

絮凝剂产生菌的筛选及产生絮凝剂的影响因素研究*

王正林¹, 冯贵颖¹, 岳晓勤², 单丽伟¹, 王月红¹, 刘晓荣³

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100; 2 西安市污水处理厂, 陕西 西安 710077;

3 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 从活性污泥中分离出63株菌株, 培养、筛选得到具有絮凝活性的菌株17株, 其中2株絮凝活性较高。研究了这2株菌在不同培养时间的生长情况及其絮凝活性等, 得出絮凝活性与菌生长量呈正相关关系。通过改变培养基的碳源、氮源、无机盐等因素, 得出2株絮凝活性较高的菌株产生絮凝剂的最佳条件: 真菌N-21, 以蔗糖为碳源, 蛋白胨为氮源, NaCl为无机盐, pH为6.0, 培养温度为30℃时, 絮凝效果最好; 细菌F-9, 以葡萄糖为碳源, 尿素为氮源, K₂HPO₄为无机盐, 培养基初始pH偏碱性, 培养温度为30℃时, 絮凝效果最好。

[关键词] 絮凝剂产生菌; 微生物絮凝剂; 絮凝活性

[中图分类号] X703.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)02-0099-06

目前应用最广泛的絮凝剂有无机盐絮凝剂(铁盐、铝盐等)和有机高分子絮凝剂(聚丙烯酰胺等), 但它们在使用过程中的不安全性和给环境造成的二次污染已越来越引起人们的重视。研究表明^[1], 无机盐絮凝剂会将大量无机离子带入处理液, 不利于人类健康。有机合成高分子絮凝剂丙烯酰胺多聚体本身虽无毒性, 但其难降解, 易造成二次污染, 而且聚合单体丙烯酰胺是神经毒性和致癌、致突变因子。因此, 环境污染治理中, 迫切需要一种安全、高效、可生物降解、不污染环境的絮凝剂。

微生物絮凝剂指某些种类的细菌、真菌、放线菌等在特定培养条件下, 其生长代谢到一定程度时产生的具有絮凝活性的高分子化合物, 主要有蛋白质、多糖、核酸等。具有分泌絮凝剂能力的微生物称为絮凝剂产生菌。微生物絮凝剂的活性成分具有两性多聚电解质特征^[2], 它们通过其电荷性质和高分子特性在液体介质中起电荷中和、吸附、桥联、网捕等作用, 使污染物脱稳、絮凝沉淀、固液分离。与传统的无机和有机合成高分子絮凝剂相比, 微生物絮凝剂具有许多独特的性质和优点: 易分离, 形成沉淀物; 易生物降解, 无毒无害, 安全性高; 无二次污染, 适用范围广; 具有除浊脱色性能等。此外, 产生絮凝剂的微生物绝大多数来自与人类关系十分密切的土壤, 资源极其丰富, 获得的方法简单, 成本低廉。

微生物生长需碳源、氮源、能源、生长因子、无机

盐和水六大要素, 各种微生物生长代谢过程中对六大要素的要求及各成分含量不同, 因而每种菌在不同培养基条件下产生的絮凝剂也不一样。本研究主要从活性污泥中筛选絮凝菌株, 研究不同生长条件下、不同培养时间絮凝菌的生长及其絮凝活性的变化情况。同时, 也研究了2株菌絮凝活性最高时的最佳环境条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 西安市北石桥污水处理厂氧化沟活性污泥。

1.1.2 分离所用培养基^[3] 牛肉膏蛋白胨培养基。牛肉膏3g, 蛋白胨10g, NaCl 5g, 琼脂15~20g, 水1000mL, pH 6.9~7.1。淀粉琼脂培养基。可溶性淀粉20g, 琼脂20g, KCl 1g, NaCl 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 水1000mL, pH 6.9~7.1。配制时, 先用少量冷水将淀粉调成糊状, 在火上加热, 边搅拌边加水及其他成分, 溶解后加水使体积为1000mL。察氏培养基。NaCl 2g, KCl 0.5g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 蔗糖30g, 琼脂15~20g, pH自然。马丁氏琼脂培养基。葡萄糖10g, 蛋白胨5g, KH₂PO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 1/3000孟加拉红100mL, 琼脂

