



# 除锰细菌的分离鉴定及其固定化除锰研究

尹思雨<sup>1,2</sup>, 黄磊<sup>1,2</sup>, 党俊杰<sup>1,2</sup>, 邓冬梅<sup>1,2</sup>

(1. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545006;

2. 广西糖资源绿色加工重点实验室, 广西柳州 545006)

**[摘要]** 自含锰土壤中筛选得到 2 株具有除锰能力的革兰氏阳性菌 S1、S2, 比对 16S rRNA 序列结果, 推测 2 株细菌可能为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。在质量浓度为 260 mg/L 的  $Mn^{2+}$  培养基中培养 6 d 后, 2 株细菌对  $Mn^{2+}$  的去除率均可达 95% 以上。扫描电镜能谱(SEM-EDS)分析、X 射线衍射(XRD)分析表明这 2 株细菌是通过将  $Mn^{2+}$  转化为  $MnCO_3$  实现对  $Mn^{2+}$  的去除。采用海藻酸钠和活性炭作为包埋剂将菌体制成固定化微胶囊, 在含锰废水  $Mn^{2+}$  质量浓度为 150 mg/L 时胶囊固定菌的除锰率远高于游离菌相应的值, 利用正交实验优化胶囊固定菌的除锰条件后菌株的除锰率均高于 96%, 3 轮循环除锰实验后胶囊固定菌仍有较好的除锰率, 可见胶囊固定菌具备一定的重复利用性能。

**[关键词]** 除锰细菌; 包埋固定化; 含锰废水; 正交实验

**[中图分类号]** X703.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2023)03-0172-09

## Isolation and identification of manganese removal bacteria and study on its manganese removal by immobilization

YIN Siyu<sup>1,2</sup>, HUANG Lei<sup>1,2</sup>, DANG Junjie<sup>1,2</sup>, DENG Dongmei<sup>1,2</sup>

(1. College of Biology and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Liuzhou 545006, China)

**Abstract:** Two Gram-positive bacteria S1 and S2 with manganese removal ability were screened from manganese-containing soil, and the comparison of 16S rRNA sequences showed that the two bacteria might be *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*. The removal rate of  $Mn^{2+}$  could reach more than 95% after 6 days of culture in the medium with the mass concentration of  $Mn^{2+}$  of 260 mg/L. Scanning electron microscopy energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS) and X-ray diffraction (XRD) analysis showed that the two bacteria could remove  $Mn^{2+}$  by transforming  $Mn^{2+}$  into  $MnCO_3$ . Sodium alginate and activated carbon were used as embedding agents to prepare immobilized microcapsules, when the mass concentration of  $Mn^{2+}$  in manganese-containing wastewater was 150 mg/L, the manganese removal rates of capsule-immobilized bacteria were much higher than those of free bacteria. The manganese removal rates could reach 96% after optimizing the manganese removal conditions of immobilized bacteria in capsules by orthogonal test. After three rounds of circulating manganese removal experiments, the immobilized bacteria in capsules still had a good manganese removal rates. It could be seen that the immobilized bacteria in capsules have certain reusability.

**Key words:** manganese-removing bacteria; embedding immobilization; manganese-containing wastewater; orthogonal test

锰是人体必需的微量元素, 但若长期过量摄入锰则会导致慢性中毒。工业生产和矿产资源的开发导致含锰废水被排放到环境中, 对人类和环境产生

危害, 因此对于锰污染废水的治理十分必要<sup>[1]</sup>。微生物法可利用除锰微生物去除水体中的锰, 是近年来研究较多的水体锰污染治理方法<sup>[2]</sup>。

**[基金项目]** 广西省自然科学基金项目(2017GXNSFBA198099); 广西研究生教育创新计划项目(GKYC202014); 大学生创新创业项目(202110594049)

除锰微生物主要通过2种方式去除锰:(1)具有锰氧化能力的微生物将可溶性的 $Mn^{2+}$ 催化氧化为不可溶的高价锰氧化物<sup>[3]</sup>;(2)部分细菌虽不能氧化 $Mn^{2+}$ 生成高价锰氧化物,但可以将 $Mn^{2+}$ 富集到菌体表面,在周围环境的作用下生成不溶的 $MnCO_3$ <sup>[4]</sup>,从而达到去除水中金属锰的效果。固定化是将细菌用于实际废水处理的手段之一,包埋法是固定化方法中较常用的一种<sup>[5]</sup>,包埋法能使集中在其内部的微生物保持较高的活性,包埋形成的小球机械强度大且能抵御一定的水力冲击<sup>[6]</sup>,在地下水处理和自来水净化中应用较多。然而,包埋法固定除锰细菌处理的大多是低浓度锰离子废水,本研究拟在对除锰细菌进行筛选鉴定和除锰特性研究基础上,利用正交实验探讨固定化细菌的最佳除锰条件和最适 $Mn^{2+}$ 浓度,以期为微生物除锰新型菌种的开发和固定化技术理论研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源及培养基的制备

#### 1.1.1 菌种来源

菌种筛选自桂林市大新锰矿区周边的土壤。含 $Mn^{2+}$ 的工业废水取自柳州市桂柳化工厂,废水COD为50 mg/L,实际含 $Mn^{2+}$ 质量浓度为29 mg/L,实验中通过添加硫酸锰改变 $Mn^{2+}$ 质量浓度。

#### 1.1.2 培养基的制备

无 $Mn^{2+}$ 液体培养基配方:蛋白胨10 g/L,牛肉浸膏3 g/L,氯化钠5 g/L, pH=6.5。

含 $Mn^{2+}$ 液体培养基配方:蛋白胨10 g/L,牛肉浸膏3 g/L,氯化钠5 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  适量, pH=6.5。

无 $Mn^{2+}$ 固体培养基的配方为在无 $Mn^{2+}$ 液体培养基基础上添加20%琼脂,含 $Mn^{2+}$ 固体培养基的配方为在含 $Mn^{2+}$ 液体培养基基础上添加20%琼脂。

以上无 $Mn^{2+}$ 培养基均需用高压灭菌锅于121℃下灭菌30 min;此外,在超净台下用已灭过菌的0.22  $\mu$ L过滤器对 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 进行过滤除菌,加入无 $Mn^{2+}$ 培养基制备含 $Mn^{2+}$ 培养基。

