

微生物絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理研究

邓述波¹, 余 刚¹, 蒋展鹏¹,

陈忠喜², 周抚生², 杨殿民², 胡筱敏³, 罗 茜³

(1 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084; 2 大庆石油管理局, 大庆 163712; 3 东北大学安全与环境系, 沈阳 110006)

摘 要: 筛选得到的硅酸盐芽孢杆菌产生的絮凝剂 MBFA 9 具有用量少、絮凝效果好等特点。絮凝剂 MBFA 9 为阴离子多糖类絮凝剂, 其絮凝机理为吸附架桥。该絮凝剂絮凝效果好的主要原因是分子量较大, 含有适宜的羧基, 使絮凝剂分子能够充分伸展, 较好地发挥吸附架桥作用。

关键词: 絮凝; 多糖; 絮凝机理; 微生物絮凝剂

中图分类号: TQ 314 253

文献标识码: A

文章编号: 1000-3770(2001)01-0022-04

本文筛选得到的一株硅酸盐芽孢杆菌新变种 (*Bacillus mucilginosus* var) 产生的絮凝剂 MBFA 9 具有用量少、絮凝效果好等特点, 尤其对淀粉厂的黄浆废水、河水等有较好的絮凝效果, 具有很好的开发应用前景^[1,2]。本文对絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理进行了较为深入的研究, 通过实验测试, 分析了微生物絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理, 解释了其絮凝性强的原因, 使人们对多糖类微生物絮凝剂有较为深入的认识。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

絮凝剂 MBFA 9 产生菌从土壤中分离得到^[1]; 微生物多糖产生菌由中科院沈阳生态研究所提供。

1.2 絮凝剂 MBFA 9 的提纯

培养液稀释 10 倍, 6000r/min 离心 10min 去除菌体, 然后用旋转蒸发器浓缩 (50~60℃) 至原体积, 加入 3 倍体积的预冷乙醇, 离心收集沉淀, 再将沉淀溶于水, 加 0.5 倍氯仿和正丁醇混合液 (5:2), 振荡, 离心, 反复数次, 最后将上清液透析 2d, 乙醇沉淀, 真空干燥得到絮凝剂 MBFA 9 精品。

1.3 絮凝剂 MBFA 9 的成分分析

通过糖的 Molish 反应、蒽酮反应以及紫外光谱, 定性判断絮凝剂 MBFA 9 样品中是否含有糖类

成分。多糖经水解, 可以测出中性糖、酸性糖和氨基糖的含量^[3,4]。

1.4 絮凝剂分子量测定 (粘度法)

试验所用毛细管的直径为 0.5mm, 水浴温度为 30℃, 以 1% NaOH 10mL 溶解 0.01g 絮凝剂 MBFA 9 精品, 即初始浓度 C_0 为 0.001g/mL, 分别测得絮凝剂溶液和纯溶液流出时间, 则可求出絮凝剂的分子量。

1.5 红外光谱分析

红外光谱分析可以分析絮凝剂所含有的基团, 本试验采用 IR-470 红外光谱分析仪, 以 1% KBr 压片法测定。

2 结果与讨论

2.1 絮凝剂 MBFA 9 的结构性能分析

为了深入研究絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理, 对提纯后得到的絮凝剂精品进行糖、蛋白质的呈色反应。结果表明絮凝剂 MBFA 9 有明显的糖类颜色反应; Molish 反应在浓硫酸和样品液分界面上有清晰的紫环生成, 蒽酮反应呈现为蓝绿色, 而没有蛋白质/氨基酸的特征反应。紫外扫描结果见图 1, 曲线为一平滑曲线, 没有特征吸收峰 (蛋白质在 280nm 有吸收峰, 核酸在 260nm 有吸收峰), 说明絮凝剂中不含有蛋白质和核酸。因此, 可以定性地判断出该絮

凝剂的有效成分为多糖。

多糖是由多种单糖构成的, 而单糖又分为中性、酸性和碱性糖。用浓硫酸处理絮凝剂MBFA 9, 使其水解为单糖, 分别测定絮凝剂中己糖醛酸、氨基糖和中性糖的含量。另外, 采用乌氏粘度计对MBFA 9 的分子量进行测定。结果见表 1。

