

文章编号: 1672 - 058X(2009)05 - 0451 - 06

微生物絮凝剂产生菌 HF-8 的筛选与培养条件优化

敖黎鑫, 邵承斌*, 卢 辉, 陈文锋

(重庆工商大学 环境与生物工程学院, 重庆 400067)

摘 要:从污水处理厂的活性污泥中筛选出微生物絮凝剂 HF-8,并对菌株的培养基组成和培养条件进行了优化;培养基最佳配方(g/500 mL):蔗糖 10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g、 KH_2PO_4 2 g、 K_2HPO_4 2.5 g、 NaCl 0.05 g、 $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、水 500 mL;最佳培养条件:温度 30 ℃、初始 pH 值 6.0、摇床转速 120 r/min,优化之后的絮凝剂对高龄土悬浊液的絮凝率提高到了 90.3%。

关键词:微生物絮凝剂;筛选;培养

中图分类号:Q939

文献标志码:A

微生物絮凝剂是一类由微生物产生的有絮凝活性的代谢产物^[1],有糖蛋白、多糖、蛋白质、纤维素和 DNA 等。它是利用生物技术,通过生物发酵、抽提、精制而得到的一种具有生物分解性和安全性的新型、高效、无毒、廉价的水处理剂,对生态环境不会产生不利影响,因此具有广阔的发展前景^[2,3]。近年来,国内外对生物絮凝剂进行了大量研究,筛选了几十种具有絮凝能力的微生物^[4-6],获得高活性微生物絮凝剂产生菌,研究其培养条件,降低生产成本是后续研究和开发应用的基础^[7-9]。

1 材料和方法

1.1 材料试剂

活性污泥:取自唐家桥污水处理厂;

仪器:721 可见分光光度计、磁力搅拌机、恒温震荡培养箱、高压灭菌锅;

试剂:牛肉膏、蛋白胨、 NaCl 、葡萄糖、 K_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、琼脂、 KH_2PO_4 、 $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、尿素、酵母膏。

1.2 方 法

1.2.1 絮凝剂产生菌的分离和筛选

取污水处理厂的活性污泥,在牛肉膏蛋白胨固体培养基上采用平板划线法分离并纯化以获得纯菌种。控制条件为:温度 30 ℃,摇床转速为 120 r/min, pH 值 7 左右,发酵时间 72 h。取发酵液测其絮凝活性,将具有良好絮凝活性的菌株作为复筛菌种。

收稿日期:2009 - 04 - 28;修回日期:2009 - 05 - 28。

作者简介:敖黎鑫(1984 -),男,重庆市人,硕士研究生,从事水污染生物治理。

*通讯作者:邵承斌(1956 -),男,重庆市人,研究员,从事水污染生物治理。shaocb1956@126.com。

1.2.2 絮凝活性测定^[10,11]:

50 mL 烧杯中加入 0.2 g 高岭土, 1 mL 絮凝剂样品(发酵液), 1 mL 质量分数为 1% 的 CaCl_2 溶液, 最后加蒸馏水置 50 mL 总体积, 调节溶液的 pH 值为 7.0, 置于磁力搅拌机上搅拌, 控制条件为: 200 r/min 下快搅 1 min, 然后 80 r/min 下慢搅 4 min。静沉 2 min, 吸取上清液于 721 型分光光度计 550 nm 处测定其吸光度, 同时以蒸馏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:

$$E = (A_0 - A) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: E ——絮凝率; A_0 ——对照上清液 550 nm 处的吸光度; A ——絮凝后上清液 550 nm 处的吸光度。

1.2.3 培养基成分的优化

根据碳源、氮源和无机盐做的单因子实验, 选择其中最好的碳源、氮源和无机盐做正交实验。

1.2.4 发酵条件的优化研究

用选出的最佳发酵培养基为基础, 选择培养基初始 pH 值、培养温度 T 和摇床转速 w 作单因子实验, 并选这 3 因素最好的条件进行正交实验^[12]。发酵培养 72 h 测其絮凝率。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

经分离、纯化, 从活性污泥中共分离得到 200 个菌株, 经初筛试验, 初步得到有絮凝活性的菌株 43 株, 再经复筛和传代培养, 通过测定絮凝率, 得到 6 株具有稳定高絮凝活性微生物, 见表 1:

表 1 微生物絮凝剂菌株的筛选结果

菌株	絮凝率 / %	菌株	絮凝率 / %	菌株	絮凝率 / %
FH - 8	89	XH - 38	85.2	XH - 59	70
FH - 6	86.3	XH - 8	88.6	FH - 55	85.1

