

一株产微生物絮凝剂菌株的分离鉴定及特性*

刘紫鹃 刘志培 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要:从活性污泥中分离筛选到一株产絮凝剂的细菌 A25, 鉴定为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*。该菌株产絮凝剂的最适碳源为麦芽糖, 最适氮源为酵母提取物, 最适 pH 为 7.0~10.0。絮凝剂的形成与菌体生长同步, 均在 10h 达到最高值。该絮凝剂主要分布在发酵液中, 另外还有一部分存在于菌体上。所产絮凝剂对供试的各种悬浮液和菌悬液都具有良好的絮凝效果。

关键词:巨大芽孢杆菌, 絮凝剂, 污水处理

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-05-04

THE SCREEN AND CHARACTERIZATION OF A FLOCCULANT-PRODUCING BACTERIUM

LIU Zi-Juan LIU Zhi-Pei YANG Hui-Fang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: A bacterial strain A25, isolated from activated sludge and identified as *Bacillus megaterium*, could produce flocculant. The optimum carbon and nitrogen sources are maltose and yeast extract, respectively. The optimum pH range is 7.0~10.0. The flocculant was synthesized during the cell growth. The flocculant mainly exists in the supernatant. The partial purified flocculant could be kept in 60°C for 1 hour without losing activity.

Key words: *Bacillus megaterium*, Novel flocculant, Treatment of wastewater

絮凝剂(flocculant)是一类可使液体中不易沉降的固体悬浮颗粒(粒径 $10^{-3}\text{cm} \sim 10^{-7}\text{cm}$)凝聚、沉淀的物质。絮凝剂可分为3类:无机絮凝剂、有机合成絮凝剂及生物絮凝剂。其中前两者因其存在二次污染的问题而无法适应环境的需求。生物絮凝剂是从动、植物中提取的或微生物分泌的天然高分子絮凝剂,较无机絮凝剂的和有机絮凝剂有高效、无毒无害、无二次污染等特点,可广泛应用于污水处理工业及发酵液的菌液分离等方面。其中微生物絮凝剂是具有广阔应用前景的一种絮凝剂。70年代以来,日本、韩国、美国和欧洲各国的十多个国家对该项研究非常重视。近年来,我国的许多环境工作者也开始注意这方面的研究,但还处在开始阶段,研究很不系统。

产生絮凝剂的微生物种类很多,广泛分布于细菌、放线菌、真菌及藻类中。早在30年代 Butterfield^[1]就发现了能产生胞外黏液的微生物,这种微生物可以分泌一种粘性物质来附着其它微生物,从而在活性污泥中形成凝结核。从此开始了以分离筛选高产絮凝剂的微生物为目的的研究。现在已经分离得到许多菌株,广泛分布在细菌^[2~5]、真菌^[6~9]和放线菌^[10]等40个属中。通过各种分析方法研究者初步发现絮凝剂的化学性质、组成各不相同。已纯化的絮凝剂分子量大都在几十万到几百

*“九五”攻关项目(No. 96-909-01-03)

收稿日期:1999-11-25, 修回日期:2000-01-21

万之间。

从活性污泥中分离到一株高效产絮凝剂的细菌,对其进行了鉴定,研究了该菌株产絮凝剂的条件并对其进行所产絮凝剂的效率和特性进行了初步研究。

1 方法与材料

1.1 样品、培养基及菌株的筛选

样品采自淄博、武汉、北京等地的污水处理厂及湖底污泥。筛选培养基为:葡萄糖 20g,酵母提取物 3g(预先用 DNA 酶及 RNA 酶 37℃处理 4h), KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, NaCl 0.05g,定容 1L 中,pH7.0,30℃摇床培养 72h。

1.2 细菌生长的测定

每 50mL 培养液离心除去上清后,以蒸馏水洗涤菌体 2 次,再加水至 500mL,在 600nm 下测定光吸收值或收集菌体在 60℃下烘干称重。

1.3 絮凝活性测定

在 100mL 的量筒中,加 1mL 0.5mol/L CaCl_2 (溶于 8.9mol/L 双甘氨酸)于 100mL (5000mg/L)的高岭土悬浊液中,调 pH 为 7.8,加 2mL 培养液或 50 μg 的絮凝剂(对照加等量无菌培养基或蒸馏水)混匀 30s,静置 1min,取上清 50mL 测 OD_{550} ,相对絮凝率为:FR = (B-A)/B × 100%。A 为样品 OD_{550} 的值,B 为对照 OD_{550} 的值。绝对絮凝率为 1/ OD_{550} ^[9]。

1.4 菌株的鉴定

观察得到的 4 株菌形态后,按照伯杰细菌系统学手册(1989 年)进行生理生化鉴定。由酚-氯仿法提取 DNA,以 Tm 法^[11]测 A25 的 G+Cmol%。

另外采用了 16S rDNA 序列测定的方法。对该菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,并将扩增产物测序。测序结果送入 RDP 数据库进行分析。扩增引物序列如下:

正向:27f 5'GAGAGTTTGATCCT GGCTCAG 3'

反向:1541r 5'AAGGAGGTGATCC AGCC 3'

1.5 絮凝剂的纯化

培养液离心除去细胞后,于上清中加入 2 倍体积乙醇,沉淀物真空干燥过液,获得微生物絮凝剂的粗制品。称重后溶于 0.05mol/L NaCl (100mg/mL)中,加入 10% CTAB(约 1/20)直至无沉淀形成。再用 2 倍体积乙醇沉淀,然后将沉淀物溶于 0.25mol/L NaCl 中,再用乙醇沉淀一次,干燥后得纯品即为絮凝剂 BP25。

2 结果与讨论

2.1 产絮凝剂菌株的筛选

从采集到的 9 个样品中在筛选培养基上培养共取得 304 个单菌落,其中有絮凝活性的 9 株,以菌株 A25、B2、B04、B18、B52 的絮凝率最高,可达 90%以上,由于菌株 B2 菌体有自溶现象被淘汰。对菌株 A25、B04、B18、B25 进行鉴定和特性的研究。

2.2 菌株鉴定

从菌株的培养特征、形态特征、生理生化反应等特征进行鉴定;菌株 A25、B04、B18、B52 在牛肉汁平板上菌落呈圆形,边缘整齐,凸出。个体较大(1.8 μm × 3~3.5 μm),芽孢中生、不膨大,V-P 反应阴性,接触酶阳性。从葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露醇产酸不产气。其他的生理生化特征与标

准菌株 *Bacillus megaterium* 也非常接近。

由于上述 4 株芽孢杆菌从表面形态及生理生化特征上没有区别,所以下面只研究 A25 的一些特征。

菌株 A25 的 G+C mol% 为 38%,与标准菌株(37.3%)相比无显著差别。16S rDNA 片段测序及在 RDP 数据库中的检索结果表明:它与标准菌株 *Bacillus megaterium* 的相似率最高,为 99%,在 1128 个碱基中只有 3 个不同,1 个 gap。确定了所分离的菌株 A25 是一株巨大芽孢杆菌。

2.3 菌株 A25 产生絮凝剂的条件

分别研究了不同碳源、氮源、初始 pH、通气量对絮凝剂产生的影响。基本条件是:50mL 培养基装入 250mL 三角瓶内,30℃ 180r/min 摇床培养 16h。

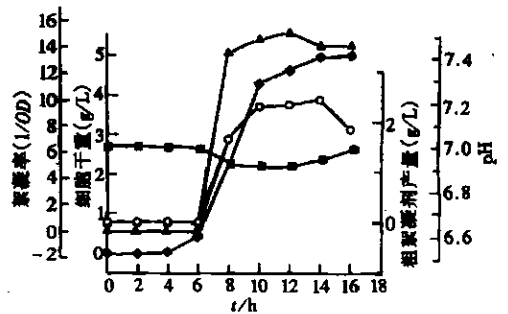
2.3.1 碳源:碳源对菌体生长及絮凝剂产生都有很大的影响,但这种影响不总是是一致的。以山梨糖及菊糖为碳源时,絮凝剂合成为 0。而以阿拉伯糖、乳糖、淀粉为碳源时,絮凝活性在 50% 以下。在以麦芽糖为碳源时絮凝剂合成最高,絮凝活性可达到 90% 以上,对菌体生长来说,半乳糖是菌体生长的最适碳源,在以山梨糖、乳糖为碳源时,生长量很低。综合以上结果,我们认为麦芽糖为碳源最合适。

2.3.2 碳源的浓度:实验结果表明,培养基中的麦芽糖浓度对菌体生长和絮凝剂的合成有很重要的影响,3% 的麦芽糖条件下,絮凝率最高,但 2% 的浓度下絮凝剂活性(90%)已经接近 3% 碳源浓度。因为在工业生产中要计算投入与产出的比率从而获得最理想的培养基配方,所以麦芽糖添加量选择为 2%。

2.3.3 氮源:在以 2% 麦芽糖为碳源,pH7 条件下,添加不同氮源。在以无机氮源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3)和有机氮源(尿素、牛肉汁)为唯一氮源的情况下,絮凝剂合成为零。以蛋白胨及酪蛋白水解物为氮源时,絮凝活性可以达到 50% 以上。而在以 0.3% 酵母提取物为氮源时,细胞生长及絮凝剂产生都达到较高的水平。因此,以 0.3% (W/V) 酵母提取物为最佳氮源。

2.3.4 培养基初始 pH 的影响:在最适碳源、氮源条件下,配制 5 种不同 pH 的培养基。结果表明,培养基初始 pH 对产絮凝剂影响很大。在酸性 pH (pH<7) 条件下,几乎不产生絮凝剂,并且不利于菌体生长。而在中性偏碱(pH7~10)条件下絮凝剂的活性均可达到 90% 以上,在此范围内,生长量变化很小。