### 1.2 锰氧化菌株的分离纯化

取含锰泥土10 g加入到90 mL灭菌生理盐水中充分振荡10 min<sup>[7]</sup>,静置5 min后取上清液5 mL接种

到100 mL含 $Mn^{2+}$ 的液体培养基中,在30℃、转速120 r/min条件下培养48 h,梯度稀释后涂布在含 $Mn^{2+}$ 平板上于30℃培养48 h,挑取单菌落多次划线分离得到耐锰纯菌种。

用亮柏蓝(Leucoberbelin blue, LBB)试剂进行高价锰离子的检测,以检验纯化得到的菌株是否具有锰氧化活性<sup>[8]</sup>。配制 $Mn^{2+}$ 质量浓度为260 mg/L的培养基,将菌株按1%的接种量接种到培养基并培养5 d;取1 mL菌液离心,倒掉上清液,在沉淀中加入1 mL 45 mmol/L乙酸和0.5 mL质量分数为0.04%的LBB,摇匀后静置一段时间,观察液体颜色的变化。

### 1.3 除锰细菌的鉴定

#### 1.3.1 形态观察

对筛选出的菌株进行划线分离,采用革兰氏染色法观察单菌落的形态特征,包括菌落的颜色、大小、形状等<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.2 16S rRNA基因序列分析

利用细菌鉴定的特异性通用引物27F和1492R对菌液进行16S rRNA基因的PCR片段扩增<sup>[8]</sup>。利用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,利用CW2302A快速琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(康为试剂生物科技有限公司)纯化PCR产物。将纯化的DNA寄送测序;将测序获得的16S rRNA基因序列在GenBank数据库中通过BlastN程序进行相似序列的搜索对比,再运用MAGE 7.0软件<sup>[10]</sup>进行同源比对,构建系统发育进化树。

### 1.4 菌株生长及 $Mn^{2+}$ 去除特性研究

考察菌株的生长情况并对其 $Mn^{2+}$ 去除特性进行研究。将菌株以1%的接种量接种到 $Mn^{2+}$ 质量浓度分别为0、130、260、488、814 mg/L的200 mL液体培养基中,在120 r/min、30℃条件下培养6 d,间隔一定时间取样测菌液pH。另取1 mL菌液离心,取上清液在450 nm处测定其吸光度,计算培养基中剩余的 $Mn^{2+}$ 得到 $Mn^{2+}$ 去除率。

### 1.5 菌株表面锰化合物的表征分析

通过X射线衍射(XRD)<sup>[11]</sup>、扫描电镜-X射线能谱分析(SEM-EDS)<sup>[12]</sup>等分析方法对细菌表面锰化合物的表现特征进行分析。

将菌株接种到含 $Mn^{2+}$ 的液体培养基中培养5 d,

在 6 000 r/min 转速下离心 5 min, 倒掉上清液, 用无菌水清洗菌体数次, 倒掉上清液, 放入冰箱冷冻, 完全结冰后, 用真空冷冻干燥机干燥直至成粉末, 压片处理后, 在管电流 40 mA、管电压 40 kV、扫描速度  $5(^{\circ})/\text{min}$ 、 $2\theta$  扫描范围  $10^{\circ}\sim 80^{\circ}$  条件下进行 XRD 衍射测定。

将菌株接种到含  $\text{Mn}^{2+}$  的液体培养基中培养 5 d, 在 6 000 r/min 转速下离心 5 min, 倒掉上清液, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗菌体 3 次, 加入 2.5% 的戊二醛混匀后放入冰箱固定 24 h。之后用不同浓度的酒精对其进行梯度脱水, 每次脱水 10 min, 离心后弃去上清液, 脱水完毕真空干燥直至菌体成粉末, 喷金处理后用扫描电子显微镜进行 SEM 观察和 EDS 能谱分析。

### 1.6 胶囊固定菌的制备

参照文献[13]中海藻酸钠-壳聚糖-粉末活性炭微胶囊的制备方法制备胶囊固定菌。以  $m$  (活性炭):  $m$  (海藻酸钠溶液) = 0.75: 100 的比例向质量分数为 2% 的海藻酸钠溶液加入粉末活性炭形成粉末活性炭-海藻酸钠溶液。将湿菌体与粉末活性炭-海藻酸钠溶液以 1 g: 50 mL 的比例充分混匀, 滴入质量分数为 4% 的氯化钙溶液中, 固定化 1.5 h, 得到凝胶颗粒。用纯水洗去颗粒表面吸附的钙离子, 浸入质量分数为 1.8% 的壳聚糖溶液中成膜, 再用 0.055 mol/L 柠檬酸钠溶液液化内核, 最后浸入质量分数为 0.15% 的海藻酸钠溶液中覆膜, 得到胶囊固定菌。将胶囊固定菌用纯水清洗 3 次后浸在纯水中, 置于  $4^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

参照上述方法不添加实验菌种获得空白胶囊。

### 1.7 $\text{Mn}^{2+}$ 去除率对比实验

在温度  $30^{\circ}\text{C}$ 、转速 120 r/min 条件下振荡培养菌种, 经 3 次离心并洗涤后得到湿菌体; 将 1 g 湿菌体用 50 mL 无菌生理盐水重悬制得游离菌, 使用前摇匀。

调整废水中  $\text{Mn}^{2+}$  质量浓度为 150 mg/L, pH=6.8。将菌悬液、胶囊固定菌及空白胶囊均按 1 mL: 10 g 的比例接种到 100 mL 废水中, 于温度  $30^{\circ}\text{C}$ 、转速 120 r/min 条件下振荡培养 3 d 后进行  $\text{Mn}^{2+}$  去除率的测定。

### 1.8 正交实验

采用  $L_9(3^4)$  正交表进行实验设计, 选取培养时间 (A)、pH (B)、 $m$  (活性炭):  $m$  (海藻酸钠溶液) (C)、

$\text{Mn}^{2+}$  质量浓度 (D) 这 4 个因素, 每个因素下选取如表 1 所示的 3 个水平, 通过对正交实验结果进行极差分析得出优化方案, 并对优化方案进行验证。

表 1 正交因素水平

| Table 1 Orthogonal factor level |     |     |          |                         |
|---------------------------------|-----|-----|----------|-------------------------|
| 水平                              | 因素  |     |          |                         |
|                                 | A/d | B   | C        | D/(mg·L <sup>-1</sup> ) |
| 1                               | 2   | 6.0 | 0.25:100 | 50                      |
| 2                               | 4   | 7.0 | 0.75:100 | 250                     |
| 3                               | 6   | 8.0 | 1.0:100  | 500                     |

