

微生物絮凝剂产生菌的筛选和优化以及在水处理中的应用

官小燕 王曙光 栾兆坤 贾智萍*

(中国科学院生态环境研究中心环境水化学国家重点实验室 北京 100085)

摘要 从土壤中筛到1株絮凝剂产生菌BY-28,该菌产生的絮凝剂对高岭土悬浊液的絮凝活性较高且稳定,鉴定为多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* BY-28. 菌BY-28产絮凝剂的最佳培养基和培养条件为:葡萄糖2%, KH_2PO_4 0.4%,黄豆饼粉0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.05%,pH 7.0,30℃,180 r/min 摇床培养2~3 d,产生具有高絮凝活性的絮凝剂.该絮凝剂对水中无机悬浮物和有机染料具有较高的去除率,尤其是能够有效地去除肌苷发酵液和肌苷生产废水中的菌体及悬浮物.图3表4参16

关键词 微生物絮凝剂;筛选;培养条件;废水

CLC X172

SCREENING AND OPTIMIZATION OF A BIOFLOCCULANT-PRODUCING BACTERIUM AND ITS APPLICATION IN WATER TREATMENT

GONG Xiaoyan, WANG Shuguang, LUAN Zhaokun & JIA Zhiping*

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract A flocculant-producing strain was isolated from soil, showing high and stable flocculating activity for Kaolin clay suspension. It was preliminarily identified as *Paenibacillus polymyxa* BY-28. Cultured for 2~3 d in flasks under the optimum culture conditions: glucose 2%, KH_2PO_4 0.4%, soybean powder 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.05%, pH 7.0, 30℃ and 180 r/min, the strain BY-28 produced flocculant with strong activity, which showed flocculation rate of above 97% against Kaolin clay suspension under optimum flocculation conditions. Furthermore, it could also remove microorganisms and suspensions in wastewater from fermentation broth for inosine production. Fig 3, Tab 4, Ref 16

Keywords bioflocculant; screening; culture conditions; wastewater

CLC X172

微生物絮凝剂是由微生物产生的具有絮凝活性的代谢产物,它能使反应体系中的胶体和悬浮颗粒物相互聚集,形成絮体沉淀,从体系中分离出来^[1].作为一种新型的絮凝剂,它不仅克服了无机和有机高分子絮凝剂大量使用时对环境造成的不良影响(如诱发老年痴呆症^[2]和三致作用^[3]),而且絮凝范围广、效率高,对多种工业废水都具有良好的净化效果^[4,5],因此受到各国研究者的重视.他们的研究工作表明^[6-10],微生物絮凝剂在工业水处理中具有广阔的应用前景.日本已有工业化生产的微生物絮凝剂,国内也有一些研究报道^[11-13].本文研究了从土壤中筛选絮凝剂产生菌及产絮凝剂的最佳培养条件以及该絮凝剂在水体和废水中的去污染效果.

1 材料与方法

1.1 筛选培养基(w/%)

葡萄糖2%, KH_2PO_4 0.2%, NH_4Cl 0.08%,酵母膏0.02%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, CaCl_2 0.05%;pH 7.0.

收稿日期:2002-03-13 修回日期:2002-06-03 接受日期:2002-06-27
*通讯作者 Corresponding author

1.2 筛选方法

取一定量土壤,用无菌水配成悬浊液,移取上悬液少许于筛选培养基中,摇瓶好氧培养2~3 d,再取一定量培养液于新鲜培养基培养2~3 d,然后涂布于相应的平板上.选择表面光滑且带粘性单菌落作为菌种,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浊液的去除率(絮凝活性).选取具有较高絮凝活性的菌株作为初筛菌种,通过培养,将具有稳定絮凝性能的菌株作为复筛菌种,经反复筛选和纯化得到实验纯菌种.

1.3 絮凝活性测定

用蒸馏水将高岭土配制成浓度为100 mg/L的悬浊液,取50 mL悬浊液,加入0.5 mL $w=1\%$ CaCl_2 溶液,然后加入絮凝剂(发酵液)0.3 mL,用一定浓度的NaOH或HCl调节pH值至7.操作程序为快速搅拌(150 r/min)过程中投加菌培养液,30 s后,转入慢速搅拌(50 r/min)5 min,然后静置10 min,在上清液面下2 cm处取样测定剩余浊度和pH值.以不加发酵液的样品作对照(CK).

$$\text{絮凝活性} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

A 为对照上清液浊度; B 为样品上清液浊度.

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

从土壤中筛选到 1 株絮凝剂产生菌 BY-28, 其发酵液具有较强絮凝能力, 该菌由中科院微生物所菌种保藏中心进行鉴定, 参照文献^[14-16], 该菌鉴定为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa* BY-28).

