

造纸厂底泥中产絮凝剂菌株的筛选 及其絮凝活性研究^{*}

颜霞, 张卫, 王莉

(西北农林科技大学 生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用常规细菌分离纯化方法, 从造纸厂排污口底泥中采样, 富集培养后分离得到5株有絮凝活性的细菌, 其中菌株E₁的絮凝除浊性能较强, 稳定性最好。对E₁絮凝活性的进一步研究表明, 该絮凝剂的适宜投加量为2.0%, Ca²⁺的助凝效果较好, 且具有较好的pH稳定性。通过测定菌株E₁对高岭土悬浮液的絮凝活性, 发现其对高岭土悬浮液的絮凝活性达到90.32%, 产絮凝剂的最佳条件为pH 8.0, 温度40℃, 180 r/min 摇床培养72 h。

[关键词] 生物絮凝剂; 菌种选育; 絮凝活性

[中图分类号] X703.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0151-04

微生物絮凝剂是指利用微生物技术, 通过微生物的发酵、抽提和精制而得到的一类絮凝剂。微生物絮凝剂具有许多独特的性质和优点, 如易分离、易生物降解、无毒无害、无二次污染, 且适用范围广, 具有除浊脱色性能等^[1,2]。

20世纪80年代后期, 日本的Kurane从旱田土壤中分离筛选到一株红平球菌, 制成了第一种微生物絮凝剂^[3]。近年来, 越来越多的研究者投入到该领域的研究工作中来, 使微生物絮凝剂的研究进入到分子水平, 利用基因工程技术使微生物絮凝剂的研制向前迈进了一大步, 使微生物絮凝剂的大规模生产应用成为可能。但我国这方面的研究起步较晚, 水平较低, 且大都停留在絮凝剂产生菌的筛选鉴定水平上^[4~7]。

本研究从造纸厂底泥中采样进行了絮凝剂产生菌的分离筛选, 并对絮凝活性较强菌株进行了絮凝效果的影响因素研究, 以期为该菌种的进一步改造, 并最终提高其絮凝活性提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

分离自杨凌秦板造纸厂排污口底泥。

1.2 培养基

(1) 分离培养基为牛肉膏蛋白胨培养基^[8]。牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂15~20 g, 水

1 000 mL, pH 6.9~7.1。

(2) 发酵培养基。葡萄糖20 g, 蛋白胨0.5 g, 酵母膏0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄ 0.2 g, NaCl 0.1 g, 水1.0 L; pH 8.0。

1.3 菌种的富集、分离和纯化

从造纸厂排污口采集底泥, 在牛肉膏蛋白胨液体培养基内加入适量造纸废水进行连续富集培养, 然后在牛肉膏蛋白胨培养基上进行分离纯化。

1.4 菌株的筛选

将分离纯化后的菌种转接于液体培养基中, 摇床培养48 h (180 r/min, 30℃)。取培养液测其对高岭土悬液的絮凝活性, 选取具有较高絮凝活性的菌株作为复筛菌种。

1.5 絮凝活性的测定^[3]

将发酵液加入到4 g/L的高岭土悬液中进行絮凝试验。紫外可见分光光度计596 nm处测定上层清液浊度B, 以不加培养液的上清液浊度A为对照, 通过浊度的减少来确定絮凝程度, 以下式计算絮凝活性。

絮凝活性/% = $(A - B) \div A \times 100 \times \text{稀释倍数}$
式中, A为对照上清液596 nm处吸光度; B为样品上清液596 nm处吸光度。