### 1.9 重复利用实验

在优化条件下检测胶囊固定菌的除锰率。一轮降解实验结束后将胶囊固定菌过滤回收, 用无菌纯水清洗 3 次, 再次按优化条件接种至废水中培养, 考察  $\text{Mn}^{2+}$  去除率, 重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和鉴定

实验经分离纯化得到了 2 株细菌 S1、S2。观察其菌落特征, 并对其进行革兰氏染色、LBB 实验, 结果见图 1。

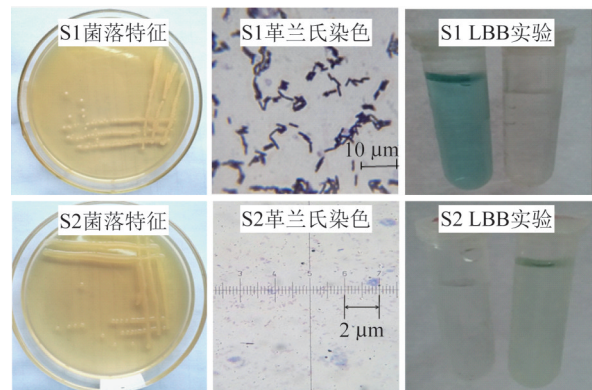


图 1 S1、S2 的菌落特征及其革兰氏染色、LBB 实验结果

Fig. 1 Colony characteristics of S1 and S2 and their Gram staining and LBB test results

由图 1 可知, 细菌 S1、S2 的菌落颜色分别为棕色和米白色, 均为不透明的圆形, 表面凸起, 为革兰氏阳性菌, 长杆状, 无鞭毛; 菌株 S1 和 S2 均具有锰氧化活性, LBB 显色结果显示菌株 S1 的显色较 S2 的深, 说明菌株 S1 的锰氧化性高于菌株 S2。

图 2 为基于 S1、S2 菌株 16s rRNA 序列的系统发育树。

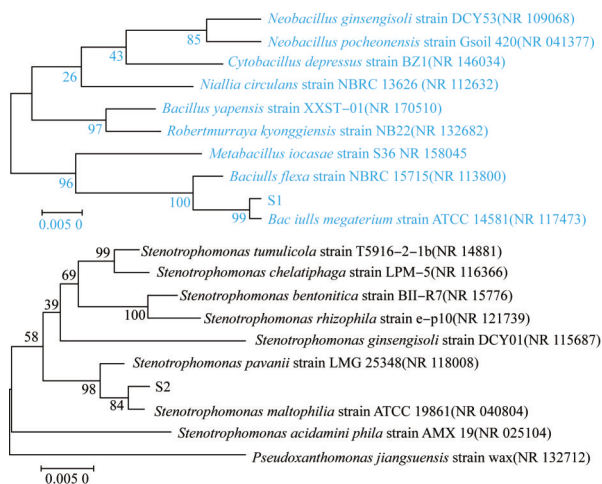


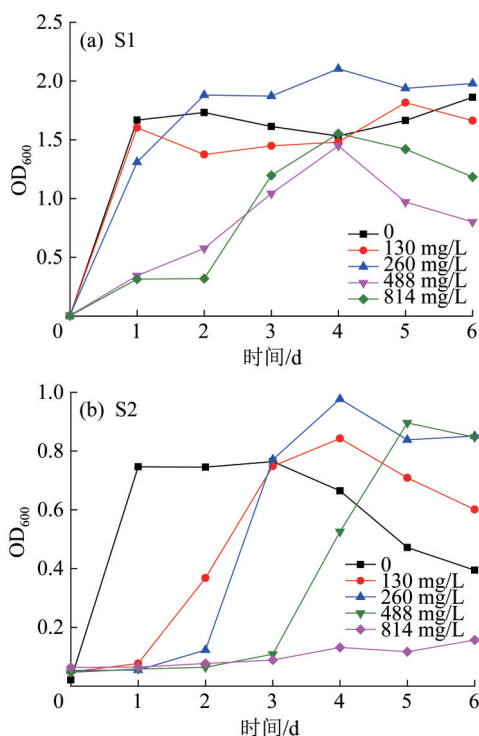
图2 基于S1、S2菌株16S rRNA序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees based on 16S rRNA sequences of S1 and S2 strains

图2所示的菌株的16S rRNA基因序列分析结果表明,菌株S1、S2分别与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)亲缘关系最为接近,推测二者可能分别为*Bacillus megaterium*和*Stenotrophomonas maltophilia*。

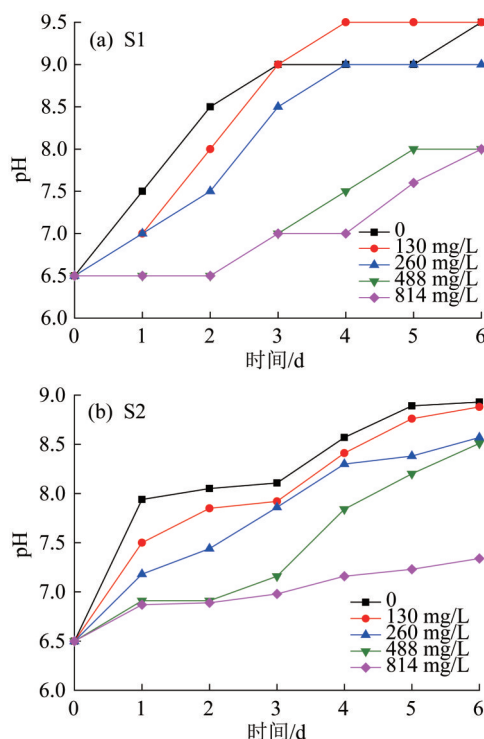
## 2.2 菌株生长情况及 $Mn^{2+}$ 去除特性

图3为菌株在不同 $Mn^{2+}$ 浓度下的生长曲线。

图3 菌株在不同 $Mn^{2+}$ 质量浓度下的生长曲线Fig. 3 Growth curves of strains at different mass concentrations of  $Mn^{2+}$ 