2.2 氮源对絮凝剂形成的影响

以筛选培养基为基础, 采用不同的无机和有机氮源, 其它培养条件同前, 将菌 BY-28 接种于培养基中摇瓶培养 48 h, 培养液离心 (10 000 r/min, 30 min) 去菌体, 测定上清液对高岭土悬液的絮凝能力, 结果如表 1 所示.

表 1 氮源对絮凝剂形成的影响

Tab 1 Effect of nitrogen sources on flocculant production

氮源 Nitrogen sources (w/% = 0.1)	絮凝活性 Flocculating activity (%)
酵母膏 Yeast extract	91.7
牛肉膏 Beef extract	84
蛋白胨 Polypeptone	75
黄豆饼粉 Bean powder	97.9
鱼粉 Fish meal	95.1
谷氨酸 Glutamic acid	77.1
NaNO ₃	77.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	94.4
NH ₄ Cl	86.1

从絮凝活性看, 鱼粉、黄豆饼粉、酵母膏和 (NH₄)₂SO₄ 为氮源得到的培养液絮凝活性较高. 从絮凝现象看, 鱼粉、黄豆饼粉、酵母膏的培养液非常粘稠, 形成的絮体粗大, 搅拌停止后快速沉淀下来, 其中以黄豆饼粉的效果最好; 而 (NH₄)₂SO₄ 的培养液絮凝率较高, 但较稀, 形成的絮体细小, 沉降较慢. 因此, 氮源选择黄豆饼粉. 据文献报道, 菌 *Aspergillus sojae* AJ7002 可以酪蛋白和酵母膏作为碳源和氮源生产絮凝剂, 2-酮葡萄糖和蛋白胨、酪氨酸、谷氨酸、丙氨酸分别作为碳源和氮源, 促进絮凝剂的产生, 而无机氮 NH₄Cl、NH₄NO₃ 和 (NH₄)₂SO₄ 则既不利于菌体生长也不利于絮凝剂的产生^[4]. 在本研究中, 当黄豆饼粉浓度为 0.1% 时, 絮凝活性最高, 达 98.6%, 浓度继续增加, 絮凝活性下降, 直到降为 0, 培养基中高氮低糖抑制该菌生产絮凝剂.

2.3 碳源及其浓度对絮凝剂形成的影响

选择不同的碳源, 以确定最佳碳源, 结果如表 2 所示.

除了淀粉外, 实验用的单糖、寡聚糖均可作为菌 BY-28 生产絮凝剂的适宜的碳源, 因此, 该菌对碳源的适应性较强. 不同的菌适宜的碳源有所不同, *Alcaligenes cupludus* KT201 可有效利用葡萄糖、半乳糖和蔗糖生产絮凝剂, 而淀粉则效果较差^[6]. *Paecilomyces* sp. I-1 适合以各种糖为碳源生产絮凝剂, 乳糖除外, 尤其是淀粉, 既适合菌体生长又适合产生絮凝剂^[7]. 在筛菌的过程中发现菌 BY-28 能水解淀粉, 但是在以淀粉为碳

源的培养基中得到的培养液的絮凝活性很低. 在上述几种糖中, 以葡萄糖和乳糖为碳源得到的发酵液絮凝效果最佳, 与其它碳源相比, 葡萄糖的成本较低, 且来源广泛, 因此采用它作为菌 BY-28 产生絮凝剂的碳源. 在试验的浓度范围内, 葡萄糖浓度在 2% ~ 6% 时, 得到的菌体培养液絮凝活性均较高, 选择葡萄糖的浓度为 2%.

表 2 碳源对絮凝剂形成的影响

Tab 2 Effect of carbon sources in culture media on flocculant production

碳源 Carbon sources (w/% = 2)	絮凝活性 Flocculating activity (%)	细胞浓度 Cell density (n/10 ⁷ mL ⁻¹)
蔗糖 Sucrose	93.1	29.7
淀粉 Starch	77.6	18.5
麦芽糖 Maltose	96.5	33.8
木糖醇 Xylitol	95.8	31.2
乳糖 Lactose	96.5	30.1
葡萄糖 Glucose	97.3	32.4

2.4 培养基 pH 值及培养温度对絮凝剂形成的影响

该菌在中性左右的培养条件下, 培养液具有较高的絮凝活性, 过酸过碱均不利于絮凝剂的产生; 在所选择的温度范围内, 温度变化对絮凝剂形成的影响较小, 只有当温度超过 35 °C 时, 絮凝剂的絮凝活性才有明显下降, 在 30 °C 时, 培养液的絮凝活性最高.

