

生物除铁除锰滤池中锰氧化菌的筛选及研究

张宇¹, 孙睿¹, 曾辉平², 张杰^{1,2}

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 北京工业大学 水质科学与水环境恢复工程北京市重点实验室, 北京 100022)

摘要: 通过模拟生物除铁除锰滤池中的营养环境, 研制了用于培养除锰菌的自制培养基, 对比该培养基与传统培养基的营养成分发现, 自制培养基的碳源、氮源、微量元素和矿物质元素等均相对较低; 分别从正在运行水厂滤池的 20、60、80 cm 深度处取锰砂滤料样品, 将滤料样品在自制培养基上涂布并划线培养, 分离得到了 14 株具有锰氧化能力的菌株。比对 16S rDNA 序列发现, 这 14 株菌分别与 *Acidobacteria*、*Chryseobacterium*、*Holophagae*、*Nitrospirae*、*Planctomycetacia*、*Thermodesulfobacteria*、*Sphingobacterium* 等具有同源性。

关键词: 生物除铁除锰滤池; 锰氧化菌; PYGV Medium 培养基; 同源性

中图分类号: TU991 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)03-0068-05

Screening of Manganese Oxidation Bacteria in Biological Iron and Manganese Removal Filter

ZHANG Yu¹, SUN Rui¹, ZENG Hui-ping², ZHANG Jie^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: A special media for the strain with iron and manganese removal functions was developed through simulating the natural nutrient environment in the filter of a water treatment plant. It was found that the contents of carbon source, nitrogen source, trace element, and mineral substance were lower in the developed media than that in the traditional media. The manganese sand samples were collected from depths of 20 cm, 60 cm, and 80 cm inside the filter of a water treatment plant. Fourteen strains with manganese removal function were isolated from the manganese sand samples through culturing with self-developed poor nutrient culture media. The isolated strains showed homology with *Acidobacteria*, *Chryseobacterium*, *Holophagae*, *Nitrospirae*, *Planctomycetacia*, *Thermodesulfobacteria*, and *Sphingobacterium* through comparing their 16S rDNA sequences.

Key words: biological iron and manganese removal filter; manganese oxidation bacteria; PYGV Medium culture medium; homology

基金项目: 城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题(QA201615); 哈尔滨工业大学科研创新基金资助项目(HIT.NSRIF.201709)

通信作者: 孙睿 E-mail: 05doudou@163.com

生物除铁除锰技术是以“生物固锰除锰机理”为核心的成套工程应用技术^[1]。自1996年生物固锰除锰理论提出以来^[2],因其工艺流程简单、运行状况稳定、投资费用少等优点^[3],在我国多个含铁含锰地下水厂得到了广泛应用^[4-7]。生物固锰除锰的机理是在适宜 pH 值条件下,将生物滤池中的 Mn^{2+} 氧化成高价态的锰氧化物,该反应在锰氧化菌群的作用下实现。为了进一步解析生物滤池中锰氧化菌群的组成,需要对锰氧化菌进行深入研究。因此,笔者以哈尔滨市松北区某自来水厂生物除铁除锰滤池中微生物的营养条件为研究对象,分析最佳的培养基成分,以期在生物除铁除锰水厂的应用奠定理论基础。

1 水厂基本情况

1.1 水厂设计与运行状况

水厂以松花江河漫滩潜水为水源,化学类型为 $HCO_3 - Ca - Mg$ 型,富含 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 离子,铁含量为 15~17 mg/L,锰含量为 1.5~1.7 mg/L,并且氨氮含量超标,约为 1.0 mg/L,属于典型的伴生氨氮高铁高锰地下水。水厂进水水质见表 1。

表 1 水质特性

Tab. 1 Characteristics of water quality

项 目	标准	检验结果
铁/(mg · L ⁻¹)	≤0.3	15.4
锰/(mg · L ⁻¹)	≤0.1	1.7
pH 值	6.5~8.5	6.8
总硬度/(mg · L ⁻¹)	≤450	220
氯化物/(mg · L ⁻¹)	≤250	45.43
硫酸盐/(mg · L ⁻¹)	≤250	30.77
色度/度	≤15	180
浊度/NTU	≤3	76.8
亚硝酸盐/(mg · L ⁻¹)	≤0.001	0.002
氨氮/(mg · L ⁻¹)	≤0.02	1.20
COD _{Mn} /(mg · L ⁻¹)	≤3.00	5.01
硫酸盐/(mg · L ⁻¹)	≤250	30.77