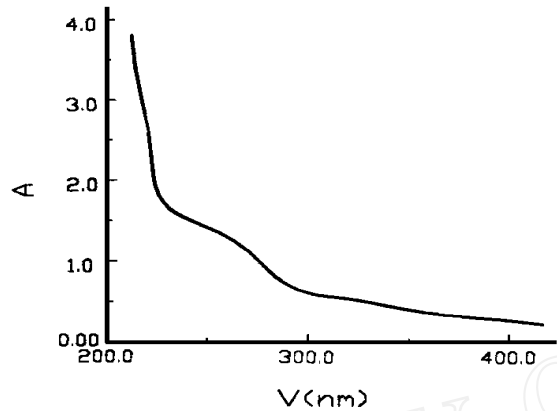


图 1 絮凝剂MBFA 9 精品的紫外扫描曲线

表 1 絮凝剂MBFA 9 的特性

名 称	多糖组成(%)			分子量
	中性糖	糖醛酸	氨基糖	
含量	47. 4	19. 1	2. 74	$2. 594 \times 10^6$

用 IR-470 红外光谱分析仪对絮凝剂MBFA 9 精品进行分析, 光谱图见图 2。图 2 为一个典型的多糖红外光谱图, 具有多糖的特征吸收峰 3420 、 2926 、 1615 、 1025 、 810cm^{-1} , 这些特征峰进一步证实絮凝剂 MBFA 9 是多糖。光谱图在 1733 、 1615 和 1415cm^{-1} 处有特征吸收峰。 1733cm^{-1} 为 $-\text{COOH}$ 中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动所致; 而 1615cm^{-1} 处的宽吸收峰

为 $-\text{COO}^-$ 中的 $\text{C}=\text{O}$ 非对称伸缩振动的结果; 1415cm^{-1} 为 $-\text{COO}^-$ 中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动所致。因此可以断定 A-9 产生的絮凝剂MBFA 9 中含有羧基, 为阴离子絮凝剂。

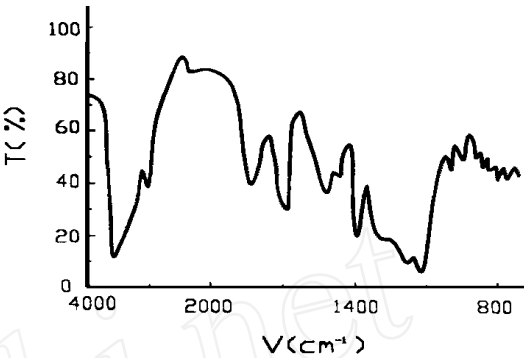


图 2 絮凝剂MBFA 9 的红外光谱

絮凝剂MBFA 9 是一种微生物多糖, 很多微生物能够产生多糖, 是不是所有的微生物多糖都有絮凝性? 具有什么性质的多糖有絮凝性? 天然多糖类絮凝剂和MBFA 9 有何异同? 以下分别比较MBFA 9 与微生物多糖及天然多糖类絮凝剂的性能和絮凝性的关系, 以期发现絮凝剂MBFA 9 絮凝性能强的原因, 进而解释其絮凝机理。

2.2 絮凝剂MBFA 9 与常见微生物多糖的比较

目前, 人们已发现多种多糖, 如黄原胶、榆耳多糖、香菇多糖等。其中微生物多糖最多。能够产生微生物多糖的微生物有芽胞杆菌(*Bacillus sp.*)、根瘤菌(*Rhizobium sp.*)和固氮菌(*Azotobacter sp.*)等^[5]。表 2 为几种多糖的性质及其对高岭土悬浮液的絮凝效果。

表 2 各种多糖的性质及其对高岭土悬浮液的絮凝效果

多糖/产生菌	中性糖(%)	氨基糖(%)	糖醛酸(%)	分子量	絮凝率(%)	用量(mL/L)
黄原胶	71. 3	0	7. 3	$6. 08 \times 10^6$	93. 7	5
B polymyxa204	67. 6	0	5. 5	$8. 12 \times 10^5$	95. 7	10
B megaterium 136	49. 1	6. 2	3. 2	小于 80 万	65. 7	20
B subtilis393	43. 6	13. 0	4. 7	小于 80 万	84. 6	20
B subtilis396	45. 3	15. 1	7. 0	小于 80 万	90. 0	20
B coagulans530	41. 6	16. 0	0	小于 80 万	8. 6	20
B mycoides370	47. 4	12. 9	0	小于 80 万	14. 3	20
B cereus491	38. 6	17. 6	2. 6	小于 80 万	28. 6	20
R phasedi	42. 2	0	7. 30	小于 80 万	92. 6	20
R meliloti A cc	42. 4	0	0	小于 80 万	7. 8	20
MBFA 9	47. 4	2. 74	19. 1	$2. 594 \times 10^6$	99. 6	0. 05

