细菌对 DO 的摄入,使壳内细菌生长环境呈缺氧状态,从而导致细菌分解部

分含铁氧化物,以获取所需的氧。前期试验结果表明,细菌对 Fe^{2+} 的利用先于 Mn^{2+} ,此时若在培养体系中加入新鲜培养液,则菌体繁殖速率加快,除铁活性会迅速恢复。

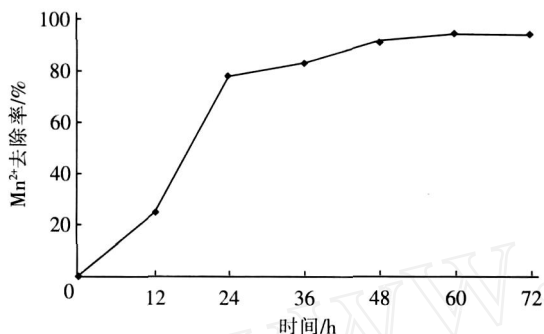


图 6 菌株 MSB - 4 对 Mn^{2+} 的去除率随培养时间的变化

Fig 6 Variation of Mn^{2+} removal rate with time

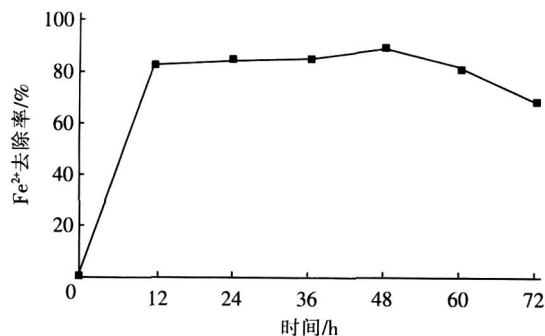


图 7 菌株 MSB - 4 对 Fe^{2+} 的去除率随培养时间的变化

Fig 7 Variation of Fe^{2+} removal rate with time

试验过程中曾向幼龄菌培养液中直接加入高浓度的铁、锰离子,结果发现该幼龄菌对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 的去除效果并不理想。分析认为,这可能是由于幼龄菌的菌体胞外粘液层尚未形成,对高浓度铁、锰的抵抗性能较差,导致铁、锰离子直接侵入细胞内部,对菌体细胞的生长产生毒害所致。因此在培养初期通常加入较低浓度的铁、锰离子以刺激相应粘液层的分泌,待 36 ~ 48 h 菌体生长基本成熟后再加入高浓度的铁、锰离子,则可获得满意的去除效果。

2.3 MSB - 4 的 16S rDNA 菌种鉴定

通过对菌株 MSB - 4 进行 16S rDNA 序列分析,发现 MSB - 4 的序列长度为 1 515 bp,最相近的菌株为金黄杆菌属的 *Chryseobacterium* sp. TM3_8,同源率为 99%。同时,RDP 数据库分析也显示,该菌属于 *Chryseobacterium*。

将该菌与曾报道的除铁除锰菌属 (*Creno-*

thrix^[15]、*Gallionella*^[16]、*Flavobacterium*^[17]、*Bacillus*^[18]、*Pseudomonas*^[19]、*Sphingobacterium*) 的 16S rDNA 序列相对比,并采用 NJ 法构建系统进化树。结果显示,菌株 *Chryseobacterium* sp. MSB - 4 与已知除铁除锰菌群明显不属于同一类群,而与 *Sphingobacterium* sp. 具有较近的亲缘关系。

3 讨论

自 1996 年以来,生物除锰技术在工程应用方面已较为成熟,但对除铁除锰功能微生物的深入研究还较少。尽管能够介导铁、锰氧化和还原的细菌几乎分布在生物圈的各个角落,但许多菌的分离纯化却很困难。某些菌种(如 *Crenothrix* 和 *Gallionella*^[15,16])往往同时存在且营养要求极为相似,以致无法选择培养;某些菌需要共生菌,而有些菌(如 *Siderocapsaceae*^[20])在人工培养条件下不断变形以致显微镜下无法识别跟踪。因此,高效除铁除锰工程菌种的获得将具有深远的理论研究和工程应用价值。

Chryseobacterium 属的微生物大多具有荚膜,部分菌群嗜冷,功能多样,但该属尚无典型的生物除铁除锰菌株报道。此外菌株 *Chryseobacterium* sp. MSB - 4 与常见的除铁除锰菌种明显分属不同类群,而与鞘细菌 (*Sphingobacterium*) 具有较近的亲缘关系,因此该菌很可能为该属的一个新种。

Chryseobacterium sp. MSB - 4 的除铁除锰机理尚不明确,其对铁、锰的利用可能是一种生理性解毒,将铁、锰离子形成相应的金属化合物沉淀于胞外,以降低高浓度的铁、锰离子对生物生长的毒害作用;铁、锰离子也可能是作为激活剂,通过酶等胞外分泌物将其运输至胞内,进而参与胞内的系列酶促反应,其中铁离子可能与细胞色素及呼吸链有关;Hoshino 等^[21]发现, Mn^{2+} 还可作为一种酶促系列反应的促进剂,促使 *Chryseobacterium* sp. 胞内酶系将 1 - 脱氧 - D - 苏氨酸戊糖酮和 4 - 羟基 - L - 苏氨酸转化为机体内重要的营养物质——维生素 B6。