由图3(a)可知,S1在各 $Mn^{2+}$ 浓度下均生长良好,在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为0、130、260 mg/L下各生长曲线形状相似,说明低浓度的 $Mn^{2+}$ 对S1的生长影响不大,在高浓度 $Mn^{2+}$ 下S1的生长速度相对减小,说明S1生长受高浓度 $Mn^{2+}$ 影响较大;由图3(b)可知,S2生长受 $Mn^{2+}$ 浓度影响较大, $Mn^{2+}$ 质量浓度为814 mg/L时S2生长受到明显抑制,在其余 $Mn^{2+}$ 质量浓度下, $Mn^{2+}$ 质量浓度越高,S2进入对数生长期的时间就越长。S1、S2均在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为260 mg/L时有最大 $OD_{600}$ 值。

图4所示为在不同 $Mn^{2+}$ 浓度下进行细菌培养的培养基pH的变化曲线。

图4 不同 $Mn^{2+}$ 质量浓度下培养基pH的变化曲线Fig. 4 Change curves of medium pH at different mass concentrations of  $Mn^{2+}$ 

由图4可知,菌株S1、S2在6 d的培养过程中,菌液pH都呈逐步升高的状态,由最初的6.5上升到9.0以上。

图5所示为菌株在不同 $Mn^{2+}$ 浓度下对 $Mn^{2+}$ 的去除率。

如图5所示,在培养时间为6 d时,S1、S2在最适生长的 $Mn^{2+}$ 质量浓度(260 mg/L)下有较为理想的除锰率,分别为97.94%、100%。S1在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为130、260 mg/L时的除锰率明显高于在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为488 mg/L时。此外,培养时间越长,菌株对 $Mn^{2+}$ 的去除率越高;S2在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为488 mg/L下的除

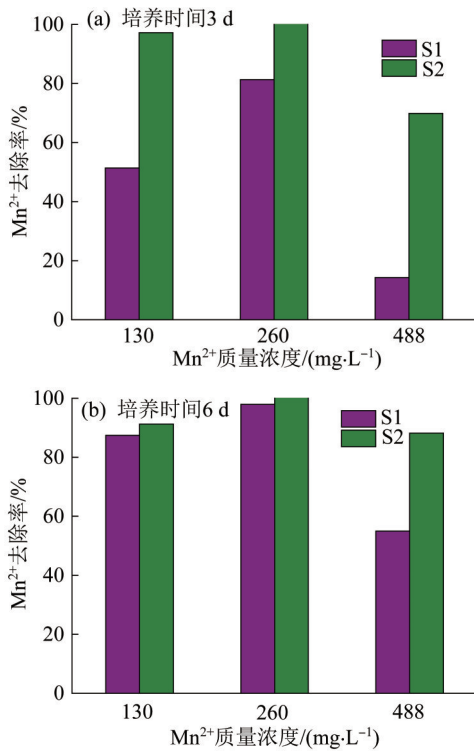


图5 在不同 Mn²⁺ 浓度下菌株的 Mn²⁺ 去除率

Fig. 5 Mn²⁺ removal rates of strains at different concentrations of Mn²⁺  
 锰率随培养时间的增加而增大,在 Mn²⁺ 质量浓度为 130、260 mg/L 时培养 3 d 的 S2 的除锰率就已接近或达到培养时间为 6 d 时的除锰率。

### 2.3 XRD 与能谱分析

图6为采用含 Mn²⁺ 和无 Mn²⁺ 培养基培养的 S1、S2 的 XRD 图谱,表2为含 Mn²⁺ 培养基培养的 S1、S2 的 SEM-EDS 分析结果。

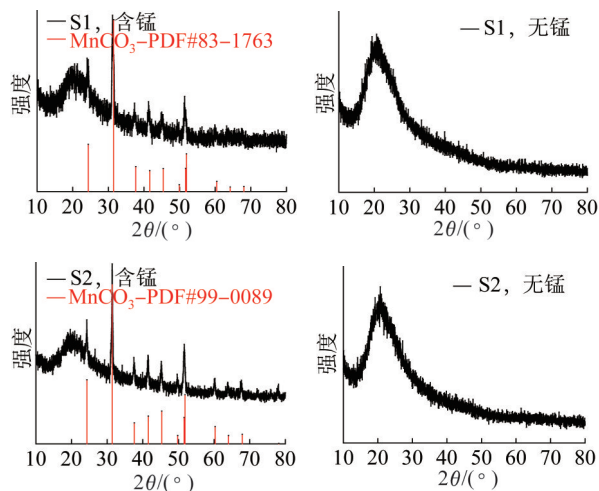


图6 含 Mn²⁺ 和无 Mn²⁺ 条件下培养的 S1、S2 的 XRD

Fig. 6 XRD patterns of S1 and S2 cultured with and without Mn²⁺

表2 S1、S2 的 SEM-EDS 分析结果

| 元素种类 | S1     |        | S2     |        |
|------|--------|--------|--------|--------|
|      | 质量分数/% | 原子分数/% | 质量分数/% | 原子分数/% |
| C    | 25.22  | 43.61  | 20.98  | 35.14  |
| N    | 2.76   | 4.09   | 3.53   | 5.07   |
| O    | 26.75  | 34.72  | 35.86  | 45.08  |
| Al   | 0.14   | 0.10   | 0.14   | 0.10   |
| Si   | 0.12   | 0.09   | —      | —      |
| P    | 0.87   | 0.59   | 0.24   | 0.16   |
| S    | 0.29   | 0.19   | 0.21   | 0.13   |
| Ca   | 0.28   | 0.14   | 0.10   | 0.05   |
| Mn   | 41.87  | 15.83  | 38.94  | 14.26  |
| Fe   | 1.71   | 0.64   | —      | —      |

由图6可知,菌株 S1 表面锰氧化作用产物的 XRD 图谱与 PDF2-2004 标准矿化物卡片库编号为 PDF#83-1763(MnCO₃) 的图谱拟合度最好,菌株 S2 表面锰氧化作用产物 XRD 图谱与 PDF2-2004 标准矿化物卡片库编号为 PDF#99-0089(MnCO₃) 的图谱拟合度最好,可判断 S1、S2 菌体表面产生的锰氧化物均为 MnCO₃。表2能谱分析结果显示含 Mn²⁺ 培养基培养的细菌 S1、S2 表面的锰质量分数都很高,分别为 41.87%、38.94%,说明菌体表面有大量含锰物质。