2.3.5 *Bacillus megaterium* A25 发酵过程:采用 2L 发酵罐(New Brunswick Scientific Co. Inc., USA),30℃ 发酵 16h。每隔 2h 取样一次,测定生



长量,絮凝率,絮凝剂产量及发酵液 pH 的变化。结果(图 1)表明,在发酵 10h 后,菌体生长、絮凝剂合成均达到最高。在工业生产中,发酵周期越短越利于节约成本。与其它文献^[9,10]中报道的相比,该菌株的发酵时间最短。

2.4 絮凝剂在发酵液及菌体上的分布

发酵液经离心得完整细胞及上清,以生理盐水洗涤菌体两次,再稀释到原来的体积,得菌悬液。测定菌悬液及上清的絮凝率,并与发酵液的絮凝率比较。结果表明,絮凝剂大部分存在于发酵液中(絮凝率为 82%),但在洗涤后的细胞上也有一部分存在(20%)。该结果表明絮凝剂主要是一种胞外絮凝剂。

2.5 不同金属离子对絮凝效果的影响

不同浓度离子分别添加到絮凝体系中,测定离子对絮凝的影响。如表1所示,所有供试的一价及三价阳离子对絮凝均无任何影响,而所有的二价阳离子都有或多或少的促进作用,其中以 Ca^{2+} , Mn^{2+} 的效果最为显著。不同离子的最适浓度不同。

表1 不同离子对絮凝剂活性的影响

浓度(mmol/L)	NaCl	AlCl ₃	FeCl ₃	MgCl ₂	CuCl ₂	CaCl ₂	BaCl ₂	MnCl ₂
0	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
4	1.01	1.08	1.01	3.6	5.66	10.07	19.59	77.9
8	0.99	1.22	1.05	9.59	15.65	13.05	22.57	63.5
12	1.02	1.36	1.08	6.17	20.14	30.93	24.03	60
16	1.00	1.46	1.06	7.5	40.48	90.26	24.87	47
20	1.00	1.66	1.07	0.36	15.13	80.5	25.43	21.95

表2 絮凝剂 BP25 对各种悬浊液及菌悬液的絮凝

絮凝样品	絮凝率(%)	絮凝样品	絮凝率(%)
10%干泥土	90	<i>Bacillus megaterium</i>	94
25%湿泥土	86	<i>Bacillus subtilis</i>	44
2%微晶纤维素	85	<i>E. coli</i>	22
2%活性炭	87	<i>Candida sp.</i>	90
		<i>Streptomyces ambogaciens</i>	76

2.7 对供试样品的絮凝效率

以泥土、活性炭、5mg/mL(湿重)菌悬液等多种液体为供试材料,加入絮凝剂,观察其对不同供试材料的絮凝能力,经过反复试验,结果表明,絮凝剂粗制品对所有供试材料在5min(悬浊液)和30min(菌悬液)之内均有良好的絮凝效果,说明该絮凝剂在污水处理行业及发酵工业的固、液分离中具有较高的应用前景。

3 结论

实验结果表明,絮凝剂产生菌 A25 为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*。它在生长的同时合成胞外絮凝剂。絮凝剂产生的最适碳源为麦芽糖,氮源为酵母提取物,最适生长及产絮凝剂的 pH 范围为 7~10。同时,絮凝剂的产生与培养基初始 pH、通气量、碳源浓度都有很大的关系。菌株 A25 具有发酵周期短、营养要求简单、絮凝性状稳定遗传等特点,其产生的絮凝剂 BP25 具有絮凝活性高、絮凝范围广、对热稳定等优点。所以是一株很有应用前景的絮凝剂产生菌。关于絮凝剂 BP25 的性质及结构有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Butterfield C T. U S Public Health Rep, 1935,50:671~674.
- [2] Napoli C, Dazzo F, Hubbel D. Applied Microbiology, 1975, 30:123~131.
- [3] Toeda K, Kurane R. Agric Biol Chem, 1991,55:2793~2799.
- [4] Sakka K, Takahashi H. Agric Biol Chem, 1981,45:2869~2876.
- [5] 王 镇,王孔星,谢裕敏,等. 微生物学报,1995,35:121~129.
- [6] Takagi H, Kadowaki K. Agric Biol Chem, 1985,49:3151~3157.
- [7] Nam J S, Kwon G S, Lee S O, et al. Biosci Biochem, 1996,60:325~327.
- [8] Kwon G S, Moon S H, Lee H M, et al. Biotechnology letters, 1996,18:1459~1464.
- [9] Lee S H, Lee S O, Jang K L, et al. Biotechnology letters, 1995,17:95~100.
- [10] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, et al. Biosci Biochem, 1994,58:1977~1982.
- [11] Marmur J, Doty P J. Mol Biol, 1962,5:109~118.