

# 微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝活性研究

罗平<sup>1</sup>, 罗固源<sup>2</sup>, 邹小兵<sup>1</sup>

(1.重庆大学 化学化工学院, 重庆 400044; 2.重庆大学 城市建设与环境工程学院, 重庆 400045)

**摘要:**用富集-分离-筛选的方法从花园土壤中分离纯化得到两株具有较高絮凝活性的絮凝剂产生菌。通过研究2B菌株在不同培养时间的生长情况、培养液中pH值变化情况及絮凝活性等,从而得出絮凝活性与菌生长量成正相关,且该菌产生的絮凝剂对高岭土悬浊液具有较高的絮凝活性和稳定性。环境因素对絮凝剂产生的影响研究表明,2B菌株产絮凝剂的最佳培养基为查氏培养基;菌产絮凝剂的最佳培养条件:初始pH值为7~9,培养温度30℃,培养时间为72h,通气量为150 r/min。研究表明,2B菌株所产絮凝剂絮凝高岭土悬浊液的最适宜pH在大于7的偏碱性条件下,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和Al<sup>3+</sup>等金属离子对其絮凝具有促进作用,絮凝率可高达94.6%。

**关键词:**微生物絮凝剂;絮凝剂产生菌;絮凝活性;时间曲线

**中图分类号:**X506 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-7329(2004)06-0063-04

## Screening of Flocculants - producing Strains and Study on Flocculating Activity

LUO Ping<sup>1</sup>, LUO Gu - yuan<sup>2</sup>, ZOU Xiao - bing<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Technology, Chongqing University, Chongqing 400044, P. R. China; 2. College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China)

**Abstract:** Two flocculants - producing strains of high flocculating activity were screened from the soil by the method of enrichment - isolation - screening. The growth of the strains, flocculating activity and pH at different time during the culture of the strains was studied and four different kinds of media were selected to culture the microorganisms. It is found that zapek medium is one to achieve the highest production rate at a low cost under the optimum conditions: pH values within 7 to 9, culture temperature 30℃ and cultivation for 72 h. It is indicated that the suitable pH value for the microbial flocculants to flocculate Kaolin clay suspension is higher than 7 and the flocculation ratio is up to 94.6% with the synergy of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup>.

**Keywords:** microbial flocculants; flocculants - producing microorganism; flocculation activity; time curve

絮凝是水和工业废水的主要处理方法,目前普遍使用的絮凝剂包括两大类:无机及有机高分子絮凝剂,但由于存在成本高、絮凝范围有限、污泥难处理以及安全和环境问题,因此开发新型的絮凝剂迫在眉睫。微生物絮凝剂因其高效、无毒而成为了近年来国内外研究的重点和热点课题。微生物絮凝剂是利用生物技术,通过微生物的发酵、抽提、精制而得到的一种新型、高效、安全、廉价的水处理剂,它具有可生物降解性,克服了铝盐、丙烯酰胺等的毒性问题,安全可靠,对环境无二次污染,絮凝范围广泛,此外,絮凝剂产生菌的种类多,因而具有广阔的开发应用前景<sup>[1-4]</sup>。

土壤是微生物生活的大本营,在这里生活的微生物无论是数量和种类都极其丰富多样,因此,土壤

\* 收稿日期:2004-08-25

基金项目:重庆大学骨干教师资助计划(71641104)

作者简介:罗平(1966-),女,重庆人,讲师,博士生,主要从事环境微生物学及污水处理研究。

是我们开发利用微生物资源的重要基地。我国的土地资源非常丰富,用其开发出更多高效、无毒、价廉、无二次污染的微生物絮凝剂,可以充分发挥我国的资源优势。本文在筛选出微生物絮凝剂产生菌的基础上,进一步研究了絮凝剂产生菌在不同培养基中的生长情况以及对高岭土悬浊液的絮凝活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株的分离及筛选