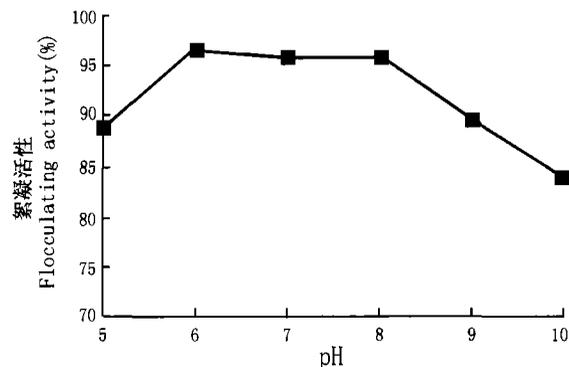


图 1 pH 对絮凝剂形成的影响

Fig 1 Effect of pH on flocculant production

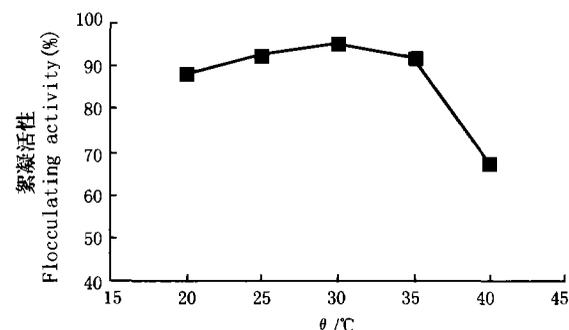


图 2 培养温度对絮凝剂形成的影响

Fig 2 Effect of temperature on flocculant production

表3 培养基无机盐对絮凝剂形成的影响
Tab 3 Effect of salts on flocculant production

无机盐 Salts	絮凝活性 Flocculating activity
KCl	6.25
MnCl ₂	68.8
FeCl ₃	19.4
Al ₂ (SO ₄) ₃	22.9
CuSO ₄	2.78
CaCO ₃	16
MgSO ₄	21.5
CaCl ₂	14.6
KH ₂ PO ₄	96.5
Na ₂ HPO ₄	0
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	79.9

2.5 培养基无机盐对絮凝剂形成的影响

无机盐可为微生物提供除碳、氮源以外的各种重要元素,其生理功能十分重要.表3所示为采用各种无机盐(浓度为0.2%)的培养基,培养菌BY-28,得到的培养液对高岭土悬液的絮凝活性. KH₂PO₄和Ca(H₂PO₄)₂可显著提高菌产絮凝剂的活性, MnCl₂也有一定的促进作用,其它无机盐则不利于甚至抑制絮凝剂的产生.而在文献[7]中,各种形式的Ca²⁺离子均促进絮凝剂的产生.

2.6 KH₂PO₄的浓度对絮凝剂形成的影响

如图3所示,在0.02%~0.4%的KH₂PO₄培养浓度范围内,发酵液的絮凝活性随着KH₂PO₄浓度的升高而升高,在0.4%~1.5%的浓度范围,其絮凝活性保持稳定,当浓度为2%时,活性急剧下降为0.高盐分的培养条件,使培养基渗透压过高,抑制菌体的生长,同时也抑制絮凝剂的产生.因此,选择KH₂PO₄的浓度为0.4%.

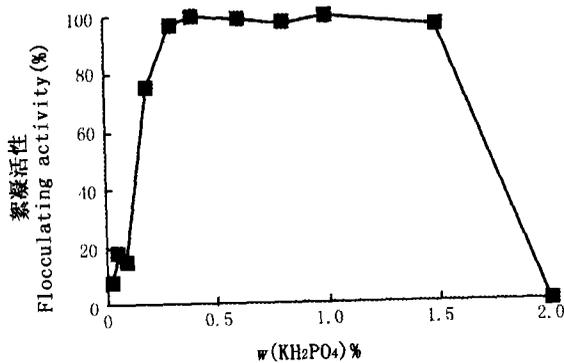


图3 KH₂PO₄的浓度对絮凝剂形成的影响
Fig 3 Effect of KH₂PO₄ concentration on flocculant production

2.7 微生物絮凝剂对水和废水中各种悬浮物的去除

对各种无机和有机悬浮物的絮凝操作如下:取配水或废水100 mL于200 mL烧杯中,用NaOH或HCl调节pH至7,投加w=1%的CaCl₂溶液5 mL,微生物絮凝剂5 mL,在六联搅拌机上进行搅拌,先快速搅拌1 min,慢速搅拌5 min,静置10 min,取上悬液测定浊度,计算得到絮凝活性.

