

# 自养型锰氧化菌富集及生物氧化锰降解双氯芬酸研究

翟俊<sup>1</sup>, 田雨<sup>1</sup>, 陈佳<sup>2</sup>, 张琨<sup>1</sup>

(1. 重庆大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045; 2. 重庆工商大学 废油资源化技术与装备教育部工程研究中心, 重庆 400067)

**摘要:** 双氯芬酸(DFC)作为一种难降解有机药物,在各种水体中已经被广泛检出。采用曝气生物滤柱富集并分离出自养型锰氧化菌,利用其制备的生物氧化锰作氧化剂,研究其对双氯芬酸的氧化降解动力学及pH值对氧化效果的影响。生物氧化锰的XRD分析结果表明,合成的锰氧化物呈弱结晶、无定形态,主要含有 $\text{MnO}_2$ 、 $\text{Mn}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Mn}_2\text{O}_3$ 和 $\text{MnOOH}$ 等成分。在pH值为2.0、2.8、3.8和5.0,DFC浓度为1 mg/L,生物氧化锰浓度为20 mg/L的条件下,反应2 h后对双氯芬酸的去除率分别为100%、100%、94.3%和83.4%,即双氯芬酸的降解率与pH值呈负相关,且在试验pH值范围内其降解符合一级反应动力学。可见,锰氧化菌及生物氧化锰经过适当的开发可成为一种新的低成本、低风险的去环境环境中双氯芬酸等新兴污染物的材料。

**关键词:** 自养型锰氧化菌; 生物氧化锰; 双氯芬酸; 反应动力学

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2018)07-0011-05

## Enrichment of Autotrophic Manganese Oxide Bacteria and Diclofenac Degradation by Biological Manganese Oxide

ZHAI Jun<sup>1</sup>, TIAN Yu<sup>1</sup>, CHEN Jia<sup>2</sup>, ZHANG Kun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment <Ministry of Education>, Chongqing University, Chongqing 400045, China; 2. Engineering Research Center for Waste Oil Recovery Technology and Equipment <Ministry of Education>, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

**Abstract:** Diclofenac (DFC), a kind of refractory organic pharmaceuticals, is commonly detected in different aquatic environments. In this study, autotrophic manganese oxide bacteria (AMOB) were enriched and isolated by biological aerated filter. The oxidation of diclofenac including oxidation rate, kinetics and pH influence by biological manganese oxides produced by isolated AMOB were investigated. The results of X-ray diffraction spectroscopic analysis indicated that the synthetic biological manganese oxides were slightly crystallized, amorphous state, and mainly contained  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{Mn}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  and  $\text{MnOOH}$ . When the pH values were 2.0, 2.8, 3.8 and 5.0, the concentration of DFC and biological manganese oxides were 1 and 20 mg/L, respectively, the DFC degradation rates were 100%, 100%, 94.3% and 83.4%, respectively. The results indicated that the DFC degradation rate was negatively correlated with pH, and the DFC degradation followed the first-order kinetic within the experimental pH values. This study showed that the AMOB and biological manganese oxides could provide a low cost and

environmental risk materials and methods through proper development to remove emerging contaminants.

**Key words:** autotrophic manganese oxide bacteria; biological manganese oxides; diclofenac; reaction kinetic

以 PPCPs 为代表的新兴有机污染物随着人类活动不断进入环境<sup>[1]</sup>,持续威胁人类及其他生物的安全<sup>[2]</sup>。双氯芬酸作为一种常见的非甾体抗炎药物,已经在多地水体中被检出<sup>[3]</sup>,是一种代表性新兴污染物。尽管高级氧化、活性炭吸附等技术对双氯芬酸等有机药物的去除效果较好,但多具有高成本、易产生反应副产物以及反应废物处置困难等缺点<sup>[4]</sup>。因此,开发低成本、低环境风险的新兴污染物深度水处理新技术具有重要的环境及社会意义。