1.1.1 菌种来源 来源于重庆大学(B区)实验大楼前的花园土壤。

1.1.2 菌种分离方法 在距离土壤表面5~20cm处取一定量的土样,用无菌水配成悬浊液,以牛肉膏蛋白胨培养基为细菌分离用培养基,采用平板划线法分离纯化。

1.1.3 筛选所用培养基 JM-1培养基:酵母浸出汁20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 为1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为1g,水为1L, pH 7.0,  $0.70 \text{ kg/cm}^2$ ,  $121.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min。

PT-1培养基:葡萄糖20g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 为2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 为5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为0.2g, NaCl为0.5g, 尿素为0.5g, 酵母膏为5g, 水为1L, pH 7.0,  $0.70 \text{ kg/cm}^2$ ,  $112.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌30 min。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏为3g, 蛋白胨为10g, NaCl为5g, 水为1L, pH 7.0~7.2,  $1.05 \text{ kg/cm}^2$ ,  $121.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min。

查氏培养基:  $\text{NaNO}_3$ 为2g, KCl为0.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 为1g,  $\text{MgSO}_4$ 为0.5g,  $\text{FeSO}_4$ 为0.01g, 蔗糖为30g, 水为1L, pH 自然,  $1.05 \text{ kg/cm}^2$ ,  $121.3 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min。

培养方法:采用本实验筛选到的絮凝剂产生菌2B,将菌接种于新鲜的斜面培养基上,活化2d,然后转接于液体培养基中,于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ r/min}$ 摇床培养3d,取发酵上清液测定其絮凝活性。

1.1.4 絮凝率的测定方法 试验用絮凝率来定量表示微生物絮凝剂的絮凝活性。方法如下:在250 mL烧杯中加入150 mL 1 g/L的高岭土悬浊液,先加入2 mL 1%的  $\text{CaCl}_2$ 溶液,再加入2 mL发酵液,混合、搅拌(以 $200 \text{ r/min}$ 快搅1 min,再以 $50 \text{ r/min}$ 慢搅3 min),静置沉降3 min,取上清液。用721分光光度计在550 nm处测其上清液吸光度,以不加培养液的高岭土悬浊液作对比,通过絮凝率来表示絮凝活性,公式如下:

$$\text{絮凝率}(E) = \frac{(A - B)}{A} \times 100\%$$

式中:A为对照上清液的吸光度;B为样品上清液的吸光度。

### 1.2 菌种的特征观察

观察记录菌落的生长状况、菌落特征、菌体的形态结构。对菌株进行革兰氏染色及荚膜染色。

### 1.3 菌产絮凝剂的周期测定

在11个50 mL的三角瓶内装25 mL培养基, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床培养。按时间序列取样,测定培养液pH值、菌生长量(以 $\text{OD}_{550}$ 表示)及絮凝率。

### 1.4 影响絮凝剂产生的因素

改变培养基成分、初始pH值、培养温度等因素,测定培养液絮凝率。即可以此确定絮凝剂产生的最佳培养条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的观察与鉴定

从土样中分离纯化得到38株菌株,利用发酵液对高岭土悬浊液进行絮凝烧杯实验,筛选出6株有絮凝能力的微生物,其中絮凝活性较高的有2株,分别为1B、2B菌株,而以2B菌株的絮凝效果最好,故以2B菌株为研究对象讨论其絮凝特性。

按《微生物学实验》<sup>[5]</sup>对筛选出的菌株进行生化和生理特征测定。菌株的特征见表1。

### 2.2 不同种类培养基对絮凝活性的影响

四种不同培养基培养下的絮凝活性如表2所示。用营养丰富的PT-1、查氏液体培养基时絮凝高岭土悬液效果较好,其中用查氏液体培养基培养时絮凝活性最高,此外,培养基PT-1中有价格昂贵的酵母膏,占PT-1培养基成本的60%,而查氏培养基成本较低,与PT-1相比价格降低了30%左右;而用高氮低糖的JM-1培养基及肉汤培养基培养时,絮凝活性低。因此,以下没有特殊说明均采用查氏培养基。

表1 菌株的特征概况

| 絮凝活性  | 菌落特征          | 革兰氏染色 | 荚膜染色 | 菌体形态 |
|-------|---------------|-------|------|------|
| 94.6% | 乳黄色,粘稠,光滑,半透明 | +     | +    | 丝状   |