* [收稿日期] 2002-07-15

[基金项目] 西北农林科技大学重点基金项目

[作者简介] 王正林(1976-), 男, 陕西汉中, 在读硕士, 主要从事废水生物处理研究。

15~ 20 g, 蒸馏水 800 mL, pH 自然, 临用前加入质量分数 0.03% 链霉素稀液 100 mL, 使每毫升培养基中含链霉素 30 μg 。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离 分离方法见文献[3]。

1.2.2 菌种筛选 絮凝剂样品的制备。将已纯化的菌株接入相应的液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 每隔 12 h, 取发酵液作为絮凝剂样品。絮凝活性测定^[4]。在 100 mL 量筒中加入 80 mL 蒸馏水, 5 mL 质量分数 1% 的 CaCl_2 和 2 mL 培养液, 然后加水至 100 mL。在 150 mL 烧杯中, 称取 0.400 g 高岭土, 将量筒中液体倒入烧杯中, 调节 pH 至 7.0, 用搅拌器搅拌 2 min, 静置 10 min, 用吸管吸取上清液于分光光度计 596 nm 处测定吸光度, 以不加培养液的吸光度为对照来确定培养液的絮凝程度。用下式计算絮凝活性。

$$\text{絮凝活性} = ((A - B) / A) \times 100\%$$

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。

1.2.3 产絮凝剂周期的测定 在 500 mL 三角瓶内加入 200 mL 培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养。每 12 h 取 1 次样, 测定 pH 值、菌生长量及絮凝活性。

1.2.4 菌生长量测定 取 50 mL 培养液离心除去上清液, 以蒸馏水洗涤菌体 3 次, 收集菌体在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干称重。

1.2.5 培养基成分及环境因素对菌产絮凝剂的影响 碳源对絮凝剂产生的影响。在培养基 (K_2HPO_4 0.05 g, KCl 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.02 g, H_2O 100 mL, pH=6.9~7.1) 中分别加入葡萄糖、乳糖、蔗糖、淀粉各 2 g, 分别培养 2 株菌, 每隔 12 h 测其絮凝活性。氮源对絮凝

剂产生的影响。在培养基 (淀粉 2 g, K_2HPO_4 0.05 g, KCl 0.05 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, H_2O 100 mL, pH=6.9~7.1) 中分别加入 0.2 g 的谷氨酸、酵母膏、蛋白胨、硫酸铵、尿素, 分别培养 2 株菌, 每隔 12 h 测其絮凝活性。无机盐离子对絮凝剂产生的影响。在培养基 (淀粉 2 g, 尿素 0.2 g, H_2O 100 mL, pH=6.9~7.1) 中分别加入 0.5 g NaCl 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 K_2HPO_4 、 CuSO_4 , 分别培养 2 株菌, 每隔 12 h 测其絮凝活性。培养基初始 pH 对絮凝剂产生的影响。取 10 个 50 mL 锥形瓶各加入 25 mL 最适培养液, pH 值分别调为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 接种后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 每隔 12 h 测其絮凝活性。培养温度对菌产絮凝剂的影响。取 6 个 50 mL 锥形瓶, 分别加入适量的最适培养基, 调节初始 pH 为 7.0, 接种后分别在 23, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 温度下摇床培养, 每隔 12 h 取培养液测其絮凝活性。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离

依稀释涂布平板法从活性污泥中分离出 63 株菌, 其中牛肉膏蛋白胨培养基分离培养出 38 株菌, 菌株代号为 I-1~ I-38, 马丁氏培养基分离培养出 25 株菌, 菌株代号为 IV-1~ IV-25, 淀粉琼脂培养基和察氏培养基未培养出菌株。

2.2 产絮凝剂菌株的筛选

将分离出的 63 株菌, 分别接入相应的液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 72 h, 以高岭土为测试材料, 测定从污泥中纯化的菌株培养液的絮凝活性。结果 (表 1) 表明, 共有 17 株菌具有絮凝活性, 其中细菌 I-9, 真菌 IV-21 的效果最好。