以生物固锰除锰理论为指导,设计了铁、锰、氨氮同层去除的一级强曝气-过滤流程^[8,9],设计规模为 4×10^4 m³/d,工艺流程如图 1 所示。

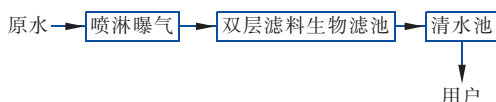


图 1 水厂工艺流程

Fig. 1 Flow chart of waterworks

1.2 锰砂表面形态

从出水水质稳定达标的水厂生物滤池中、下层挖取锰砂样品,检测表面形态(见图 2)。可以看出,锰砂表面被大量的锰氧化菌膜覆盖,同时也有锰氧化物沉淀聚集^[10]。因此,更直观地验证了生物滤池的中、下层为除锰层。

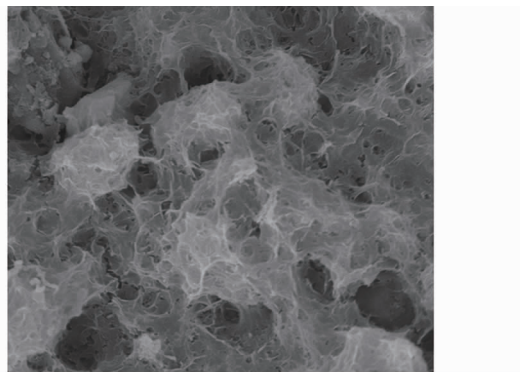


图 2 锰砂表面形态的扫描电镜照片

Fig. 2 SEM photo of manganese sand surface morphological

2 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 锰砂样品的提取

试验过程中,分别从水厂滤池 20、60、80 cm 深度处取锰砂样品,装入已经灭菌的 50 mL 离心管中备用。

2.1.2 锰氧化菌培养基筛选

PYGV Medium 低营养成分培养基:蛋白胨(0.2 g/L)、酵母提取物(0.2 g/L)、葡萄糖(0.2 g/L)、维生素混合液(1 号辅液,10 mL/L)、矿物质辅液(2 号辅液,20 mL/L)。

1 号辅液组分:生物素(V_H , 2 mg/L)、烟酸(5 mg/L)、盐酸硫胺素(5 mg/L)、对氨基苯甲酸(5 mg/L)、泛酸钙(5 mg/L)、烟酸吡哆辛(V_{B6} , 5 mg/L)、氰钴维生素(V_{B12} , 0.1 mg/L)、核黄素(V_{B2} , 5 mg/L)、叶酸(2 mg/L)。

2 号辅液组分:在 900 mL 蒸馏水中溶解 10 mg 被氢氧化钾中和的次氨基三乙酸,之后加入 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (3.34 g)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (99 mg)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (29.7 g)、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (12.67 g),再加入 50 mL 金属溶液“44”,最后用蒸馏水定容至 1 L,于 5℃ 下保存。

金属溶液“44”组分:将乙二胺四乙酸盐(EDTA, 250 mg)、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1.095 mg)、 $MnSO_4 \cdot$

H₂O(154 mg)、CoCl₂ · 6H₂O(20.3 mg)、FeSO₄ · 7H₂O(500 mg)、CuSO₄ · 5H₂O(39.2 mg)、NaB₄O₇ · 10H₂O(17.7 mg)逐一加入放有数滴硫酸的蒸馏水中(1 L)。

2.2 试验方法

2.2.1 菌株培养

将样品放入装有无菌水的离心管中充分振荡,在无菌操作台上取 1 mL 混合液均匀涂布在 PYGV Medium 固体培养基上,经培养箱(24 ℃)培养 10 d,观察并且记录相关的菌落特性。

2.2.2 菌株的锰氧化能力初步鉴定

试验过程中,从培养基上刮取少许菌落,分别用过硫酸法和 Wursters Blue 测定其中的锰,过硫酸法结果呈红色且 Wursters Blue 结果呈蓝色的菌落具

