

絮凝活性产紫青霉 EL-02 的分离鉴定及其絮凝活性初探

张雨山, 王静, 郝建安, 张秀芝, 成玉

(国家海洋局天津海水淡化与综合利用研究所, 天津 300192)

摘要:【目的】分离鉴定有絮凝活性真菌,同时对其絮凝活性进行初步研究。【方法】采用梯度稀释、平板划线、18S rDNA 检测等方法分离鉴定絮凝活性菌株。通过高速离心、超声破碎、乙醇沉淀、定性试验等方法确定絮凝活性物质性质。【结果】从渤海湾海岸土壤样品中分离筛选出一株有较高絮凝活性的真菌,经鉴定为产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*),命名为产紫青霉 EL-02(*P. purpurogenum* EL-02)。超声破碎试验证实其絮凝活性主要存在于发酵上清液。根据絮凝活性曲线,确定 4 d 为积累絮凝活性产物的最佳发酵时间。乙醇沉淀法获得该菌株絮凝活性物质。经鉴定该菌株所产絮凝活性物质为糖类,且其活性在 pH 2-11,温度 -70 °C-100 °C 范围内保持稳定。【结论】分离筛选到一株有絮凝活性的产紫青霉 EL-02,经鉴定其产生糖类絮凝活性物质。

关键词: 絮凝活性;真菌分离鉴定;活性物质;产紫青霉

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0917-06

絮凝(flocculation),是指水中悬浮微粒集聚变大,或形成絮团,粒子聚沉加快,最终造成固-液分离的现象。絮凝作用的原理已被应用于工业给水,冶金除尘废水,石油化工废水,印染污水,造纸废水以及含油废水的净化处理^[1]。近年来,伴随经济发展与人口增多,淡水资源日渐紧张。海水储量丰富,如何利用海水资源造福人类,成为当今热门课题。海水水质直接决定海水利用的效率,然而海水性质独特,且不同地区海水水质差异较大,因此海水预处理成为海水利用的关键步骤^[2]。

作为一种简便实用的水处理技术,国内外已将絮凝技术广泛应用于海水预处理过程,其关键问题是絮凝剂的选择。目前常用于海水预处理的絮凝剂有无机盐类如硫酸铝、氯化铁以及有机高分子化合物如丙烯酰胺的共聚物等^[3]。无机与有机絮凝剂虽效果良好,但都存在二次污染的问题,易对人类的健康造成危害^[4],因此开发环境友好型海水絮凝剂

是当务之急。

1876年,法国科学家 Louis Pasteur 发现酵母菌能絮凝微生物的现象,这是最早报道的微生物絮凝作用。1986年,日本学者 Ryuichiro Kurane 等人发现红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)有很好的絮凝活性,并将该菌制成微生物絮凝剂 NOC-1^[5]。试验证明该絮凝剂对大肠杆菌、酵母、泥浆水、河水、粉煤灰水、活性碳粉水、膨胀污泥、纸浆废水等均有极好的絮凝和脱色效果,具有良好的应用前景。微生物产品易于降解,无毒无害,安全性高;同时由于其繁殖周期短,易于生产。因此,微生物絮凝作用与微生物絮凝剂的研究逐渐成为热点^[6]。

进入 21 世纪,科学家不断致力于将微生物絮凝剂应用于海水预处理,目前已陆续分离到多株有絮凝活性的海洋微生物^[7-9]。本实验室从渤海湾海岸土壤样品中筛选分离到一株有较高絮凝活性的真菌,并对其絮凝活性进行初步探索,为日后将絮凝活

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAB03A08)

作者简介:张雨山(1962-),男,河北人,研究员,博士,研究方向:海水利用技术。Tel: +86-22-87898171; Fax: +86-22-87898173; E-mail: yushanzhang@hotmail.com

收稿日期:2009-12-08; **修回日期:**2009-02-10

性海洋微生物应用于海水处理提供理论支撑和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:采自渤海湾海岸土壤。

1.1.2 菌种:大肠杆菌 (*Escherichia. coli*) DH5 α 为本实验室保存。

1.1.3 培养基:真菌培养基:葡萄糖 20 g, KH₂PO₄ 2 g, NH₄Cl 0.8 g, 酵母抽提物 (Oxford 公司) 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, CaCl₂ 0.5 g, 调节 pH 值至 7.0, 陈海水补足 1 L, 琼脂 1.5% (W/V, 固体培养基), 115 °C 灭菌 20 min。

1.1.4 主要试剂和仪器: *rTaq* 聚合酶、dNTP、pMD18-T 载体与 DNA Marker (DL2000, DL15000) 购自大连宝生物公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司, 化学试剂 (分析纯) 购自南开大学化工厂。