其中选絮凝性能最好的菌株 FH - 8 做下面的优化实验。

2.2 培养基成分选择、单因子实验

从活性污泥中筛选出的具有较高絮凝活性的微生物絮凝剂 HF-8, 对它的 C 源、N 源、无机盐分别做了单因子实验。将发酵培养基(牛肉膏、蛋白胨、 NaCl 、葡萄糖、 K_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、尿素)中的葡萄糖用等量的其他碳源代替, 做 C 源的单因子实验。其它的以此类推。发酵培养 72 h, 测得的具体数据见表 2。

表 2 菌株 HF-1 在不同碳源、氮源和无机盐下的絮凝活性

碳源 (20 g/L)	絮凝率 / %	氮源 (2 g/L)	絮凝率 / %	无机盐 / (g/L)	絮凝率 / %
蔗糖	87.2	尿 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	88	K_2HPO_4 (5.0)	80
葡萄糖	86.7	蛋白胨	87.3	KH_2PO_4 (2.0)	87.7
乳糖	67.8	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	89.7	NaCl (0.1)	81.7
可溶性淀粉	67.5	尿	87.7	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2)	86.5
乙醇	64.3	酵母膏	87		

用以上 5 种碳源对实验菌种进行培养,菌体生长良好,其培养液均浑浊且有不同程度的粘性.当以蔗糖为碳源时,培养液粘性最大,用此培养液的絮凝剂样品对高岭土悬浊液进行絮凝时形成的絮体比其它样品的都大,而且在慢搅过程中絮体就已经沉降下来,原本浑浊的液体变的很澄清了.与此相比,其他几种碳源也有较为明显的絮凝作用,但形成的絮体较小,沉淀速度较慢.由表 2 可以看出,虽然这 5 种物质均可作为该菌生长的营养碳源,就产絮凝剂而言,蔗糖效果最好,葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉次之,乙醇最差.因此,蔗糖是该菌产絮凝剂的最佳碳源.同理,当以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源时,其菌株的絮凝效果最好达到 89.7%,其余的稍差一点.在无机盐中 KH_2PO_4 对絮凝剂的影响较大,所以最终选出蔗糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 作为最佳的碳源、氮源和无机盐。

2.3 培养基成分的正交优化实验

将筛选出的最佳碳源、氮源和无机盐进行正交优化实验.在 K_2HPO_4 、 NaCl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 不变的情况下,蔗糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 分别选取 4 个水平.按照 $L_{16}(4^3)$ 正交表配置培养基.在 1.2.1 中所述培养条件下接菌种 HF-8 培养,发酵培养 72 h 后测其絮凝率.结果见表 3:

表 3 培养基主要成分正交实验结果

因素	A:蔗糖 / (g/L)	B: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / (g/L)	C: KH_2PO_4 / (g/L)	絮凝率 / %
1	5	0.2	1	83.4
2	5	0.5	1.5	64.1
3	5	1	2	68.7
4	5	1.5	2.5	82
5	10	0.2	1.5	80.6
6	10	0.5	1	72.9
7	10	1	2.5	65.1
8	10	1.5	2	88.9
9	15	0.2	2	80.8
10	15	0.5	2.5	68.7
11	15	1	1	57
12	15	1.5	1.5	56.9
13	20	0.2	2.5	66.9
14	20	0.5	2	69
15	20	1	1.5	76.9
16	20	1.5	1	58.7
k1	74.550	77.925	68.000	
k2	76.875	68.675	69.625	
k3	65.850	66.925	76.850	
k4	67.875	71.625	70.675	
极差	11.025	11.000	8.850	

培养基中的碳源对菌 HF-8 所产絮凝剂的影响较大.对微生物絮凝剂絮凝活性的影响按大到小的顺序为:碳源 > 氮源 > 无机盐.最佳培养基培养条件(单位 g/500 mL)为 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_3$: 蔗糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为 0.2 g, KH_2PO_4 为 2 g.从表 3 可以看出,过高或过低的糖浓度都不利于该菌株生长.这是由于糖浓度过低不能提供足够的能量和物质来源;而糖浓度过高一方面会引起发酵液中渗透压过高,使细胞失水,生长受到抑制,另一方面糖浓度过高使代谢产生的葡糖酸增加,发酵液 pH 值降低,不利于菌株生长.而氮源随着浓度增加,絮凝率有所降低,这是因为浓度过高导致 C/N 比值降低,不利于产物积累。

2.4 培养条件的单因子实验

2.4.1 培养基初始 pH 对絮凝活性的影响

培养基的 pH 值对絮凝剂的产生有重要的影响,培养基初始 pH 值过高过低都不利于产絮凝菌产生生物絮凝剂。不同的菌种也都有一个生长的 pH 范围,且微生物不同,产生絮凝剂所需发酵培养基的 pH 值也不同。