有锰氧化能力,其他情况均表明菌落没有锰氧化能力。

3 结果与讨论

3.1 菌株的锰氧化能力初步鉴定

TMPD 法是初步检测菌株是否具有锰氧化能力的一种方法,通过显色反应的颜色对菌株的锰氧化能力作出判断,且 TMPD 的氧化速度不受 Mn²⁺ 的影响。通过 TMPD 法的初步筛选,其显色反应结果很好,从 26 株菌中得到了 14 株具有较强锰氧化能力的菌株,编号为 1~14 号。

3.2 菌株的形态

3.2.1 锰氧化菌表面形态

观察 14 株具有锰氧化能力的菌株,结果见表 2。

表 2 菌落形态

Tab. 2 Morphology information of colonies

序号	形状	边缘	颜色	大小/mm	透明度	表面形态
1	圆形有凸起	整齐	浅粉色边缘带白色粉末	3~4	不透明	不光滑
2	圆形	较整齐	中心浅肉色	5	边缘透明	光滑、湿润
3	圆形	整齐	橙红	2~3	半透明	光滑、湿润
4	圆形	整齐	棕色	1	不透明	不光滑、表面粉末状有凸起
5	圆形	整齐	中心淡绿色	2~3	不透明	粉末状、边缘白色粉末状
6	圆形	整齐	灰白色、中心灰色	3~4	不透明	不光滑、扁平状
7	圆形	整齐	棕色	2~3	边缘略透明、中间有深棕色圈	较光滑、湿润
8	圆形	整齐	橙色	2~5	不透明	光滑、湿润
9	环形	整齐	乳白色	2~3	环形、中间有空洞	湿润、不光滑
10	圆形	整齐	中心棕色	1~2	不透明	不光滑、凸起
11	圆形	整齐	表面金属色	1~2	不透明	不光滑、不湿润
12	环形	整齐	红棕色	1	不透明	不光滑、不湿润
13	环形	整齐	乳白色	2~3	半透明	有凸起、光滑、湿润
14	圆形	整齐	边缘乳白、中间粉白	3~5	不透明	湿润

3.2.2 菌落电镜观察结果

利用透射电镜对锰氧化菌进行观察,结果如图 3 所示。

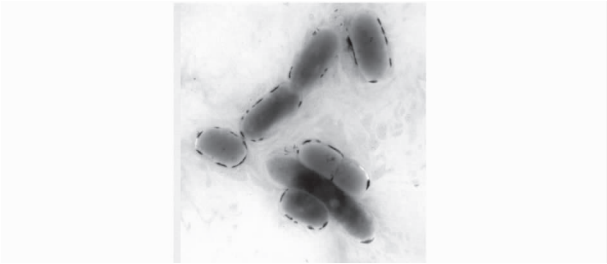


图 3 锰氧化菌透射电镜照片

Fig. 3 Transmission electron micrograph of manganese oxidation bacteria

从图 3 可以看出,锰氧化菌大多以短杆菌为主,有的有鞭毛,常呈链条状或相互聚集排列,这样有利于菌胶团的形成,在菌体外覆盖有粘液状物质。

14 株菌株中一些菌能够在 0~10 ℃ 下生长良好,尤其是 8 号菌株最具有代表性,这对于将人工驯化培养的菌剂回投到水厂滤池并加快生物除铁除锰滤池的快速启动和应对突发情况具有深远意义。另外,该 14 株具有较强除锰能力的锰氧化菌,为开展除锰菌在锰砂生物滤池中的强化研究也是十分有利的^[11]。