1.2 菌种的分离

菌种的分离采用稀释平板法^[10]联合平板划线法。取 10g 土壤样品加入 90 mL 无菌水中混匀即成 10⁻¹ 稀释液, 取 1 mL 10⁻¹ 稀释液加入 9 mL 无菌水中混匀即成 10⁻² 稀释液, 依此类推, 连续稀释制成 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ 等一系列稀释液。每种稀释液取 100 μ L 涂布真菌固体培养基平板, 30 °C 过夜培养。选取菌落稀疏有致的平板, 挑取菌苔再进行平板划线, 观察菌落形态, 直到获得单菌落并在平板上保存。

1.3 絮凝活性检测

絮凝活性检测采用高岭土法^[11], 在 150 mL 的烧杯中加入 93 mL 蒸馏水, 0.4 g 高岭土, 5 mL 1% (W/V) CaCl₂ 溶液以及 2 mL 待测样品。200 r/min 搅拌 2 min, 静置 5 min, 测定其上清液在波长 550 nm 处的吸光度 (以 A 表示)。同时以蒸馏水代替培养液作絮凝活性实验, 其上清液在波长 550 nm 处的吸光度 (以 B 表示) 为对照, 絮凝率 = (B - A) / B \times 100%。

絮凝活性真菌的筛选借助此法, 取 2 mL 过夜培养的菌液测定絮凝率。

1.4 18S rDNA 鉴定

真菌菌株基因组的提取参照 Weiland 所述方法^[12], 选用通用引物 NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGCTCTC-3' 和 NS8 5'-TCCGCAGGTTCCACTACGGA-3'^[13] 扩增 18S rRNA 基因。PCR 反应体系

(25 μ L): 基因组 DNA 2 μ L, 引物各 10 pmol, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 1.5 μ L, dNTP 2 μ L, *rTaq* 3 u, ddH₂O 补足。反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 cycles; 72 °C 10 min; 4 °C pause。PCR 产物纯化回收, 与 pMD18-T 载体连接 (16 °C 过夜)。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选, PCR 鉴定。阳性克隆子委托上海生物工程公司测序, 测序结果在 GenBank 中比对分析。

1.5 菌株形态观察

真菌固体培养基平板划线培养菌株, 观察菌落特征; 制作菌丝玻片, 光学显微镜下观察菌丝特征。

1.6 絮凝活性定位

真菌接种于液体培养基, 30 °C 180 r/min 培养 48 h, 保留部分培养物。高速离心保留发酵上清液。收集菌体重悬于 10 mmol/L Tris. HCl (pH8.0) 溶液, 500 W 以 10 s 为间隔超声破碎 30 min。离心保留上清液即为细胞破碎产物。培养物, 发酵上清液, 细胞破碎产物进行絮凝活性检测。

1.7 絮凝活性曲线

接种菌块于 100 mL 液体培养基, 30 °C 180 r/min 培养, 每隔 24 h 取 2 mL, 4 °C 12557 \times g 离心 10 min, 上清液进行絮凝活性检测。

1.8 絮凝活性物质提取

真菌液体发酵产物, 4 °C 12557 \times g 离心 10 min, 保留上清液。上清液中加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 充分缓慢搅拌, 0 °C 沉降 5 h。4 °C 12557 \times g 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀冷冻真空干燥, 即获得粉末状絮凝活性物质。

1.9 絮凝活性物质定性测定

粉末状絮凝活性物质溶于适量无菌水, 进行糖类 (Molish 反应, 蒽酮反应)、蛋白类 (茆三铜反应, 双缩脲反应)、脂类 (苏丹 III 染色)、以及核酸类 (苔黑酚反应, 二苯胺反应) 定性反应, 同时用蛋白酶 K (56 °C 30 min) 处理, 最终确定絮凝活性物质种类。

1.10 pH 对絮凝活性的影响

粉末状絮凝活性物质溶于适量无菌水, 将该溶液 pH 在 2 - 12 范围内以 1 为间隔调节, 进行絮凝活性检测。

1.11 温度对絮凝活性的影响

粉末状絮凝活性物质溶于适量无菌水, 将该溶液在 -70 °C、-20 °C、0 °C、4 °C、20 °C、30 °C、37 °C、50 °C、65 °C、80 °C 以及 100 °C 条件下反应 15 min 后, 进行絮凝活性检测。

2 结果

2.1 絮凝活性菌株的分离筛选

梯度稀释法与平板划线法联用, 自渤海湾土壤样品中分离到 100 株真菌。将 100 株真菌分别进行絮凝活性检测, 发现编号为 EL-02 的菌株絮凝活性最强, 达到 94.0%。因此选取该菌株作为下一步的研究对象(数据未显示)。