### 2.4 胶囊固定菌成品

图7为胶囊固定菌外观。制备好的胶囊固定菌呈小圆球状,直径约 5 mm,大小较为均匀。

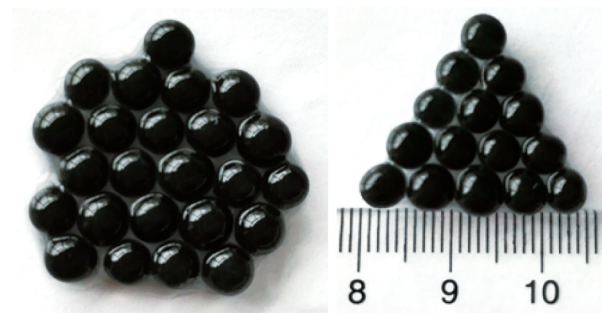


图7 胶囊固定菌外观

Fig. 7 Appearance of immobilized bacteria in capsules

### 2.5 Mn²⁺ 去除率分析

图8为游离菌、空白胶囊、胶囊固定菌对 Mn²⁺ 去除率的对比结果。

如图8所示,经过 3 d 的降解,游离菌 S1、S2,空白胶囊及胶囊固定菌 S1、S2 的平均 Mn²⁺ 去除率分别是 16.79%、21.23%、34.94%、64.07%、57.53%,空白胶囊

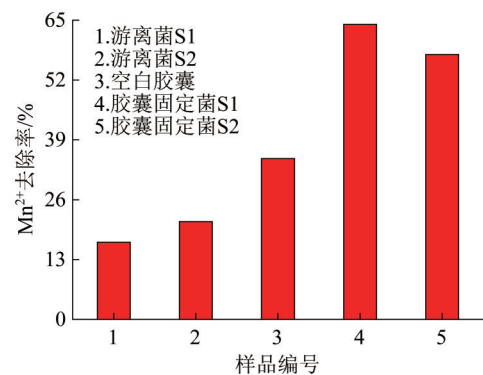


图8 游离菌、空白胶囊、胶囊固定菌对Mn<sup>2+</sup>去除效果

Fig. 8 Removal of Mn<sup>2+</sup> by free bacteria, blank capsule and immobilized bacteria in capsules

因活性炭的吸附作用使其也具有一定的除Mn<sup>2+</sup>能力,胶囊固定菌的除锰率明显高于游离菌的除锰率。

2.6 正交实验分析

胶囊固定菌S1和S2的正交实验结果如表3、表4所示,表中*k*<sub>1</sub>、*k*<sub>2</sub>、*k*<sub>3</sub>分别代表各因素水平下Mn<sup>2+</sup>的平均去除率,*r*为极差值。

表3 胶囊固定菌S1去除Mn<sup>2+</sup>的正交实验结果

Table 3 Orthogonal experiment results of removing Mn<sup>2+</sup> by immobilized bacteria S1 in capsule

| 实验序号                  | A/d   | B     | C        | D/(mg·L <sup>-1</sup> ) | Mn <sup>2+</sup> 去除率/% |
|-----------------------|-------|-------|----------|-------------------------|------------------------|
| 1                     | 2     | 6.0   | 0.25:100 | 50                      | 75.54                  |
| 2                     | 2     | 7.0   | 0.75:100 | 250                     | 31.48                  |
| 3                     | 2     | 8.0   | 1.0:100  | 500                     | 42.72                  |
| 4                     | 4     | 6.0   | 0.75:100 | 500                     | 50.87                  |
| 5                     | 4     | 7.0   | 1.0:100  | 50                      | 79.79                  |
| 6                     | 4     | 8.0   | 0.25:100 | 250                     | 30.97                  |
| 7                     | 6     | 6.0   | 1.0:100  | 250                     | 25.27                  |
| 8                     | 6     | 7.0   | 0.25:100 | 500                     | 39.18                  |
| 9                     | 6     | 8.0   | 0.75:100 | 50                      | 93.11                  |
| <i>k</i> <sub>1</sub> | 49.91 | 50.56 | 48.56    | 82.81                   |                        |
| <i>k</i> <sub>2</sub> | 53.88 | 50.15 | 58.49    | 29.24                   |                        |
| <i>k</i> <sub>3</sub> | 52.52 | 55.60 | 49.26    | 44.26                   |                        |
| <i>r</i>              | 3.96  | 5.45  | 9.92     | 53.57                   |                        |
| 因素主次                  |       |       |          |                         | D>C>B>A                |

表3中,胶囊固定菌S1在3个时间水平下的除锰率相差不大,考虑成本及Mn<sup>2+</sup>去除率,S1的除锰时间定为2 d。根据pH、*m*(活性炭):*m*(海藻酸钠溶液)、Mn<sup>2+</sup>质量浓度3个因素下的最大的除锰率,其余条件定为pH=8.0、*m*(活性炭):*m*(海藻酸钠溶液)=0.75:100、Mn<sup>2+</sup>质量浓度为50 mg/L。表4中,胶囊固定菌S2在4个因素的不同水平下均有各自最高

表4 胶囊固定菌S2去除Mn<sup>2+</sup>的正交实验结果

Table 4 Orthogonal experiment results of removing Mn<sup>2+</sup> by immobilized bacteria S2 in capsule

| 实验序号                  | A/d   | B     | C        | D/(mg·L <sup>-1</sup> ) | Mn <sup>2+</sup> 去除率/% |
|-----------------------|-------|-------|----------|-------------------------|------------------------|
| 1                     | 2     | 6.0   | 0.25:100 | 50                      | 81.00                  |
| 2                     | 2     | 7.0   | 0.75:100 | 250                     | 96.37                  |
| 3                     | 2     | 8.0   | 1.0:100  | 500                     | 85.90                  |
| 4                     | 4     | 6.0   | 0.75:100 | 500                     | 46.61                  |
| 5                     | 4     | 7.0   | 1.0:100  | 50                      | 68.29                  |
| 6                     | 4     | 8.0   | 0.25:100 | 250                     | 43.82                  |
| 7                     | 6     | 6.0   | 1.0:100  | 250                     | 35.68                  |
| 8                     | 6     | 7.0   | 0.25:100 | 500                     | 67.07                  |
| 9                     | 6     | 8.0   | 0.75:100 | 50                      | 91.79                  |
| <i>k</i> <sub>1</sub> | 87.76 | 54.43 | 63.96    | 80.36                   |                        |
| <i>k</i> <sub>2</sub> | 52.91 | 77.24 | 78.26    | 58.62                   |                        |
| <i>k</i> <sub>3</sub> | 64.85 | 73.84 | 63.29    | 66.53                   |                        |
| <i>r</i>              | 34.85 | 22.81 | 14.97    | 21.74                   |                        |
| 因素主次                  |       |       |          |                         | A>B>D>C                |

