

天然碱碱泥分离用微生物絮凝剂产生菌的筛选*

卢文玉** 张 通*** 张冬艳 田 春

(内蒙古工业大学化工学院 呼和浩特 010062)

摘要: 为解决内蒙天然碱泥分离的问题, 从土壤、污水和活性污泥中, 经初筛得到的 57 株产絮凝剂菌株, 均有絮凝活性。并通过复筛从中筛选出絮凝活性较高、性状相对更稳定的 2 株菌株 W23 和 I42。细菌的全培养液对强碱性的天然碱碱泥具有较强絮凝作用, 其平均絮凝率分别达到 79.80% 和 87.96%。

关键词: 天然碱, 微生物絮凝剂, 菌种筛选

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0017-05

THE STRAIN SELECTION OF FLOCCULANT-PRODUCING MICROORGANISMS USED TO SEPARATE NATURAL SODA IN INNER MONGOLIA

LU Wen-Yu ZHANG Tong ZHANG Dong-Yan TIAN Chun

(Institute of Chemical Engineering, Inner Mongolia Polytechnic University, Huhehaote 010062)

Abstract: To solve separating problem of natural soda, fifty-seven strains screened from soil, flout water and activated mud were of flocculating activity. Two strains of bacteria, which were screened from above mentioned strains have higher activity and better steady than the whole culture liquid of bacteria was observed that its flocculating use to natural soda was strong and the mean flocculating rate of two strains were 79.80% and 87.96% respectively.

Key words: Natural soda, Microbial flocculant, Strain selection

内蒙各碱湖的原生矿石均赋存于第四系湖相化学沉积层中, 与湖相黑色淤泥或含碱淤泥互成层带, 在生产过程中淤泥分离是个难题。目前多数天然碱加工厂为解决碱泥的澄清问题都使用聚丙烯酰胺类絮凝剂。此类絮凝剂具有絮凝活性高、成本低等优点。但其不易被降解, 残留物有害, 尤其是丙烯酰胺单体有毒, 且有致癌及诱发老年性痴呆等毒副作用, 因此在很多领域都已禁用或限量使用。天然碱主要用于生产食用小苏打、食用纯碱, 所以此絮凝剂的使用必然要受到限制。同时, 碱泥中有机物含量高时, 自然沉降法或利用聚丙烯酰胺絮凝澄清均无效。

微生物絮凝剂以其安全、无二次污染的特点而日益受到人们的重视。微生物絮凝剂是一种由微生物产生的有絮凝活性的次生代谢产物, 已经筛选了很多具有较强絮凝活性的絮凝剂产生菌, 目前报道的一些菌属如下: (1) 革兰氏阳性菌 (红平红球菌属: *Rhodococcus erythropolis*、*Genera rhodoccus*; 诺卡氏菌属: *Nocardia restrirea*、*Nocardia*

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 29766003)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No. 29766003)

** 现在天津轻工学院攻读博士

*** 通讯联系人

收稿日期: 2000-12-18, 修回日期: 2001-04-09

calcarca、*Nocardia rhodnii*、*Nocardia amarae*；棒状杆菌属：*Genera corynebacterium*)；(2) 革兰氏阴性菌（协腹产碱杆菌：*Alcaligenes latus* KT201、*Alcaligenes cupidus*)；(3) 其它（酱油曲霉：*Aspergillus sojae* AJ7002、*Aspergillus sojae* AJ7360、*Aspergillus sojae* AJ7184；假单胞菌属：*Pseudomonas* sp. *Pseudomonas* sp. GX4-1；土壤杆菌属：*Agrobacterium* sp.；厄氏菌属：*Oerskovia* sp.；芽孢杆菌属：*Bacillus* sp. PY-90、*Bacillus* sp. A-9；不动细菌属：*Acinetobacter* sp.；暗色孢属：*Dematium* sp.；拟青霉属：*Paecilomyces* sp.，*Klebsiella* sp.、Q-1、Q-2、Q-3A)。其中某些微生物絮凝剂已开始应用到畜产废水的处理上^[1-13]。