表 1 EL-02 18S rDNA 鉴定结果

Table 1 EL-02 18S rDNA test result

Accession No.	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF245257.1	<i>Penicillium purpurogenum</i> strain KCTC16069 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3066	3066	100%	0.0	98%
AF245244.1	<i>Penicillium purpurogenum</i> strain KCTC6820 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3066	3066	100%	0.0	98%
AF245268.1	<i>Penicillium purpurogenum</i> strain KCTC16073 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	3064	3064	100%	0.0	98%

2.3 菌株形态观察

平板划线菌落生长较慢, 30 °C 培养 72 h 后方可观察到菌落, 菌落形态见图 1。EL-02 菌落扁平致密, 外缘不规则, 菌丝白色绒状, 孢子绿色。



图 1 EL-02 菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of EL-02.

1000 倍光学显微镜下观察, EL-02 菌丝形态见图 2。EL-02 菌丝有隔膜, 分生孢子梗的主分枝较长, 分枝简单, 次级分枝常不等间距的单生或对生, 分枝较短。瓶梗基部有缢缩。分生孢子为淡绿色, 圆形或椭圆形。

综合上述实验结果, 经 18S rDNA 鉴定与菌落形态观察, 确定 EL-02 为产紫青霉, 命名为产紫青霉 EL-02 (*P. purpurogenum* EL-02)。

2.4 絮凝活性定位

菌株培养物, 发酵上清液, 细胞破碎产物进行絮凝活性检测, 结果显示(图 3), 培养物的絮凝率为

2.2 18S rDNA 鉴定

菌株 EL-02 的 18S rDNA 序列在 GenBank 中比对结果见表 1。该表中结果显示 EL-02 菌株的 18S rDNA 序列与多株产紫青霉 (*P. purpurogenum*) 相似, 且相似性可达 98%, 因此可以初步确定该菌株是一株近似于产紫青霉的真菌。目前已将 EL-02 18S rDNA 序列在 GenBank 中注册, 注册号为 GQ903331。



图 2 显微镜下 EL-02 菌丝形态 (1000 ×)

Fig. 2 Hyphal morphology of EL-02 under microscope (1000 ×).

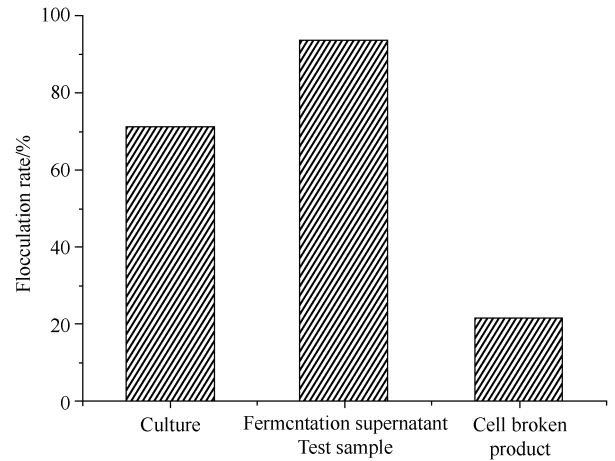


图 3 产紫青霉 EL-02 絮凝活性定位

Fig. 3 Location of flocculating activity of *P. purpurogenum* EL-02.

71.1%, 发酵上清液的絮凝率为 94%, 而细胞破碎产物的絮凝率仅为 21.1%, 因此可以肯定该菌株的絮

凝活性主要存在于发酵上清液,后续实验可以选择发酵上清液为研究对象。

2.5 絮凝活性曲线

以5 d为周期,1 d为间隔绘制絮凝活性曲线,结果显示(图4),培养前2 d,菌株发酵上清液絮凝率为负值,证明菌株不产絮凝活性物质。发酵3 d以后,菌株发酵上清液的絮凝活性达到80%以上,说明开始产生大量絮凝活性产物。菌株在4 d发酵上清液絮凝活性最高,因此4 d可以作为积累絮凝活性产物最佳发酵时间。