地下水中的微生物利用的营养物质非常少,致使锰砂生物滤池中的微生物数量就更少,利用微

生物的固定化技术,并结合具有良好性能的载体,会较大幅度提高锰砂生物滤池的锰氧化菌数量,也可有针对性地开展锰氧化菌在锰砂滤池中的载体研究提供良好的支持。

3.3 16S rDNA 比对结果及系统发育树的构建

根据 16S rDNA 比对结果作出系统发育树,结果如图 4 所示。

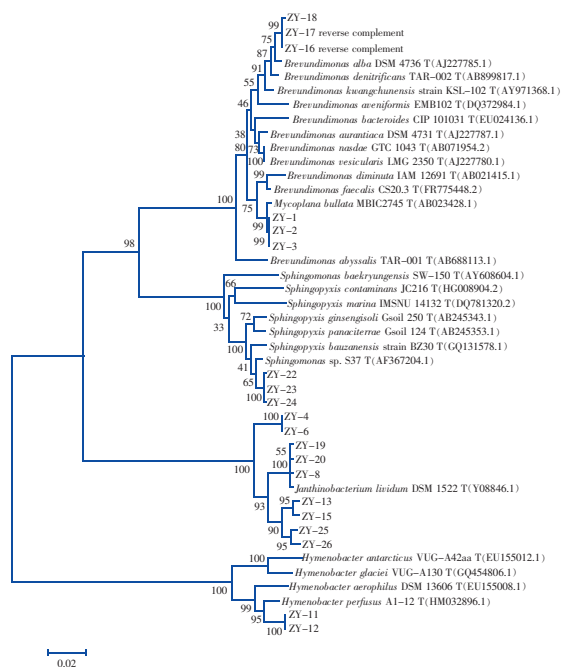


图 4 系统发育树结果

Fig.4 Results of phylogenetic tree

经过前期培养基筛选试验,共分离出 26 株锰氧化菌。图 4 清晰地展示了所筛选的锰氧化菌与已报道的锰氧化菌之间的亲缘关系,后续又经过锰氧化能力检验,得到了 14 株纯菌株。

研究发现,这 14 株纯菌株分别与 *Acidobacteria*、*Chryseobacterium*、*Holophagae*、*Nitrospirae*、*Planctomycetacia*、*Thermodesulfobacteria*、*Sphingobacterium* 等具有同源性。其中硝化螺旋菌属 (*Nitrospirae*) 在生物滤池的中、下层广泛存在,对整个生物滤池的稳定起重要作用。对这些细菌生理生化特性及功能定位等方面研究有助于强化生物滤池的除锰能力,并提高其生化性能,为生物除锰滤池的快速启动提供了技术支持。

从图 4 还可以看出,ZY-1、ZY-2 和 ZY-3 具有较近的亲缘关系,同属于 *Mycoplana bullata*;ZY-8、

ZY-19 和 ZY-20 具有较近的亲缘关系,同属于 *Janthinobacterium lividum*;ZY-11 和 ZY-12 具有较近的亲缘关系,同属于 *Hymenobacter perfusus*;ZY-17、ZY-18 和 ZY-16 具有较近的亲缘关系,同属于 reverse complement。

3.4 锰氧化菌除锰效果

将分离得到的锰氧化菌菌液回投到松北区水厂现场中试装置(锰砂已经没有吸附能力)中,结果表明,接种成功后 65 d 内将滤速由 2 m/h 逐渐提高到 12 m/h,并在 12 m/h 的滤速下连续运行了 90 d,出水中锰的含量一直为痕量,说明锰氧化菌在锰砂生物滤池的快速启动和应对突发情况等方面具有非常大的优势。

4 结论

① 与传统培养基相比,优化后的 PYGV Medium 培养基中的碳源和氮源等营养成分更低,非常接近于实际稳定运行的生物除铁除锰水厂滤池中的条件。在这样极低的营养条件下,分离出了具有锰氧化能力的菌株,并验证其具有很好的锰氧化能力。这对于水厂的稳定运行具有重要价值,也有利于生物除铁除锰滤池的快速启动,此培养基已获得发明专利的授权(分离锰氧化菌的培养基,专利号为 201310364594. X)。

② 首次从北方寒冷地区出水水质良好的水厂中分离得到了锰氧化菌的纯菌株,并且具有较好的锰氧化能力。中试结果表明,得到的锰氧化菌对锰的去除效果较好,出水锰含量为痕量,远低于国家标准,为探索生物除铁除锰的机理提供了强有力的数据支撑。

③ 在生物除锰滤池中,不同滤层深度之间表现出了微生物群落的演替规律。上层与中、下层形成了各自的优势功能菌群,表明滤层生化能力和抗冲击能力较强。该结果更真实地解析了滤池中的微生物群落结构特点,可为滤池中微生物固定提供参考。

参考文献:

- [1] 杨宏,李冬,张杰,等. 生物固锰除锰机理与生物除铁除锰技术[J]. 中国给水排水,2003,19(6):1-5.
- [2] 张杰,曾辉平,李冬,等. 维系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

(下转第 76 页)