

# 微生物絮凝剂的研制——菌种选育、 絮凝效果及提取工艺\*

叶晶菁<sup>1</sup> 谭天伟<sup>2</sup>

(北京化工研究院 北京 100013)<sup>1</sup>

(北京化工大学 北京 100029)<sup>2</sup>

**摘要:** 从土壤、河泥、活性污泥中分离出 752 株细菌, 以发酵液对高岭土悬浮液絮凝效果为指标, 筛选出 1 株絮凝剂产生高效菌。该菌在实验室培养条件下, 以 0.2mL/30mL 接种量, 5h 种龄的种子液接种, 25℃、pH7 摇床培养 3d 可达最高絮凝活性。最佳培养基配方为: 葡萄糖 20g, 尿素 0.3g, 酵母膏 0.6g, NaClO<sub>6</sub> 0.6g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 6g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g, pH7; 微生物絮凝剂的絮凝效果受加样量、pH、金属离子、温度、搅拌速度、水质等多种因素的影响。实际废水试验显示, 该菌对去除水中悬浮物能力较强, 且对高浓度染料废水的脱色能力较好; 采用水抽提-丙酮沉淀-真空干燥的工艺路线, 最终从 100mL 发酵液中得到 0.1985g 干品。

**关键词:** 微生物絮凝剂, 菌种选育, 废水处理

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0031-05

\* 中国石油化工股份有限公司科学技术研究开发资金资助项目 (No. 990018)

收稿日期: 2000-04-03, 修改日期: 2000-12-30

## SCREENING FOR AND CHARACTERISTICS OF MICROBIAL FLOCCULANT

YE Jing-Jing TAN Tian-Wei

(Beijing Research Institute of Chemical Industry, Beijing 100013)

(Beijing Chemical Industry University, Beijing 100013)

**Abstract:** strain 49<sup>o</sup> (BD-4), which had the highest flocculating activity among 752 strains, was picked out. The fermentation conditions and the flocculating influence factors were studied. By testing, this culture broth had a much more ability to get rid of suspended materials in water and to decolourize the high-density dyestuff wastewater.

In laboratory scale, bioflocculant was roughly extracted from culture broth by the technological process, water extraction—organic solvent sediment—vacuum dry. The suitable work conditions of each step were set up through the tests.

0.1985g dry product was obtained from 100mL culture broth.

**Keyword:** Bioflocculant, Screening, Wastewater treatment

微生物絮凝剂以其高效、安全、可生物分解的独特性质,越来越引起人们的关注,其中以日本仓根隆一郎筛选出的红平红球菌 *Rhodococcus erythropolis* 所产絮凝剂 NOC-1 的絮凝效果最好,已用于畜产品废水处理中<sup>[1-3]</sup>。本试验筛选得到了一株絮凝剂产生高效菌种,研究了该菌产絮凝剂的最佳生长条件及其絮凝效果,并且在提取得到粗产品后,对其性质、组成进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种分离及筛选

从不同地点采集土样,常规方法富集、分离并纯化后,摇瓶培养并筛选。筛选用培养基:葡萄糖 20g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, NaCl 0.1g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2g, 尿素 0.5g, 酵母膏 0.5g, MgSO<sub>4</sub> 0.2g, pH 8.0, 0.07MPa 灭菌 20min。絮凝率测定方法:100mL 0.5%高岭土悬浮液,5mL 1% CaCl<sub>2</sub>, 2mL 待测样品, pH7.0, 混匀后静置 5min, 550nm 测定 OD 值,絮凝率计算公式:絮凝率(%) = (A - B) / A × 100%

式中:A—对照上相液 550nm 处的 OD 值;B—样品上相液 550nm 处的 OD 值。

### 1.2 废水絮凝试验

85mL 废水, 5mL 1% CaCl<sub>2</sub>, 10mL 发酵液, pH7, 混匀静置 30min, 上清液用重铬酸钾法<sup>[4]</sup>测定 COD 值或稀释倍数法<sup>[4]</sup>测定色度。

### 1.3 提取操作流程

发酵液→4 倍体积水稀释, 慢速搅拌 2h→离心, 除菌体→上清液用 10, 000 分子量的膜超滤, 浓缩至 0.5 倍原体积→乙醇或丙酮沉淀→离心→2 次有机溶剂沉淀→丙酮洗涤→乙醚洗涤→真空干燥, 得部分纯化的絮凝剂。

### 1.4 性质测定

苯酚—硫酸法<sup>[5,6]</sup>测定多糖;考马斯亮蓝法<sup>[7]</sup>测定蛋白质;硫酸水解法<sup>[8]</sup>水解多糖;SDS-PAGE 法<sup>[9]</sup>进行电泳;纸层析方法参照文献 [9]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品采集及菌种分离

