

# 一株产絮凝剂不动杆菌的筛选及其絮凝特性

王兆慧<sup>1</sup> 叶辉<sup>1</sup> 常燕<sup>1</sup> 徐磊<sup>1</sup> 曹军<sup>1</sup> 尹立红<sup>2\*</sup>

(1. 南通大学生命科学学院 南通 226007)

(2. 东南大学公共卫生学院 南京 210096)

**摘要:** 从活性污泥中筛选出一株高效的微生物絮凝剂产生菌, 鉴定为鲍曼不动杆菌。蚕豆根尖细胞微核试验未显示该菌株所产絮凝剂具有遗传毒性。该菌产絮凝剂的最佳碳源和氮源分别为葡萄糖和酵母浸出汁, 培养时间为 24 h。在絮凝体系中加入  $\text{Ca}^{2+}$  能明显提高发酵液的絮凝率。在 pH 为 8.0 时对高岭土悬浊液和污水具有良好的絮凝效果。

**关键词:** 絮凝剂, 絮凝能力, 鲍曼不动杆菌, 污水处理

## Screening and Flocculating Characteristics of a Flocculating-producing Strain of *Acinetobacter* sp.

WANG Zhao-Hui<sup>1</sup> YE Hui<sup>1</sup> CHANG Yan<sup>1</sup> XU Lei<sup>1</sup> CAO Jun<sup>1</sup> YIN Li-Hong<sup>2\*</sup>

(1. Life Science School, Nantong University, Nantong 226007)

(2. Public Health School, Southeast University, Nanjing 210096)

**Abstract:** An effective flocculant-producing microorganism was isolated from activated sludge which was identified as *Acinetobacter baumannii*. Its genetic toxicity is checked by the *Vicia faba* root-tip cells micro-nucleus test, the result has not demonstrated the genetic toxicity. The best carbon sources and nitrogen sources for flocculant production are glucose and yeast extract, the cultivation time is 24 hours. Addition of  $\text{Ca}^{2+}$  could obviously increase the flocculating rate. It has good flocculating effect on Kaolin suspension and sewage with pH at the scale of 8.0.

**Keywords:** Flocculants, Flocculating activity, *Acinetobacter baumannii*, Wastewater treatment

絮凝剂是一类可使水体中不易沉降的溶质、胶体或者悬浮颗粒凝聚沉淀的物质, 在工业废水处理、食品生产、发酵工业中发挥着重要作用, 尤其在各种污水的预处理中。常用的絮凝剂分为无机絮凝剂、人工合成有机高分子絮凝剂和天然有机高分子絮凝剂。广泛应用的无机絮凝剂及人工合成有机絮凝剂在水处理中一般用量较大, 且易产生二次污

染。如有关研究表明人体摄入过量的  $\text{Al}^{3+}$  与老年性痴呆成正相关, 因此铝系絮凝剂的使用受到限制<sup>[1]</sup>; 聚丙烯酰胺的合成材料单体丙烯酰胺有强烈的神经毒性, 是“三致”因子, 能诱发膀胱癌<sup>[2]</sup>, 同时, 在其生产和降解过程中所释放的污染物也严重危害人类健康和生态环境。微生物絮凝剂是利用生物技术, 从微生物体或其分泌物中提取、纯化而获得的具有

基金项目: 南通大学自然科学基金资助项目(No. 06Z111)

\* 通讯作者: Tel: 025-83272583; E-mail: Lhyin@seu.edu.cn

收稿日期: 2007-06-25; 接受日期: 2007-08-06

絮凝活性的一类代谢产物,属于天然高分子絮凝剂,可使水体中的悬浮颗粒、胶体粒子及菌体细胞凝聚、沉淀,具有高效、无毒、无二次污染、能自行降解及使用范围广泛等优点<sup>[3]</sup>,其研制和开发应用一直是近几年污水处理领域研究的热点,国内外的研究者已筛选出多种产絮凝剂的微生物,但已有的相关文献中关于不动杆菌属产絮凝剂的报道不多。本文从活性污泥、污水等环境中分离得到一株具有较高絮凝活性的细菌,鉴定为鲍曼不动杆菌。经 24 h 发酵,其发酵液对高岭土悬浊液、污水等具有较强的絮凝作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源及筛选培养基

