

一株生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝活性研究*

王国惠

(中山大学环境科学与工程学院 广州 510275)

摘要: 从活性污泥中筛选到一株产絮凝剂的菌株 WJ-100。该菌株产絮凝剂的适宜 pH 为 6.5, 适宜温度为 25℃ ~ 40℃, 摇床速度为 80 ~ 240 r/min; Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Fe³⁺ 均有较好的促絮凝作用, Ca²⁺ 尤为显著; WJ-100 以多种糖类为良好碳源, 絮凝率达 99.2%、99.8% 甚至 100%; 该菌株在高岭土悬液 pH 2.0 ~ 10.0 范围均有较好的絮凝效果。WJ-100 在较大的 pH、温度、碳源、摇床速度、搅拌速度等范围内均具有很高的絮凝活性, 显示出重要的研究和应用价值。

关键词: 絮凝剂产生菌, 微生物絮凝剂, 絮凝活性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0107-05

Screen of a Bio-flocculants-producing Strain and Study on Flocculating Activity

WANG Guo-Hui

(School of Environmental Sciences and Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract: A strain, WJ-100, with high flocculating activity was screened from activated sludge. Its optimum pH was 6.5 and optimum temperature was 25℃ ~ 40℃. Its shaking speed was in the range of 80 ~ 240 r/min. Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Fe³⁺ could accelerate flocculation. Ca²⁺ did the most obviously. WJ-100 can use various saccharides as good sources of carbon, the flocculating rate reached 99.2%, 99.8%, even 100%. The strain could flocculate very well when pH of Kaolin clay suspension was 2.0 ~ 10.0. WJ-100 had high flocculation efficiency in the conditions of relatively large pH value, temperature, sources of carbon, shaking speed, mixing speed etc. and showed fine research and application importance.

Key words: Flocculant-producing microorganisms, Microbial flocculants, Flocculating activity

水处理工程中常用的絮凝剂有无机絮凝剂、有机高分子絮凝剂和天然高分子絮凝剂^[1]。无机及有机高分子絮凝剂都具有一定的毒性, 且会造成二次污染等^[2], 对人类健康与生态系统产生严重影响。因此, 开发安全、高效、廉价、易于降解^[3]的新型絮凝剂具有特别重要的意义。

微生物絮凝剂是一类由微生物产生并分泌到胞外的代谢产物^[4,5], 可使液体中不易沉降的固体悬浮颗粒凝聚、沉淀^[6]。由于微生物絮凝剂可以克服化学絮凝剂成本高、二次污染且对人体有害等缺陷, 所以, 微生物絮凝剂已成为该领域的研究热点^[7]。

本文从活性污泥中筛选到一株高活性生物絮凝剂产生菌, 并对其絮凝活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源与培养基

菌种来源于华南理工大学西湖湖水、广州西朗污水处理厂沉淀池活性污泥。

* 河南省科技厅自然科学基金项目 (No. 0211050900)

中山大学实验室开放基金项目 (No. KF2005013)

中山大学 2005 年学生科研立项项目

收稿日期: 2005-11-09, 修回日期: 2006-01-20

分离培养基: (1) 牛肉膏蛋白胨培养基; (2) 孟加拉红琼脂培养基。

筛选培养基 (发酵培养基): 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 2g, K_2HPO_4 5g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g, NaCl 0.1g, 尿素 0.5g, 酵母膏 0.5g, 定容至 1L。

1.2 筛选方法

1.2.1 初筛方法: 将 25mL 筛选培养基装入 100mL 三角瓶中, 接种自分离平板上纯化出的菌株。140r/min, 30℃ 摇床培养 72h, 将所得培养液进行絮凝活性的初步测定。测定方法是: 在 100mL 量筒中加入 93mL 4g/L 高岭土悬浊液, 2mL 培养液, 将量筒颠倒 3~5 次, 目测, 使高岭土悬浊液絮凝成较大絮状体的为有絮凝活性的菌株。