表 1 菌株的絮凝活性

Table 1 Flocculent-producing strains

| 牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone medium | | | | 察氏培养基 Czapek medium | | | |
|--|-------|-------|---------------------------------|------------------------|-------|-------|---------------------------------|
| 菌株 Strains | A | B | 絮凝活性/% Flocculation activity | 菌株 Strains | A | B | 絮凝活性/% Flocculation activity |
| I-1 | 0.264 | 0.181 | 31.4 | IV-8 | 0.348 | 0.232 | 33.3 |
| I-3 | 0.380 | 0.324 | 14.7 | IV-9 | 0.348 | 0.334 | 4.0 |
| I-5 | 0.380 | 0.370 | 2.6 | IV-13 | 0.348 | 0.324 | 6.9 |
| I-9 | 0.380 | 0.204 | 46.3 | IV-15 | 0.348 | 0.308 | 11.5 |
| I-21 | 0.380 | 0.345 | 9.2 | IV-17 | 0.348 | 0.321 | 7.8 |
| I-25 | 0.264 | 0.205 | 22.4 | IV-19 | 0.348 | 0.208 | 40.2 |
| I-26 | 0.264 | 0.205 | 22.4 | IV-21 | 0.348 | 0.065 | 81.3 |
| I-29 | 0.64 | 0.203 | 23.1 | IV-22 | 0.348 | 0.197 | 43.4 |
| I-38 | 0.264 | 0.256 | 9.9 | | | | |

注: 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。

Note: A represents the 596 nm absorbance of the contrast; B represents the 596 nm absorbance of the sample

2.3 产絮凝剂周期的测定

细菌 I-9 和真菌 IV-21 的 pH 变化曲线、生长曲线、絮凝活性变化曲线如图 1 所示。从图 1 可以看出,在整个培养过程中,培养液 pH 呈下降趋势,真菌 IV-21 在 60 h 左右降到最低,然后缓慢升高并趋于稳定,而细菌 I-9 则持续下降。培养液絮凝活性

随菌生长量的增加而升高,细菌 I-9 和真菌 IV-21 的絮凝活性均在培养 60 h 时达到最高值。研究显示,絮凝活性与菌生长量呈正相关性,这表明培养液中具有絮凝活性的物质是由菌产生的。这与 Nakamura 等^[2]、Kurane 等^[5]、Takagi 等^[6]研究的菌产絮凝剂结论相同。

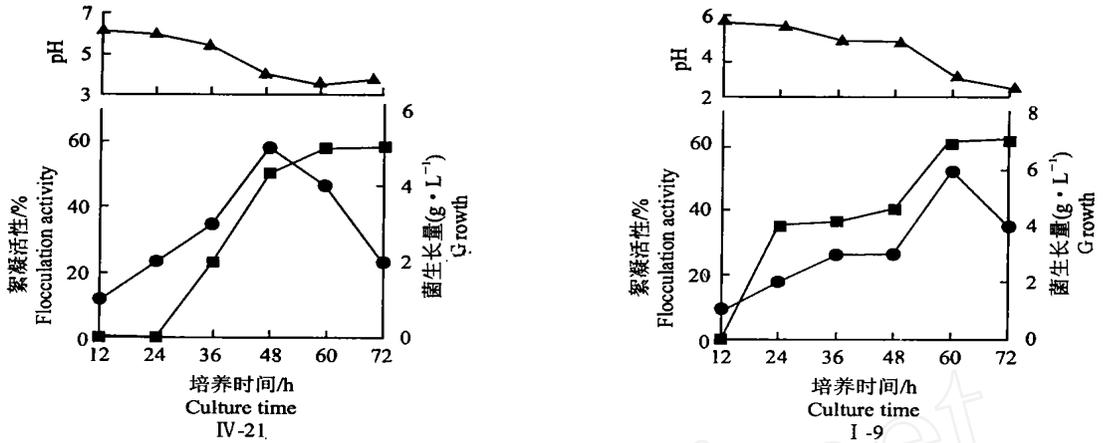


图 1 2 菌株产絮凝剂的周期曲线

Fig. 1 Time course of flocculants production by IV-21, I-9
 - - - pH; - - - 絮凝活性; - - - 菌生长量
 - - - pH; - - - Flocculation activity; - - - Growth

