

# 一株絮凝剂产生菌的筛选鉴定及培养条件

咎继清 林炜铁\*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

**摘要:** 从淤泥中筛选到 1 株高效微生物絮凝剂产生菌 JX18, 经过对其形态特征、生理生化特性、以及 16S rRNA 序列分析初步鉴定为荧光假单胞菌。该菌培养 40 h 进入稳定期, 48 h 时絮凝活性达到最大。进一步研究表明: 菌株 JX18 最适培养基初始 pH 值 7.0, 培养温度 30°C, 摇床转速 160 r/min, 最佳碳源和氮源分别为葡萄糖和蛋白胨。最适培养条件下, 所产絮凝剂对高岭土悬浮液的絮凝活性达到 90.56%。

**关键词:** 絮凝剂, 絮凝剂产生菌, 筛选鉴定, 16S rRNA

## Screening and Identifying of a Kind of Flocculants-producing Bacteria and Its Cultural Conditions

ZAN Ji-Qing LIN Wei-Tie\*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** A new kind of high flocculants-producing bacteria JX18 was isolated from sludge samples. It was identified as a *Pseudomonas fluorescens* based on its morphological, physiological characteristics and the partial sequences of its 16S rRNA. The bacteria reached stationary phase after culturing 40 h, and had a maximum flocculating activity after culturing 48 h. The further investigation indicated that the optimum flocculants-producing conditions obtained were initial pH 7.0, temperature 30°C, rotation speed 160 r/min, glucose and peptone were chosen as the optimum carbon and nitrogen sources. Optimum cultivation conditions, the flocculation efficiency toward a kaolin clay suspension reached 90.56%.

**Keywords:** Flocculants, Flocculants-producing bacteria, Screening and identifying, 16S rRNA

絮凝沉降法是水处理中一种常用的方法, 常用的絮凝剂分为无机絮凝剂和有机絮凝剂。但研究发现, 这两类絮凝剂在使用过程中对人体安全存在危害。例如, 无机絮凝剂中的铝离子易诱发老年痴呆症, 有机合成的高分子絮凝剂聚丙烯酰胺在环境中难以降解, 同时, 聚丙烯酰胺单体丙烯酰胺具有强烈的神经毒性, 是致癌物质<sup>[1-2]</sup>。因此, 开发一种高

效的新型絮凝剂具有重要的意义。微生物絮凝剂是利用生物技术, 通过微生物培养发酵得到的一类新型絮凝剂<sup>[3]</sup>。与传统絮凝剂相比, 它具有高效、无毒、无二次污染, 易降解等优点, 已成为近几年环境微生物领域研究的热点。

目前, 国内外报道的絮凝剂产生菌已多达几十种, 但能实现工业化生产的生物絮凝剂并不多, 主

要原因是大多数絮凝剂存在絮凝活性低, 生产成本低等问题<sup>[4-5]</sup>, 因此进一步筛选絮凝性能优良的菌株, 提高絮凝剂产量, 降低生产成本是絮凝剂工业化生产亟待解决的问题。本研究从污泥中筛选到一株高效絮凝剂产生菌, 采用分子生物学方法对其进行鉴定, 研究了产絮凝剂的最适培养条件, 为工业化生产奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源:** 从广州市大学城珠江边淤泥, 江门市污水处理厂活性污泥中分离筛选得到。

**1.1.2 培养基:** (1) 分离筛选培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号培养基、查氏培养基; (2) 种子培养基: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0–7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。 (3) 基础发酵培养基(筛选培养基)<sup>[6]</sup>: 葡萄糖 10.0 g, 酵母膏 0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 0.1 g, 尿素 0.5 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

### 1.2 方法

**1.2.1 分离筛选方法:** 采集样品经富集培养后, 分别以牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号培养基和查氏培养基为细菌、放线菌、霉菌分离培养基, 采用稀释法和平板划线法分离并纯化菌种。将纯化的菌株接入装有 50 mL 基础发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 在 30°C、150 r/min 的摇床中培养 3 d。取发酵液测絮凝率, 以筛选出具有良好絮凝活性的菌株。多次连续传代, 保留絮凝性能稳定的菌株做进一步研究。