1.2.2 复筛方法: 将初筛得到的有絮凝活性的菌株接种到装有 25mL 培养基的 100mL 三角瓶中, 140r/min, 30℃ 培养 72h, 所得培养液进行如下絮凝活性的测定: 在 100 mL 量筒中加入 93mL 4g/L 高岭土悬浊液, 5mL 1% (wt %) CaCl_2 溶液和 2mL 培养液, 用搅拌器快搅 3min, 慢搅 3min, 静置 10min 后, 吸取上清液于 722 型分光光度计 550nm 处测定其吸光度 OD_{550} , 同时以去离子水代替发酵液作对照, 以絮凝率表示絮凝活性, 絮凝率的计算公式为: 絮凝率 = $[(A - B) / A] \times 100\%$ 。式中 A 表示对照上清液 550nm 处的吸光度; B 表示培养液絮凝后上清液 550nm 处的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 菌种分离筛选结果

以高岭土悬液为测试材料, 测定从样品中分离纯化出的 186 株培养液絮凝活性。初筛到有絮凝能力的菌株 12 株。经过复筛, 获得了 1 株絮凝活性高的菌株 WJ-100。

2.2 培养条件实验

2.2.1 培养基初始 pH 对菌株絮凝活性的影响: 将筛选培养基的 pH 值调为 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 以 140r/min, 30℃ 培养 72h 后, 测定菌种的絮凝活性实验结果见图 1。由图 1 可以看出, WJ-100 的 pH 适应范围较宽且絮凝能力较强。在所选定的整个 pH 范围内, 絮凝率均在 63.1% 以上。该菌适宜的 pH 区段为 4.0 ~ 7.5, 其絮凝率为 86.9% ~ 97.7%; WJ-100 的最适 pH 为 6.5, 其絮凝率达 97.7%。

2.2.2 培养温度对菌株絮凝活性的影响: 将培养温度分别设定为 15℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 50℃, 以 140 r/min, 培养 72h 后, 测定菌株的絮凝活性, 实验结果见图 2。从图 2 中可以看到, WJ-100 温度适应范围很宽, 自 25℃ 到 50℃, 其絮凝活性都很高, 分别为 95.7%、96.0%、96.7%、95.7%、89.3%。在较宽的适宜温度范围内, WJ-100 的最适温度为 25℃ ~ 40℃。

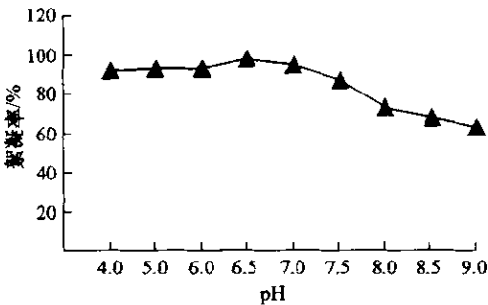


图1 pH 对 WJ-100 絮凝活性的影响

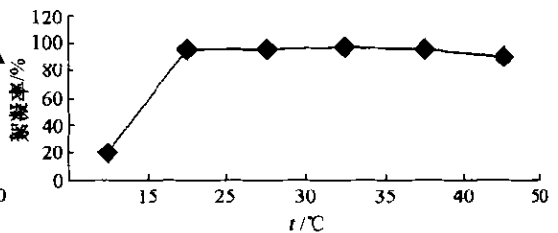


图2 温度对 WJ-100 絮凝活性的影响

2.2.3 通气情况对菌株絮凝活性的影响:图3给出了通气情况对菌株絮凝活性的影响。由图3可以看出,发酵三角瓶瓶塞不同,WJ-100的絮凝活性也不同。装发酵液三角瓶覆盖以纱布(10~12层)时,其絮凝率最高,为95.7%;换以棉塞时絮凝率有所降低,为94.3%;再换以硅胶塞时,絮凝率更低,为88.3%。其絮凝活性的规律为:纱布>棉塞>硅胶塞。由此说明,WJ-100属严格好氧菌。供氧有利于絮凝剂的产生。

2.2.4 摇床速度对菌株絮凝活性的影响:图4显示了在30℃、72h培养条件下,不同摇床速度对菌株絮凝活性的影响。可以看出,摇床速度在80~240r/min范围内,WJ-100的絮凝效果都很理想,特别是在80r/min、100r/min摇速较低时,絮凝率已达到95%,进一步表明WJ-100具有很强的产絮凝剂的能力。图4还显示出,WJ-100的最佳摇速为160r/min,其絮凝率达98.0%

一般认为,摇床速度是通气量及微生物细胞与养分有效接触的重要影响因素。摇速越大,通气量越大,细胞与养分越能有效地接触,对好氧菌(见2.2.3)来说,其结果也越理想。但在本实验中发现,当摇速超过160r/min时,絮凝率均有所下降。产生此现象的原因需要进一步研究。