活性污泥取自南通开发区污水处理厂,污水取自南通市通州区通甲河“五一”桥下。富集培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[4]</sup>,发酵培养基为:葡萄糖 20 g,酵母浸出汁 0.5 g,尿素 0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2 g, NaCl 0.1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,加水至 1000 mL,调节 pH 至 7.5~8.0。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 絮凝剂产生菌的分离与筛选:** 用稀释倒平板法将样品进行富集培养后,用平板划线法获得单菌落<sup>[2]</sup>,纯化后依次编号为 B1、B2……。各菌加入发酵培养基中于 30 °C, 120 r/min, 摇床培养 72 h。挑选发酵液粘稠的菌株进行复筛,测定发酵液的絮凝率。

**1.2.2 絮凝率的测定:** 100 mL 烧杯中加入 4.5 g/L 高岭土悬浊液 97 mL, 0.5 mol/L  $\text{CaCl}_2$  1 mL, 发酵液 2 mL (对照加等量无菌发酵液), 调节 pH 至 8.0, 搅拌 1 min, 静置 1 min, 取 50 mL 刻度处上清液, 用 722 型分光光度计于 550 nm 处测定其光密度值  $OD_{550}$ , 计算发酵液的絮凝率。

絮凝率(%)=(A-B)/A × 100, 其中 A 为对照  $OD_{550}$  值, B 为样品  $OD_{550}$  值<sup>[5]</sup>。

**1.2.3 菌株的鉴定:** 根据菌株 B5 在固体培养基上的群体形态、染色后的个体形态、革兰氏染色结果以及一系列生理生化反应的结果,对照《伯杰细菌鉴定手册》第八版,对菌株 B5 进行初步鉴定。另外采用 16S rDNA 寡核苷酸序列测定的方法,对该菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,并将测序结果送入 NCBI 数据库进行分析。扩增引物序列如下:

正向: 27F 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'

反向: 1495R 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'

### 1.3 发酵液的遗传毒性检测

用 B5 所产发酵液浸泡蚕豆种子(对照组用自来水浸泡),计算蚕豆根尖细胞微核千分率(MCN‰),方法参照文献[6]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产絮凝剂细菌的筛选

从活性污泥和污水中分离出的 56 个单菌落中,16 株有絮凝活性,其中 B5 絮凝活性最高,为 89.9%。

### 2.2 菌株的鉴定

**2.2.1 菌株 B5 的群体培养特征:** 在牛肉膏蛋白胨琼脂平板上,菌落湿润、透明,呈圆形,边缘整齐、凸起。见图 1。



图 1 菌株 B5 的菌落形态

Fig. 1 The colony modality of strain B5

**2.2.2 菌株 B5 的个体形态特征:** 培养 18 h 的菌体呈短杆状,大小为  $1.3 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ ,多成对或以短链排列,见图 2。革兰氏染色结果阴性,芽孢染色阴性,鞭毛染色阴性。

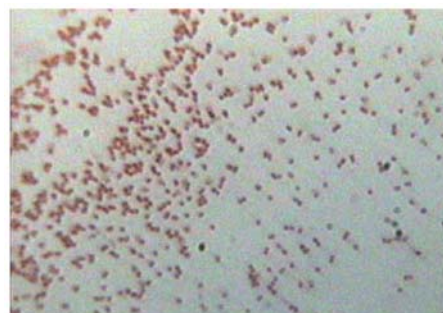


图 2 菌株 B5 的显微摄影图(10 × 100)

Fig. 2 Micrography of strain B5

**2.2.3 菌株 B5 的生理生化特性:** 菌株 B5 的部分生理生化特性见表 1。

表 1 菌株 B5 的部分生理生化特性 Table 1 Some physiological and biochemical properties of strain B5		
项目	B5	<i>Acinetobacter</i> sp.
氧化酶试验	—	—
接触酶试验	+	+
葡萄糖发酵	产酸不产气	产酸+/-
吲哚试验	—	—
硫化氢试验	—	—
最适温度	30 ~32	30 ~32
最适 pH	7	7
青霉素抗性	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: positive; -: negative