**1.2.2 絮凝率的测定<sup>[7]</sup>:** 以高岭土悬浮液模拟实际废水作为絮凝对象。在 100 mL 高型烧杯中加入 4 g/L 的高岭土悬浊液 95 mL 及 5 mL 1% (W/V) 的  $\text{CaCl}_2$  溶液和 2 mL 发酵液(或絮凝剂), 用磁力搅拌器搅拌(200 r/min 快速搅拌 1 min, 80 r/min 慢速搅拌 2 min), 静置 5 min, 从中间液层取样测定在 550 nm 下的吸光度, 以同样处理的、加等量蒸馏水的高岭土悬浊液作为对照, 来确定发酵液或絮凝剂的絮凝活性(用絮凝率来表征):  $\text{絮凝率}(\%) = (A-B) / A \times 100\%$ , 其中 A——对照组的  $OD_{550}$ , B——待测样品的  $OD_{550}$ 。

**1.2.3 菌种鉴定:** 对菌株进行生理生化实验, 结合伯杰氏细菌鉴定手册和 16S rRNA 同源性序列比对法鉴定菌种。细菌基因组的提取采用 CTAB 法<sup>[8]</sup>, 16S

rRNA 相似性分析采用细菌通用引物, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'(由上海英俊生物技术有限公司合成)。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ : 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 4  $\mu\text{L}$ , 正向引物 1  $\mu\text{L}$ , 反向引物 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , rTaq 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 无菌水 37.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min, 4°C 保存。

**1.2.4 系统发育学分析:** PCR 产物直接送上海英俊生物技术有限公司测序, 所测序列利用 BLAST 软件比对进行序列相似性分析, 从 GenBank 选取相关菌种的同源序列, 利用 MEGA3.1 软件包中的邻位连接法构建 JX18 和相关菌种的系统发育树<sup>[9]</sup>。

**1.2.5 培养条件研究:** 在发酵培养基基础上, 分别研究培养时间、培养基初始 pH 值、培养温度、摇床转速、不同碳源和氮源等因素对生产絮凝剂的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 絮凝菌的筛选结果

采用稀释平板法和划线分离法从珠江边淤泥和活性污泥中共筛选到单菌落 245 株, 通过初筛得到 8 株有絮凝活性的菌株, 进一步复筛得到一株絮凝活性稳定的菌株 JX18, 其对高岭土悬浮液的絮凝率达到 84%, 将该菌株作为出发菌株进行研究。JX18 在营养肉汤培养基上为白色不透明菌落, 表面光滑, 直径 2 mm–3 mm (图 1), 生理生化实验表明: 革兰氏染色(-), 无芽孢, 无荚膜, 甲基红试验(+), VP 试验(-), 吡啶试验(-), 过氧化氢酶试验(+), 能微弱水解淀粉, 能使明胶液化。

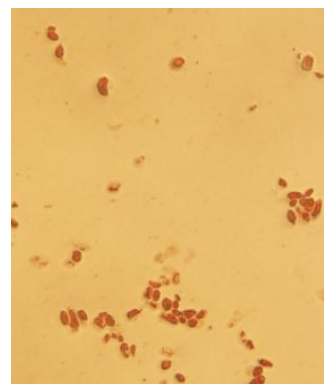


图 1 JX18 菌体形态(400  $\times$ )

Fig. 1 Single cell morphology of JX18 (400  $\times$ )

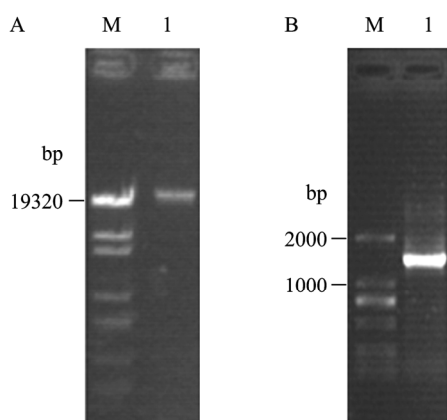


图2 JX18的基因组DNA(A)和16S rRNA PCR(B)琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Result of JX18 genome DNA (A) and 16S rRNA PCR (B) in agarose electrophoresis