2.4 培养基成分及环境因素对絮凝活性的影响

2.4.1 碳源 在不同的碳源培养条件下,2 菌株的絮凝活性变化曲线如图 2。由图 2 可以看出,真菌 IV-21 可以蔗糖、乳糖等为碳源,其中蔗糖作碳源时絮凝活性最高,且随培养时间的增加,絮凝活性快速增大。葡萄糖、淀粉絮凝效果均较差,葡萄糖絮凝活

性虽然低但比较稳定。细菌 I-9 可以葡萄糖、蔗糖、乳糖、淀粉为碳源,但其中作为单糖的葡萄糖效果最好,它不仅有利于絮凝剂的产生,还有利于絮凝菌的生长。单糖对菌产絮凝剂的促进作用的研究结果与王镇等^[7]的报道一致。

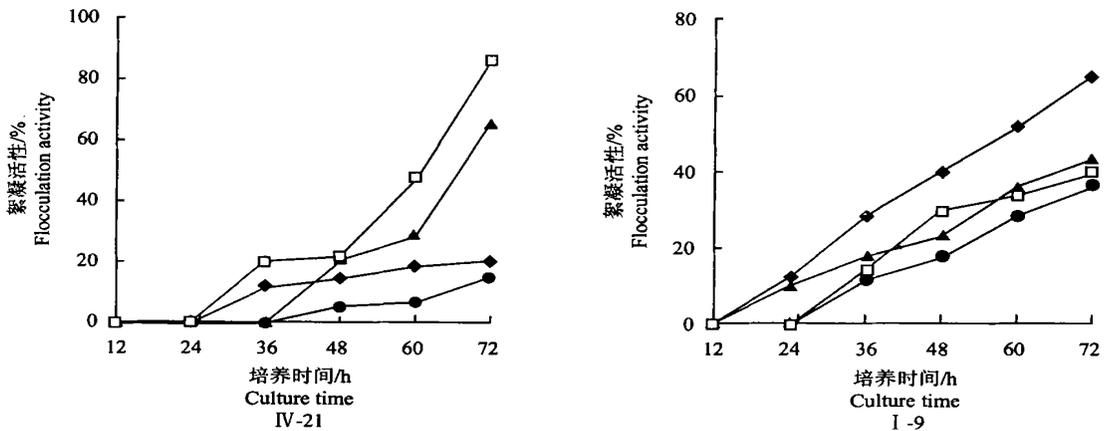


图 2 碳源对 2 菌株絮凝活性的影响

Fig. 2 Carbon sources vs flocculation activity of IV-21, I-9
 - - - 葡萄糖; - - - 蔗糖; - - - 乳糖; - - - 淀粉
 - - - Glucose; - - - Sucrose; - - - Lactose; - - - Starch

