

文章编号:1672-3961(2008)03-0099-05

生物絮凝剂产生菌的筛选及培养条件优化

潘多涛, 刘桂萍, 刘长风

(沈阳化工学院环境与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

摘要:从林下土壤中筛选得一株产絮凝剂的细菌 XMX-1(其产生的絮凝剂命名为 XMX-1F);研究表明:玉米淀粉、玉米浆是廉价的碳氮源;通过乙醇提取的方法,从发酵液离心后的上清液中获得絮凝剂粗产品 7.685 g/L;通过蒽酮反应、紫外扫描以及红外扫描等多种方法手段分析确认 XMX-1F 是以多糖为主的高分子絮凝剂,多糖含量为 77.87%;在实际废水处理方面,通过 XMX-1F 对模拟洗煤废水的应用研究表明,其应用到处理实际洗煤废水中的前景是可观的.

关键词:微生物絮凝剂;廉价培养基;多糖;红外光谱;洗煤废水

中图分类号:Q935 **文献标志码:**A

Screening of microbe producing flocculant and optimization on its cultural conditions

PAN Duo-tao, LIU Gui-ping, LIU Chang-feng

(Department of Environmental and Biological Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: A strain was screened from soil, and named XMX-1(the bioflocculant produced by XMX-1 named XMX-1F), which has the highest flocculating activity. Cornstarch and the corn steep liquor were chosen as carbon and nitrogen sources. 7.685 g/L XMX-1F raw product was obtained from the supernatant by using ethanol. The XMX-1F is mainly composed of polysaccharide, which was determined by Anthrone reaction, ultraviolet spectroscope method and Infrared spectra. The polysaccharide content is 77.87%. In the treatment of high SS waste water, XMX-1F shows high flocculating activity. Study of XMX-1F flocculating coal-washing wastewater indicates the actual application potential of XMX-1F.

Key words: bioflocculant; cost-effective medium; polysaccharide; Infrared spectra; coal-washing waste water

0 引言

微生物絮凝剂是利用生物技术,通过微生物发酵、分离提取而得到的一种新型水处理剂.与传统絮凝剂相比,它不仅可以提高被絮凝物质的沉降性能,而且对环境无二次污染,使用方便、安全、应用范围广泛.

近年来,越来越多的人开始投入到这方面的工

作中,其中以日本仓根隆一郎筛选出的红平红球菌(R. Erythropolis)所产絮凝剂 NOC-1 的絮凝效果最好^[1-2].目前对微生物絮凝剂的研究大多停留在实验室研究阶段,未达到大规模的应用和工业化生产阶段.制约微生物絮凝剂发展的关键问题在于生产成本过高和产量过低.

本研究主要目的是从土壤中分离和筛选产絮凝剂的高产细菌,并寻找其生产絮凝剂的廉价培养基,以降低生产成本,并进行了粗产品的提取及成分分析.

收稿日期:2007-09-10

基金项目:沈阳市科技基金资助项目(1041029-1-02-05)

作者简介:潘多涛(1979-),男,宁夏人,助教,硕士,研究方向为生物技术在环境保护中的应用.

E-mail: panduotao@126.com

1 实验部分

1.1 菌种来源及培养基

1.1.1 菌种来源

从沈阳北部污水处理厂的污泥、泡菜水、味精厂废水、味精发酵废母液、淀粉厂废水及吉林采集样品进行初筛。目的菌为菌落较粘稠的、粗糙,细胞具有荚膜的细菌^[3]。

1.1.2 培养基(g/L)

(1) 基本发酵培养基:葡萄糖 20,酵母膏 2, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 4, K₂HPO₄ 1; (2) 固体培养基:牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 2. (3) 种子液培养基(g/L):牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5.

1.2 目的菌株的分离筛选

样品经富集培养后,以牛肉膏蛋白胨培养基为细菌分离培养基,采用稀释法或平板划线法分离并纯化。

1.3 培养条件

1.3.1 基本培养条件

菌种筛选培养条件:从纯化获得的各菌株接种于发酵培养基中(50 mL/250 mL 三角瓶),在摇床(30 ℃, 150 r/min)中培养 48 h。

摇瓶培养条件:制得种子液后,用灭菌后的移液管以 2% 的接种量接入发酵培养基(50 mL/250 mL 三角瓶)中进行培养,在 30 ℃, 150 r/min 的摇床中培养 60 h。