## 2.2 16S rRNA 序列系统发育树

通过对16S rRNA测序,其碱基数为1303 bp(图2), (G+C)%为52.2%。将测序结果提交到GenBank, Accession No.为GU220720, 用BLAST进行相似性搜索比对并绘制系统进化树。分析结果显示: JX18与假单胞菌和荧光假单胞菌序列有较高的相似性(99%), 在系统发育树中位于同一分支(图3)。结合菌株的形态和生理生化特征, 认为JX18属于假单胞菌属荧光假单胞菌。1976年, Nakamura等筛选出了19株生物絮凝剂产生菌, 其中一株为荧光假单胞菌, 但未做进一步研究<sup>[10]</sup>, 目前对荧光假单胞菌产

絮凝剂的研究报道较少。

## 2.3 培养时间对絮凝剂合成的影响

将菌株JX18从斜面接入到装有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中, 培养温度为30℃, 摇床转速为150 r/min, 每隔一定时间取一次样, 测定培养液的 $OD_{600}$ , pH值, 絮凝率(图4)。

由图4可知, 菌株JX18的延滞期为12 h, 12–40 h为对数生长期, 40 h进入稳定期。絮凝物质的产生主要在对数生长期和稳定期前期, 在48 h时絮凝物质对高岭土悬浮液的絮凝活性达到最大, 为86.90%。在此以后, 絮凝活性有所下降, 可能原因是菌体培养一段时间后, 营养物质消耗过大, 絮凝物质可能被菌体利用。这可能与菌株JX18的代谢机制有关, 将在以后做进一步研究。微生物培养过程中, 发酵液的pH值由7.0逐渐降低到6.73, 这主要是由于菌体生长过程中将营养物质分解生成了酸类物质造成的, 这与杨阿明等<sup>[11]</sup>报道的奇异变形杆菌相似。

## 2.4 培养条件对絮凝剂合成产生影响

**2.4.1 培养基初始pH对絮凝剂产生的影响:** 在基础发酵培养基的基础上, 调整培养基的初始pH值为3、4、5、6、7、8、9、10、将培养24 h的种子液以2%接种量接入发酵培养基经摇床培养后, 测定培养液对高岭土悬液的絮凝活性, 并测定培养结束后发酵液的最终pH值。

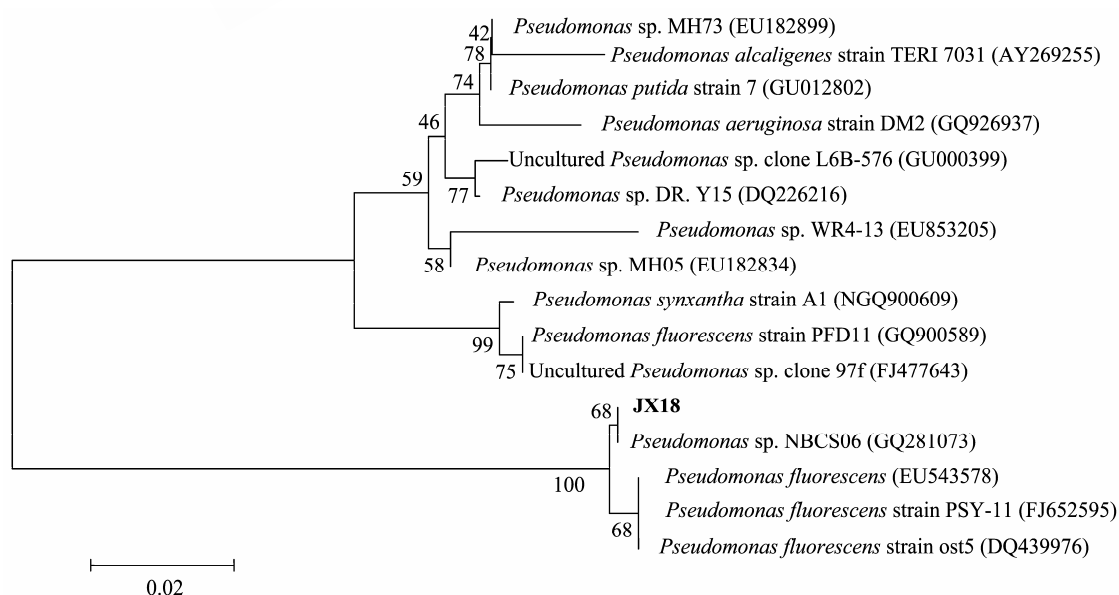


图3 菌株JX18和相关菌基于16S rRNA序列的系统发育进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree base on 16S rRNA gene sequences of strain JX18 and other *Pseudomonas*

Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 100 samplings). Bar: 0.02 sequence divergence.