表2 不同培养基产生的絮凝剂的絮凝活性

| 培养基种类 | 初始 pH | 发酵液 pH | 上清液 OD <sub>550</sub> |
|-------|-------|--------|-----------------------|
| JM-1  | 7.46  | 9.01   | 0.531                 |
| PT-1  | 6.47  | 5.81   | 0.014                 |
| 肉汤培养基 | 8.01  | 8.97   | 1.143                 |
| 查氏培养基 | 6.93  | 8.69   | 0.015                 |

### 2.3 菌产絮凝剂的周期测定

2.3.1 絮凝条件探索试验 为了考察pH值、CaCl<sub>2</sub>、微生物絮凝剂等条件对高岭土悬浊液的影响,得到最佳絮凝效果,因而进行了如下探索试验,结果见表2。试验结果表明,在有CaCl<sub>2</sub>存在的条件下,加微生物絮凝剂再将pH值调至8~9,其絮凝效果最佳。

表3 不同条件下对高岭土悬液絮凝效果

| 条件                | 加CaCl <sub>2</sub> ,<br>调pH值 | 加发酵液,<br>调pH值   | 加CaCl <sub>2</sub> ,<br>后加发酵液 | 先加CaCl <sub>2</sub> ,再加发酵<br>液,调pH值 | 先加CaCl <sub>2</sub> ,再调pH值,<br>后加发酵液 |
|-------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 现象                | 生成小絮团,<br>沉降缓慢。              | 生成小絮团,沉<br>降缓慢。 | 生成很小絮团,沉降很<br>缓慢,上清液浊。        | 迅速生成很大絮团,沉<br>降很快,上清液清              | 生成大絮团,沉降快,上<br>清液较清澈。                |
| OD <sub>550</sub> | 0.213                        | 0.421           | 1.126                         | 0.002                               | 0.187                                |

2.3.2 菌产絮凝剂的周期测定 不同的微生物有不同的生长曲线,同一种微生物在不同的培养条件下,其生长曲线也不一样。因此,测定微生物的生长曲线对于了解和掌握微生物的生长规律,确定最佳培养时间都是很有帮助的<sup>[6]</sup>。图1为2B菌株在查氏培养基中的生长曲线及絮凝率曲线、图2为菌生长过程中的pH值变化曲线。

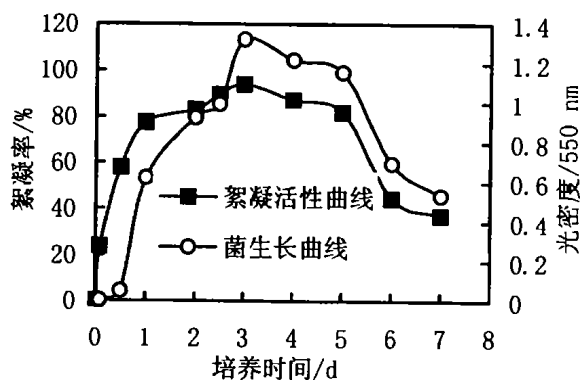


图1 菌生长及絮凝活性曲线

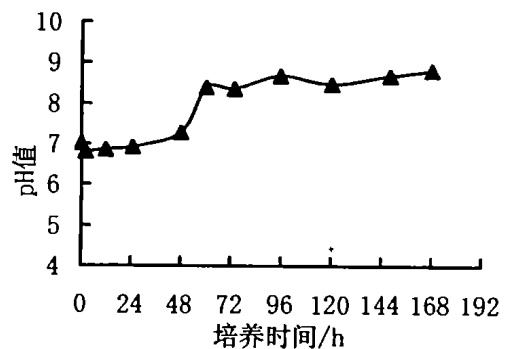


图2 pH值变化曲线

由图1、2可知,在3d以前,培养液的絮凝率随菌生长量的增加而增加,3d以后絮凝活性不再提高,且开始缓慢下降,这可能是由于体系中解絮凝活性酶的产生所致,所以培养时间以3d为好。培养基的pH值在2h左右约有下降,之后缓慢上升并趋于稳定,可解释为由于氮源的消耗和代谢过程中铵盐的产生所引起。