**2.2.4 菌株 B5 的 16S rDNA 片段测序结果分析:** B5 的 16S rDNA 片段在 NCBI 数据库中的检索结果表明: B5 与菌株 *Acinetobacter baumannii* 的相似率最高, 为 99%, 在 1423 个碱基中只有一个不同, 最终确定所分离的菌株 B5 是一株鲍曼不动杆菌。

根据以上实验结果, 将 B5 初步鉴定为不动杆菌属<sup>[7]</sup>。

### 2.3 发酵液的遗传毒性检测

用 SPSS13.0 统计软件对两组蚕豆根尖细胞微核千分率(MCN‰)进行单因素方差分析(见表 2)。

表 2 蚕豆根尖细胞 MCN‰实验结果 Table 2 The result of the <i>Vicia faba</i> tip cells micronucleus rate test					
	FS	If	NS		
组间 Between Groups	0.03	1	0.03	0.28	0.76
组内 Within Groups	0.72	4	0.18		
总 Total	0.75	5			

$P=0.876>0.01$ , 两组蚕豆根尖细胞 MCN‰差异无显著性, 未显示菌株 B5 所产絮凝剂对生物具有遗传毒性。

### 2.4 菌株 B5 产絮凝剂的条件

**2.4.1 培养时间对菌株生长量及絮凝活性的影响:** 结果见图 3。

从图 3 可以看出菌株 B5 发酵液的絮凝活性与菌株的生长量随时间呈同步增长, 在菌株生长的稳定期絮凝活性达到最高, 表明絮凝活性与菌的生长量呈正相关。从絮凝率随时间的变化情况看, 24 h~72 h 间絮凝率变化不明显, 从工业角度讲, 发

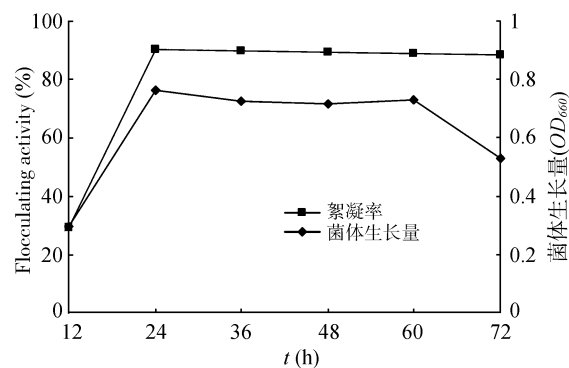


图 3 培养时间对菌株 B5 生长量及絮凝活性的影响

Fig. 3 Effect of culture time on growth and flocculating activity of strain B5

酵周期越短越有利于节约成本, 故后续研究取发酵周期为 24 h。

**2.4.2 培养基不同碳源对絮凝活性的影响:** 分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、玉米粉为碳源, 发酵 24 h 测定絮凝率。结果见图 4。

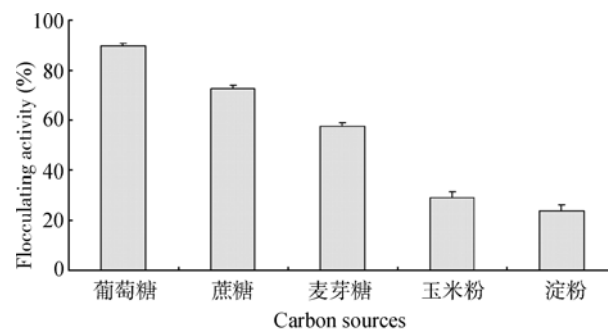


图 4 不同碳源对菌株 B5 絮凝活性的影响

Fig. 4 Effect of different carbon sources on flocculating activity of strain B5

图 4 表明, 葡萄糖作碳源最有利于菌株 B5 产絮凝剂, 而用可溶性淀粉或玉米粉作为碳源时, 菌株所产絮凝剂活性不高。

**2.4.3 培养基不同氮源对絮凝活性的影响:** 分别以牛肉膏、酵母浸出汁、尿素、硫酸铵、蛋白胨作为氮源, 发酵 24 h 测定絮凝率。结果见图 5。

由图 5 可知, 菌株 B5 所能利用的氮源范围较广, 其中以酵母浸出汁作为氮源, 所产絮凝剂絮凝活性最高, 尿素和硫酸铵也是很好的氮源。从经济节约的角度考虑, 可以用硫酸铵作为后续研究的氮源。