从表中可见多糖的絮凝率和多糖组成中糖醛酸的含量及分子量密切相关。中性糖和氨基糖的含量多少和絮凝率没有直接关系,这是因为中性糖不含有利于吸附于颗粒的亲固基团,而氨基糖的氨基虽有一定的亲固能力,但往往又容易被乙酰化。带有负电的糖醛酸含量高的多糖絮凝性也较强,试验发现芽孢杆菌 *B. polymyxa* 204、*B. subtilis* 396 和根瘤菌 *R. phaseoli* 所产的多糖中糖醛酸含量较高,分别为 5.5%、7.0% 和 7.3%,絮凝率分别为 95.7%、90.0% 和 92.6%。其次,分子量也是影响絮凝性的重要因素。虽然黄原胶的糖醛酸含量为 7.3%,比 MBFA 9 的含量低,但由于分子量高达 6.08×10^6 ,絮凝率仍高达 93.7%,用量相对较少。絮凝剂 MBFA 9 的絮凝性最强,高达 99.6%,而且用量仅为 0.05 mL/L,其糖醛酸含量高达 19.1%,分子量为 2.594×10^6 。由此可见,多糖中的糖醛酸含量越高,分子量越大,其絮凝性越强。

2.3 絮凝剂 MBFA 9 与天然多糖类絮凝剂的比较

天然絮凝剂多数为糖类,如淀粉类、纤维素衍生物类、壳聚糖、海藻酸钠等。这些天然高分子多糖类絮凝剂多为带糖环类非离子絮凝剂,水溶性差,本身絮凝性不强,需要进行改性,使其分子中带有水溶性的基团,絮凝性才得以提高。常常是通过糖环上的甲基、羟基进行化学反应,引进极性基团,改善絮凝性,提高水溶性。但普遍存在带电基团在结构中取代度较低,反应不均匀等问题。天然多糖絮凝剂的分子量较低,一般不超过 100 万。

絮凝剂 MBFA 9 和天然多糖类絮凝剂一样也是多糖,不同的是该多糖是微生物在生长过程中分泌的存在于培养液的聚合物,保证了多糖具有较好的水溶性。微生物利用发酵液中营养成分,在各种酶的作用下,合成大分子絮凝剂,然后排出体外。微生物的作用相当于酶促化学反应,把简单的营养物转化成化学反应难以得到的高分子物质。絮凝剂 MBFA 9 的分子量为 2.594×10^6 ,大于一般天然多糖类絮凝剂,糖醛酸含量也较高,因而其絮凝性能优异。可见利用微生物自身的反应合成具有有利于絮凝的极性基团,而且分子量能高达几百万的理想絮凝剂,克服天然絮凝剂的缺陷,是完全可以实现的。由于微生物的种类不同,产生的絮凝剂的组成、结构也存在差异,这就决定絮凝剂的种类和性能的多样化。可以预见微生物絮凝剂的研究很有可能为多糖类絮凝剂的开发开辟新的途径。

2.4 絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理

通过微生物絮凝剂 MBFA 9 和微生物多糖及天然絮凝剂的比较研究可以发现,絮凝剂中含有较多的羧基和具有较大的分子量是絮凝剂 MBFA 9 具有较强絮凝性的主要原因。絮凝剂 MBFA 9 是如何进行吸附架桥的? 以下进行详细分析。

絮凝剂在絮凝过程中,首要条件是絮凝剂分子能够在颗粒表面产生吸附。根据絮凝剂 MBFA 9 的特性,我们认为絮凝剂 MBFA 9 是一种极性大分子,与水中颗粒之间一定存在范德华力作用;氢键是一种短程作用力,絮凝剂 MBFA 9 的分子中含有 OH、COOH、COO⁻ 等基团,因而可以认为这些基团和颗粒表面的 H⁺、OH⁻ 等能以氢键方式发生吸附;因为絮凝剂 MBFA 9 中含有 -COO⁻ 基,很容易和颗粒表面的 Ca²⁺、Al³⁺ 等离子以化学键结合,发生吸附。

因此,可以认为絮凝剂 MBFA 9 和颗粒间在相互靠近时,首先是范德华力克服静电斥力,随着距离的缩短,氢键为主要吸附力,促使絮凝剂分子在颗粒表面产生吸附,同时,絮凝剂也很可能和颗粒发生化学吸附。