### 2.4 微生物絮凝剂的最佳产生条件

各种理化因素都会影响菌的生长速度,生物量的多少和代谢特征等,同样,生物絮凝剂的产生也会受到许多因素的影响,除了营养物质之外,其他环境因素也相当重要。

2.4.1 培养基初始 pH 值对菌产絮凝剂的影响 微生物的生命活动、物质代谢与 pH 值密切相关,不同的微生物要求最适 pH 值不同,表 4 为不同初始 pH 条件下的絮凝率。实验结果表明,培养基的初始 pH 值对絮凝剂的产生有一定的影响。菌株 2B 的最适 pH 值为 7~9,此时,菌体生长量多,絮凝效果好。

表 4 初始 pH 值对菌产絮凝剂的影响

| 初始 pH                 | 3     | 5     | 7     | 9     | 11    |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 发酵液 OD <sub>550</sub> | 0.004 | 0.162 | 1.915 | 1.582 | 1.279 |
| 絮凝率/%                 | 0     | 0     | 89.2  | 93.1  | 71.3  |

2.4.2 培养温度对菌产絮凝剂的影响 在其他条件不变的前提下,改变培养温度,从而确定最适宜生长温度,结果如表 5。测定结果表明:该菌的最适培养温度为 30℃。

表 5 培养温度的影响

| 温度/℃                  | 20    | 30    | 37    | 45    |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| 发酵液 OD <sub>550</sub> | 0.270 | 1.046 | 0.137 | 0.165 |
| 絮凝率/%                 | 1.6   | 88.2  | 1.0   | 0.8   |

2.4.3 不同阳离子对絮凝活性的影响 在培养基中加入各种无机盐(1%),考察不同阳离子对絮凝活性的影响。从表 6 可以看出,不同金属离子对絮凝剂的絮凝效果的影响有差异,Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>的添加有利于菌产絮凝剂的絮凝作用,其中,Ca<sup>2+</sup>絮凝率最高且无二次污染问题,因此,Ca<sup>2+</sup>是较理想的选择。而 Na<sup>+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>等阳离子的加入不利于絮凝作用的产生。

表 6 不同阳离子对絮凝活性的影响

| 无机盐   | CaCl <sub>2</sub> | NaCl  | MgSO <sub>4</sub> | CuSO <sub>4</sub> | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | MnSO <sub>4</sub> | FeSO <sub>4</sub> | KCl   |
|-------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|-------|
| 吸光度值  | 0.039             | 0.930 | 0.078             | 0.124             | 0.067   | 0.645             | 0.854             | 0.745 |
| 絮凝率/% | 95.8              | 0     | 91.6              | 86.7              | 92.8  | 30.6              | 8.1               | 19.8  |

### 3 结语

从分离、纯化得到的 38 株菌株中筛选出一株微生物絮凝剂高效菌株 2B。该菌在生长周期中,絮凝除浊率最大值出现在稳定期后期。最适生长条件为:培养基为查氏培养基,培养基的初始 pH 为 8,培养时间 72 h,培养温度为 30℃,在此条件下菌产絮凝剂絮凝活性最高。此外,环境因素会影响絮凝效果,适宜的 pH 值为大于 7 的偏碱性范围,Ca<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>等金属离子的存在对絮凝有促进作用。阳离子促进絮凝是通过电中和作用,降低了悬浮颗粒间、悬浮颗粒与絮凝剂分子间的静电排斥力,有利于“桥联”的形成,从而促进絮凝。

### 参考文献:

- [1] 陆柱,蔡兰坤.水处理药剂[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [2] 王镇,王孔星.几株絮凝剂产生菌的特性研究[J].微生物学报,1995,35(2):121-129.
- [3] 宫小燕.微生物絮凝剂絮凝特性的研究[J].环境化学,2001,20(6):550-556.
- [4] I. L. Shih, Y. T. Vna, Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculant properties[J]. Bioresource Technology 2001, 78:267-272.
- [5] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1999,7:12-23.
- [6] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.