的除锰率,所以胶囊固定菌S2的除锰条件定为时间2 d、pH=7.0、*m*(活性炭):*m*(海藻酸钠溶液)=0.75:100、Mn<sup>2+</sup>质量浓度为50 mg/L。通过正交实验结果分析所得出的2个优化方案并不包含在正交表已经做过的9个实验方案中,体现了正交实验的优越性。

按2种胶囊固定菌各自的最优方案进行实验,得到胶囊固定菌S1的除锰率为96.33%(>93.11%),说明除Mn<sup>2+</sup>最佳条件组合为*A*<sub>1</sub>*B*<sub>3</sub>*C*<sub>2</sub>*D*<sub>1</sub>,即时间2 d、pH=8.0、*m*(活性炭):*m*(海藻酸钠溶液)=0.75:100、Mn<sup>2+</sup>质量浓度50 mg/L。胶囊固定菌S2的除锰率为94.88%(<96.37%),说明除锰最佳条件组合为*A*<sub>1</sub>*B*<sub>2</sub>*C*<sub>2</sub>*D*<sub>2</sub>,即时间2 d、pH=7.0、*m*(活性炭):*m*(海藻酸钠溶液)=0.75:100、Mn<sup>2+</sup>质量浓度250 mg/L。

在胶囊固定菌S1的最优方案*A*<sub>1</sub>*B*<sub>3</sub>*C*<sub>2</sub>*D*<sub>1</sub>及胶囊固定菌S2的最优方案*A*<sub>1</sub>*B*<sub>2</sub>*C*<sub>2</sub>*D*<sub>2</sub>下进行后续实验。

2.7 重复利用实验

胶囊固定菌S1和S2的重复利用结果见图9。

如图9所示,在最佳除锰条件下,胶囊固定菌S1、S2第1次使用时的除锰率分别为95.40%、95.73%,经3轮重复实验后胶囊固定菌的除锰率分别有59.73%、34.60%,说明胶囊固定菌具有一定重复利用性,且胶囊固定菌S1的重复利用性能强于S2。

胶囊固定菌S1、S2经3轮重复利用实验后,整体外

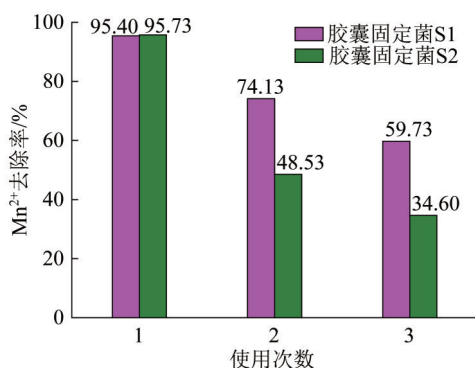


图9 重复利用实验结果

Fig. 9 Reuse the experimental results

观基本正常,有个别颗粒观察到轻微破损现象(<5%),原因可能是制备及转移培养过程中导致的机械损伤或培养过程中胶囊吸水溶胀,致使球体破裂。可见,胶囊固定菌具备一定的重复利用性能,有较好的经济效益和环境效益。

### 3 讨论

目前,研究者已从环境中筛选出多株具有耐锰特点的芽孢杆菌。*Bacillus megaterium* MB2<sup>[14]</sup>的最高耐  $Mn^{2+}$  质量浓度为 550 mg/L,但其在含  $Mn^{2+}$  条件下的生长均不如无  $Mn^{2+}$  条件下的生长,  $Mn^{2+}$  质量浓度为 660 mg/L 时菌体几乎不能生长,且其在  $Mn^{2+}$  质量浓度为 55 mg/L 的培养基中培养 7 d 后对  $Mn^{2+}$  的去除率仅有  $(61.7 \pm 1.17)\%$ ; *Bacillus megaterium* 79<sup>[15]</sup> 在  $Mn^{2+}$  质量浓度为 55 mg/L 时对数期延迟,菌体生长受到明显抑制,在高质量浓度(550 mg/L)的  $Mn^{2+}$  下基本丧失了锰氧化能力。而本研究中菌株 S1 在 0~814 mg/L 的  $Mn^{2+}$  质量浓度范围内生长过程基本正常,在 260 mg/L  $Mn^{2+}$  质量浓度下生长情况最好且有最高除锰率 97.94%。

*Stenotrophomonas maltophilia* 很少作为除锰细菌出现,但有关于 *Stenotrophomonas maltophilia* 去除重金属离子  $U^{4+}$ <sup>[16]</sup> 和  $Cu^{2+}$ <sup>[17]</sup> 的报道。在本研究中菌株 S2 作为锰氧化细菌用于重金属  $Mn^{2+}$  的去除,在 130~488 mg/L  $Mn^{2+}$  下的最终生物量均优于无  $Mn^{2+}$  条件下,  $Mn^{2+}$  质量浓度为 260 mg/L 时 S2 对  $Mn^{2+}$  的去除率达到了 100%。

和其他重金属离子一样,高浓度  $Mn^{2+}$  会通过影响细胞分裂、细胞膜通透性、细胞生理生化反应等<sup>[18]</sup> 对细胞生长造成抑制或毒害作用,研究表明,

细菌可以通过细菌胞外分泌物、细胞表面的重金属吸附作用、胞内分子机制等<sup>[19]</sup> 在高浓度重金属离子环境中生长。因 S1、S2 都具有良好的耐锰能力,初步说明 S1、S2 可能具有上述一种或几种耐受机制,但具体的耐受机制还有待深入研究。