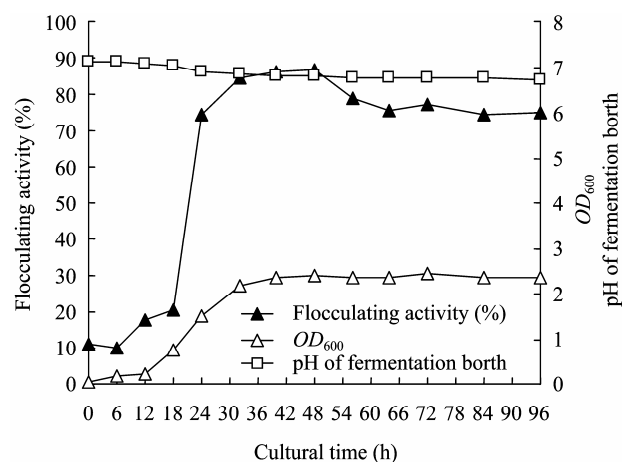


图4 菌体浓度、絮凝率、发酵液 pH 值随培养时间变化  
Fig. 4 Cell concentration, flocculation rate and pH with cultural time

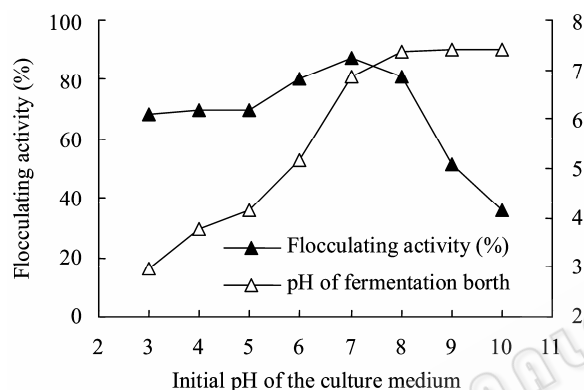


图5 培养基初始 pH 值对絮凝活性的影响  
Fig. 5 Effect of the initial pH of the production medium on the flocculating activity

由图 5 可知, 培养基初始 pH 值在 3–8 范围内, 絮凝率较高, 均在 70% 以上。pH 值大于 8.5 以后, 不利于絮凝物质的合成, 絮凝活性急剧下降, pH 值为 10 时, 絮凝率仅为 35.54%。当 pH 值为 7 时, 发酵液的絮凝率最高, 达到 88.45%。发酵液的 pH 值主要影响菌体细胞体内的表面电荷和氧化还原电位, 进而影响菌体对营养物质的吸收和体内关键酶的活性。不同的絮凝菌, 其最适 pH 值有很大不同, Kurane 等人研究 *R. erythropolis* S-1 的最适 pH 为 9.5。Nakamare<sup>[12]</sup> 等人研究 *Aspergillus sojae* 在 pH 8.0 时, 絮凝剂的产量和活性最高。胡筱敏, 邓述波等<sup>[13]</sup> 研究絮凝剂产生菌 A-9 的最适 pH 值为 8–9。

**2.4.2 培养温度对絮凝剂产生的影响:** 在基础发酵培养基基础上, 分别采用不同的培养温度, 将培养 24 h 的种子液以 2% 接种量接种, 在 150 r/min 条件

下摇床培养 48 h, 按 1.2.3 的方法测定发酵液的絮凝率。结果见图 6。

由图 6 可知, 20°C 时, 发酵液的絮凝率为 84.38%, 25°C 达到 87.64%, 30°C 时絮凝活性最高, 达到 88.04%, 随后随着培养温度升高, 絮凝活性逐渐下降, 当培养温度达到 40°C 时, 絮凝活性仅为 62.20%。温度的高低主要影响微生物的新陈代谢, 大多数微生物的最适生长温度在 20°C–40°C 之间, 温度太低, 达不到新陈代谢的最适酶活, 温度太高, 核酸和酶容易失活。荧光假单胞菌的最适生长温度为 25°C–30°C, 对于 JX18, 产絮凝剂的最适培养温度为 30°C 左右。