絮凝剂分子在水中的伸展状态直接影响絮凝剂的絮凝性能。一般认为絮凝剂分子链呈现无规则线团形状,分子的有效长度变短了,不利于吸附架桥;而絮凝剂分子充分伸展,呈现柔性线状有利于絮凝。絮凝剂 MBFA 9 含有 47.4% 的中性糖、2.74% 的氨基糖和 19.1% 的糖醛酸。中性糖不带有极性基团,多数氨基糖又常被乙酰化,而糖醛酸能够提供极性基团 -COO⁻ 基,因而多糖分子中糖醛酸的含量多少就十分重要了。絮凝剂 MBFA 9 含有 19.1% 的糖醛酸,高于一般微生物多糖,由于 -COO⁻ 基的静电斥力作用,分子链具有较好的伸展性。另外,糖醛酸在絮凝剂中的分布直接影响絮凝剂分子的伸展性,糖醛酸可能均匀分布在每个絮凝剂分子中,也可能分布在某些絮凝剂分子中;在一个絮凝剂分子中糖醛酸可能均匀分布,也可能集中分布。絮凝剂 MBFA 9 絮凝性强,糖醛酸很可能均匀分布在每个絮凝剂分子中,在每个分子中又均匀分布,只有这样,才能保证絮凝剂分子由于静电斥力充分伸展,絮凝效果好。羧基不仅能产生静电斥力,而且能使絮凝剂 MBFA 9 具有较好的水溶性。虽然糖环有多个羟基,但随着多糖分子量增加,糖环数增多,其水溶性减弱,分子中存在羧基等基团,增加絮凝剂分子的水溶性,有利于絮凝剂 MBFA 9 分子链在水溶液中充分

伸展, 增加分子链的有效长度, 有利于吸附架桥。另外, 絮凝剂MBFA 9 分子中的糖环结构使分子链不易弯曲。

当絮凝剂MBFA 9 吸附到颗粒表面后, 由于静电斥力, 絮凝剂分子链和颗粒发生点吸附, 而不是整个分子都吸附到固体表面上。试验中发现絮凝剂MBFA 9 絮凝印染废水和黄浆废水时, 在碱性条件下具有较好的絮凝效果。这是因为絮凝剂MBFA 9 吸附在颗粒表面后, 由于MBFA 9 的分子链中带有适宜的负电荷羧基, 而水中的颗粒也带负电荷, 随着pH 升高, 絮凝剂和颗粒间的斥力增加, 絮凝剂分子的其余部分由于斥力作用, 也就很难再被吸附到颗粒表面, 而是朝外伸向溶液中。所以颗粒是不会被絮凝剂MBFA 9 所覆盖的, 有足够可供进一步吸附的空位; 而没有被吸附的分子链很可能成为自由链端, 或为一个疏松的链环, 有利于吸附其它颗粒, 发生桥连作用。

通过以上分析, 认为絮凝剂MBFA 9 的阴离子基团含量和分布较适宜, 它保证了絮凝剂分子有较好的伸展性, 增加分子链的有效长度, 有利于吸附架桥。

3 结 论

絮凝剂MBFA 9 的主要成分为多糖, 该多糖由

19.1% 的糖醛酸、47.4% 的中性糖、2.74% 的氨基糖组成, 絮凝剂MBFA 9 的分子量为 2.594×10^6 , 分子中含有 $-\text{COO}^-$ 。

通过和多种微生物多糖及天然多糖絮凝剂的比较, 认为糖醛酸含量高, 分子量是絮凝剂MBFA 9 絮凝效果好的主要原因。

絮凝剂MBFA 9 的絮凝机理为吸附架桥, 絮凝剂分子靠范德华力和氢键吸附到颗粒表面, 含量适宜、分布均匀的羧基使絮凝剂分子能够充分伸展, 有效发挥吸附架桥作用。

参考文献

- [1] 邓述波, 胡筱敏, 罗茜. 高效微生物絮凝剂的培养条件及特性[J]. 东北大学学报, 1999, 20(5): 525- 528
- [2] 邓述波, 胡筱敏, 罗茜. 微生物絮凝剂处理淀粉废水的研究[J]. 工业水处理, 1999, 19(5): 8- 10
- [3] 李建武, 等. 生物化学试验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997.
- [4] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994. 10
- [5] 李凤珍, 刘瑞君. 土壤微生物产生的胞外多糖的研究[C]. 沈阳生态研究所论文集, 1991.

STUDY OF FLOCCULATING MECHANISM OF MICROBIAL FLOCCULANT MBFA 9

DENG Shu-bo¹, YU Gang¹, JIANG Zhan-peng¹, CHEN Zhong-xi²,
ZHOU Fu-sheng², YANG Dian-m in², HU Xiao-m in³, LUO Q ian³

(1 Dept of Environmental Science and Engineering of Tsinghua University, Beijing, 100084; 2 Daqing Petroleum Administration, Daqing 163712; 3 Security and Environment Dept, Northeastern University, Shenyang 110006, China)

Abstract: The bioflocculant MBFA 9 produced by the *Bacillus mucilginosus* Var has some advantages, such as less dosage, better flocculating effects, etc. This flocculant is anionic polysaccharide one with the flocculating mechanism of absorbing and bridging. The high flocculating activity of MBFA 9 are from high molecular weight and proper content of $-\text{COO}^-$, which make the flocculant molecular chains spread well and promote bridging.

Key words: Flocculation; polysaccharide; flocculating mechanism; microbial flocculant