不同于大多数锰氧化细菌那样将  $Mn^{2+}$  氧化为  $Mn^{4+}$ , S1、S2 这 2 株细菌是将  $Mn^{2+}$  转化为不溶的  $MnCO_3$ 。培养过程中培养基 pH 呈上升趋势,最高达到了 9.0 以上,可能是菌体在代谢过程中生成了  $OH^-$  使培养基 pH 增大,促进了化学反应  $Mn^{2+} + HCO_3^- + OH^- = MnCO_3 + H_2O$  的发生<sup>[4]</sup>。LBB 显色实验表明细菌在培养过程中有高价锰的生成,但菌体表面化合物鉴定为  $MnCO_3$ ,可能是由于生成的锰氧化物量太少而未被检测出来,也有可能是一开始生成的高价锰氧化物不稳定,在细菌培养过程中又转化为了低价锰<sup>[20]</sup>。研究发现重金属离子<sup>[21-22]</sup> 能以络合、离子交换、螯合等方式与细菌细胞壁表面的聚合电解质(肽聚糖、蛋白质等)、活性基团(羧基、羟基等)结合,能谱分析结果显示 S1、S2 菌体表面有较高含锰量(41.87%、38.94%),说明除了氧化作用形成的含锰化合物之外,细菌还可能通过物理吸附和积累等作用协同去除  $Mn^{2+}$ 。

将筛选出的 2 株除锰细菌通过包埋法制成胶囊固定菌,2 种胶囊固定菌的除锰率显著高于其对应的游离菌,体现了微生物固定化技术的高效性<sup>[23]</sup>。胶囊固定菌的除锰率显著大于空白胶囊和游离菌相应的值,主要原因可能有:(1)活性炭与锰氧化菌具有协同作用,活性炭的吸附作用加上锰氧化菌的生物氧化作用使胶囊固定菌的除锰率大大提高;(2)活性炭具有保护作用,活性炭表面存在许多微孔,表面积巨大,可达 1 000  $m^2/g$  以上<sup>[24]</sup>,活性炭发达的孔隙使微生物可以大量附着,并为微生物生长提供了相对稳定的环境;(3)胶囊固定菌有更好的底物耐受性,由于传质扩散作用,胶囊表面到内部、细胞外到细胞内形成由高到低的  $Mn^{2+}$  浓度梯度,因此胶囊固定菌比游离菌耐受更高的  $Mn^{2+}$  浓度,除锰率也更高。

废水 COD 可能是影响细菌除锰率的一个因素,高 COD 有利于水体中细菌的生长<sup>[25]</sup>,但对比实验和

正交实验中废水的COD仅为50 mg/L,有机物含量少不利于细菌的生长,而含 $Mn^{2+}$ 培养基中加入了足量的有机物,所以游离菌S1、S2在废水中的除锰率明显小于在含 $Mn^{2+}$ 培养基中除锰率。正交实验结果显示,废水中的 $Mn^{2+}$ 浓度是胶囊固定菌S1除锰过程中非常重要的影响因子,固定菌S1在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为50 mg/L时的除锰率是在其余2个浓度下的2倍以上,说明胶囊固定菌S1适用于处理低 $Mn^{2+}$ 浓度的废水; $Mn^{2+}$ 浓度对胶囊固定菌S2的影响较小,固定菌S2在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为250 mg/L时有最大除锰率96.37%,但其在 $Mn^{2+}$ 质量浓度为50、500 mg/L时的除锰率也能达到91.79%和85.93%,胶囊固定菌S2在高浓度和低浓度 $Mn^{2+}$ 废水处理中均适用。胶囊固定菌S1、S2在特定条件下均具备高效除锰能力,胶囊固定菌S2的应用范围较S1更广,后续可进一步验证废水COD对胶囊固定菌除锰率的影响,探讨其应用潜力。

#### 4 结论

(1)从桂林市大新锰矿区周边的土壤中筛选出的2株锰氧化细菌可能为S1巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和S2嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*),2株细菌产生的锰转化物都为 $MnCO_3$ 。

(2) $Mn^{2+}$ 去除率对比实验表明胶囊固定菌的除锰率显著高于对应游离菌的除锰率。通过正交实验得出胶囊固定菌S1的最佳除锰条件为时间2 d、pH=8.0、 $Mn^{2+}$ 质量浓度50 mg/L、 $m$ (活性炭): $m$ (海藻酸钠溶液)=0.75:100,固定菌S2最佳除锰条件为时间2 d、pH=7.0、 $Mn^{2+}$ 质量浓度250 mg/L、 $m$ (活性炭): $m$ (海藻酸钠溶液)=0.75:100。

(3)在最佳除锰条件下,胶囊固定菌S1、S2第1次使用时的除锰率分别为95.40%、95.73%,经3轮重复实验后胶囊固定菌的除锰率仍有59.73%、34.60%,说明胶囊固定菌具有一定重复利用性。

#### 参考文献

- [1] 刘学鹏,潘高峰,赵遥菲,等. 地下水中锰污染现状及治理技术进展[J]. 当代化工研究, 2021(23): 89-91.  
LIU Xuepeng, PAN Gaofeng, ZHAO Yaofei, et al. Current status of Mn

- pollution in groundwater and progress in treatment technology[J]. Modern Chemical Research, 2021(23): 89-91.
- [2] 赵海华,刘林斌. 生物法去除地下水铁锰的影响因素研究[J]. 工程建设与设计, 2013(3): 128-130.  
ZHAO Haihua, LIU Linbin. Study on factors affecting biological removal of iron and manganese in groundwater[J]. Construction & Design for Project, 2013(3): 128-130.
- [3] 刘振洋,金琳,安强. 锰氧化细菌分类及作用机制研究进展[J]. 当代化工研究, 2021(22): 163-164.  
LIU Zhenyang, JIN Lin, AN Qiang. Research progress on the type and mechanism of manganese-oxidizing bacteria[J]. Modern Chemical Research, 2021(22): 163-164.
- [4] 周静晓,刘颜军,冉昊,等. 五株产 $MnCO_3$ 细菌的除锰特性[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 573-579.  
ZHOU Jingxiao, LIU Yanjun, RAN Hao, et al. Manganese removal mechanisms of five bacterial strains with the abilities to produce  $MnCO_3$ [J]. Microbiology China, 2010, 37(4): 573-579.
- [5] 张凤君,王斯佳,钟爽,等. 锰细菌的选育及其固定化除锰[J]. 科技导报, 2011, 29(9): 26-30.  
ZHANG Fengjun, WANG Sijia, ZHONG Shuang, et al. Breeding of manganese-oxidizing bacteria and application of manganese removal by immobilization technology[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(9): 26-30.
- [6] 张磊. 微生物固定化技术在废水处理中的应用[J]. 农业与技术, 2021, 41(14): 139-141.  
ZHANG Lei. Application of microbial immobilization technology in wastewater treatment[J]. Agriculture and Technology, 2021, 41(14): 139-141.
- [7] 许爱清,向言词,杨光玺,等. 抗锰细菌的分离鉴定及其对生猪养殖粪水中锰的去除效果[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2015, 41(3): 307-312.  
XU Aiqing, XIANG Yanci, YANG Guangxi, et al. Isolation, identification of a manganous salt resistant bacterium and manganese removal from pig-breeding fecal wastewater[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2015, 41(3): 307-312.
- [8] 侯荷霞. 自养型锰氧化菌的选育及除锰效果研究[J]. 中国环境管理干部学院学报, 2016, 26(4): 85-89.  
HOU Hexia. A research on screening and identifying autotrophic manganese-oxidizing bacteria and manganese removal effect [J]. Journal of Environmental Management College of China, 2016, 26(4): 85-89.
- [9] 郑洁,孟佑婷,方瑶瑶,等. 一株锰氧化细菌的分离、鉴定及其锰氧化特性[J]. 微生物学报, 2016, 56(11): 1699-1708.  
ZHENG Jie, MENG Youting, FANG Yaoyao, et al. Isolation and characterization of a manganese-oxidizing bacterium from soils[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(11): 1699-1708.