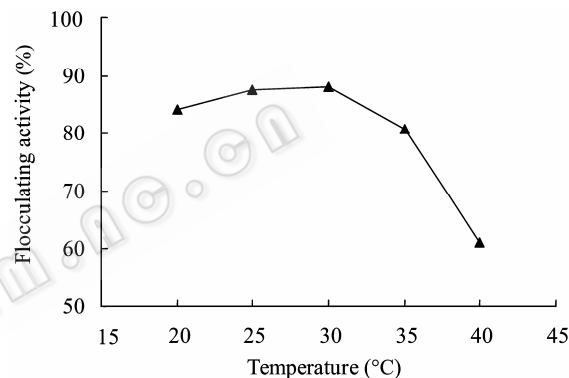


图6 不同培养温度对絮凝活性的影响  
Fig. 6 Effect of the cultural temperature on the flocculating activity

**2.4.3 摇床转速对絮凝剂合成的影响:** JX18 作为一种严格好氧微生物, 培养液中溶解氧的多少对菌体的生长、繁殖和代谢将产生重要影响。不同的摇床转速间接反映了发酵液中溶解氧的多少, 分别研究了不同的摇床转速对絮凝活性的影响, 结果见图 7。随着摇床转数的增加, 发酵液的絮凝活性也随着增加, 当摇床转速达到 160 r/min 后, 絮凝活性基本维持在 88% 左右, 提高摇床转速, 絮凝活性不再上升。从节约成本考虑, 发酵培养的最适转速为 160 r/min。

**2.4.4 培养基组成对絮凝剂合成产生的影响:** (1) 碳源的影响: 在最适培养条件下, 以基础发酵培养基为对照, 分别研究了果糖、半乳糖、蔗糖、可溶性淀粉、柠檬酸、乙醇、甘油、乙酸钠等 9 种不同的碳源物质作为唯一碳源替代培养基中原有碳源

(含碳量 0.4%), 其它组成不变, 研究最终发酵液絮凝活性, 结果如图 8 所示。葡萄糖、果糖、半乳糖做碳源时, 发酵液的絮凝率均较高, 超过了 80%。其中半乳糖做碳源时絮凝率最高, 达到 89.72%。这是由于以上 3 种碳源均为单糖, 易被微生物分解利用, 同时这 3 种单糖可能与絮凝物质的合成有直接关系, 在絮凝物质的合成代谢机理中将做进一步分析研究。以柠檬酸为碳源时, 不利于絮凝物质的产生, 甚至对絮凝有阻碍作用。由于果糖、半乳糖的成本远远高于葡萄糖, 综合考虑, 在以后的研究中以葡萄糖为碳源。(2) 氮源的影响: 在最适培养条件下, 以基础发酵培养基为对照, 分别研究了蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、L-谷氨酸、尿素、硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵等 8 种不同的氮源物质替代培养基中原有氮源(含氮量 0.03%), 其它组成不变, 研究最终发酵液絮凝活性(图 9)。

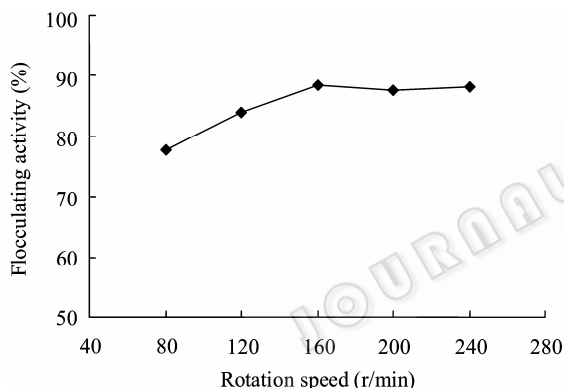


图 7 不同摇床转速对絮凝活性的影响  
Fig. 7 Effect of the rotate speed on the flocculating activity