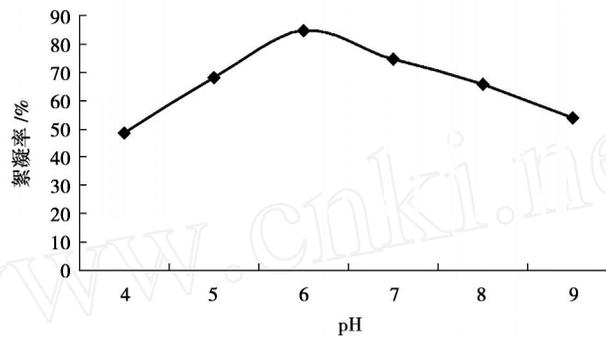


图 1 pH 值对絮凝活性的影响

由图 1 可以看出,该菌生长的适宜 pH 范围为 4.0~9.0,并且初始 pH 为 6.0 时菌体生长旺盛且絮凝剂样品的絮凝活性最高,对高岭土悬浊液的絮凝率为 84.4%。pH 值太高或太低均不利于该菌生长。这是由于一方面 pH 值过低或过高都会引起微生物表面电荷的改变,从而不利于细胞对营养物质的吸收;另一方面 pH 值的改变会让有机化合物离子化,不利于有机化合物渗入细胞。

2.4.2 培养温度对絮凝活性的影响

培养温度对微生物积累絮凝剂有明显影响。不同絮凝剂产生菌有各自最适的培养温度。

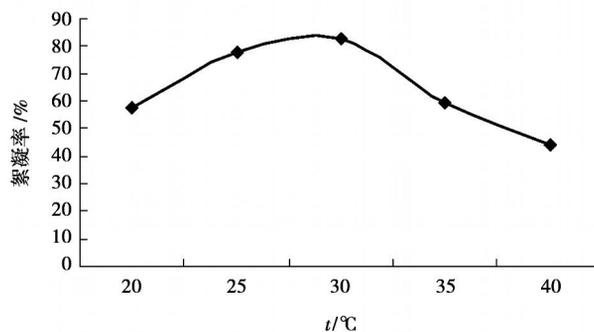


图 2 培养温度对絮凝活性的影响

从图 2 中可以看出,培养温度不同,发酵液的絮凝率也不同。在 30 时絮凝率最高;温度再升高,絮凝率开始下降,原因是微生物絮凝剂是某些微生物在一定生长条件下伴生的一种次生代谢产物,当温度过高会影响酶的活性,使细胞代谢缓慢,影响物质的合成,进而影响所产 MBF 的絮凝活性。

2.4.3 摇床转数对菌株絮凝活性的影响

耗氧量对絮凝剂絮凝活性的影响通过改变摇床转速来实现。在最佳培养 pH 值 (pH 为 6.0)、培养温度 (30)条件下,设转速分别为 90, 120, 150 r/min 进行培养,并测定相应培养液的絮凝活性。

从图 4 中看出,转数的大小对絮凝率的大小有影响,变化在 10% 以内,当转数在 120 r/min 时絮凝率略高一些。因为通气一方面有利于菌的生长,防止菌体絮凝成较大颗粒,另一方面有利于菌合成絮凝剂,但过高的溶解氧会抑制絮凝物质的生成^[1]。

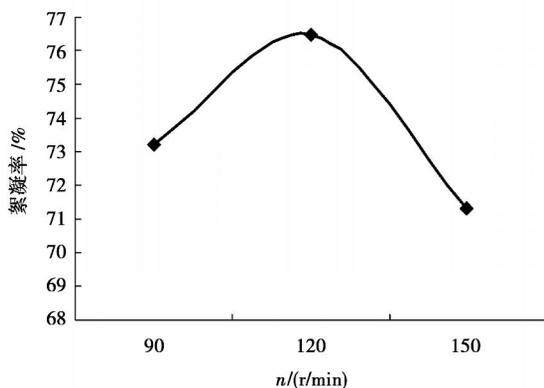


图 3 摇床转数对絮凝活性的影响

2.5 培养条件的正交优化实验

在单因素实验的基础上进一步采用正交实验优化培养条件,实验采用 $L_9(3^3)$ 方案法设计正交实验^[13],相对应的 3 个因素取为摇床转速,培养温度和培养基初始 pH,每个因素考察 3 个水平,通过 9 组正交培养实验优化菌株培养条件,正交实验因素水平见表 4。

表 4 正交设计实验结果

实验次数	A: pH	B: t/	C: n/(r/min)	絮凝率 /%
1	5	25	90	58.3
2	5	30	120	78.4
3	5	35	150	56.3
4	6	25	120	77.2
5	6	30	150	82.4
6	6	35	90	73.8
7	7	25	150	71
8	7	30	90	84.8
9	7	35	120	70.1
k_1	64.333	68.833	72.300	
k_2	77.800	81.867	75.233	
k_3	75.300	66.733	69.900	
极差	13.467	15.134	5.333	