从北京远、近郊区、县多处大田土壤及长白山、白河、西双版纳和五指山等地原始环境中的土样、北京西坝河、北京大学未名湖边等地的泥样以及光华印染厂、向阳化工厂的生化曝气池中的活性污泥中,共分离、纯化得到了752支菌株。

### 2.2 初筛及复筛

经活性测定,许多菌株都不同程度地存在絮凝活性,水体中存在的絮凝菌比土壤中多,这与日本文献报道不甚一致<sup>[10]</sup>。经初筛、复筛最终选定49#(BD-4)为絮凝剂高效产生菌,上清液絮凝率大于96%,见表1。经鉴定,该菌为一株假单胞菌。

表1 49#(BD-4)发酵产物对高岭土悬浮液絮凝效果

编号	菌体浊度 $OD_{600}$	发酵液絮凝率%	上清液絮凝率%	菌体絮凝率%
49	3.720	93.14	97.04	5.84
	3.204	95.27	96.28	7.51

### 2.3 微生物絮凝剂的最佳产生条件

通过正交试验最终确定最佳发酵培养基配方为:葡萄糖30g,尿素0.3g,酵母膏0.6g,NaCl 0.6g,  $K_2HPO_4$  6g,  $KH_2PO_4$  3g, pH 7。接种量0.2 mL/30mL,种龄则以5h为最好,培养时间以3d较好,3d以后絮凝效果不再提高;pH为7;温度为25℃。

### 2.4 高岭土悬浮液体系的絮凝条件

2.4.1 加样量:在10mL高岭土悬浮液中加入不同体积的发酵液,在0.20mL/10mL时絮凝效果达到最佳值。见图1。

2.4.2 絮凝体系 pH:在pH5至11的范围内高岭土悬浮液絮凝率均可达到80%以上,显示了该菌发酵液中的絮凝物质具有较广泛的pH适应性。

2.4.3 金属离子的影响:不同金属离子的50mmol/L氯化物溶液试验显示,多价阳离子均对絮凝有不同程度的促进作用,其中又以  $Al^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$  最好。但由于  $Al^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$  有二次污染问题而不宜采用,因此,  $Ca^{2+}$  是较理想的选择。

2.4.4 温度:在20℃、30℃、40℃时测定的絮凝率分别为59.26%、78.55%和91.13%。说明温度对絮凝效果具有很大影响。

2.4.5 搅拌:在试管絮凝试验中,若只快摇混合10次,絮凝率仅为56.27%,且絮体细小;若继以10次慢速颠倒混合则絮凝率升至78.55%,且絮体较为粗大,沉降速度也加快了。说明慢摇对小絮体互相缔合而成大絮体是必须的。

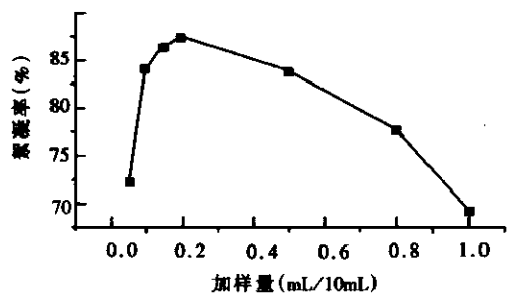


图1 发酵液加样量对絮凝效果的影响

## 2.5 实际废水絮凝效果试验

该菌对性质不同的废水的处理效果有很大差异：对含有悬浮物的废水絮凝脱色效果较好，如对聚酯废水的悬浮物去除率大于90%；对染料废水脱色作用不很理想；对COD较高的燕山化工三厂废水有一定絮凝效果。采用34正交表考察了絮凝操作的最适pH、搅拌速度、搅拌时间及絮凝剂用量。反应总体积100mL（含5mL1%CaCl<sub>2</sub>），以反应前后废水在最大吸收处（405nm）的OD值下降率为指标，经试验确定絮凝最佳条件为：pH9，30℃，搅拌速度100r/min，搅拌时间4min，絮凝剂用量10mL。在如上5项最佳絮凝条件下，使用化工三厂废水将微生物絮凝剂BD-4发酵液与化学絮凝剂聚合硫酸铝进行对比，结果见表2。

表2 微生物絮凝剂与化学絮凝剂对比

	BD-4 发酵液 聚合硫酸铝	
开始出现沉降的时间 (min)	1	13
30min 固液沉降比 (%)	16	89
浊度 (OD <sub>405</sub> ) 下降率 (%)	45	85
色度去除率 (%)	8	10
COD去除率 (%)	18.6	10.6

