

# 土壤微生物絮凝剂菌株的筛选 及其培养条件优化

刘小真<sup>1,2</sup> 梁越<sup>2</sup> 汪月华<sup>2</sup> 肖远东<sup>3</sup>

(1. 南昌大学 鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室 江西 南昌 330031; 2. 南昌航空大学 环境与化学工程学院 江西 南昌 330063; 3. 江西农业大学 国土资源与环境学院 江西 南昌 330045)

**摘要:**从鄱阳湖地区3种耕作层的土壤中分离出17种菌株,经过初筛及复筛获得1株有较强絮凝活性的菌株(CSB3),经鉴定为革兰氏阴性杆菌。采用单因素试验方法和正交试验设计方法,分析了影响絮凝效果的主要因素,对该菌株的最佳培养条件进行了优化研究。结果表明:金属离子 $Mg^{2+}$ 对产生菌的絮凝活性有较大影响, $Mg^{2+}$ 更适合做该产生菌的助凝剂。该产生菌的絮凝活性主要集中在上清液中(絮凝率为71.4%),表明该微生物絮凝剂是微生物在发酵过程中由菌细胞分泌的胞外物质。搅拌速度在80~120 r/min时有较好的絮凝活性。CSB3菌株产絮凝剂的最佳条件为:质量分数为1% (g/mL)  $Mg^{2+}$ 的投加量为3 mL, pH为12, 搅拌速度为120 r/min, 温度为30℃, 培养时间为26~28 h。CSB3菌株产生的絮凝剂对质量分数为5‰高岭土悬浊液的最高絮凝率为93.1%。

**关键词:**微生物絮凝剂; 筛选; 培养条件; 耕作土壤

中图分类号:S154.34 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)04-0817-06

## Screening of Flocculant-producing Strains from Soil Microorganism and Optimization of Their Cultural Conditions

LIU Xiao-zhen<sup>1,2</sup>, LIANG Yue<sup>2</sup>, WANG Yue-hua<sup>2</sup>, XIAO Yuan-dong<sup>3</sup>

(1. Key Lab of Lake Ecology and Bio-resource Utilization of Poyang Lake, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. School of Environmental and Chemical Engineering, Nanchang Hangkong University, Nanchang 330063, China; 3. College of National Land Resources and Environment, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** An optimum strain CSB3 with high flocculating activity was chosen by preliminary screening and rescreening from 17 strains of bacteria, which were isolated from 3 kinds of cultivated soil in the area of Poyang Lake. By preliminary identification, CSB3 was discovered as a rod, gram-negative strain. Then the major factors of impacting flocculation effect were analyzed and the best cultural conditions of CSB3 bacterial strain were studied by single factor test and orthogonal design test. The experimental results showed that metal ion  $Mg^{2+}$  had a significant effect on flocculation activity from the producing strain,  $Mg^{2+}$  was more appropriate for flocculation aid to the producing strain. The flocculation activity from the producing strain concentrated mainly on supernatant (flocculation rate 71.4%), which showed that the microorganism flocculant was an

收稿日期:2011-04-20 修回日期:2011-06-03

基金项目:江西省科技厅资助项目(2009AE00600 2009BNB06100 200513222)和南昌大学鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室开发基金资助项目(Z05002)

作者简介:刘小真(1965—),男,教授,博士,主要从事环境生物技术研究, E-mail: L\_xiaozhen2003@yahoo.com.cn。

extracellular matter secreted by germ cell in the fermentation process. It had better flocculation rate when the stirring rate was 80 – 120 r/min. The optimum culture conditions were: quantity of 1% (g/mL)  $Mg^{2+}$  3 mL, pH 12, agitating rate 120 r/min, temperature 30 °C, cultivated for 26 – 28 h in Erlenmeyer flasks. The strain produced a strong-activity flocculant, and its best flocculating rate to 5‰ kaolin suspension could reach 93.1%.