生物氧化锰作为一种自然界中的强氧化物,氧化还原电位在 500 ~ 600 mV 之间<sup>[5]</sup>,其降解有机微污染物已成为新的研究热点<sup>[6,7]</sup>。研究表明,锰氧化物广泛参与到地球生物化学循环中<sup>[8]</sup>,而锰氧化菌在其中起到重要作用。现阶段对锰氧化菌的研究主要针对异养型锰氧化菌,包括 *Bacillus* sp. SG-1、*Pseudomonas putida* GB-1、*Pseudomonas putida* MnB1、*Leptothrix discophora* SS-1 等<sup>[9]</sup>,对自养型锰氧化菌的研究甚少。通常在自然水体中,溶解性有机物含量很低,自养型锰氧化菌更具优势,其产生的生物氧化锰去除有机污染物更具有实际意义。

笔者以污水厂好氧污泥作为菌源,以不同填料的曝气生物滤柱富集自养型锰氧化菌,分离纯化出三株具有锰氧化能力的细菌并选取一株制备生物氧化锰,然后选取双氯芬酸为代表性有机药物,研究生物氧化锰对其去除效果,以期为锰氧化物去除有机微污染物提供技术支持。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 菌种来源及培养基的制备

以重庆鸡冠石污水处理厂好氧污泥作为菌源。

滤柱进水培养基:  $\text{NaHCO}_3$  为 50 mg/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  为 40 mg/L、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  为 10 mg/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为 20 mg/L、 $\text{CaCl}_2$  为 10 mg/L、矿物质溶液为 1 mL/L; 矿物质溶液:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 3 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  为 100 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 100 mg/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  为 10 mg/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  为 10 mg/L、 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  为 10 mg/L、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  为 20 mg/L、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  为 10 mg/L。

锰氧化菌分离、生物氧化锰制备培养基:  $\text{MnCl}_2$

$\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  为 0.2 g/L、 $\text{NaHCO}_3$  为 0.25 g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  为 0.1 g/L、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  为 0.1 g/L、 $\text{NaNO}_3$  为 0.2 g/L、 $\text{CaCl}_2$  为 0.1 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 5 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 5 mg/L。其中  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤灭菌,其他成分通过 121  $^\circ\text{C}$  高压湿热灭菌 30 min。制成固体培养基时需提前加入 1.5% 琼脂。

### 1.2 自养型锰氧化菌富集装置与运行方式

试验采用污泥石英砂、污泥磁铁矿、石英砂、磁铁矿等 4 组有机玻璃曝气生物滤柱(见图 1),每组滤柱底部通过蠕动泵从进水箱进水,采用曝气头供氧。4 组滤柱均采用上向流连续运行方式,控制 DO 为 10 mg/L。在吸附阶段(0 ~ 40 d)为便于微生物挂膜,污泥石英砂、污泥磁铁矿滤柱的水力停留时间(HRT)为 3 d,其后为 24 h;而石英砂滤柱、磁铁矿滤柱的 HRT 一直维持在 24 h。滤柱运行期间测定进出水  $\text{Mn}^{2+}$  浓度和 pH 值。

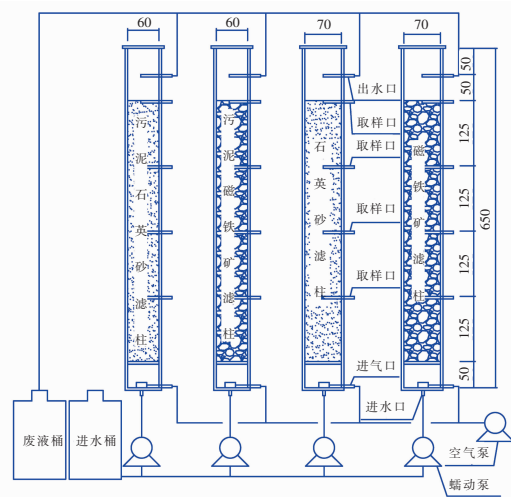


图 1 曝气生物滤柱示意

Fig. 1 Schematic diagram of biological aerated filter

### 1.3 自养型锰氧化菌的纯化与鉴定

运行稳定后,选取效果最佳的一组滤柱,从中部取适量生物膜制成菌悬液。随后进行平板涂布、反复划线,将得到的菌种进行革兰氏染色及菌种鉴定。

### 1.4 生物氧化锰的制备和表征

将筛选后的自养型锰氧化菌接种至生物氧化锰

制备培养基,在 28 ℃、120 r/min 恒温摇床中培养 2 周。将制成的生物氧化锰经无菌水洗涤、10 000 r/min 离心浓缩 10 min,反复数次后置于 4 ℃ 冰箱中留存待用(不超过 3 d)。生物氧化锰浓度通过亮柏蓝比色法测定。