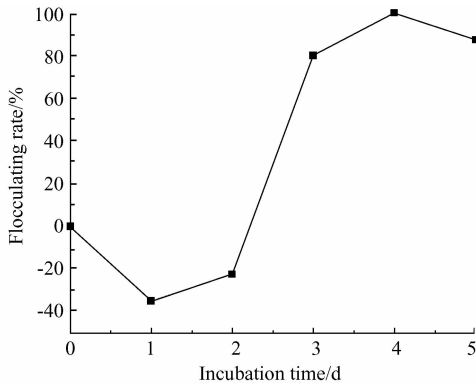


图4 产紫青霉 EL-02 絮凝活性曲线

Fig.4 Flocculating activity curve of *P. purpurogenum* EL-02

2.6 絮凝活性物质定性测定

粉末状絮凝活性物质溶于适量无菌水,进行糖

类(Molish反应,蒽酮反应)、蛋白类(茆三铜反应,双缩脲反应)、脂类(苏丹 III 染色)、以及核酸类(苔黑酚反应,二苯胺反应)定性反应。结果显示(表2),molish与蒽酮反应呈阳性,说明该溶液中含有糖类;茆三铜反应有微弱阳性而双缩脲反应阴性,提示该溶液含有极少量蛋白;苏丹 III 染色阴性,证实溶液不含脂类;二苯胺反应与苔黑酚反应阴性,证实溶液不含核酸。经此系列定性试验可证实溶液中主要含有糖类和少量蛋白质。经蛋白酶 K 处理(56 °C 30 min)去除蛋白后,溶液絮凝活性不变,因此可以推定该菌株所产絮凝活性物质为糖类。

2.7 pH对絮凝活性的影响

调节絮凝活性物质溶液 pH 值,使其在 2 至 12 间改变。结果显示(表3),絮凝活性物质溶液 pH 值在 2 至 12 范围内变动,并不影响其絮凝活性,即该物质的絮凝活性对酸碱环境的变化耐受性较好。

2.8 温度对絮凝活性的影响

将絮凝活性物质溶液在 -70 °C、-20 °C、0 °C、4 °C、20 °C、30 °C、37 °C、50 °C、65 °C、80 °C 以及 100 °C 条件下反应 15 min 后,进行絮凝活性检测,结果显示(表4),当温度在较大范围内变动,絮凝活性物质的活性并不受影响,即该物质的絮凝活性对温度环境的变化耐受性也较好。

表2 产紫青霉 EL-02 絮凝活性物质定性试验

Table 24 Qualitative reaction of flocculating active substance of *P. purpurogenum* EL-02

Reaction	Molish Reaction	Anthrone reaction	Ninhydrin reaction	Biuret reaction	Sudan III dyeing	Orcinol reaction	Diphenylamine reaction
Result	++	++	+	-	-	-	-

表3 pH值对产紫青霉 EL-02 絮凝活性的影响

Table 3 pH influence toward flocculating activity of *P. purpurogenum* EL-02

pH value	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Flocculating activity	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

表4 温度对产紫青霉 EL-02 絮凝活性的影响

Table 4 Temperature influence toward flocculating activity of *P. purpurogenum* EL-02

Temperature(°C)	-70	-20	0	4	20	30	37	50	65	80	100
Flocculating activity	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

3 讨论

分子标记技术的发展,使 DNA 分子成为区分物种、变种、地理株的有效手段。较之在细菌鉴定中常用的 16S rDNA 序列,真菌 18S rDNA 序列长度适中,在一级结构中存在多拷贝同时其高变区域高度保守,因此被广泛用于分子系统学研究尤其是真菌

种属的鉴定^[14]。本实验室自渤海湾海岸土壤样品中分离得到一株有较高絮凝活性的真菌,通过 18S rDNA 鉴定,联合菌落形态观察与显微观察确定其为产紫青霉。经超声波破碎,发现该菌的絮凝活性主要存在发酵上清液,细胞破碎产物存在约 20% 絮凝活性,推测可能是由细胞成分引发,但由于活性较低,因此后续试验仅以发酵上清液为研究对象。絮

凝活性曲线的绘制为大量积累絮凝活性产物提供了帮助,更为今后絮凝活性物质的大规模发酵生产提供了理论支撑。发酵上清液絮凝活性在 pH 值 2 - 12 以及 -70 °C - 100 °C 范围内保持稳定,提示该絮凝活性物质保存方便,对酸碱环境变化适应能力强,便于推广应用。经多种定性试验验证,该菌株产生的絮凝活性物质为糖类,为下一步即将进行的分离纯化与性质鉴定提供了参考。曾在发酵上清液中加入微量一价、二价和三价阳离子 (Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Al^{3+}) 发现没有明显助凝作用(数据未显示),因此该菌株的絮凝活性并不依赖于阳性离子的辅助。使用此菌株的发酵上清液对海水和河道污水进行絮凝活性试验,也获得不错效果(数据未显示),但与无机絮凝剂如 FeCl_3 的实际应用效果相比,相差约 15%。推测是由于发酵上清液中絮凝活性物质的纯度与浓度不够,如何提高絮凝活性物质的纯度与浓度将是下一步工作的重点。微生物絮凝作用已研究多年,有絮凝活性的菌株包含细菌、真菌以及放线菌多种。综合至今报道,细菌与真菌所产的絮凝活性物质报道最多,絮凝活性物质主要为胞外多糖。本实验分离到一株絮凝活性真菌且其絮凝活性物质为糖类,与多数报道相吻合。然而本实验菌株的发酵上清液对高岭土悬液的絮凝率为 94%,属于较少的高絮凝活性菌株,且其絮凝活性物质对温度、酸碱环境要求不苛刻,因此具有极高的工业应用价值。为使此絮凝活性物质早日实际应用,本实验室已开始寻找廉价替代培养基,试验中发现自制的土豆培养基已能很好替代原培养基,具体发酵条件仍在摸索中。