2.4.2 氮源 在不同的氮源培养条件下,2 菌株

的絮凝活性变化曲线如图 3。结果(图 3)显示,对真

菌IV-21, 蛋白胨、谷氨酸都是很好的氮源, 蛋白胨效果最佳。尿素作细菌 I-9 的氮源较好。硫酸铵对 2 株菌絮凝活性的影响均较小。由于蛋白胨、谷氨酸

酵母膏的成本均比尿素高, 故以下试验选用尿素作为氮源。

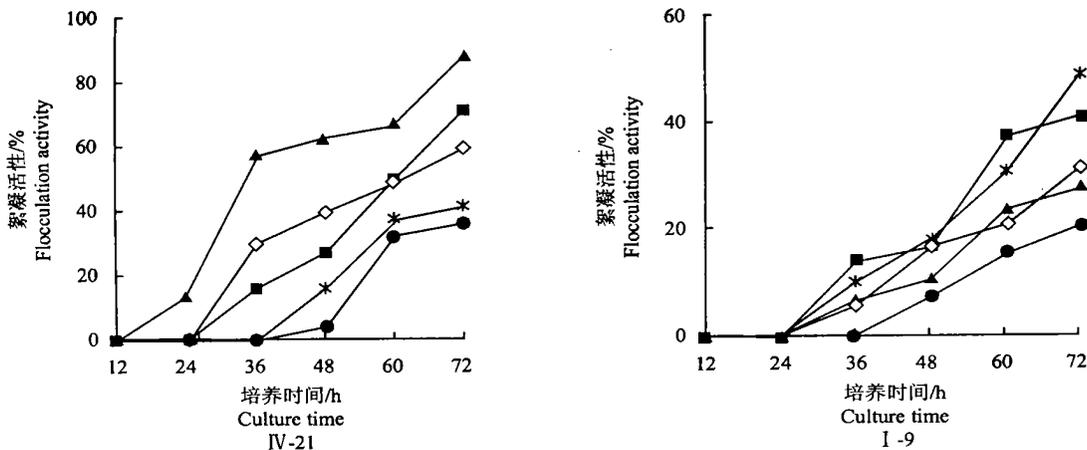


图 3 氮源对 2 株菌絮凝活性影响

- - - 谷氨酸; - - - 酵母膏; - - - 蛋白胨; - - - 硫酸铵; - * - 尿素

Fig 3 Nitrogen sources vs flocculation activity of IV-21, I-9

- - - Glutamic acid; - - - Yeast extract; - - - Peptone; - - - Ammonium sulfate; - * - Urea

2.4.3 无机盐离子 培养基中添加不同的无机盐离子, 2 株菌的絮凝活性变化曲线如图 4。结果(图 4)表明, 一些无机盐离子对絮凝活性有较好的促进作用, 如 K_2HPO_4 、 $NaCl$ 、 $MgSO_4$, 但是 $CuSO_4$ 对絮凝活性的增加却不起作用。对真菌 IV-21, $NaCl$ 、 K_2HPO_4 的促进作用最强, 在培养 60 h 内, 两者几乎无区别, 只有在此后, $NaCl$ 才稍大于 K_2HPO_4 。细菌 I-9 在 K_2HPO_4 存在条件下, 培养 24 h 后, 菌的絮凝活性几乎呈直线上升, 培养 72 h 时, 达到

70.8%。 $NaCl$ 存在条件下, 培养 72 h 内, 变化总体呈上升趋势, 但在培养 48 h 时, 絮凝活性降低, 随后又上升, 其最大絮凝活性远不如 K_2HPO_4 。 $MgSO_4$ 对真菌 IV-21 和细菌 I-9 絮凝活性均有较明显的促进作用。这与张彤等^[8]报道的一价和二价金属离子对微生物絮凝活性有较好的促进作用结论相一致。至于 $CuSO_4$ 对菌的絮凝活性不起作用的原因有待进一步研究。