采用 XRD 方法对生物氧化锰进行表征,将生物氧化锰冻干压片处理后采用理光 D/MAX - III X 射线衍射仪进行物相分析,测试管压为 40 kV,电流为 80 mA,扫描范围为 10° ~ 90°,扫描速度为每分钟 2.0°,步长为 0.02°。

### 1.5 生物氧化锰降解双氯芬酸试验研究

双氯芬酸初始浓度为 1 mg/L,生物氧化锰初始浓度为 20 mg/L,反应 pH 值为 2.0、2.8、3.8、5.0,反应体系为 100 mL,置于 250 mL 锥形瓶中于 28 ℃、160 r/min 恒温摇床中避光反应,于 0、5、10、15、30、60、90、120 min 取样,经 0.22 μm 滤头过滤后保存。双氯芬酸浓度采用安捷伦 1260 高效液相色谱仪测定,选用 Eclipse XDB - C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,柱温为 25 ℃,流动相为乙腈和 1% 冰乙酸(70 : 30),流速为 1.0 mL/min,进样量为 20 μL,检测波长为 276 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 自养型锰氧化菌的富集与驯化

在 0 ~ 40 d 污泥石英砂滤柱、污泥铁矿滤柱出水  $Mn^{2+}$  浓度先显著低于进水浓度,随后逐渐升高,直至与进水浓度接近(见图 2)。此过程为填料的吸附阶段,此时好氧污泥刚刚接种到滤柱中,微生物未发挥主导作用。与此相反,矿石填料的吸附作用成为  $Mn^{2+}$  浓度降低的主要原因。同时,石英砂滤柱和铁矿滤柱在 0 ~ 30 d 的变化趋势相同。4 组滤柱中,铁矿滤柱达到吸附饱和的时间明显长于石英砂填料组,可见铁矿填料对  $Mn^{2+}$  的吸附效果要优于石英砂。

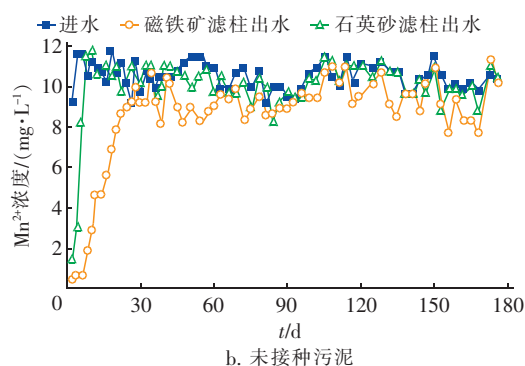
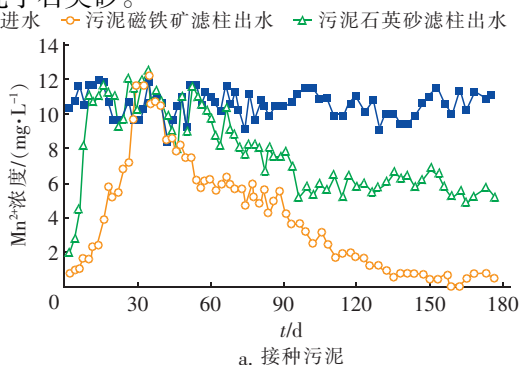
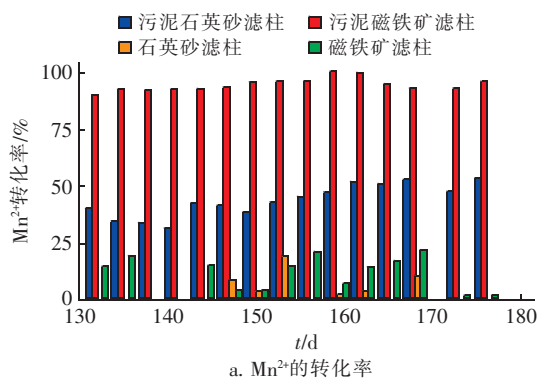