针对天然碱碱泥的分离问题，经多点采样、多次反复筛选，初筛得到 57 株产絮凝剂菌株，并复筛从中筛选出絮凝活性较高、性状相对更稳定的 2 株菌株 W23 和 L42。细菌的全培养液对强碱性的天然碱碱泥具有较高絮凝作用。

1 材料与方法

1.1 采样地点及数量

呼市郊区旱田土壤土样 2 份；呼市郊区蔬菜地土样 1 份；呼市郊区松林土样 2 份；呼市新城区污水处理厂污水处理系统污泥样 3 份；呼市炼油厂活性污泥 2 份；内蒙伊盟合同察汗淖尔碱湖边土壤土样 5 份；呼市食品公司牛羊肉经营部废水处理系统水样 2 份。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基：蛋白胨 10g，牛肉膏 3g，NaCl 5g，琼脂 15g，水 1 L，pH 3。

高氏一号培养基：可溶性淀粉 20g，KNO₃ 1g，K₂HPO₄ 0.5g，琼脂 15g，MgSO₄·7H₂O 0.5g，NaCl 0.5g，FeSO₄·7H₂O 0.01g，水 1L，pH7.2~7.4。

产絮凝剂培养基：葡萄糖 10g，果糖 10g，蛋白胨 0.5g，酵母膏 0.5g，脲 0.5g，(NH₄)₂SO₄ 0.5g，KH₂PO₄ 5g，MgSO₄ 0.2g，NaCl 0.1g，水 1L，pH 8。

1.3 实验材料

天然碱：内蒙伊克昭盟合同察汗淖尔碱湖天然碱，对其进行化学分析，组成为 Na₂CO₃ 22.03%、NaHCO₃ 4.40%、Na₂SO₄ 1.67%、NaCl 1.84%、H₂O 11.04%、水不溶物 58.83%。

高岭土：化学纯，上海化学试剂厂。

1.4 实验方法

1.4.1 样品的预处理及增殖培养^[14]：称取 2g 土样或泥样于 250mL 摇瓶中，加数粒玻璃珠，每瓶中分别加 100mL 生理盐水，室温下在摇床上 120r/min 摇动 20min，取出静止 10min；污水样直接静止 10min 即可。吸取 5mL 经预处理的样品上清液接种到盛有 100mL 牛肉膏蛋白胨培养基（不加琼脂）和 100mL 高氏一号培养基（不加琼脂）的摇瓶中，于 30℃，180r/min 条件下，使用摇床对菌体进行增殖培养。

1.4.2 分离纯化方法^[14]：将牛肉膏蛋白胨培养基和高氏一号培养基分别灭菌倒平皿，挑取少许增殖浑浊液在平皿中划线，30℃恒温倒置培养 2~3d，经多次划线分离，直到获得纯菌落。

1.4.3 絮凝剂产生菌筛选方法：取纯化的菌株，接种菌体到盛有 30mL 产絮凝剂培养基的 250mL 摇瓶中。在 30℃，180r/min 条件下摇床培养。

1.4.4 高岭土絮凝澄清实验^[5]: 在 25mL 比色管中加入 2g 高岭土、20mL 蒸馏水、2mL 培养液和 2mL CaCl₂ (1%) 混合, 加水至 25mL, 调节 pH 值为 10.5, 摇匀, 静止 5min, 以不加培养液的上相液浊度为参照, 记录能使碱性高岭土悬浮液出现大块絮状沉淀且上清液明显澄清的菌株。

1.4.5 天然碱絮凝澄清实验^[5]: 25mL 比色管中加入 2g 天然碱, 加入 20mL 水, 加热至 50℃使之完全溶解。将比色管置于 30℃水浴, 加入 2mL 培养液, 加水至 25mL, 摇匀, 静止 5min, 于 721 分光光度计 600nm 处测定上相光密度液吸收值 (OD 值), 以不加培养液比色管的上相液 OD 值为空白进行对照。