1.6 培养液中絮凝活性的分布

将培养液于10 000 r/min离心30 min, 取上清

^{*} [收稿日期] 2004-09-13

[作者简介] 颜霞(1974-), 女, 山东泰安人, 讲师, 在读博士, 主要从事工业微生物育种和环境微生物研究。

液。菌体用无菌水洗涤后悬浮在与上清液等体积的磷酸盐缓冲液中, 定量测定培养液、去菌细胞上清液及菌细胞悬液对高岭土悬液的絮凝活性。

1.7 絮凝活性影响因素的分析

(1) 加样量对絮凝效果的影响。在 10 mL 高岭土悬浮液中加入不同体积的 E_1 发酵液, 测定其絮凝活性。(2) 絮凝体系 pH 值对絮凝活性的影响。在 10 mL 具不同 pH 值的高岭土悬浮液中各加入 0.2 mL 的发酵液, 测定其絮凝活性。(3) 不同金属离子对絮凝效果的影响。将不同金属阳离子(10 g/kg) 分别加到用高岭土和发酵液配制的混合液中, 测定阳离子对菌株絮凝效果的影响。(4) 温度对絮凝效果的影响。在 20, 30, 40 °C 时测定其发酵液的絮凝活性。(5) 培养时间与絮凝活性的关系。在装有发酵培养基的摇瓶中接入一定量的菌种, 于 30 °C, 180 r/min 条件下摇床培养, 每隔 10 h 取样 1 次, 测其絮凝活性。(6) 热稳定性。将絮凝剂提取液于 100 °C 水浴加热 30~60 min, 测其絮凝活性。

1.8 菌株形态观察和性质的测定^[8]

用革兰氏染色法进行染色, 光学显微镜下观察菌株的形态及颜色反应。

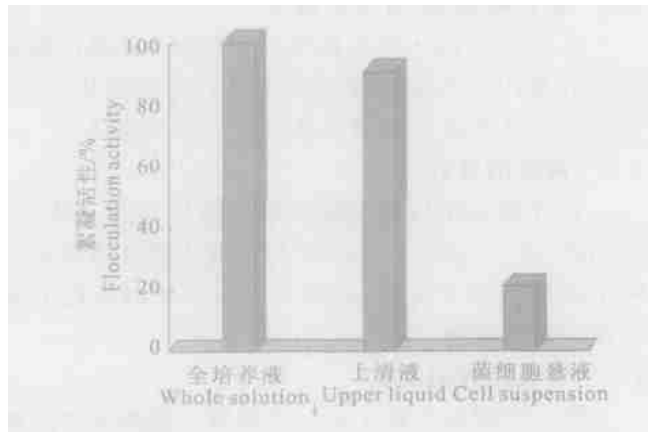


图 1 培养液中絮凝活性的分布

Fig. 1 Distribution of flocculation activity in nutrient solution

2.3.2 加样量 在 10 mL 高岭土悬浮液中加入不同体积的 E_1 发酵液, 絮凝效果并不与加样量成正比, 而是存在一个有效范围, 并在加样量为 2.0% 发酵液时达到最佳值(图 3)。这与一般絮凝剂的絮凝规律相符^[2]。

2.3.3 絮凝体系 pH 值 由图 4 可知, 在 pH=4~12 时, 该絮凝剂均有较好的絮凝效果, 其中以 pH=7.5 时最好, 絮凝活性达 90.32%。说明该絮凝剂具

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

采集的土样和活性污泥经分离纯化后, 以高岭土悬液为测试材料, 经初筛获得了 5 株有絮凝能力的菌株。定量测定絮凝活性, 复筛出 3 株絮凝活性高的菌株 E_1 , E_4 和 E_{11} , 经多次重复试验和传代培养, 发现 E_1 絮凝活性的稳定性最好, 故对其进行下一步试验。

2.2 培养液中絮凝活性的分布

以未分离的培养液絮凝活性为 100%, 测定菌株 E_1 的全培养液、去菌上清液和菌悬液的絮凝活性, 结果如图 1 所示。由图 1 可见, 菌株 E_1 培养液絮凝活性的 80% 分布在去菌上清液中, 20% 存在于细胞中。絮凝剂活性大部分分布在培养液中有利于降低提取成本。

2.3 絮凝活性的影响因素分析

2.3.1 培养时间 以 E_1 为絮凝剂产生菌, 测得其产絮凝剂的时间曲线如图 2 所示。由图 2 可见, 菌株 E_1 的絮凝活性随菌株生长量的增加而增加, 在 72 h 后达到稳定。因此其最佳培养时间为 72 h 左右。