1.3.2 培养条件优化

考察培养基的碳氮源、初始 pH 值、培养时间、接种量,以及装液量等因素对生产絮凝剂的影响。

1.4 絮凝率测定方法

在 50 mL 烧杯中加入 4 g/L 的高岭土悬浊液 28 mL 及 1 mL 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液和 1.0 mL 发酵液(或絮凝剂),用六联搅拌机先快速搅拌 3 min,再慢速搅拌 2 min,静置 2 min,取上清液于 550 nm 处测定吸光度 OD₅₅₀,以同时搅拌的、不加待测样品的高岭土悬浊液上清液测定的吸光度作为对照,来确定发酵液或絮凝剂的絮凝活性(用絮凝率来表征)^[4]。

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

其中 A——对照组的 OD_{550nm}, B——待测样品的 OD_{550nm}。

1.5 絮凝剂的提取

发酵液高速离心后所得上清液中加入 2 倍体积乙醇,混匀后在 4 ℃ 下静置过夜,析出的沉淀物在大

容量低速离心机中以 3000 r/min 离心 20 min,所得沉淀用丙酮洗涤,最后真空干燥得絮凝剂粗品.将粗品制成一定浓度的溶液待用。

1.6 性质分析

(1) 取适量絮凝剂溶液,在 200 ~ 600nm 范围内进行紫外扫描,考察特征吸收峰。(2) 取适量絮凝剂溶液,分别用双缩脲试剂、茚三酮、α-萘酚、葱酮等显色剂进行显色反应。(3) 取适量干燥的粗产品,进行红外光谱扫描。(4) 通过苯酚——硫酸法^[5-6]测定微生物絮凝剂中的多糖含量。

1.7 实际废水处理应用

考察生物絮凝剂在模拟洗煤废水处理中的应用^[7]。模拟洗煤废水的配置:在煤场采集原煤样品,将适量的原煤研磨成细粉状.取煤粉过 200 目筛的细煤粉用自来水浸泡 24 h,制得 4 g/L 的模拟洗煤废水待处理。

2 结果与讨论

2.1 絮凝剂产生菌的筛选结果

经分离纯化以及实验室现有菌种共 46 株细菌,初筛获得 18 株有絮凝能力的菌株.经过复筛后,最终选定 10 # (XMX-1) 为产絮凝高效菌株,发酵液絮凝率大于 95.49%。经革兰氏染色后,确定为革兰氏阴性菌,菌体形状为球状,菌落边缘不规则,突起,菌落周边有透明环带.菌种有待于进一步鉴定。

2.2 絮凝剂最佳产生条件

2.2.1 培养基组成

以葡萄糖、蔗糖、D-乳糖、麦芽糖、玉米淀粉、豆腐水、可溶性淀粉为碳源,以硫酸铵、硝酸铵、蛋白胨、酵母膏、尿素、玉米浆为氮源代替基本培养基中的相应成分,经相同条件发酵后,测定絮凝率。

结果显示:价格低廉的玉米淀粉作为碳源(图 1 所示)、玉米浆(淀粉厂的副产品)作为氮源(图 2 所示)时效果最好。

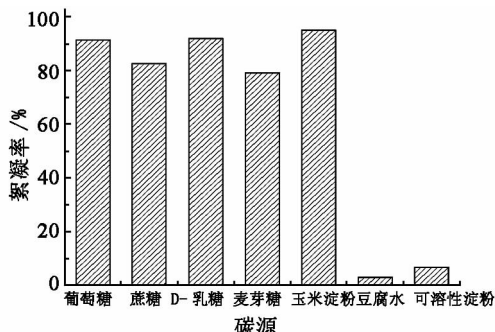


图 1 不同碳源对 XMX-1 合成微生物絮凝剂的影响
Fig.1 Effect of carbon source on flocculant producing

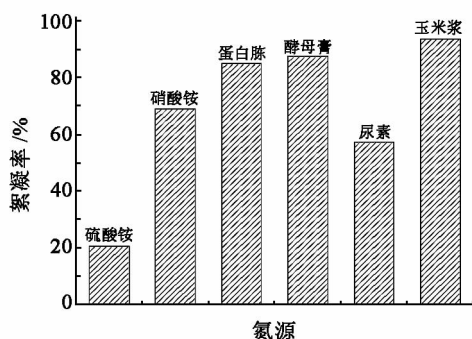


图2 不同氮源对 XMx-1 合成絮凝剂的影响
Fig.2 Effect of nitrogen source on flocculant producing

2.2.2 培养基初始 pH 值对生物絮凝剂合成的影响

采用前述实验确定的玉米淀粉、玉米浆作为碳氮源,其他组分不变配置培养基.调整各组培养基的初始 pH 为 3,4,5,6,7,8,9,10 接入菌种经摇床培养后,测定培养液对高岭土悬液的絮凝活性,并测定培养结束后发酵液的终了 pH 值.