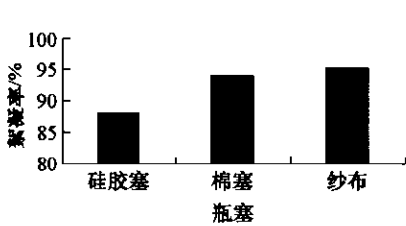


图3 通气情况对WJ-100絮凝活性的影响

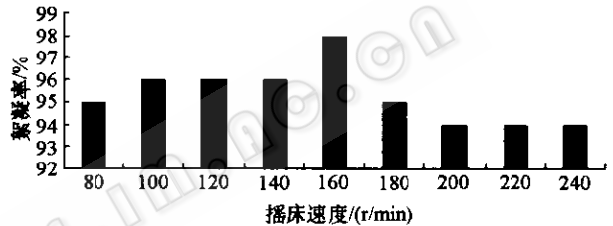


图4 摇速对WJ-100絮凝活性的影响

2.2.5 不同碳源对菌株絮凝活性的影响:碳源对絮凝剂的生成有较大的影响,不同絮凝剂产生菌产絮凝剂最适碳源不同。分别以蔗糖、麦芽汁、葡萄糖、淀粉、乳糖、甘蔗汁、红糖、白糖代替筛选培养基中的葡萄糖作碳源,其余成分不变,以140 r/min,30℃培养72h后,测定菌株的絮凝活性,结果见表1。由表1可知,WJ-100对八种碳源的利用情况都比较好,其絮凝率均较高,分别达99.8%,100%,97.3%,96.3%,91.3%、99.2%,98.4%,96.3%。这些碳源物质大部分价格低廉,对降低絮凝剂的生产成本具有重要实际意义。

表1 碳源对W-100絮凝活性的影响

碳源	蔗糖	麦芽糖	葡萄糖	淀粉	乳糖	甘蔗汁	红糖	白糖
絮凝率/%	99.8	100.0	97.3	96.3	91.3	99.2	98.4	96.5

2.3 絮凝条件实验

2.3.1 不同种类阳离子对絮凝效果的影响:在高岭土悬液中加入1mL 0.4%的NaCl、KCl、CaCl₂、FeSO₄、Fe₂(SO₄)₃,考察金属阳离子对菌株絮凝效果的影响,结果见图5。从图5中可以看出,除FeSO₄外,一价阳离子Na⁺、K⁺、二价Ca²⁺、三价Fe³⁺均有明显的促絮凝作用,其中以Ca²⁺最为显著。

需要说明的是,加入FeSO₄本能观察到明显的促絮凝现象,但其絮凝率却显著偏低,可能与FeSO₄溶液呈深黄色使OD值偏高所致。

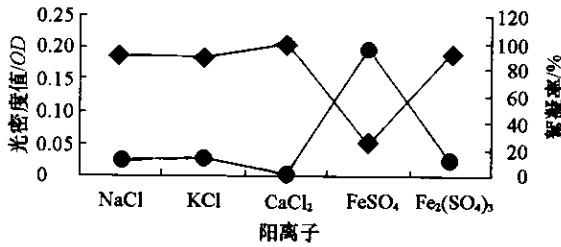


图5 阳离子对絮凝效果的影响

● 光密度值, ◆ 絮凝率

2.3.2 搅拌速度与搅拌方式对絮凝效果的影响: 改变搅拌器的搅拌速度, 考察其对絮凝效果的影响。实验中, 按“先快后慢”的方式设置3组参数。第1组先按140r/min快搅, 再按60r/min慢搅, 以“140~60”表示; 第2组先按230r/min快搅, 再按100r/min慢搅, 以“230~100”表示; 第3组先按300r/min快搅, 再按140r/min慢搅, 以“300~140”表示。实验结果见表2。由表2可以看出, WJ-100的适宜搅拌速度与方式为“230~100”和“300~140”, 其絮凝率分别达96.2%和97.3%。该实验说明, 搅拌有利于絮凝体的形成与沉降。

表2 搅拌对絮凝效果的影响

搅拌速度 (r/min):	WJ-100	
	光密度值 (OD)	絮凝率 (%)
先快后慢		
140~60	0.027	89.6
230~100	0.010	96.2
300~140	0.007	97.3
对照	0.260	