**Key words:** microbial flocculent; screening; culture condition; cultivated soil

微生物在重金属、多环芳烃(PAHs)等的废水处理过程中起着重要的作用<sup>[1-4]</sup>。微生物絮凝剂(Microbial Flocculants, MBF)既不同于无机絮凝剂中的铝离子、有机合成的高分子絮凝剂聚丙烯酰胺(Polyacrylamide)<sup>[5]</sup>,也不同于豆类植物中可溶性纤维物质瓜尔豆胶(Guar gum)等絮凝剂<sup>[6]</sup>,而是一类由微生物或其分泌物产生的代谢产物,通过细菌、真菌等微生物发酵、提取、精制而获得,可以使水中不易降解的固体悬浮颗粒和胶体颗粒等絮凝沉淀,是一种高效、安全、无二次污染、能自然降解的新型水处理剂。微生物絮凝剂属于天然微生物高分子絮凝剂,其主要活性成分有糖蛋白、多糖、蛋白质、纤维素和DNA等高分子多聚物<sup>[7]</sup>。微生物絮凝剂的pH值稳定,热稳定性好,用量小,来源广泛,生长周期短,能够聚集、沉淀水中的悬浮颗粒、有机物、色素及金属离子,具有絮凝效果好、可生物降解的特性,对环境和人类无毒无害<sup>[8-9]</sup>,部分已应用到含油废水<sup>[10]</sup>、豆<sup>[11]</sup>制品废水<sup>[11]</sup>、畜禽粪污水<sup>[12]</sup>等相关废水处理之中。但还未达到大规模工业化生产和应用的水平。开发和系统研究微生物絮凝剂成为当今热点研究领域,因地制宜地筛选高效微生物絮凝剂产生菌并提高其絮凝剂产量尤为重要,本文基于鄱阳湖地区耕作层的土壤对微生物絮凝剂进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养基

菌种:取自鄱阳湖地区不同地点的3种耕作层的土壤。

筛选用的培养基:葡萄糖 20 g/L、 $K_2HPO_4$  5 g/L、 $KH_2PO_4$  2 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$  0.2 g/L、NaCl 0.1 g/L、尿素 0.5 g/L、酵母膏 0.5 g/L、 $MgSO_4$  0.2 g/L, pH = 8。

制备菌液:分别称取3种土壤样品各10 g于100 mL杯中,加无菌水至80 mL用玻璃棒搅拌均匀后静置,每种样品都取上层清液10 mL于100 mL的烧杯中加水至100 mL的刻度线。加水稀释的上清液称为稀样品,而不加水稀释的称为浓样品。接种:取出已培养24 h的培养基,挑选分离菌落较大、长势较好的培养皿,仔细观察、记录菌落的形态、颜色。在草酸铵结晶紫染色的条件下用显微镜观察细菌的形状,对挑选的菌落逐一编号,并分别接种于相应编号的液体培养基和斜面培养基中。液体培养基用于培养产絮凝菌,斜面培养基用于保留菌种。接种后的三角烧瓶置于30 °C, 140 r/min的摇床中振荡培养24 h。将斜面培养基放入培养箱30 °C的条件下培养24 h。

### 1.2 产絮凝剂菌株的筛选

(1) 初筛的方法。分别取80 mL质量分数为5‰的高岭土悬浮液倒入100 mL的烧杯中,加入1 mL相应编号的培养液,用玻璃棒搅拌后静置,观察絮凝效果,筛选有絮凝活性的菌种。(2) 复筛的方法。将初筛的与之对应的斜面培养基中的菌种接种到装有大约30 mL液体培养基的50 mL三角瓶中,放在30 °C恒温振荡培养24 h后,所得培养液经沉淀后取上清液进行絮凝活性测定,进行复筛。

### 1.3 培养条件对絮凝特性的影响

1.3.1 絮凝活性的测定 用絮凝率对微生物絮凝剂的絮凝性进行定量。在400 mL的烧杯中加入250 mL质量分数为5‰的高岭土悬浮液,再加1 mL复筛的培养液,摇匀后静置5 min,用751分光光度计测定上清液在波长为550 nm处的吸光度,以不加培养液的样品做对比,计算絮凝率 $E$ <sup>[5]</sup>。 $E = [A - B] / A \times 100\%$ ,其中A为对照在550 nm处的吸光度;B为样品在550 nm处的吸光度。

1.3.2 培养条件的优化 取复筛后具有很高絮凝活性的1株细菌进行培养条件优化实验,考察培养时间(12 ~ 49 h)、金属离子(1% (g/mL)的 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$ ,即质量分数为1%  $CaCl_2$ 、1%  $MgCl_2$ 、1%  $FeCl_3$ 、1%  $Al_2(SO_4)_3$ 的溶液)、培养基pH值(2.0 ~ 13.0)、温度(10 ~ 50 °C)、培养液中絮凝活性的分布、搅拌速度(20 ~ 120 r/min)等因素对絮凝活性的影响。