表4 微生物絮凝剂对各种悬浮物的去除效果
Tab 4 Effect of flocculant on removing various substances

样品 Samples	絮凝活性 Flocculating activity (%)	絮凝活性 (只加 CaCl ₂) Flocculating activity (only CaCl ₂) (%)
高岭土 Kaolin clay	97.3	57
硅藻土 Diatomite	92.7	65
泥浆水 Soil solid	81.6	32
肌苷发酵液 Broth (inosine)	94.3	13
来自提取肌苷的废水 Wastewater from inosine production	96.5	17
活性艳蓝 Reactive brilliant blue	96.9	0
活性嫩黄 Reactive brilliant yellow	81	0

去除效果如表4所示,其中泥浆水是取一定量土壤放入水中,搅拌均匀,静置1 h后得到的上层液体;肌苷发酵液取自广东肇庆星湖公司生产肌苷的发酵液;肌苷提取废水是肌苷发酵液经膜过滤后剩余的滤液.在加入的Ca²⁺助凝作用下,该絮凝剂可以有效地去除水中溶解性有机染料活性艳蓝和活性嫩黄,以及无机悬浮物高岭土、硅藻土和泥浆水.尤其是对工业生产肌苷的发酵液和肌苷废水中的菌体及其悬浮物也具有很高的去除率,而Ca²⁺本身对悬浮的颗粒物有一定的絮凝作用,但效果弱于与微生物絮凝剂共同的作用,对于发酵液及染料几乎没有去除效果.由于微生物絮凝剂是由微生物产生的,毒性低,可以取代目前常用的无机絮凝剂铝盐及有机高分子絮凝剂聚丙烯酰胺在发酵工业中去除菌体,因此*Paenibacillus polymyxa* BY-28产生的絮凝剂具有很高的实际应用价值.

3 结论

从土壤中筛选出1株能形成高活性絮凝剂的生产菌BY-28,鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa* BY-28).该菌产絮凝剂对高岭土悬浊液的最高絮凝活性在97%以上,对其产絮凝剂所需的营养条件进行了研究和优化.菌BY-28在含有一定浓度的适宜碳、氮源培养基中大量积累絮凝剂,有机氮源较无机氮源更利于絮凝剂的产生,碳源中以葡萄糖、乳糖和麦芽糖效果最佳.无机盐中KH₂PO₄和Ca(H₂PO₄)₂可显著提高菌产絮凝剂的活性, MnCl₂也有一定的促进作用.絮凝剂的最佳培养基和培养条件(w/%)为:葡萄糖2, KH₂PO₄ 0.4, 黄豆饼粉0.1, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCl₂ 0.05; pH 7.0, 30 °C, 摇床转速180 r/min, 连续培养2~3 d.得到的絮凝剂可以有效地絮凝水和所试工业废水中各种无机和有机悬浮物.

References

- 1 Kurane R, Takeda K, Suzuke T. Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(9):2301~2307

- 2 Kurane R, Nohata Y. Microbial flocculation of waste water liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**(4):1127~1129
- 3 Choi CW, Yoo SA, Oh IH, Park SH. Characterization of an extracellular flocculating substance produced by a planktonic cyanobacterium, *Anabaena* sp. *Biotech Lett*, 1998, **20**(7):643~646
- 4 Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Conditions for production of microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7002. *Agric Biol Chem*, 1976, **40**(7):1341~1347
- 5 Lee SH, Lee SO, Jant KL, Lee TH. Microbial flocculant from *Arcuadendron* sp. TS-49. *Biotech Lett*, 1995, **17**(1):95~100
- 6 Toeda K, Kurane R. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agric Biol Chem*, 1991, **55**(11):2793~2799
- 7 Takagi H, Kadowaki K. Flocculant production by *Paecilomyces* sp. taxonomic studies and culture conditions for production. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**(11):3151~3157
- 8 Kurane R, Toeda K, Takeda K and Suzuki T. Culture Conditions for Production of Microbial Flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(9):2309~2313
- 9 Yokoi H, Yoshida T, Mori S, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp. *Biotech Lett*, 1997, **19**(6):569~573
- 10 Takeda M, Koizumi JI, Matsuoka H, Hikuma M. Factors affecting the activity of a protein bioflocculant produced by *Nocardia amarae*. *J Ferment Bioeng*, 1992, **74**(6):408~409
- 11 Li ZL(李智良), Zhang BL(张本兰), Pei J(裴健). Screening of flocculant-producing bacteria and their flocculating effects on some wastewaters. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 1997, **3**(1):67~70
- 12 Gong XY(宫小燕), Luan ZK(栾兆坤), Wang SG(王曙光), Li ZH(黎泽华). Studies on characteristics of microbial flocculant. *Environ Chem*(环境化学), 2001, **20**(6):550~556
- 13 He N(何宁), Li Y(李寅), Lu ML(陆茂林), Chen J(陈坚). Effects of culture conditions on production of microbial flocculant. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2001, **7**(5):483~488
- 14 Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group3 bacillus (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, **64**:253~260
- 15 Validation of the publication of new names and combinations previously effectively published outside the IJSB. *Intern J Syst Bacteriol*, 1994, **44**:852
- 16 Peter HAS. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: Peter HAS, Nicholas SM, Sharpe ME, Holt JG ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1986. 1104~1139