

高效微生物絮凝剂产生菌 TJ-3 的絮凝特性分析

宁雪 常玉广 丁西明 夏四清*

(同济大学 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

摘要: 从活性污泥中分离筛选出一株高效絮凝剂产生菌 TJ-3, 经生理生化试验检测其属于革兰氏阴性菌, 短杆状, 16S rDNA 测序鉴定为铜绿假单胞菌。生长曲线表明, TJ-3 的生长稳定期较长, 所产微生物絮凝剂 (MBF) 的稳定性良好。TJ-3 产 MBF 对高岭土悬液具有良好的絮凝效果, 最佳条件下的絮凝率为 98.2%。絮凝活性分布实验结果表明, TJ-3 所产 MBF 的活性物质大部分存在于离心后的沉淀物中。处理 100 mL 高岭土悬液, pH 值 8.5、1% (质量分数) CaCl_2 溶液投加量 3.5 mL、菌液投加量 1.5 mL 时, 絮凝效果最佳。

关键词: 微生物絮凝剂, 絮凝率, 高岭土悬液, 生长曲线, 16S rDNA

Analysis on Flocculation Characteristics of Bioflocculant-producing Bacteria TJ-3

NING Xue CHANG Yu-Guang DING Xi-Ming XIA Si-Qing*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: A strain of high-efficiency bioflocculant-producing bacteria, which was named TJ-3, was screened from sewage sludge. The strain was gram-negative and rod-shaped in physiological biochemical test and was identified as *Pseudomonas aeruginosa* by 16S rDNA Sequencing. According to the growth curve of the TJ-3 strain, the growth stabilization period is long so that Microbial Flocculants (MBF) production is stable. The MBF produced by the TJ-3 strain is able to flocculate kaolin suspension with 98.2%. The MBF activity distribution tests show that most of the active components of the bioflocculant exist in deposition after centrifugation. When pH is 8.5, 1% (quality fraction) CaCl_2 Solution dosing quantity is 3.5 mL, bioflocculant dosing quantity is 1.5 mL in 100 mL kaolin suspension, the bioflocculant has an optimal flocculation.

Keywords: Bioflocculant, Flocculating rate, Kaolin suspension, Growth curve, 16S rDNA

絮凝是废水处理中常用的关键环节之一。絮凝剂包括化学絮凝剂和微生物絮凝剂 (Microbial Flocculants, 简称 MBF) 两大类。化学絮凝剂的使用会产生二次污染和“三致”效应 (致畸、致癌、致突变), 对人类健康和生态环境产生不利影响。MBF 又称为第三类絮凝剂, 是利用微生物技术, 通过细菌、真菌

等微生物发酵、提取、精制而得到生物高分子物质, 主要含有糖蛋白、多糖、蛋白质、纤维素和 DNA 等, 具有可生物分解和安全性, 是高效、无毒、廉价、用途广泛且无二次污染的新型絮凝剂^[1-5]。最早的 MBF 产生菌是由美国学者 Butterfield 在 1935 年从活性污泥中筛选出来的^[2]。目前发现的絮凝效果最

好的MBF是Ryuichiro Kurane等人从旱田土壤中分离出来的红平球菌所产NOC-1^[6]。杨阿明等人在2006年从活性污泥中首次分离出属于奇异变形杆菌的MBF产生菌TJ-1^[7]。

MBF因其各种显著的优点在给水、医药、食品等与人类安全密切相关的领域具有非常广阔的应用前景,其中新型高效MBF产生菌的筛选和培养起着非常关键的作用。本研究从活性污泥中分离和纯化出一株高效MBF产生菌,命名为TJ-3,并对其生理生化特征及其絮凝特性进行了研究和探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

将上海曲阳水质净化厂的回流污泥采用稀释平板法和平板划线法^[8]得到一株从肉汤培养基中分离出来菌株,命名为TJ-3,其产MBF对高岭土悬浊液的絮凝率和稳定性均最佳。

1.2 培养基

肉汤蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,牛肉膏 3 g~5 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.2,灭菌条件为 1×10^5 Pa,灭菌时间 30 min。

通用发酵培养基:葡萄糖 20 g,尿素 0.5 g,酵母膏 0.5 g, KH_2PO_4 2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g, K_2HPO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.0,灭菌条件为 1×10^5 Pa,灭菌时间 30 min^[8]。