由图3可知,培养基初始 pH 值为 5~6 时(未经调节的培养基 pH 值为 5 左右),发酵液的絮凝活性在 90% 以上,如果初始 pH 值低于 5 或高于 6 时,则对 XMx-1 产生絮凝剂有抑制作用.在后续培养中,培养基的维持原有 pH 值(5 左右)即可.

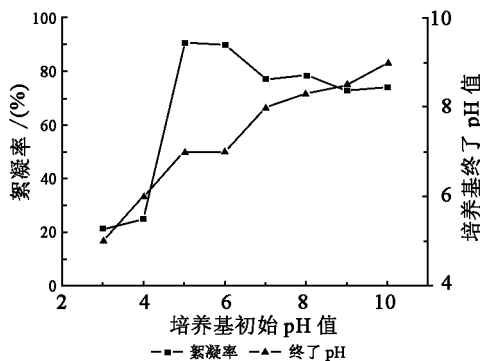


图3 培养基初始 pH 值对微生物絮凝剂合成的影响
Fig.3 Effect of pH on flocculant producing

2.2.3 培养时间对微生物絮凝剂合成的影响

分别测定培养时间不同的发酵液对高岭土悬液的絮凝活性.结果如图4所示.

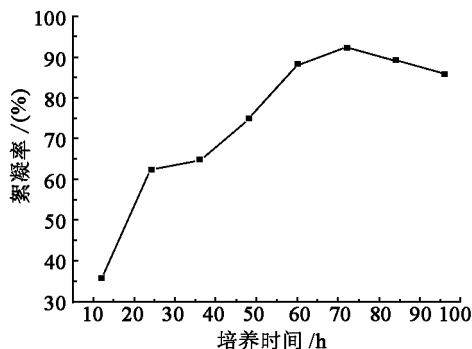


图4 培养时间对 XMx-1 合成絮凝剂的影响
Fig.4 Effect of culture time on flocculant producing

由图4可知,当培养时间在为 12~24 h 时,絮凝率迅速增加;培养时间为 60 h 时,絮凝效果超过 90%,72 h 时絮凝效果最好,絮凝率达到 92.6%;此后,随着培养时间的进一步延长,絮凝率有一定程度的下降.因此, XMx-1 产絮凝剂的较好的培养时间是 60~72 h.因此, XMx-1 发酵合成絮凝剂的最佳获得时间是 72 h.

2.2.4 接种量对微生物絮凝剂合成的影响

在培养基中分别以 2%,3%,4%,5%,6% 的接种量接入种子液,经摇床培养 72 h 后,分别测定各组培养液对高岭土悬液的絮凝活性.结果如图5.

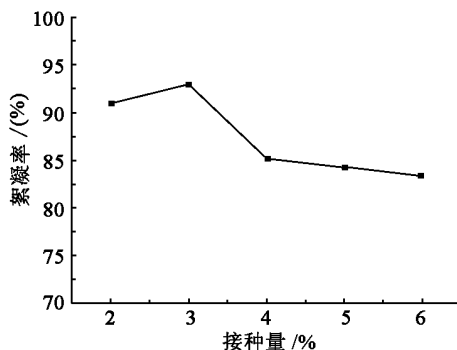


图5 接种量对 XMx-1 合成絮凝剂的影响
Fig.5 Effect of inoculation capacity on flocculant producing

由图5可以看出,接种量为 2%,3% 时,发酵液的絮凝活性都在 90% 以上,当接种量大于 4% 以后,发酵液的絮凝活性显著下降.因此接种量也是影响 XMx-1 的一个因素.由于接种量过大,培养液中细菌的初始浓度高,生长初期细菌生长繁殖则会消耗大量的营养底物,导致絮凝剂的产量下降;而接种量过小,培养液中细菌浓度低,使得培养周期延长.因此 XMx-1 发酵培养的最佳接种量为 3%.

2.2.5 装液量对微生物絮凝剂合成的影响

以节 2.5.7 所述方法测定培养液对高岭土悬液的絮凝活性.结果如图6所示.