2 结果与讨论

2.1 初筛结果

将所取土样或水样按 1.4.1 所述方法进行预处理及增殖培养, 并按 1.4.2 所述方法进行分离纯化得到纯菌落。从分离纯化到的若干菌株中随机取 10 个分离纯化菌株, 分别进行摇床培养。每 10h 取定量培养液, 按 1.4.4 所述的方法观察能否对强碱性高岭土悬浮液进行絮凝。在培养 50h 时, 随机取出其中的一些菌株, 其培养液加入到高岭土悬浮液时出现程度不同的絮状沉淀, 且上清液明显澄清, 对能絮凝强碱性高岭土悬浮液的菌株作标记并加以保藏。

工业生产中生产纯碱、小苏打及烧碱的化碱液总碱浓度 (以碳酸钠计) 大约要求在 120~250g/L 之间^[15], 由于实验用伊盟合同察汉淖尔天然碱含泥量太高, 按照此浓度制备的天然碱浑碱液在进行菌种筛选实验时有一定困难, 实验时考虑先使用总碱浓度低的化碱液进行菌株筛选。按 1.4.5 所述方法配制的天然碱液, 静止 5min, 测得的上相液吸光度值在 0.6~0.8 之间, 经测定其总碱浓度 (以碳酸钠计) 为 35.65g/L。

分别以牛肉膏培养基和高氏一号培养基作分离纯化培养基, 按 1.4.5 所述方法用能絮凝强碱性高岭土悬浮液的菌株进行筛选。最终从几百株分离纯化菌株中共筛选到能絮凝天然碱的菌株共 57 株。

牛肉膏培养基为纯化培养基初筛得到 42 株有絮凝活性的菌株, 如表 1 所示。

表 1 牛肉膏培养基为培养基筛选到的菌株

序号	初筛菌株编号	样品采集地	菌株数目
1	L01、L11、L17、L18、L19、L20、L27、L30、L31、L32、L33、L35、W20、W23	蔬菜地	14
2	L40、L41、L42、L44、L46、L47、L49、L50、L51、L53、L57、L60、L63、L65	旱田	14
3	L67、L68、L69、L72、L73、W19、W38、W39、W40	污水口	9
4	W30、W31	山林土	2
5	H1	活性污泥	1
6	—	碱湖边土壤	0
7	S7、S18	食品公司废水	2

从表 1 中可以看出, 在这些产絮凝剂菌株中, 采自旱田土壤及蔬菜地土壤的菌株约占 70%左右, 采自伊盟合同察汉淖尔碱湖边的土样中未筛选到产絮凝剂菌株。

以高氏一号培养基为纯化培养基筛选到 15 株产絮凝剂菌株, 如表 2 所示。

表 2 高氏一号培养基为培养基筛选到的菌株

序号	初筛菌株编号	样品采集地	菌株数目
1	G2、G6、G9	旱田	3
2	G12、G17、G19、G20	菜地	4
3	G30、G33、G36	污水口	3
4	G42、G45	山林土	2
5	G54、G60	活性污泥	2
6	—	伊盟碱湖土壤	0
7	G77	食品公司废水	1

从表 2 中看出,旱田、菜地、污水口、山林土、活性污泥中都能筛选到产絮凝剂菌株,从伊盟合同察汉淖尔碱湖边的土壤中仍没有筛选出产絮凝剂菌株。

利用牛肉膏培养基及高氏一号培养基作为纯化培养基均筛选到产絮凝剂的菌株,分别是细菌和放线菌,但得到的细菌数量更多。产菌地点比较广泛,菌株形态学特征也不尽相同。从伊盟合同察汉淖尔碱湖边的土壤中未能筛选到产絮凝剂菌株,可能是那里的强碱性环境影响菌株的生长或影响絮凝剂的产生。由于强碱本身即具有杀菌性,从而导致大部分微生物都不能在此条件下良好生长繁殖,同时强碱性环境会引起细胞膜电荷的变化,从而影响微生物对营养物质的吸收,影响代谢过程中酶的活性,影响代谢物质的产生,出乎意料的是活性污泥中筛选出的菌株种类非常多,但能对碱泥起到絮凝作用的菌株并不多。