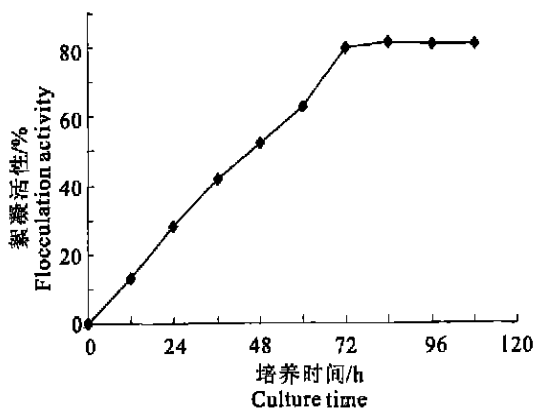


图 2 E_1 摇瓶培养时间与絮凝活性的关系

Fig. 2 Relation between culture time and flocculation activity

有较好的 pH 稳定性。

2.3.4 金属阳离子 由表 1 可见, 不同金属阳离子对絮凝效果的影响各有差异, Al^{3+} , Ca^{2+} 的添加有利于絮凝剂的絮凝作用, 但增加并不十分显著, 而 Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} 等阳离子的加入不利于絮凝作用的发生。

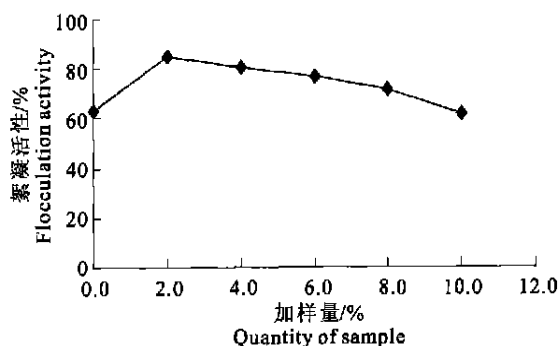


图3 发酵液加样量对絮凝效果的影响

Fig 3 Effect of sample quantity on flocculation activity

表1 金属阳离子对絮凝活性的影响

Table 1 Effect of positive ion on flocculation activity

阳离子 Positive ion	絮凝活性 Flocculation activity	阳离子 Positive ion	絮凝活性 Flocculation activity
对照(CK)	91.39	Mn ²⁺	82.1
Al ³⁺	92.5	Cu ²⁺	67.8
Ca ²⁺	95.4	K ⁺	81.5
Fe ²⁺	64.2		

2.3.5 絮凝体系温度 温度对絮凝效果具有很大影响,随着温度的升高,水中分子热运动加快,促使悬浮颗粒间碰撞机会增加,更有利于絮体的形成。本试验结果证实,在20, 30, 40℃时,测定的絮凝活性分别为59.26%, 78.55%和91.13%,这与前人的研究结果^[9, 10]相同。

2.3.6 热稳定性 将絮凝剂提取液于100℃水浴加热30 min,絮凝率下降了约50%;继续加热至60 min,则絮凝率不再继续下降。由此推断,该絮凝剂

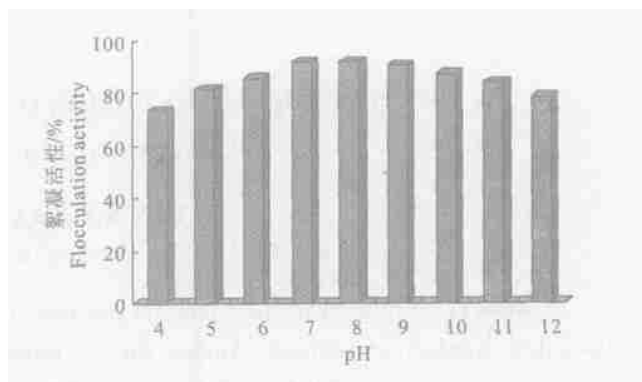


图4 pH对絮凝活性的影响

Fig 4 Effect of pH on flocculation activity

组成中可能包含一部分热稳定性物质(如多糖)及另一部分热不稳定性物质(如蛋白质)。另一种可能是由于加热造成线状分子的无规卷曲,导致桥联作用丧失,而电中和作用依然存在。