### 2.5 絮凝剂在发酵液中的分布

将菌株 B5 的 24 h 发酵液用高速冷冻离心机 10000 r/min 离心 5 min, 得到上清液和完整细胞, 用生理盐水稀释菌体到原体积, 制备成 B5 菌悬液。分别测定上清液与菌悬液的絮凝率, 与原发酵液的絮

凝率进行比较, 见图 6。结果表明, 具有絮凝活性的成份存在于上清液中, 菌体几乎没有絮凝活性, 表明菌株 B5 所产絮凝剂是一种菌体分泌的胞外絮凝剂。

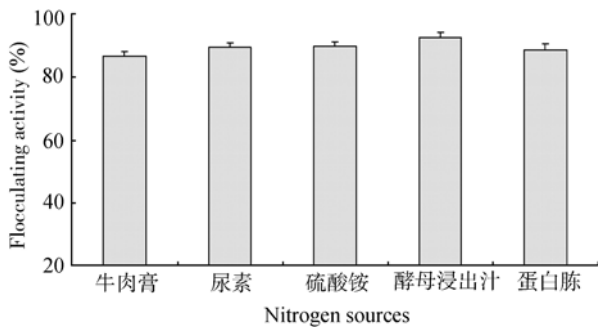


图 5 不同氮源对菌株 B5 絮凝活性的影响

Fig. 5 Effect of different nitrogen sources on flocculating activity of strain B5

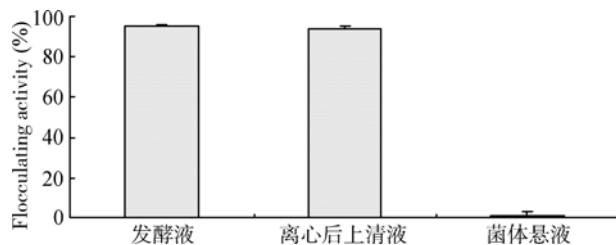


图 6 发酵液中絮凝活性的分布

Fig. 6 The flocculating activity distribution of the fermentation liquid

## 2.6 高岭土不同初始 pH 值对絮凝效果的影响

分别调节高岭土悬浊液的 pH 值为 5.0~10.0, 测定 B5 发酵液的絮凝活性, 结果见图 7。

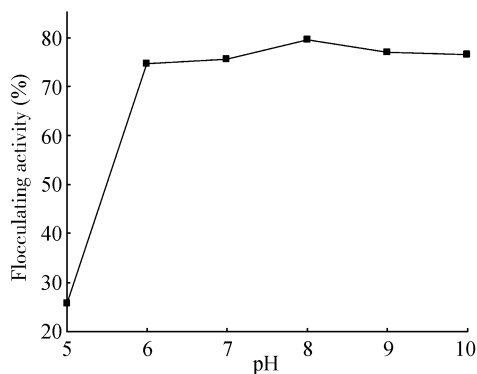


图 7 高岭土悬浊液不同 pH 对菌株 B5 絮凝活性的影响

Fig. 7 Effect of Kaolin clay suspension pH on flocculating activity of strain B5

由图 7 可见, pH 为 8.0 时 B5 的絮凝能力最强, 对高岭土的絮凝率达 79.4%, pH 在 6.0~10.0 范围内絮凝率变化不大, 说明 B5 所产絮凝剂发挥絮凝作

用时对 pH 值的适用范围较广。

## 2.7 助凝剂对絮凝效果的影响

在测定絮凝率时分别加入各种 0.5 mol/L 的无机盐, 同时观察各类金属离子对絮凝活性的影响, 见图 8。结果表明, 加入  $\text{Ca}^{2+}$  尤其是 0.5 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液有利于提高絮凝活性。而  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  对菌株 B5 的絮凝活性有明显抑制作用。