图2 曝气生物滤柱进出水  $Mn^{2+}$  浓度随时间的变化

Fig. 2 Temporal variation of  $Mn^{2+}$  in biological aerated filter

随着污泥石英砂滤柱和污泥铁矿滤柱的运行,出水  $Mn^{2+}$  浓度逐渐降低。此时两组滤柱以生物氧化作用为主转化  $Mn^{2+}$ 。污泥石英砂滤柱出水  $Mn^{2+}$  浓度在 96 d 后稳定在 5.0 ~ 6.7 mg/L,污泥铁矿滤柱出水  $Mn^{2+}$  浓度在 132 d 之后稳定在 0.8 mg/L 以下。与之相反,石英砂和铁矿滤柱在吸附饱和后,未出现类似接种污泥组滤柱的除锰效果。可见污泥石英砂和污泥铁矿滤柱出水  $Mn^{2+}$  浓度的降低主要由自养型锰氧化菌的氧化作用造成。

在 132 ~ 176 d 期间,4 组滤柱中  $Mn^{2+}$  的转化率见图 3(a),污泥石英砂滤柱和污泥铁矿滤柱的  $Mn^{2+}$  平均转化率分别为 44% 和 94%,石英砂滤柱和铁矿滤柱的  $Mn^{2+}$  平均转化率分别为 4% 和 11%,转化效果远低于另外两组滤柱。这也说明添加好氧污泥的滤柱中富集的自养型锰氧化菌对  $Mn^{2+}$  的转化起主要作用。同时,4 组滤柱在稳定阶段的出水 pH 值均低于进水,且污泥石英砂滤柱、污泥铁矿滤柱出水 pH 值低于石英砂滤柱及铁矿滤柱,这主要是由于污泥石英砂滤柱和污泥铁矿滤柱中的锰氧化菌在氧化锰的过程中产生了  $H^+$ ,导致 pH 值降低<sup>[8]</sup>。



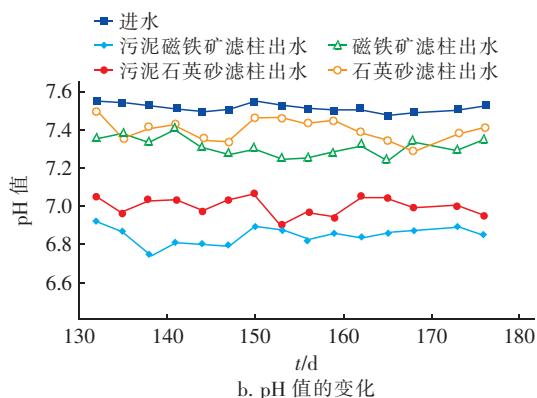
图3 稳定运行阶段  $Mn^{2+}$  转化率和 pH 值的变化

Fig. 3 Variation of  $Mn^{2+}$  conversion rate and pH in biological aerated filter during stable operation stage

## 2.2 自养型锰氧化菌的筛选与鉴定

从除锰效果最好的污泥磁铁矿滤柱中部取部分填料,加无菌水振荡制成菌悬液并稀释至  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-7}$  倍,在固体培养基上进行平板涂布,于  $28^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 5 d,选取形态不同菌株进行反复平板划线,得到 3 株锰氧化菌(见图 4),分别命名为 Mn1、Mn2、Mn3。Mn1 为棕黄色圆形菌落,边缘不整齐,表面湿润凸起,革兰氏染色呈阳性;Mn2 为棕黄色圆形菌落,边缘不整齐,表面湿润平整,革兰氏染色呈阳性;Mn3 为白色圆形菌落,边缘整齐,表面干燥凸起,革兰氏染色呈阳性。

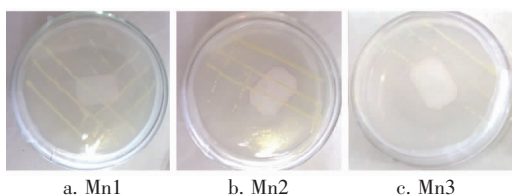


图4 平板中的菌落形态

Fig. 4 Colonial morphology on streaked plates

得到的菌落交由上海美吉生物技术有限公司进行鉴定。根据鉴定结果,Mn1 菌株与 *Sphingobium yanoikuyae* strain(鞘氨醇单胞球菌属)的相似度为 100%,Mn2 菌株与 *Paracoccus marcusii* strain(莫氏副球菌属)的相似度为 100%,Mn3 菌株与 *Streptomyces*(链霉菌属)的相似度为 99%,根据相关报道<sup>[8]</sup>,可认为 Mn1、Mn2、Mn3 菌株属于锰氧化菌。