## 2 结果和讨论

### 2.1 絮凝剂产生菌的初筛与复筛

本次实验初筛中选到了17种菌种,其中只有3种有絮凝性,均为革兰氏阴性杆菌(表1)。复筛结果显示CSB1号和CSB2号的絮凝性较差,CSB3号产生菌絮凝性最好。以下选择CSB3号产生菌来研究其絮凝特性。

表1 3种菌株形态特征及絮凝率

Tab.1 The morphology characteristics and flocculation rates of three kinds of strains

编号 Code	菌落形态 Colonial morphology	细菌形态 Germ morphology	絮凝性 Flocculation	絮凝率/% Flocculation rate
CSB1	乳白色脓状液体,表面湿润,菌落突起,边缘整齐,菌落较大,长势较好	杆状	+	44.3
CSB2	菌落为黄色扁平状,粘稠,边缘为锯齿形	杆状	+	50.4
CSB3	菌落透明无色,整体突起,表面湿润,边缘整齐,菌落较小	杆状	++	65.7

+表示有絮凝性,++表示有絮凝性、且絮凝性好。

+ indicating having flocculation, ++ indicating having better flocculation.

### 2.2 培养条件对絮凝特性的影响

#### 2.2.1 培养时间对絮凝效果的影响

培养时间为24~26h时絮凝率增长很快(图1),处于微生物生长周期的对数期,从48.6%增长到73.6%,并在26h时絮凝率达到最大(73.6%)。随后微生物的絮凝活性呈现下降趋势,但絮凝率仍高于65%以上。下降原因可能是由于微生物分解利用了部分有絮凝性能的高分子物质,也可能是由于菌体生长迅速,加快了底物的消耗,不利于胞外分泌物的合成,这说明菌液浓度过高时可能抑制絮凝活性。因此该微生物絮凝剂产生菌的最佳培养时间应在26~28h。

#### 2.2.2 金属离子对絮凝效果的影响

培养基中的金属离子对微生物絮凝剂的产生有影响<sup>[13]</sup>。图2显示,CSB3号产生菌随着 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 投加量的增加,絮凝率逐渐增大,这是由于金属离子中和了颗粒物基团上的负电荷,在不同颗粒间形成配位结合桥,从而加强微生物絮凝剂的絮凝作用,即二价阳离子可以降低负电荷微生物絮凝剂和悬浮颗粒之间的静电排斥力,增加微生物絮凝剂在悬浮颗粒物上的初始吸附。 $\text{Ca}^{2+}$ 的最佳投加量在2mL,此时的絮凝率为69.4%; $\text{Mg}^{2+}$ 的最佳投加量为3mL,絮凝率为75.4%。通过 $\text{Ca}^{2+}$ 与 $\text{Mg}^{2+}$ 对絮凝效果的比较, $\text{Mg}^{2+}$ 对产生菌的絮凝活性影响更大,说明 $\text{Mg}^{2+}$ 更适合做该产生菌的助凝剂。