1.3 絮凝率的测定

向 100 mL比色管中加入 0.4 g高岭土、3 mL 1%(质量分数)的 CaCl_2 溶液和 2 mL絮凝剂产生菌发酵液,然后加蒸馏水去离子水至 100 mL,盖上磨口塞;将比色管做 10 次上下自然翻转,转速以每次翻转时气泡上升完毕为准,翻转结束后,静置 5 min,取比色管中 50 mL处的处理液,用岛津UV-1700 分析仪测定上清液在 550 nm波长下的吸光度 $OD_{550}(A)$,在其它条件相同时,用 2 mL新鲜培养基代替菌液基作空白参照(B),絮凝率FR(Flocculating rate)按下式计算:

$$\text{FR} = (\text{B} - \text{A}) \times 100\% / \text{B}^{[7]}$$

1.4 生理生化特性

按照参考文献^[8]进行革兰氏染色、接触酶实验、淀粉水解实验、甲基红实验(M.R 实验)。

1.5 电镜观察

用接种环从斜面上挑取少许菌体用去离子水在载玻片上溶开,制备两份。一份用革兰氏染色后在

TK-C1380E 型光学显微镜下观察;另一份自然晾干,用导电胶贴于圆形贴片上,喷金后在 VEGA TS 5136MM 型扫描电镜下观察。

1.6 生长曲线

将菌株 TJ-3 用接种环从斜面接入装有 50 mL 通用发酵培养基的 150 mL 锥形瓶内培养。培养条件为温度 30°C、转速 160 r/min。前两次每隔 10 h 取 1 次样,之后每隔 8 h 取 1 次样,测定其 OD 值及絮凝率。

1.7 絮凝活性分布测定

取 10 mL 发酵液,12000 r/min 离心 20 min 去除菌体,收集上清液,并定容至 10 mL 备用。分别测定发酵液、上清液及沉淀絮凝效果,即考察发酵液、细菌分泌物和菌体的絮凝活性。

1.8 最佳絮凝条件的研究

采用单因素实验,分别改变pH值、 CaCl_2 溶液投加量、TJ-3 菌液投加量,测定絮凝率,得出最佳絮凝条件。

为了研究pH值的影响,每次试验 1% CaCl_2 溶液投加量均为 3 mL, TJ-3 菌液投加量为 2 mL,以 2 mL 新鲜培养基替代菌液作为空白对照。分别选取 pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.2 进行试验。

通过优化后固定 pH 值为 8.5, TJ-3 菌液投加量为 2 mL,以 2 mL新鲜培养基替代菌液作为空白对照。分别选取 1% CaCl_2 溶液投加量为 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL、3.5 mL、4.0 mL、4.5 mL、5.0 mL以研究 CaCl_2 溶液投加量的影响。

采用优化后的 CaCl_2 溶液投加量为 3.5 mL, pH值为最佳值 8.5,其它条件相同时分别加入 TJ-3 菌液 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL以研究菌液投加量的影响。

1.9 16S rDNA 测序

基因组 DNA 提取按照参考文献^[9]操作。

PCR 引物采用上海生工生物工程技术有限公司生产的 16S rDNA 基因扩增通用引物 P338F(5'-CC TACGGGAGGCAGCAG-3')和 1492r(5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3')。PCR 扩增体系(20 μL)为:10 μL 双蒸水,10 \times dNTP 1.0 μL ,10 \times PCR buffer 5 μL ,引物 P338F 和 1492r 各 1 μL ,Taq DNA 聚合酶 1 μL ,基因组 DNA 1 μL 。PCR 扩增程序为:94°C 5 min;94°C 45 s,57°C 45 s,72°C 90 s,共 30 个循环;72°C

10 min; 4°C 保存。其产物由上海生工生物工程技术有限公司测序。

2 结果与讨论

2.1 菌株筛选

经过多次稀释平板分离和平板划线纯化, 获得 4 种絮凝率在 80% 以上的菌株。其中一株絮凝剂产生菌 TJ-3 的发酵液粘度大, 呈淡黄色, 有絮状沉淀, 选定其作为研究对象。