## 2.3 生物氧化锰的XRD表征

选取 Mn2 菌株作为生物氧化锰制备菌株,将制备的生物氧化锰冻干、粉末压片后,进行 XRD 测试。

样品的  $2\theta$  特征峰分别出现在  $19.195^{\circ}$ 、 $22.103^{\circ}$ 、 $33.527^{\circ}$ 、 $35.307^{\circ}$ 、 $36.805^{\circ}$  等处(见图 5),由此确定出  $MnOOH$ 、 $MnO_2$ 、 $Mn_2O_3$  和  $Mn_3O_4$  等成分。在 Mn2 菌株产生的生物氧化锰中,锰主要以 Mn(IV) 和 Mn(III) 形态存在。Mandernack 等<sup>[10]</sup> 采用 *Bacillus* SG-1 制备生物氧化锰,初期生成了  $\beta$ - $MnOOH$ 、 $Mn_3O_4$ 、 $\gamma$ - $MnOOH$  等物质,Mn2 菌株在氧化锰的过程中也出现了同样现象。并且样品结晶度较低,呈无定形态,与 Tebo 等<sup>[8]</sup> 对生物氧化锰的形成机制和特性的研究结果一致。

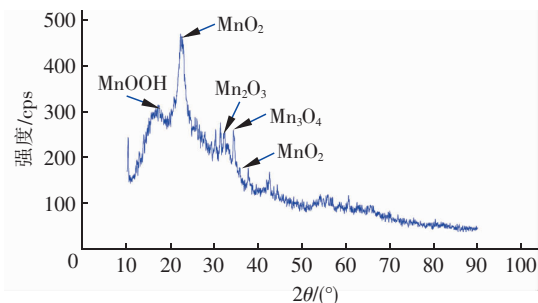


图5 生物氧化锰的 XRD 分析结果

Fig. 5 Result of XRD analysis of biological manganese oxides

## 2.4 生物氧化锰对双氯芬酸的去除

不同 pH 值下生物氧化锰对双氯芬酸的去除效果见图 6。pH 值为 2.0 及 2.8 时,双氯芬酸浓度分别在 5 和 90 min 后降至检测限以下;pH 值为 3.8 及 5.0 时,120 min 后双氯芬酸去除率分别为 94.3%、83.4%,反应在弱酸性条件下即可有效去除双氯酚酸,且效果与 pH 值呈负相关。低 pH 值条件可使锰氧化物氧化还原电位提高,促进电子转移,有利于双氯芬酸同锰氧化物结合。

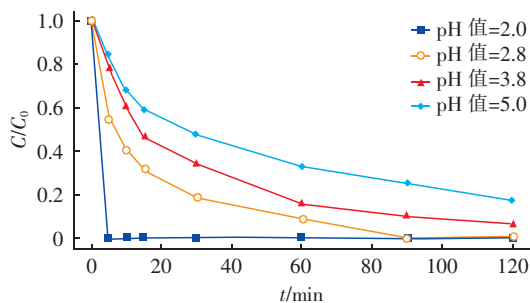


图6 不同 pH 值条件下生物氧化锰去除双氯芬酸效果

Fig. 6 Diclofenac removal by biological manganese oxides under different pH conditions

有报道指出,在锰氧化物降解有机污染物过程中,有机物先扩散至锰氧化物表面并形成前体复合物,进而得到降解。也有研究显示,锰氧化物的等电

位点 pH 值为 2.4~3.4。接近锰氧化物等电位点的 pH 值条件可为反应提供更多的表面活性位点,使双氯芬酸更易于与锰氧化物结合,促进其降解。

对降解过程用一级动力学方程进行拟合,结果显示,当 pH 值为 2.8、3.8 和 5.0 时,降解反应符合一级反应动力学,其对应的一级动力学常数分别为 0.036 4、0.022 5 和 0.013 6  $\text{min}^{-1}$ ,  $R^2$  分别为 0.903 9、0.966 9、0.958 5。对  $K$  值与 pH 值的关系进行拟合,发现反应速率常数与 pH 值接近为一阶线性关系,pH 值从 5.0 降低到 2.8 时,反应速率常数提升了近 2.6 倍,降解速率与 pH 值呈负相关。