菌株 *Chryseobacterium* sp. MSB - 4 从常年低温的地下水环境中分离获得,地下水营养贫乏,对细菌的生长极具挑战性,*Chryseobacterium* sp. MSB - 4 易形成菌胶团,并具有异染颗粒、类脂粒等能源储藏结构,增强了细菌对低温、贫营养环境的耐受能力。同时,该菌的硝酸盐还原能力若被进一步证实,则该菌可能为一株多功能菌株,对含高氨氮、高铁、高锰地

下水的处理具有重要意义。

4 结论

采用平板划线与平板涂布技术相结合,利用贫营养培养基,从运行多年的生物除锰滤池曝气池壁上筛选获得了生物除锰菌种 MSB - 4。

对菌株 MSB - 4 的 16S rDNA 的测序表明,其 16S rDNA 序列与金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*) 的相似性为 99%,并与鞘细菌的亲缘关系较近。

MSB - 4 属于具有除铁除锰功能的好氧菌种,具有异染颗粒、类脂粒,易形成菌胶团,对外界不良环境的抵抗性较强。该菌株的最适除锰温度为 8 ~ 12 °C、最佳 pH 值为 8, Fe^{2+} 对锰的去除具有明显的促进作用。

在温度为 12 °C、pH 值为 7.5、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的初始浓度分别为 5.6 mg/L 和 14 mg/L 的条件下,MSB - 4 菌株于 48 h 内对 Mn^{2+} 的去除率高达 94.44%,对 Fe^{2+} 的去除率高达 90%。该功能菌株的获得将为高效生物除锰滤池的构建,及生物除锰工艺的快速启动提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] 张杰,戴镇生. 地下水除铁除锰现代观 [J]. 给水排水, 1996, 22(10): 13 - 16
- [2] 张杰,杨宏,徐爱军,等. 生物固锰除锰技术的确立 [J]. 给水排水, 1996, 22(11): 5 - 10
- [3] 李冬,张杰,陈立学,等. 生物除铁除锰在地下水处理厂的应用 [J]. 中国给水排水, 2004, 20(12): 85 - 88
- [4] 高洁,张杰. 地下水除铁除锰技术研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报, 2003, 19(5): 547 - 549
- [5] 张杰,李冬,陈立学,等. 地下水除铁除锰机理与技术的变革 [J]. 自然科学进展, 2005, 15(4): 433 - 438
- [6] 张杰,杨宏,李冬,等. 生物滤层中 Fe^{2+} 的作用及对除锰的影响 [J]. 中国给水排水, 2001, 17(9): 14 - 19
- [7] 李冬,杨宏,张杰. 生物滤层同时去除地下水中铁、锰离子的研究 [J]. 中国给水排水, 2001, 17(8): 1 - 5
- [8] 李冬,杨宏,陈立学,等. 空气氧化除 Fe^{2+} 理论与生物除 Fe^{2+} 除 Mn^{2+} 工艺技术研究 () [J]. 北京工业大学学报, 2003, 29(3): 328 - 333
- [9] 李冬,杨宏,陈立学,等. 空气氧化除 Fe^{2+} 理论与生物除 Fe^{2+} 除 Mn^{2+} 工艺技术研究 () [J]. 北京工业大学学报, 2003, 29(4): 441 - 446
- [10] 李冬,张杰,王洪涛,等. 生物除铁除锰滤池的快速启动研究 [J]. 中国给水排水, 2006, 21(12): 35 - 38
- [11] 张杰,曾辉平,李冬,等. 维生生物除铁除锰滤池持续除锰能力的研究 [J]. 中国给水排水, 2007, 23(3): 1 - 4
- [12] Vandenberghe J, de Beer D, Gernonpre R, et al. Manganese oxidation by microbial consortia from sand filters [J]. Microb Ecol, 1992, 24(1): 91 - 108
- [13] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验 [M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2002
- [14] APHA, AWWA, WPCF. 水和废水标准检验法 (第 15 版) [M]. 宋仁元等译. 北京:中国建筑工业出版社, 1985
- [15] Martin D, Stanley F, Eugene R. The Prokaryotes [M]. New York: Springer New York, 2006
- [16] Virginia A P, Ingallinella A M, Sanguinetti G. Removal of iron and manganese using biological roughing up flow filtration technology [J]. Water Res, 2005, 39(18): 4463 - 4475
- [17] Katsoyiannis IA, Zouboulis A I. Biological treatment of Mn() and Fe() containing groundwater: kinetic considerations and product characterization [J]. Water Res, 2004, 38(7): 1922 - 1932
- [18] Minna P, Pia N, Martti P, et al. Bioaccumulation of manganese oxides in industrial heat exchangers [J]. Geophysical Res, 2007, (9): 116 - 124
- [19] Gregory J D, Yifan E L, Bradley M T. Manganese() - oxidizing *bacillus* spores in guaymas basin hydrothermal sediments and plumes [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5): 3184 - 3190
- [20] Ron C, Bradley M T, Haygood M G. c-Type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1 [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(10): 3549 - 3555
- [21] Hoshino, Tatsuo, Tazoe, et al. Enzymatic production of vitamin B6 [P]. Japan: EP19990106676, 1999 - 10 - 20

作者简介:赵焱 (1977 -), 女, 黑龙江牡丹江人, 博士研究生, 研究方向为水恢复方略理论研究及环境分子生态学技术。

电话: 13703614096

E - mail: ZY_hit@126.com

责任作者:张杰

收稿日期: 2008 - 06 - 16