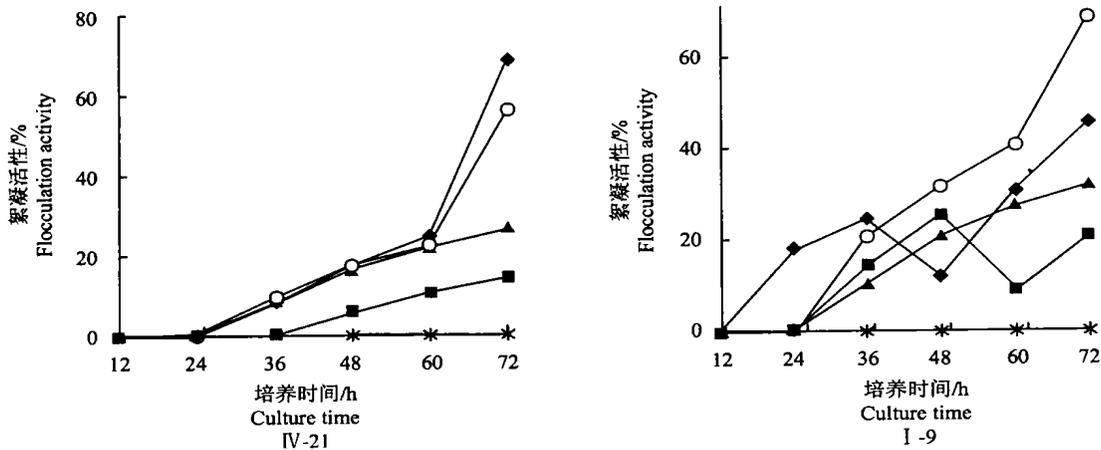


图 4 无机盐离子对 2 株菌絮凝活性的影响

- - - 氯化钠; - - - 氯化钙; - - - 硫酸镁; - - - 磷酸氢二钾; - * - 硫酸铜

Fig 4 Inorganic salt ion vs flocculation activity of IV-21, I-9

- - - NaCl; - - - CaCl₂; - - - MgSO₄; - - - K₂HPO₄; - * - CuSO₄

2.4.4 培养基初始 pH 不同的 pH 条件下, 2 株菌

的絮凝活性变化曲线如图 5。由图 5 可以看出, 真菌

IV-21 适合在偏酸性环境条件下合成絮凝剂, 例如, 在培养 60 h, pH 为 6.0 时絮凝活性为 93.4%, 而在 pH 为 9.0 时絮凝活性仅为 20.8%。对细菌 I-9,