2.2 复筛结果

经过初筛得到的 57 株产絮凝剂菌株均有絮凝活性,但絮凝活性大小有差别,絮凝性状的稳定性也不同。因此,通过多次重复实验,考察它们的絮凝活性的稳定性和高效性,从 57 株初筛菌株中筛选出絮凝活性较高、絮凝性状相对稳定的菌株。

按 1.4.5 所述方法进行复筛试验,经试验得到光密吸收值 (OD 值),通过 OD 值降低来定性表示絮凝程度,用絮凝率^[5]定量表示絮凝活性,絮凝率越大,絮凝活性越高。

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

式中: A——空白上相液 600nm 处的 OD 值, B——絮凝体系上相液 600nm 处的 OD 值。

经过反复实验,最终筛选到 2 株絮凝活性较高、絮凝效果较稳定的菌株,结果见表 3。

表 3 复筛结果

序号	复筛菌株编号	样品采集地	纯化培养基	絮凝率		
				平均值	平均偏差	标准偏差
1	L42	旱田	牛肉膏培养基	87.96	0.52	0.65
2	W23	菜地	牛肉膏培养基	79.80	0.34	0.45

实验过程中发现,从蔬菜地筛选到的菌种 W23 最高絮凝活性虽然没有从旱田中筛选的 L42 高,但其稳定性要明显强于后者,所以实验中采用 W23 做絮凝试验菌种。

通过对菌株的个体形态特征、菌落形态特征、运动性进行观察;同时对其接触酶、氧化酶等生理生化指标进行了测试,菌种的鉴定结果为 L42 是粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)^[16]、W23 是产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。

参 考 文 献

- [1] Kurane R, Takeda K, Suzuki T. *Agric. Biol. chem.*, 1986, **50** (9): 2301 ~ 2307.
- [2] Kurane R, Suzuki T, Takahara Y. *Agric. Biol. Chem.*, 1979, **43** (5): 907 ~ 917.
- [3] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno K, *et al.* *Agric. Biol. Chem.*, 1994, **58** (2): 428 ~ 429.
- [4] Toeda K, Kurane R. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55** (11): 2793 ~ 2799.
- [5] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. *Agric. Biol. Chem.*, 1976, **40** (2): 377 ~ 383.
- [6] Takagi H, Kadowaki K. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, **49** (11): 3151 ~ 3157.
- [7] Sakka K, Takahashi H. *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **45** (12): 2869 ~ 2876.
- [8] Levy H, Bar Y, Magdassis. *Colloids and Surfaces*, 1990, **48**: 337 ~ 349.
- [9] Yokoi H, Natsuda O. *J. Ferment and Bioeng.*, 1995, **79** (4): 378 ~ 380.
- [10] 王 镇, 王孔星. *微生物学报*, 1995, **35** (2): 121 ~ 129.
- [11] 陆茂林, 施大林, 王 蕾, 等. *工业微生物*, 1997, **27** (2): 121 ~ 129.
- [12] 李智良, 张本兰, 裴 健. *应用与环境生物学报*, 1997, **3** (1): 67 ~ 70.
- [13] Dermlim W, Prasertan P, Doelle H. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 698 ~ 703.
- [14] 沈 萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验 (第三版)*. 北京: 高等教育出版社, 1999: 69 ~ 89.
- [15] 内蒙古工学院天然碱研究室. *内蒙古化工*, 1980, (1): 26 ~ 36.
- [16] 张 通, 卢文玉, 张冬艳, 等. *生物技术*, 2001, **11** (1): 23 ~ 25.