在实验中还观察到, 即使在高岭土悬液中加入有絮凝活性的菌液, 若只快搅, 不经过慢搅, 形成的絮体细小, 且不易沉降; 如果快搅后接着慢搅, 会形成较大的颗粒絮体(在慢搅过程中即可观察到这一现象), 沉降速度也会加快。这说明絮凝体的形成需要一个过程, 即先形成小絮体, 再由小絮体互相缔合成大絮体。该过程是通过控制搅拌速度并改变搅拌方式实现的。

2.3.3 水样(高岭土悬液) pH对絮凝效果的影响: 水样(高岭土悬液) pH对絮凝效果的影响见图6。自图6可以看到, WJ-100在较大酸碱范围内(pH2.0~10.0)保持着较高的絮凝活力(絮凝率为84.1%~97.8%), 特别是在中性及偏酸环境具有更高的絮凝能力, 由此反映出该菌株所产生的絮凝剂具有良好的适应性与稳定性。

2.4 絮凝活性的分布

发酵液以12,000r/min离心1min, 取上清液测定其絮凝活性。菌体用灭菌水洗涤后悬浮在与上清液等体积的灭菌水中, 测定其絮凝活性。结果如图7所示。从图7可知, 离心后的上清液的絮凝活性与原发酵液的絮凝活性相近, 细胞悬液的絮凝活性明显

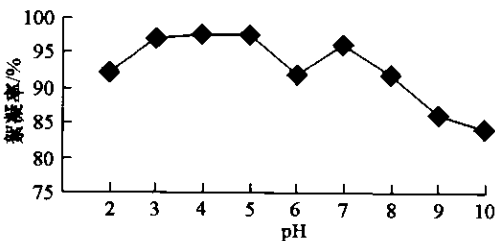


图6 水样 pH 对絮凝效果的影响

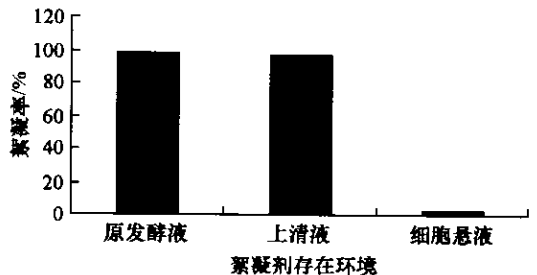


图7 WJ-100絮凝活性的分布

偏低。这说明絮凝剂主要存在于上清液中,同时表明,微生物絮凝剂是微生物在发酵过程中产生并释放到细胞外的代谢产物。

3 结论

(1) 通过筛选获得了一株对高岭土悬浊液具有较高絮凝活性的菌株 WJ-100。

(2) WJ-100 的适宜初始 pH 为 4.0 ~ 7.5; 适宜温度范围为 25℃ ~ 50℃; 摇床速度为 80 ~ 240r/min; 蔗糖、麦芽汁、葡萄糖、淀粉、乳糖、甘蔗汁、红糖、白糖均可作为该菌株良好的碳源。

(3) Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 均有较好的促絮凝作用,其中 Ca^{2+} 尤为显著。

(4) WJ-100 的适宜絮凝搅拌速度与方式为“230 ~ 100”和“300 ~ 140”。

(5) WJ-100 产生的絮凝剂在较大 pH 范围内,絮凝效果较好,反映出该该絮凝剂良好的适应性与稳定性。

(6) WJ-100 在较大的 pH、温度、碳源的利用、摇速、搅拌速度等范围内均表现出较高且稳定的絮凝活性,标志着该菌具有重要的研究和应用价值。

参考文献

- [1] 张景来,王剑波,常冠钦,等.环境生物技术及应用.北京:化学工业出版社,环境科学与工程出版社,2002.
- [2] 陈坚,堵国成.环境友好材料的生产与应用.北京:化学工业出版社,2002.314~343.
- [3] Toeda K, Kurane R. Agric Biol Chem, 1991, 55 (11): 2793~2799.
- [4] Jin S N, Gi S K, Sang O L, et al. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60 (2): 325~327.
- [5] 黄民生,孙萍,朱莉.环境科学,2000,21(1):23~26.
- [6] 刘紫鹏,刘志培,杨惠芳.微生物学通报,2001,28(1):5~8.
- [7] 汪德生,张洪林,蒋林时,等.工业水处理,2004,24(9):9~12.