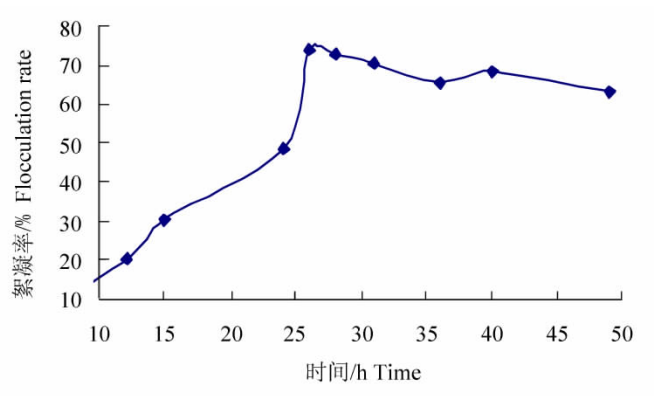


图1 培养时间与絮凝率的关系

Fig.1 The relationship between incubation time and flocculation rate

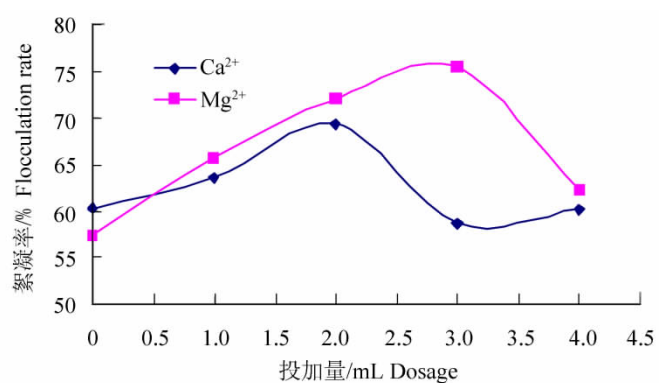


图2 金属离子投加量对絮凝率的影响

Fig.2 The relationship between the quantity of metal ion and flocculation rate

从表2可以看出  $Fe^{3+}$  对絮凝率的影响起负作用,可能是  $Fe^{3+}$  本身就有颜色,对吸光度有影响,不能客观地反映出它对该产生菌的影响。 $Al^{3+}$  对该产生菌的影响不大。

表2  $Fe^{3+}$  与  $Al^{3+}$  对絮凝活性的影响

Tab.2 Effect of  $Fe^{3+}$  and  $Al^{3+}$  on flocculation rate

供试样品 Experimental sample	金属离子 Metal ion		空白 Blank space
	$Fe^{3+}$	$Al^{3+}$	
絮凝率/% Flocculation rate	-14.5	60.3	60.2

2.2.3 培养基 pH 值对絮凝效果的影响 pH 值对胶体颗粒的表面电荷、 $\delta$  电位,对絮凝剂的水溶液性质及其絮凝作用有很大的影响。图3可以看出 pH 值 2.0 ~ 13.0 内,该絮凝剂的絮凝率波动较大,总体呈现上升趋势; pH = 11 时,絮凝率突然下降,其原因有待进一步研究。pH < 9.0 时,絮凝率都小于 65%,不利于处理废水;当 pH > 9.0 时,絮凝效果较好; pH = 12.0 时,絮凝率达到最大(80.4%)。pH 值主要影响菌体细胞体内的表面电荷和氧化还原电位,进而影响菌体对营养物质的吸收和体内关键酶的活性<sup>[5]</sup>。酸碱度的变化改变了生物聚合体的带电状态和中和电荷的能力以及被絮凝物质的颗粒表面性质<sup>[10]</sup>。不同的絮凝菌最适 pH 值有很大不同, JX18 菌的 pH 值为 7 时,絮凝率最高(88.45%)<sup>[5]</sup>。该菌种(CSB3)产生的微生物絮凝剂在碱性条件下絮凝效果较好。

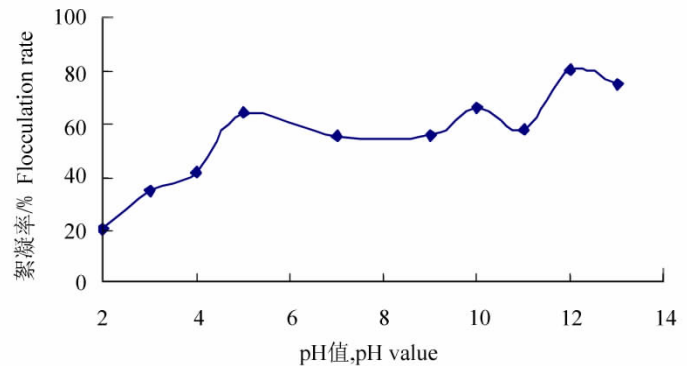


图3 pH 对絮凝率的影响

Fig.3 Effect of pH on agitating rate

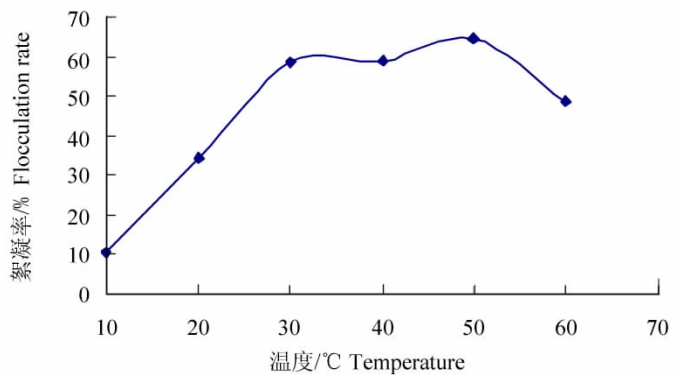


图4 温度对絮凝率的影响

Fig.4 Effect of temperature on flocculation rate

2.2.4 温度对絮凝效果的影响 从图4可以看出,随着温度升高,该产生菌的絮凝效果逐渐提高,当水温达到了

50 °C 时,微生物的絮凝活性依然很好,此时的絮凝率达到最大(64.7%)。这可能是由于温度的升高,水中分子热运动加快,促使悬浮颗粒间的碰撞机会增加,有利于絮凝体的形成;同时温度影响微生物的新陈代谢,大多数微生物的最适生长温度在 20 ~ 40 °C,温度太低,达不到新陈代谢的最适酶活性,温度太高,核酸和酶容易失活<sup>[5]</sup>。50 °C 可能是接近该种产生菌分泌的絮凝物质的酶所需要的适宜温度。