pH 为 6.0 时絮凝活性不稳定且低于 45.0%, pH 为 9.0 时絮凝活性较大, 表明细菌 I-9 适合在偏碱性条件下合成絮凝剂。

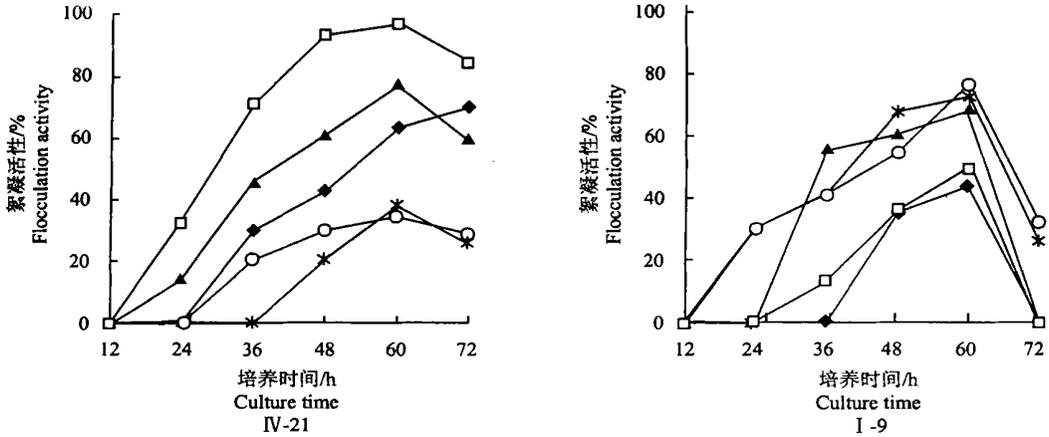


图 5 pH 对 2 株菌絮凝活性的影响

- - - pH= 5.0; - - - pH= 6.0; - - - pH= 7.0; - - - pH= 8.0; - * - - pH= 9.0

Fig. 5 Initial pH vs flocculation activity of IV-21, I-9

- - - pH= 5.0; - - - pH= 6.0; - - - pH= 7.0; - - - pH= 8.0; - * - - pH= 9.0

2.4.5 培养温度 23, 30, 35 培养温度下, 2 株菌的絮凝活性变化曲线如图 6 所示。从图 6 结果可

以看出, 30 下絮凝活性最高, 菌产絮凝剂的最适温度为 30。

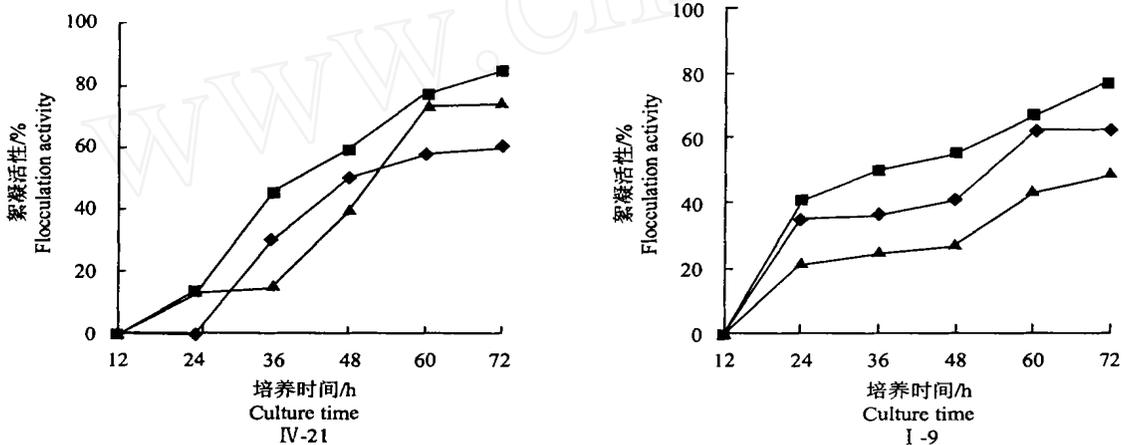


图 6 培养温度对 2 株菌产絮凝剂的影响

- - - 23 ; - - - 30 ; - - - 35

Fig. 6 Culture temperature vs flocculation activity of IV-21, I-9

- - - 23 ; - - - 30 ; - - - 35

3 结 论

1) 试验结果表明, 液体培养时, 絮凝活性高的菌体有絮集现象。周期测定显示, 其培养液絮凝活性与菌生长量有正相关性, 且絮凝活性在菌的生长稳定期早期达到最高, 表明存在于培养液中具有絮凝活性的物质是由菌产生的。

2) 培养基成分对菌产絮凝剂有较大影响, 营养丰富的培养基有利于絮凝剂的产生。不同的菌所需生长条件不同, 真菌 IV-21 在蔗糖为碳源、蛋白胨为氮源、NaCl 为无机盐、pH 6.0、培养温度 30 时, 产絮凝剂效果最佳; 而细菌 I-9 产生絮凝剂的最佳因素为: 葡萄糖作碳源、尿素为氮源、K₂HPO₄ 为无机盐、培养基初始 pH 偏碱性、培养温度 30。

[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] Nakamura J,M iyashiro S,Hirose Y. Screening isolation and properties of microbial cell Flocculants[J]. *Agric Biol Chem*, 1976, 40(2): 377- 383.
- [3] 程丽娟,李志芳,唐 明,等. 微生物学试验技术[M]. 陕西杨陵:天则出版社,1993.
- [4] 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.
- [5] Kurane R, Takeda K, Suzuki Culture condition for production of microbial by *Rhodococcus erythropolis*[J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(9): 2301- 2307.
- [6] Takagi H, Kadowaki K. Screening for and characteristics of microbial flocculates[J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(11): 3151- 3157.
- [7] 王 镇,王孔星,谢裕敏,等. 几株絮凝剂产生菌的特性研究[J]. *微生物学报*, 1995, 35(2): 121- 129.
- [8] 张 彤,朱怀兰,林 哲,等. 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- 105.

Screening of flocculant-producing microorganisms and studying on the effective factors

WANG Zheng-lin¹, FENG Gui-yong¹, YUE Xiao-qing²,
SHAN Li-wei¹, WANG Yue-hong¹, LIU Xiao-rong³

(1 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Wastewater Treatment Factory of Xi'an City, Xi'an, Shaanxi 710077, China;

3 College of Resources and Environment, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 63 strains were isolated from activated sludge. Each strain which was picked out was cultured in relevant flocculant-producing liquid medium. 17 flocculant-producing strains were obtained. Among them, two strains with high flocculation activity. In this paper, time course of flocculants production including growth, flocculating activity etc were studied. The best flocculant-producing conditions of the two strains were found by changing medium of carbon sources, nitrogen sources, inorganic salt ion etc. The favorable substrate for fungus IV-9 were sucrose, peptone, NaCl. Optimum culture initial pH and optimum culture temperature were 6.0 and 30 °C respectively. The favorable substrates for bacteria I-9 were fructose, urea, K₂HPO₄. Optimum culture initial pH and optimum culture temperature were 8.0 and 30 °C.

Key words: Flocculant-producing microorganisms; microbial flocculants; flocculating activity