从表2可以看出，BD-4发酵液处理化工三厂废水时在沉降时间、固液沉降比及COD去除率等方面均优于对照，而对浊度及色度的去除能力略逊于对照。

## 2.6 提取操作条件

**2.6.1 水抽提条件选择：**由于该菌发酵液有粘性，离心前先将发酵液加适量去离子水，起到稀释及溶解有效成分的作用，再行离心分离。经正交试验得出最佳抽提条件：4倍体积水、25℃水温、抽提2h。

**2.6.2 有机溶剂沉淀条件选择：**采用不同体积比的乙醇溶液、丙酮溶液对离心发酵液进行沉淀，并适当调节pH，经比较，丙酮沉淀效果好于乙醇沉淀，且当不调节pH时，1倍丙酮沉淀物溶解回原体积后的絮凝率可达90.16%。

**2.6.3 粗提取前后絮凝效果对比：**经测定，100mL发酵液得到0.1985g干品。将该品溶于100mL水中，其对分散红染料配水、直接耐晒翠蓝染料配水的脱色率分别由75%、43%提高到81%、66%；对高岭土悬浮液的絮凝率由83%提高到89.2%。这说明在粗提去除部分杂质干扰后，该絮凝剂的有效成分基本保留且絮凝效果略有提高。所得粗品可用于进一步精制，也可直接用于废水絮凝处理。

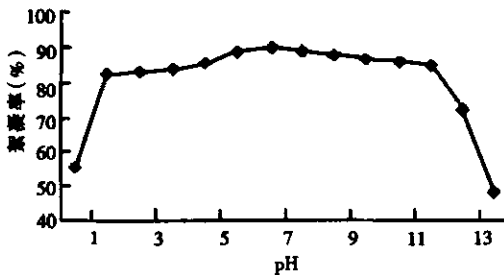


图2 pH稳定性

## 2.7 微生物絮凝剂性质测定及初步组成分析

**2.7.1 pH稳定性：**经测定，在pH2~12的范围内，以相同的0.2mL加样量加入高岭土悬浮液中，该絮凝剂均有较好的絮凝效果。其中，以pH7时为最好，达90.32%。说明该絮凝剂具有较好的pH稳定性，且pH稳定范围远远超过了铝系、铁系等无机絮凝剂。见图2。

**2.7.2 热稳定性：**将絮凝剂提取液于100℃水浴加热30min，絮凝率下降了约50%；继续加热至60min，则絮凝率不再继续下降。由此推断该絮凝剂组成中可能包含一部分热稳定性物质（如多糖）及另一部分热不稳定性物质（如蛋白质）。另一种可能是由于加

热造成线状分子的无规卷曲导致桥连作用的丧失,而电中和作用依然存在。

**2.7.3 糖、蛋白质含量分析:**经测定,该提取物中含56.66%的多糖及2.93%的蛋白质,另有40.41%的未知成分尚待检测。用三氯乙酸沉淀法不能分离多糖中的蛋白,说明多糖与蛋白质是以共价键连接的,因而推测该物质是一种糖蛋白。

**2.7.4 单糖分析:**絮凝剂提取物经酸水解后,经纸层析展层分析,水解液只显出一个斑点,说明该多糖由单一成分的单糖构成,且迁移率与葡萄糖标样的迁移率相近,所以初步推断该多糖为葡萄糖的聚合物。粗提物水溶液显示出3条电泳谱带,说明提取物尚未纯化完全。根据标准蛋白谱图可大致看出这三种分子的分子量均在3~5万之间。

### 参 考 文 献

- [1] Kurane R, Takeda K, Suzuki T. *Agric Biol Chem*, 1986, 50 (9): 2301~2307.
- [2] Toeda K, Kurane R. *Agri Biol Chem*, 1991, 55 (11): 2793~2799.
- [3] Endo T, Nakamura K, Takahashi H. *Agri Biol Chem*, 1976, 40 (11): 2289~2295.
- [4] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. *水和废水监测分析方法(第三版)*. 北京:中国环境科学出版社, 1989, 93.
- [5] Michel D. *Analytical Chemistry*, 1956, 28 (3): 350~356.
- [6] 董 群, *中国药学杂志*, 1996, 31 (9): 550~553.
- [7] Marion M. *Bradford Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248~254.
- [8] 吴东儒. *糖类的生物化学*第一版. 上海:高等教育出版社, 1987, 885~886.
- [9] **李建武**. *生物化学实验原理和方法*第一版. 北京:北京大学出版社, 1994, 28~36、216~223.
- [10] 仓根隆一郎. *日本化学会志*, 1992, (5): 453~465.