2.2.5 培养液中絮凝活性的分布 在培养时间最佳范围内,取培养液 1 mL,于 3 000 r/min 离心分离 30 min,上清液留用,菌体用蒸馏水洗涤 3 次后,加入与培养液等体积的蒸馏水得到菌体悬浮液。测定并计算全培养液、上清液、菌体悬浮液及灭菌后纯培养液对高岭土的絮凝活性。由表3可以看出,该产生菌的絮凝活性主要集中在上清液中,上清液的絮凝率为 71.4%。上清液的絮凝率略高于全培养液(61.5%),可能是除去菌体后对其干扰减少,这也说明起絮凝作用的物质是微生物分泌到胞外的,且大部分扩散到了上清液中,小部分未脱落的附着在菌体细胞表面,这也使菌体有部分絮凝活性。纯培养液的絮凝性为负值,表明微生物絮凝剂是微生物在发酵过程中由菌细胞分泌,而不是培养液本身具有絮凝作用。

表 3 培养液中的絮凝活性的分布

Tab. 3 Distribution of flocculation activity in culture solution

供试样品 Experimental sample	上清液 Supernate	培养液 Culture solution	菌细胞悬液 Bacterial cell suspension	液体培养基 Liquid nutrient medium
絮凝率/% Flocculation rate	71.4	61.5	29.5	-5.0

2.2.6 搅拌速度对絮凝效果的影响

从图 5 可以看出,当搅拌速度小于 60 r/min 时,絮凝率小于 30.0%,这主要是由于搅拌速度太小,絮凝剂与高岭土悬浮液混合不均匀,不能很好脱稳,影响絮凝效果。当搅拌速度大于 80 r/min 时,絮凝率都高于或接近于 65%,絮凝效果比较好。短时间快速搅拌,使絮凝剂与废水迅速混合均匀,有利于压缩双电层及电性中和。当搅拌速度大于 100 r/min 时,絮凝率稍微下降,这是由于搅拌速度太高则会打破絮凝体,从而使絮凝率有所降低。因此,最佳搅拌速度为 80~100 r/min。

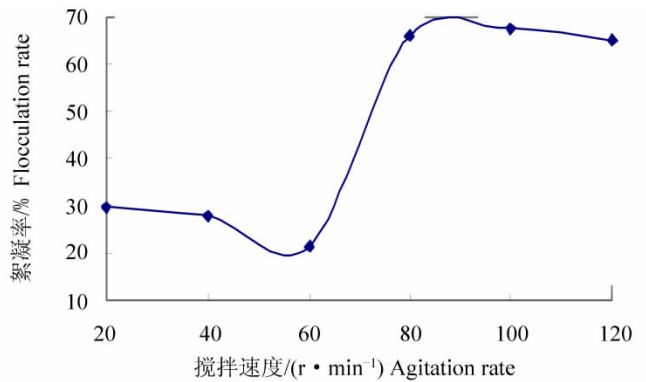


图 5 搅拌速度对絮凝率的影响

Fig. 5 Effect of agitating rate on flocculation rate

2.2.7 正交实验 综合考虑 Mg<sup>2+</sup>、pH 值、搅拌速度和温度等因素水平时,该产生菌对其絮凝活性的影响,做了正交实验(表 4)。根据表 4 正交试验的极差分析结果,较优实验组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即 9 号试验组合,较优理论组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。在实验与理论较优组合不一致时,应将两组合进行对比验证试验。本文未进行验证试验,因此只能采用实验较优组合 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>,即质量分数为 1% (g/mL) Mg<sup>2+</sup> 的投加量为 3 mL, pH 为 12, 搅拌速度为 120 r/min, 温度为 30 °C。该菌产生的絮凝剂对高岭土悬浊液的最高絮凝率为 93.1%。