2.4 菌株形态观察与性质测定

菌株E₁菌落表面浅白色,粘稠,光镜下菌株形态为杆状,革兰氏染色后呈红色,为革兰氏阴性菌。据文献^[11]记载,产絮凝剂的细菌种类比较多,其中绝大多数为革兰氏阳性菌,而革兰氏阴性菌较少。

3 结论

本试验结果表明,菌株E₁絮凝活性主要存在于去菌体的上清液中,最佳培养时间为72 h左右,摇床转速180 r/min。絮凝体系的最佳pH为7.5,温度为40℃,加样量为2.0%。在较广泛的pH范围内,E₁所产的絮凝剂对高岭土悬浮液体系有较强的絮凝能力,Ca²⁺是其一种相对较好的助凝剂。

[参考文献]

- [1] 陈坚,任洪强,堵国成,等.环境生物技术应用与发展[M].北京:中国轻工业出版社,2001.
- [2] 张本兰.新型高效、无毒水处理剂——微生物絮凝剂的开发与应用[J].工业水处理,1996,16(1): 7-8.
- [3] Kurane R, Toeda K, Takeda K, et al. Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(9): 2301-2307.
- [4] 王镇.几株絮凝剂产生菌的特性研究[J].微生物学报,1995,35(2): 121-129.
- [5] 宫小燕,王竞,周集体.絮凝剂的筛选及其培养条件优化[J].环境科学研究,1999,12(4): 9-11.
- [6] 李兆龙,虞杏英.微生物絮凝剂[J].上海环境科学,1991,10(9): 45-46.
- [7] 张彤,朱怀兰,林哲.微生物絮凝剂的研究与应用进展[J].应用与环境生物学报,1996,2(1): 95-100.
- [8] 程丽娟,李志芳,唐明,等.微生物学实验技术[M].陕西杨陵:天则出版社,1993.
- [9] Kurane R, Nohata Y. Microbial flocculation of wastewater liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(4): 1127-1129.
- [10] Choi C W, Yoo S A, Oh I H, et al. Characterization of an extracellular flocculating substance produced by planktonic *Cyanobacterium anabaena* sp. [J]. Biotech Lett, 1998, 20(7): 643-646.
- [11] 刘丽,朴勇.微生物絮凝剂的研究与应用[J].抚顺轻加工技术,2003,(5): 11-15.

Screening of flocculant-producing microorganisms and studying of the flocculant activity

YAN Xia, ZHANG Wei, WANG Li

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 5 strains were isolated and purified from sewage sludge. Each strain was cultured in relevant flocculant-producing mediums. Among these strains, E₁ had high and stable flocculating activity for Kaolin suspension. Ca²⁺ was of help in flocculation. When the sample was added at the proportion of 2.0%, the flocculation activity reached 90.32%, and remained firm as pH value changed. The optimum cultural condition of E₁ was decided: pH 8.0, temperature 40 °C, cultural time 72 h at the rate of 180 r/min.

Key words: bioflocculant; screening; flocculant activity

(上接第 150 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)07-0147-EA

Extracting flavonoids of bamboo leaves by microwave

GAO Meng-xiang¹, ZHANG Jia-lan², WANG Jiang-ming¹

(¹ College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China;

² College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Extraction of Bamboo Leaves (Ebl) is a new developing vegetable flavone preparation. The single experimental factor, such as microwave power, percent of ethanol volume, microwave treating time, ratio of solid to liquid was studied. Then, the optimum parameters were obtained by orthogonal test at the ratio of solid to liquid 1 : 40 (g/mL), microwave treating 6 min, microwave power 400 W, percent of ethanol volume 10%. The total flavonoids content of bamboo leaves is 4.689 mg/g at the optimum parameters.

Key words: Bamboo leaves; flavonoids; microwave; extraction