参考文献

- [1] 沈小兵. 微生物絮凝剂的研究及其在水处理中的应用. 环境科学与技术 (*Environmental Science and Technology*), 2006, 29: 26-29.
- [2] 张雨山, 张秀芝, 王静, 王树勋. 海水预处理过程絮凝剂的絮凝效能研究. 盐业与化工 (*Journal of Salt and Chemical Industry*), 2009, 38(2): 1-5.
- [3] 徐碧, 陆雪梅, 邵春燕, 徐炎华. 高效絮凝剂的研究进展. 化工时刊 (*Chemical Industry Times*), 2004, 18(5): 6-9.
- [4] 汪德生, 张洪林, 蒋林时, 邱峰. 微生物絮凝剂发展现状与应用前景. 工业水处理 (*Industrial Water Treatment*), 2004, 24(9): 9-12.
- [5] Ryuichiro K, Kiyoshi T, Tomoo S. Screening for and Characteristics of Microbial Flocculants. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(9): 2301-2307.
- [6] 胡勇有, 高宝玉. 微生物絮凝剂. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [7] Li WW, Zhou WZ, Zhang YZ, Wang J, Zhu XB. Flocculation behavior and mechanism of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6893-6899.
- [8] Zhang J, Liu Z, Wang S, Jiang P. Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4-5): 517-22.
- [9] Qin GK, Zhu L Zh, Chen XL, Wang P, Zhang YZh. Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiology*, 2007, 153: 1566-1572.
- [10] 赵斌, 何绍江, 主编. 微生物学实验. 第一版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 闰永胜, 刘彬彬, 毛艳丽, 许化溪, 苏兆亮. 一株 *Pseudomonas* sp. 的分离鉴定与所产絮凝剂性能研究. 环境科学与技术 (*Environmental Science and Technology*), 2008, 31(6): 40-43.
- [12] Weiland JJ. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genetics Newsletter*, 1997, 44: 60-63.
- [13] Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1990.
- [14] 何毅婷, 杨汝德, 张广, 黄耀威. 以 18S rDNA 序列鉴定一株产纤维素酶真菌. 现代食品科技 (*Modern Food Science and Technology*), 2008, 24(7): 638-640.

Flocculating activity of *Penicillium purpurogenum* EL-02 and its flocculating activity

Yushan Zhang^{*}, Jing Wang, Jian'an Hao, Xiuzhi Zhang, Yu Cheng

(Institute of Seawater Desalination and Multipurpose Utilization, SOA, Tianjin 300192, China)

Abstract: [**Objective**] To isolate, identify and characterize a fungus with flocculating activity. [**Methods**] We used gradient dilution, plaque distribution and 18S rDNA analysis to isolate and identify a fungus with flocculating activity. We used high-speed centrifugation, ultrasonication and qualitative test to determine the nature of flocculating active substances. [**Results**] We isolated a flocculating active fungi and identified it as *Penicillium purpurogenum*. Ultrasonication test confirmed that the flocculating activity was primarily in the fermentation supernatant. We explored the flocculating activity curve and found that 4 days was the optimum fermentation time for accumulating flocculating active substances. The strain flocculating activity remains unchanged when pH varied from 2 to 11 and temperature varied from -70 °C to 100 °C. We finally identified the flocculating active substances as saccharides. [**Conclusion**] We isolated a flocculating active strain *P. purpurogenum* EL - 02, and identified its flocculating active products as saccharides.

Keywords: flocculating activity; fungi isolation and identification; active substances; *Penicillium purpurogenum*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 11th Five Years National Scientific and Technological Support Projects (2006BAB03A08)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-22-87898171; Email: yushanzhang@hotmail.com

Received: 8 December 2009/Revised:10 February 2010

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2010 年 7 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	7