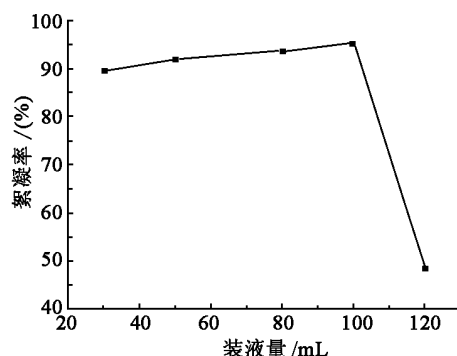


图6 装液量对微生物絮凝剂合成的影响
Fig.6 Effect of culture medium capacity on flocculant producing

装液量在一定程度上可反映发酵介质的溶氧水平.结果显示,在 250 mL 摇瓶中装液量为 50 mL 时发

酵液絮凝活性最高,虽然装液量为 80 mL 和 100 mL 时,其发酵液的絮凝活性也达到 90% 以上,但培养基中的组分利用不充分,考虑经济原因选择装液量为 50 mL/250 mL 最好。

2.3 絮凝剂的性质

2.3.1 絮凝剂的提取

从 40 mL XMX-1 发酵液离心后的上清液提取获得 0.3074 g 粗产品 (7.685 g/L)。将此产品命名为 XMX-1F(下同),将粗品溶于适量水中配置成 150 mg/L 的絮凝剂溶液。

2.3.2 微生物絮凝剂粗产品的成分分析

(1) 在 200 ~ 600 nm 范围内紫外扫描絮凝剂 XMX-1F 溶液,结果可知: XMX-1F 的紫外扫描曲线为一条平滑曲线,没有特征吸收峰。这说明絮凝剂中几乎不含有核酸(260 nm 有吸收峰)和蛋白质(280 nm 有吸收峰)。因此可以定性判断该絮凝剂的有效成分不是蛋白质或核酸。如图 7 所示。

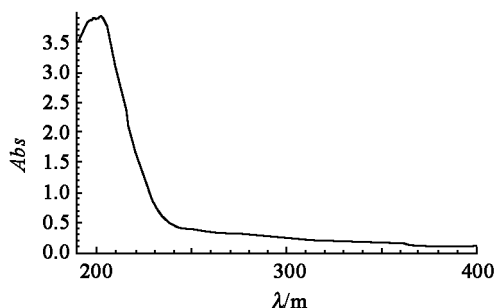


图 7 XMX-1F 溶液的紫外扫描谱图
Fig.7 Ultraviolet spectra of XMX-1F

(2) 取适量絮凝剂溶液,分别用双缩脲试剂、茚三酮、 α -萘酚、蒽酮等显色剂进行生化反应。茚三酮、双缩脲试剂均无颜色反应,进一步肯定 XMX-1 所产絮凝剂中不含蛋白质(或氨基酸); α -萘酚、蒽酮均有显色反应,判断产品中主要成分是多糖。

(3) XMX-1F 干品经红外光谱扫描,如图 8。

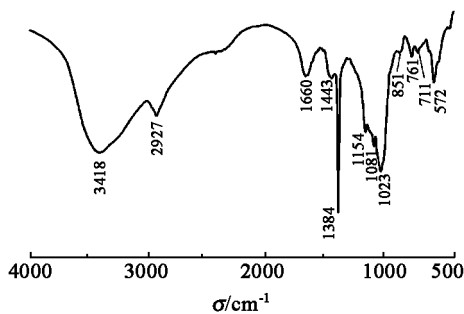


图 8 XMX-1F 的红外扫描谱图
Fig.8 Infrared spectra of XMX-1F

和其他一些多糖的红外光谱图相比^[8-9],图 9 的谱图是较为典型的多糖红外光谱图,3418 cm^{-1} 处强而宽的吸收峰是分子内的-OH 伸缩振动所导致形成

的。1660 cm^{-1} 是由多糖中的乙酰氨基(-NHCOCH₃)的 C=O 键伸缩振动造成的。1384 cm^{-1} 处为羧基-COO⁻ 中的 C=O 对称伸缩振动。1023 cm^{-1} 的强吸收峰是糖环中的 C-O-C 反对称伸缩振动吸收谱带。XMX-1F 的红外光谱显示了糖的特征结构外,还有酰胺结构的特征吸收峰, XMX-1F 的主要成分很可能为一种氨基多糖。

(4) 由以上实验结果,确定 XMX-1 所产絮凝剂中不含蛋白质,进行多糖的含量测定。经过计算 XMX-1F 中多糖的含量为 5.984 g/L,占产物总量的 77.87%。这与红外光谱扫描的结果一致。