- [10] LIANG Jinsong, BAI Yaohui, HU Chengzhi, et al. Cooperative Mn(II) oxidation between two bacterial strains in an aquatic environment[J]. Water Research, 2016, 89: 252–260. [LinkOut]
- [11] 刘颜军, 周静晓, 王革娇. 锰氧化菌 *Bacillus* sp. MK3-1 的 Mn(II) 氧化特性和除锰能力研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 473–478. LIU Yanjun, ZHOU Jingxiao, WANG Gejiao. Mn(II) oxidation and removal by a manganese-oxidizing bacterium *Bacillus* sp. MK3-1[J]. Microbiology, 2009, 36(4): 473–478.
- [12] 晏平, 姜理英, 陈建孟, 等. 锰氧化菌 *Aminobacter* sp. H1 的分离鉴定及其锰氧化机制研究[J]. 环境科学, 2014, 35(4): 1428–1436. YAN Ping, JIANG Liying, CHEN Jianmeng, et al. Isolation and identification of Mn oxidizing bacterium *Aminobacter* sp. H1 and its oxidation mechanism[J]. Environmental Science, 2014, 35(4): 1428–1436.
- [13] 李朝霞. 海藻酸钠-壳聚糖-粉末活性炭生物微胶囊的制备[J]. 膜科学与技术, 2007, 27(6): 37–41. LI Zhaoxia. SA-CA-PAC bio-microcapsule prepared by sodium alginate-chitosan-active carbon powder[J]. Membrane Science and Technology, 2007, 27(6): 37–41.
- [14] 崔馨文. 锰氧化细菌的分离鉴定及其锰氧化能力的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014. CUI Xinwen. Isolation, identification of manganese-oxidizing bacterium and its manganese oxidation characteristics [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [15] 卢腾飞. 土壤中锰氧化菌的筛选及氧化  $Mn^{2+}$  的特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010. LU Tengfei. The isolation of manganese-oxidizing bacteria in soil and the characteristics of  $Mn^{2+}$  oxidation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2010.
- [16] 陈天宇, 孙敏, 冯红. 嗜麦芽糖寡养单胞菌 H002 对铀的生物吸附[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58(5): 145–151. CHEN Tianyu, SUN Min, FENG Hong. Biosorption of uranium by *Stenotrophomonas maltophilia* H002[J]. Journal of Sichuan University: Natural Science Edition, 2021, 58(5): 145–151.
- [17] ZHAO Lianheng, LI Liang, YANG Feng, et al. Upper bound analysis of slope stability with nonlinear failure criterion based on strength reduction technique[J]. Journal of Central South University of Technology, 2010, 17(4): 836–844.
- [18] 王瑛, 林钰清, 李爱军, 等. 重金属危害机制及益生菌清除重金属机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 281–292. WANG Ying, LIN Yuqing, LI Aijun, et al. Research progress on the mechanism of heavy metal contamination and probiotics sequestration[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 281–292.
- [19] 文雅, 冷艳, 李师翁. 微生物重金属耐受性及其机制的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(9): 79–86. WEN Ya, LENG Yan, LI Shiweng. Research progress on microbial tolerance to heavy metals and its mechanisms [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 43(9): 79–86.
- [20] 田雨. 锰氧化菌的激活及生物氧化锰去除有机药物效果的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2018. TIAN Yu. Research on activation of manganese oxide bacteria and removal efficiency of pharmaceuticals by biogenic manganese oxides [D]. Chongqing: Chongqing University, 2018.
- [21] HUANG Huimin, ZHAO Yunlin, XU Zhenggang, et al. A high Mn(II)-tolerance strain, *Bacillus thuringiensis* HM7, isolated from manganese ore and its biosorption characteristics[J]. PeerJ, 2020, 8: e8589.
- [22] DING Peifei, SONG Weifeng, YANG Ziheng, et al. Influence of Zn(II) stress-induction on component variation and sorption performance of extracellular polymeric substances (EPS) from *Bacillus vallismortis* [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(6): 781–791.
- [23] 屈佳玉. 微生物固定化技术及其在污水处理领域的研究进展[J]. 工业水处理, 2010, 30(10): 14–16. QU Jiayu. Development of researches on immobilized microorganism technique and its application to wastewater treatment [J]. Industrial Water Treatment, 2010, 30(10): 14–16.
- [24] 魏伟. 活性炭在饮用水处理中的应用探讨[J]. 化工管理, 2019(4): 43–44. WEI Wei. Application of activated carbon in drinking water treatment [J]. Chemical Enterprise Management, 2019(4): 43–44.
- [25] 郇和生, 张春原, 王吉龙, 等. 污水回用时 pH、COD 对细菌生长及杀菌性能的影响[J]. 工业水处理, 2002, 22(5): 45–46. LI Hesheng, ZHANG Chunyuan, WANG Jilong, et al. Effects of pH and COD on bacteria growth and bactericidal performance while wastewater is being reused [J]. Industrial Water Treatment, 2002, 22(5): 45–46.
- [作者简介] 尹思雨(1998—), 硕士研究生. E-mail: Missyyin@126.com. 通讯作者: 邓冬梅, 副教授, 博士. E-mail: dengdongmei@163.com.
- [收稿日期] 2023-01-06(修改稿)