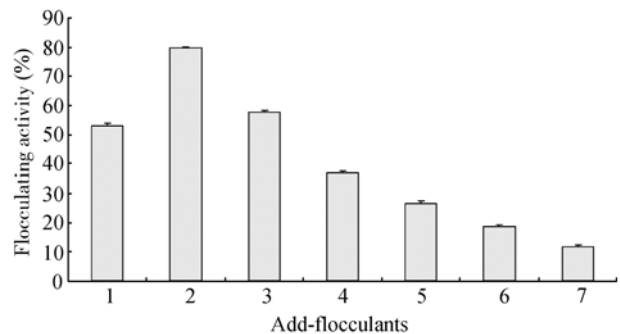


图 8 不同助凝剂对絮凝活性的影响

Fig. 8 Effect of different add-flocculants on flocculating activity

1: 对照; 2:  $\text{CaCl}_2$ ; 3:  $\text{CaO}$ ; 4:  $\text{MgSO}_4$ ; 5:  $\text{ZnSO}_4$ ; 6:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 7:  $\text{CuSO}_4$

1: contrast; 2:  $\text{CaCl}_2$ ; 3:  $\text{CaO}$ ; 4:  $\text{MgSO}_4$ ; 5:  $\text{ZnSO}_4$ ; 6:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 7:  $\text{CuSO}_4$

## 2.8 B5 发酵液对供试样品的絮凝效果

分别以碳素墨水、蓝墨水、泥土、硅藻土、淘米水、污水等悬液作为供试材料, 在 pH 为 8.0 时测定 B5 发酵液对不同悬液的絮凝能力。结果见图 9。

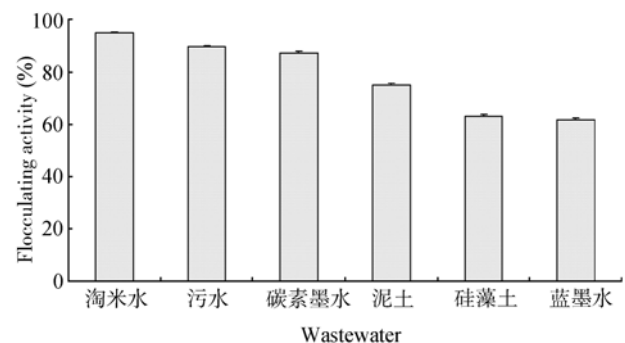


图 9 菌株 B5 发酵液对废水的絮凝效果

Fig. 9 Flocculating effect of strain B5 fermentation liquid on some wastewater

由图 9 可见, 菌株 B5 的发酵液对所有供试材料均有良好絮凝效果, 对碳素墨水有较好的脱色效果。

## 3 结论

实验结果表明, 絮凝剂产生菌 B5 为一株鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)。该菌在菌体生长的同时合成胞外絮凝剂, 该絮凝剂不具有遗传毒

性。产生絮凝剂的最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母浸出汁,培养时间为 24 h。测定絮凝率时的 pH 适用范围为 6.0~10.0。在高岭土悬浊液 pH 为 8.0 时,絮凝活性达到最高,添加  $\text{Ca}^{2+}$  能明显提高发酵液的絮凝活性。菌株 B5 发酵周期短,产生的絮凝剂有较高的絮凝活性,应用范围广,处理污水时 pH 适用范围宽,是一株很有应用前景的絮凝剂产生菌。

## 参考文献

- [1] Salehizadeh H, Shojaosadati SA. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 2001, **19**:371-385.
- [2] 国家环境保护局. 混凝剂与絮凝剂. 北京: 中国环境科学出版社, 1991, pp. 20-23.
- [3] 李道荣. 水处理剂概论. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp. 36-37.
- [4] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1980, pp. 69-74.
- [5] 程金平, 郑 敏, 张兰英, 等. 影响微生物絮凝剂产生的因素研究. *环境科学与技术*, 2001, **24**(3): 28-31.
- [6] 刘祖洞. 遗传学实验. 北京: 高等教育出版社, 1987, pp. 261-265.
- [7] R E 布坎兰. 《伯杰细菌鉴定手册》(第八版). 北京: 科学出版社, 1984, pp. 604-606.

(上接 p.177)

## 征稿简则

### 3.4 摘要和关键词写作注意事项

3.4.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句 (毕竟不是我们的母语), 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部; 5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取 230 元/页的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

### 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所 B401 《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>