### 3 结论

① 通过接种好氧污泥的曝气生物滤柱完成了对自养型锰氧化菌的驯化。污泥石英砂和污泥铁矿滤柱的平均  $\text{Mn}^{2+}$  转化率分别达到 44% 和 94%。

② 从污泥铁矿滤柱中筛选出 Mn1、Mn2 和 Mn3 等 3 株自养型锰氧化菌。经鉴定,Mn1 菌株与 *Sphingobium yanoikuyae* strain 的相似度为 100%, Mn2 菌株与 *Paracoccus marcusii* strain 的相似度为 100%, Mn3 菌株与 *Streptomyces* 的相似度为 99%。

③ 选取 Mn2 菌株合成的生物氧化锰呈弱结晶、无定形态,主要含有  $\text{MnO}_2$ 、 $\text{Mn}_3\text{O}_4$ 、 $\text{Mn}_2\text{O}_3$  和  $\text{MnOOH}$  等成分。

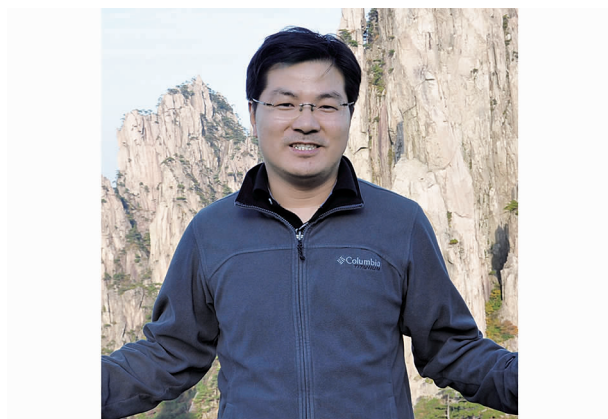
④ 生物氧化锰去除双氯芬酸的效果与 pH 值呈负相关。在 2.0、2.8、3.8、5.0 等 4 种 pH 值下,反应 2 h 后对双氯芬酸的去除率分别为 100%、100%、94.3% 和 83.4%,即在弱酸性反应条件下可实现对双氯芬酸的有效去除。

### 参考文献:

- [1] Zhang Y, Geissen S U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies [J]. *Chemosphere*, 2008, 73 (8): 1151–1161.
- [2] Nassef M, Matsumoto S, Seki M, et al. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 2010, 80 (9): 1095–1100.
- [3] Wang L, Ying G G, Zhao J L, et al. Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of north China [J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408 (16): 3139–3147.
- [4] Sellaoui L, Mechi N, Lima E C, et al. Adsorption of di-

clofenac and nimesulide on activated carbon: Statistical physics modeling and effect of adsorbate size [J]. *Journal of Physics & Chemistry of Solids*, 2017, 109: 117–123.

- [5] Furgal K M, Meyer R L, Bester K. Removing selected steroid hormones, biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles in situ at ppb levels [J]. *Chemosphere*, 2015, 136: 321–326.
- [6] Kim D G, Jiang S, Jeong K, et al. Removal of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by biogenic manganese oxides produced by the *Pseudomonas putida*, strain MnB1 [J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2012, 223 (2): 837–846.
- [7] Hu Y, Chen X, Liu Z, et al. Activated carbon doped with biogenic manganese oxides for the removal of indigo carmine [J]. *J Environ Manage*, 2015, 166: 512–518.
- [8] Tebo B M, Bargar J R, Clement B G, et al. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation [J]. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 2004, 32 (32): 287–328.
- [9] Hennebel T, De Gussem B, Boon N, et al. Biogenic metals in advanced water treatment [J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27 (2): 90–98.
- [10] Mandernack K W, Post J, Tebo B M. Manganese mineral formation by bacterial spores of the marine *Bacillus*, strain SG-1: Evidence for the direct oxidation of Mn(II) to Mn(IV) [J]. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 1995, 59 (21): 4393–4408.



作者简介: 翟俊 (1977—), 男, 江苏溧阳人, 博士, 教授, 从事废水处理理论与技术研究。

E-mail: zhajun99@126.com

收稿日期: 2018-01-10