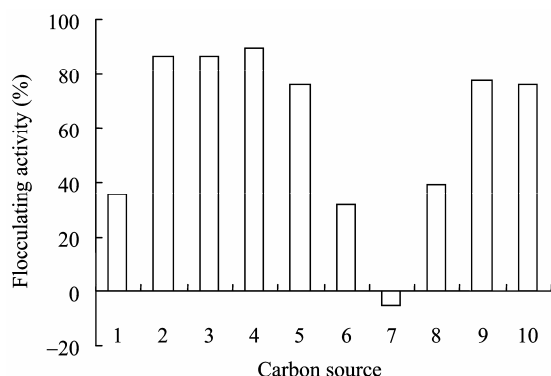


图 8 不同种类碳源对絮凝率的影响  
Fig. 8 Effect of various carbon sources on flocculating rate  
Note: 1: Blank; 2: D-Glucose; 3: D-Fructose; 4: D-Galactose; 5: Lactose; 6: Starch; 7: Citric acid; 8: Ethanol; 9: Glycerol; 10: Sodium acetate.

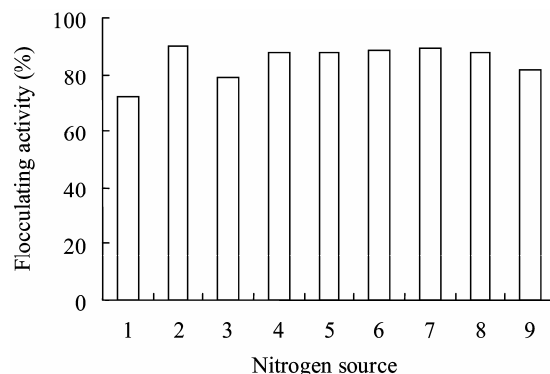


图 9 不同种类氮源对絮凝率的影响  
Fig. 9 Effect of various nitrogen sources on the flocculating rate  
Note: 1: Blank; 2: Peptone; 3: Yeast extract; 4: Beef extract; 5: L-Glutamic acid; 6: Urea; 7: NaNO<sub>3</sub>; 8: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 9: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

由图 9 可知, 采用以上 8 种氮源时, 发酵液的絮凝率均在 75% 以上, 说明菌株 JX18 对氮源的要求不高。以蛋白胨、尿素、硝酸钠做氮源时絮凝率在 90% 左右, 其中蛋白胨做氮源时絮凝率最高, 达 90.56%。同时在絮凝实验时发现, 以蛋白胨为氮源时, 絮凝沉降较快, 所形成絮花较大, 而且发酵液粘稠。主要原因是蛋白胨成分比较复杂, 利于菌体的生长, 因此确定蛋白胨为 JX18 的最佳氮源。

### 3 结论

(1) 从淤泥中分离得到 254 株单菌落, 经过多次复筛得到一株絮凝活性稳定的菌株 JX18, 其絮凝活性定在 84% 左右, 经过形态特征, 生理生化 and 分子生物学鉴定, 该菌株为荧光假单胞菌。

(2) 通过研究 JX18 的生长时间与絮凝剂产生的关系, 该菌产生絮凝物质主要在对数生长期的后期和稳定期前期, 在 48 h 时, 絮凝活性达到最大。

(3) 通过对该菌株发酵条件的初步研究发现, 最适培养条件为: 发酵液初始 pH 值 7.0, 培养温度 30°C, 摇床转速 160 r/min。

(4) JX18 的最适碳源和氮源分别为葡萄糖和蛋白胨, 絮凝活性达到 90.56%, 其中氮源种类对絮凝剂的合成影响较小。采用蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、L-谷氨酸、尿素、硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵等 8 种氮源, 絮凝活性均在 75% 以上, 进一步筛选廉价的碳源、氮源是今后研究的方向。