2.4 实际废水处理效果

(1) 絮凝剂的投加量对处理模拟洗煤废水的影响: XMX-1F 的投加量为 0.3 mL(絮凝体系 30 mL)时其对模拟洗煤废水的絮凝活性达到最高 85.9%,之后随着投加量的加大,出现絮凝恶化现象。

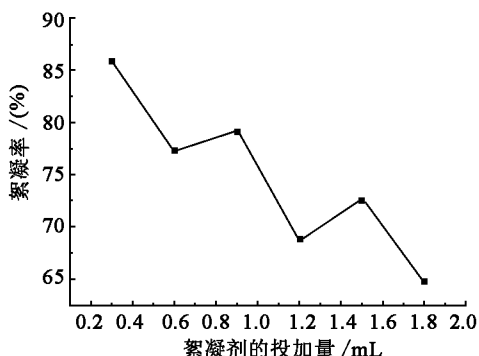


图 9 絮凝剂的投加量对处理模拟洗煤废水的影响
Fig.9 Effect of XMX-1F concentration on flocculation

(2) 与聚丙烯酰胺(PAM)的对比实验

配置 0.1% 的聚丙烯酰胺溶液,取 1 mL 对模拟洗煤废水进行处理。结果显示, PAM 对模拟洗煤废水的絮凝率为 73.7%,而同时测定的 1 mL XMX-1F 溶液对模拟洗煤废水的絮凝率达到 83.9%。

3 结论

从林下土壤中筛选得到一株产微生物絮凝剂高效菌株 XMX-1,该菌为短杆状的革兰氏阴性菌。

通过实验,找了采用玉米淀粉和玉米浆作为碳氮源的廉价培养基,有效地解决了发酵生产中的成本问题。该菌产絮凝剂最佳培养基与培养条件:玉米淀粉 10 g/L,玉米浆 20 mL/L, MgSO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, pH 值 5,接种量 3%,温度 30 °C,培养时间 72 h。

经乙醇提取、丙酮洗涤、真空干燥, XMX-1 所产絮凝剂粗产品的产量为 7.685 g/L。经过对 XMX-1F

的样品进行紫外扫描分析,蛋白和糖的显色反应以及红外扫描分析,确认是以氨基多糖为主的高分子絮凝剂,多糖含量为 77.87%。

实际废水处理方面, XMX-1F 对模拟洗煤废水处理效果很好,有望应用到处理实际洗煤废水中。

参考文献:

- [1] TAKEDA M, KURANE R. A protein bioflocculant produced by rhodococcus erythropolis [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55 (10):2663-2664.
- [2] TOEDA K, KURANE R. Microbial flocculant from alcali2 genes cupidus KT 201 [J]. Agri Biol Chem, 1991, 55 (11): 2793-2799.
- [3] 何宁,李寅,陈坚.生物絮凝剂的最新研究进展及其应用 [J].微生物学通报,2005,32(2):104-108.
HE Ning, LI Yin, CHEN Jian. Recent investigations and applications of bioflocculant [J]. Microbiology, 2005, 32(2): 104-108.
- [4] 王兰.生物絮凝剂絮凝活性评价方法的探讨 [J].生物技术,2005,15(5):57-59.
WANG Lan. Studies on assessing methods of flocculating activity of bioflocculants [J]. Biotechnology, 2005, 15(5):57-59.
- [5] PELLERIN P, GOSSELIN M, LEPOUTRE J. Enzymic production of oligosaccharides from corn cob xylan [J]. Enzyme Microb Technol, 1991, 13:617-621.
- [6] BRECCIA J D, CATRO G R, BAIGORI M D. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78:469-472.
- [7] 李梅,黄廷林,汪国雅.洗煤废水高效处理的实验研究 [J].西安建筑科技大学学报,2002,34(1):38-41.
LI Mei, HUANG Ting-lin, WANG Guo-ya. An experimental study on the high efficiency treatment of coal-washing wastewater [J]. Journal of Xi'an University of Architecture & technology, 2002, 34(1):38-41.
- [8] 康学军,曲见松,顾忠泽.白芷多糖的分析 [J].分析化学研究简报,2006,34(4):533-535.
KANG Xue-jun, QU Jian-song, GU Zhong-ze. Analysis of angelica dahurica polysaccharide [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(4):533-535.
- [9] 马放,张金凤,远立江.复合型生物絮凝剂成分分析及其絮凝机理的研究 [J].环境科学学报,2005,25(11):1491-1496.
MA Fang, ZHANG Jin-feng, YUAN Li-jiang. Flocculating mechanism and ingredient analysis of compound bioflocculant [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(11):1491-1496.

(编辑:孙广增)