表 4 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计及结果

Tab. 4 Orthogonal design and its results

试验序号 Test code	因素 Factor				空白 Blank space	实测 Actual measurement	絮凝率/% Flocculation
	Mg <sup>2+</sup> /mL	pH	搅拌速度/(r · min <sup>-1</sup> ) Agitating rate	温度/°C Temperature			
1	2	11	80	30	0.539	0.100	81.4
2	2	12	100	40	0.547	0.053	90.3
3	2	13	120	50	0.578	0.065	88.8
4	3	11	100	50	0.547	0.061	88.8
5	3	13	80	40	0.539	0.058	89.2
6	4	11	120	40	0.565	0.124	78.1
7	4	12	80	50	0.523	0.055	89.5
8	4	13	100	30	0.533	0.056	89.5
9	3	12	120	30	0.578	0.040	93.1
K <sub>1</sub>	86.83	82.76	86.70	88.00	实验较优组合: A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> ;		
K <sub>2</sub>	90.36	90.96	89.53	85.86	理论较优组合: A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ;		
K <sub>3</sub>	85.70	89.16	86.66	89.03			
R	4.66	8.20	2.86	3.16			

空白表示不加 Mg<sup>2+</sup>、不调节 pH 值在室温下的吸光度,实测表示在 Mg<sup>2+</sup>、pH 值、搅拌速度和温度影响因素时的吸光度。

Blank space showing room temperature absorbance not adding Mg<sup>2+</sup> and not adjusting pH, actual measurement showing the absorbance based on effect from Mg<sup>2+</sup>, pH, agitating rate and temperature.

### 3 结 论

本实验从鄱阳湖地区3种不同耕作土壤样品中筛选出1株具有高效絮凝活性的革兰氏阴性杆菌(CSB3)。通过单因素试验方法和正交试验设计方法,该产生菌的最佳培养时间为26~28 h,其絮凝剂物质主要是胞外物质;该产生菌适合处理碱性废水,金属离子中镁离子的助凝作用较大, $Mg^{2+}$ 更适合做该产生菌的助凝剂。该产生菌最佳培养条件是:质量分数为1% (g/mL)  $Mg^{2+}$ 的投加量为3 mL, pH为12, 搅拌速度为120 r/min, 温度为30℃。该菌产生的絮凝剂对高岭土悬浊液的最高絮凝率为93.1%。

#### 参考文献:

- [1] Wenchuan Cao, Jianchao Hao, Bin Lian, et al. Zeolite and fungi's flocculability of simulated wastewater containing heavy metal ions or phosphorus [J]. Chinese Journal of Geochemistry 2010 29(2): 137-142.
- [2] F Fernández-Luqueno, C Valenzuela-Encinas, R Marsch, et al. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review [J]. Environ Sci Pollut Res 2011, 18: 12-30.
- [3] W Fuchs, H Binder, G Mavrias, et al. Anaerobic treatment of wastewater with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit [J]. Water Research, 2003, 37: 902-908.
- [4] Derek R Lovley, Elizabeth J P Phillips. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in Anaerobic sediments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(4): 683-689.
- [5] 咎继清, 林炜铁. 一株絮凝剂产生菌的筛选鉴定及培养条件 [J]. 微生物学通报 2010, 37(4): 547-552.
- [6] Bhaskar Sen Gupta, Jubilant E, Ako. Application of guar gum as a flocculant aid in food processing and potable water treatment [J]. Eur Food Res Technol 2005, 221: 746-751.
- [7] 李红. 絮凝剂产生菌的筛选、培养及产物性质研究 [J]. 生物学杂志 2008, 25(5): 61-62.
- [8] 钟文文. 絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件的优化 [J]. 西北农业学报 2008, 17(1): 120-123.
- [9] 韩艳霞, 胡斌杰, 姬红. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化 [J]. 化工环保 2010, 30(3): 206-209.
- [10] 刘其友, 张云波, 赵朝成, 等. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其对含油废水的处理研究 [J]. 化学与生物工程 2010, 27(8): 80-82.
- [11] 邵伟, 罗少华, 唐明. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及在豆制品废水中的应用 [J]. 中国酿造 2009, 209(8): 129-131.
- [12] 李妍, 高贤彪, 赵琳娜, 等. 处理畜禽粪污的微生物絮凝剂产生菌的筛选 [J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 24-26.
- [13] 黎忠, 张修玉. 一株高效微生物絮凝剂产生菌的筛选鉴定和培养条件优化 [J]. 环境工程学报 2010, 49(11): 2515-2518.