由表 4 可知,对絮凝率的影响按大到小次序排列为:培养温度 > 初始 pH 值 > 摇床转速,即培养温度为主要影响因素,其次是初始 pH 值,摇床转速的影响最小,且最优培养条件为 $B_2A_2C_2$,即培养温度为 30,初始 pH 值为 6,摇床转速为 120 r/min。

利用以上的优化结果,再对絮凝剂菌株 HF-8 进行发酵培养,然后对高龄土悬浊液进行絮凝实验,其絮凝率提高到 90.3%。

3 结 论

(1) 通过单因子实验得到最佳碳源是蔗糖,最佳氮源是 $(NH_4)_2SO_4$,最佳无机盐是 KH_2PO_4 ;

(2) 对微生物絮凝剂絮凝活性的影响碳源 > 氮源 > 无机盐,最佳培养基成分(单位 g/500 mL)为:蔗糖 10 g, $(NH_4)_2SO_4$ 为 0.2 g, KH_2PO_4 为 2 g, NaCl 为 0.05 g, KH_2PO_4 为 2.5 g, $Mg(SO_4) \cdot 7H_2O$ 为 0.1 g, H_2O 为 500 mL;

- (3) 菌株 HF-8 发酵培养的最适 pH6, 最适温度为 30 , 最适摇床转速为 120 r/min;
 (4) 优化之后的絮凝率提高到了 90.3%。

因此, 经筛选和优化培养条件后得到的微生物絮凝剂产生菌 HF-8 具有比优化之前更高的絮凝能力, 微生物絮凝菌的筛选和培养条件的优化为后续工作的展开奠定了基础。

参考文献:

- [1] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [2] SALEH IZADEH H, SHOJAOSADATI S A. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance [J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19 (5): 371 - 385
- [3] 马放, 李淑更, 金文标, 等. 微生物絮凝剂的研究现状及发展趋势 [J]. *工业用水与废水*, 2002, 33 (1): 7 - 9
- [4] 王镇, 王孔星, 谢裕敏. 几株絮凝剂产生菌的特性研究 [J]. *微生物学报*, 1995, 35 (2): 121 - 127
- [5] TOEDA K, KURANE R. Microbial Flocculant from *Alcaligenes Cup idus* KT201 [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55 (11): 2793 - 2799
- [6] 朱晓江, 尹双凤, 桑军强. 微生物絮凝剂的研究和应用 [J]. *中国给水排水*, 2001, 17 (6): 19 - 22
- [7] DENG SB, BAIR B, HU XM, et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60 (5): 588 - 593
- [8] 周礼, 张永奎, 陈晓. 一种高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养基优化 [J]. *环境科学学报*, 2006, 26 (4): 584 - 588
- [9] 杨阿明, 张志强, 王学江. 高效微生物絮凝剂用于污泥脱水及其动力学研究 [J]. *中国给水排水*, 2007, 23 (90): 24 - 28
- [10] 程金平, 郑敏, 张兰英. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及产絮凝剂的周期研究 [J]. *环境科学与技术*, 2001, 2 (3): 12 - 15
- [11] NOKAMURA J, MIYASHIRO S, HIROSE Y. Some Properties of Microbial Cell Flocculants [J]. *Agric Biol Chem*, 1976, 46 (2): 377 - 383
- [12] 陶然, 杨朝晖, 曾光明, 等. 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及培养条件的优化研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25 (8): 76 - 81
- [13] 石璐, 唐受印, 刘忠义. 一株青霉素产微生物絮凝剂的培养条件研究 [J]. *湘潭大学社会科学学报*, 2003, 27 (5): 223 - 225

Screening and the cultivating conditions optimized for microbial flocculant-producing bacteria (HF-8)

AO Lixin, SHAO Cheng-bin, LU Hui, CHEN Wen-feng

(School of Environmental and Biological Engineering, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China)

Abstract: Microbial flocculant-producing bacteria (HF-8) were screened from active sludge of wastewater treatment plant. To this strain, its culture medium composition and the culture conditions were optimized. The culture medium best formula is (g/500ml): cane: 10g, ammonium sulfate: 0.2g, monopotassium phosphate: 2g, dipotassium hydrogen phosphate: 2.5g, sodium chloride: 0.05g, heptahydrate magnesium sulfate: 0.1g, water: 500ml. The best culture condition is: the culture temperature: 30. C, the initial pH: 6, rotate speed of shack bed: 120r/min.

Key words: microbial flocculant; filtration; the cultivation conditions optimized

责任编辑: 田 静