## 参 考 文 献

- [1] Salehizadeh H, Vossoughi M, Alemzadeh I. Some investigations on biofloculant producing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 2000(5): 39-44.
- [2] Jang JH, Ike M, Kim SM, *et al.* Production of a novel biofloculant by fed-batch culture of *Citrobacter* sp.. *Biotechnology*, 2001(23): 593-597.
- [3] 甘莉, 孟召平. 微生物絮凝剂的研究进展. 水处理技术, 2006, **32**(7): 5-8.
- [4] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, *et al.* Purification and characterization of lipid biofloculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, **58**(11): 1977-1982.
- [5] Yang Y, Ren NQ, Wang AJ, *et al.* Use of waste fermenting liquor to produce biofloculants with isolated strains. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008(33): 3295-3301.
- [6] Dermlim W, Prasertsan P, Doelle P. Screening and characterization of bio-floculant produced by isolated *Klebsiella* sp.. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999(52): 698-703.
- [7] Zheng Y, Ye ZL, Fang XL, *et al.* Production and characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus* sp. F19. *Bioresource Technology*, 2008(99): 7686-7691.
- [8] 汪长东, 陈鹏, 闫旭, 等. 一株耐盐细菌的 16S rRNA 基因序列分析. 生物技术通报, 2008(6): 164-167.
- [9] 李建军, 叶广运, 陈进林, 等. 一株硫酸盐还原菌的分离鉴定和系统发育分析. 微生物学通报, 2009, **36**(10): 1476-1482.
- [10] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Screening isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agric Biol Chem*, 1976(40): 377-383.
- [11] 杨阿明, 夏四清, 王学江, 等. 奇异变形杆菌 TJ-1 产絮凝剂的培养基优化研究. 环境科学学报, 2007, **27**(12): 1988-1993.
- [12] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y. Conditions of production of microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ-7002. *Agric Biol Chem*, 1976(40): 1341-1347.
- [13] 胡筱敏, 邓述波, 牛力东, 等. 一株芽孢杆菌所产絮凝剂的研究. 环境科学研究, 2001, **14**(1): 36-40.

## 征订启事

## 2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
大豆科学	14-95	双月刊	60	<a href="http://ddkx.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4606693">http://ddkx.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4606693</a>	dadoukx@sina.com
动物学研究	64-20	双月刊	150	<a href="http://www.zoores.ac.cn">www.zoores.ac.cn</a>	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	210	<a href="http://dwxzz.ioz.ac.cn">http://dwxzz.ioz.ac.cn</a>	journal@ioz.ac.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	120	<a href="http://www.jgswxb.net">www.jgswxb.net</a>	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	<a href="http://journals.im.ac.cn/jwxtcn">http://journals.im.ac.cn/jwxtcn</a>	jwxt@im.ac.cn
昆虫学报	2-153	月刊	420	<a href="http://www.insect.org.cn">www.insect.org.cn</a>	kcx@ioz.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	150	<a href="http://www.ent-bull.com.cn">www.ent-bull.com.cn</a>	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	<a href="http://www.linyekexue.net">www.linyekexue.net</a>	liny@forestry.ac.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	<a href="http://www.ivpp.ac.cn">www.ivpp.ac.cn</a>	acta@ivpp.ac.cn
山地农业生物学报	66-66	双月	100	<a href="http://web.gzu.edu.cn/jou/jou">http://web.gzu.edu.cn/jou/jou</a>	Sd.xb@163.com
生命科学	4-628	月刊	360	<a href="http://www.lifescience.net.cn">www.lifescience.net.cn</a>	cbis@sibs.ac.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	<a href="http://journals.im.ac.cn/cjbcn">http://journals.im.ac.cn/cjbcn</a>	cjb@im.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300	<a href="http://swjstb.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4615630">http://swjstb.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4615630</a>	biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月	150	<a href="http://swtx.chinajournal.net.cn">http://swtx.chinajournal.net.cn</a>	swtx@263.net
生物信息学	14-14	季刊	48	<a href="http://xxsw.chinajournal.net.cn">http://xxsw.chinajournal.net.cn</a>	cjbioinformatics@yahoo.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	<a href="http://journals.im.ac.cn/actamicrocn">http://journals.im.ac.cn/actamicrocn</a>	actamicro@im.ac.cn