2.2 菌株形态、生理生化特征与 DNA 序列

通过扫描电镜照片观察发现 TJ-3 菌株短杆状, 其观察结果如图 1 所示。

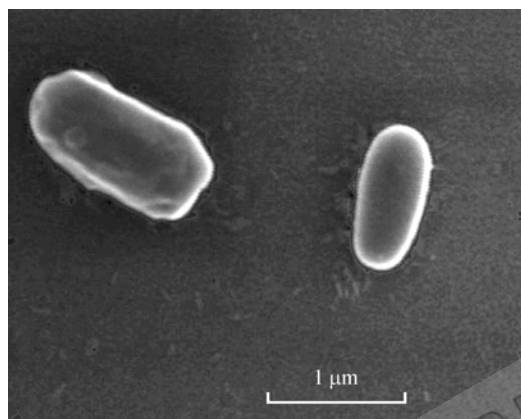


图 1 TJ-3 扫描电镜照片($\times 40000$)

Fig. 1 SEM photo of TJ-3($\times 40000$)

对 TJ-3 菌株进行的接触酶实验呈阳性, 严格好氧, 甲基红染色实验呈阴性, 淀粉水解实验呈阳性, 并且水解淀粉的能力较强, 属于革兰氏阴性菌。并且经过 16S rDNA 测序鉴定, 确定其属于铜绿假单胞菌, 相似率为 99.99%。

2.3 生长曲线

对 TJ-3 菌株的生长曲线及生长过程絮凝率进行了分析, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, TJ-3 在培养初期菌体生长迅速, 分泌的 MBF 增多, 所以絮凝率也随之上升。在对数生长期, 大量吸收营养物质, 细胞分裂旺盛, 36 h 时细菌生长达到顶峰, OD_{550} 值达到最大, 之后进入生长稳定期, 细胞分泌物 MBF 的产量也逐渐达到顶峰并稳定, 这一时期所产 MBF 这一时期的絮凝效果最好。TJ-3 的生长稳定期较长, 可见产 MBF 的时期较长且稳定。

2.4 絮凝活性

TJ-3 菌液及其离心后的上清液絮凝率如图 3 所示。从图 3 中可以看出, TJ-3 的菌液絮凝率为 88.2%,

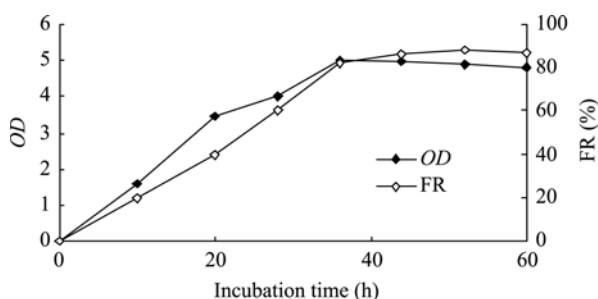


图 2 TJ-3 菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curve of TJ-3 strain

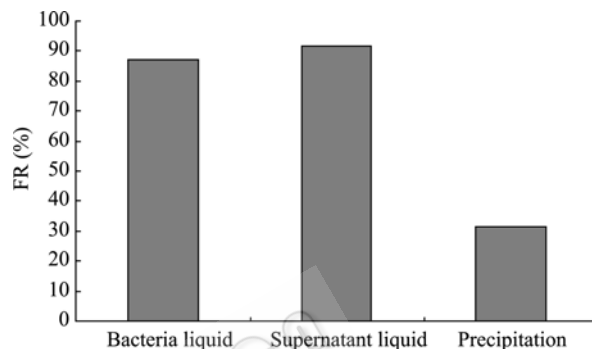


图 3 TJ-3 的絮凝活性分布

Fig. 3 Flocculating activity distribution of TJ-3

离心上清液的絮凝率达到了 92%, 而沉淀的絮凝率只有 31.7%。这说明 MBF 的有效絮凝成分主要存在于上清液即分泌物中。

2.5 最佳絮凝条件研究

2.5.1 最佳 pH 值: 检测 TJ-3 菌液和新鲜培养基对高岭土悬浊液的絮凝率随 pH 值的变化如图 4 所示。

从图 4 可以看出, 当投加没有絮凝作用的新鲜培养基时, 在碱性条件下高岭土悬浊液也会有絮凝现象, 而且 pH 值越高, 絮凝率越高, 可达到 50%。这是由于在碱性条件下, 高岭土颗粒表面电荷发生改变, 相互聚集发生絮凝现象。TJ-3 菌液对 pH 值的适应范围较广, 当 $pH > 6.5$ 时, 絮凝率维持在 88% 以上。pH 值在 7 到 9 范围内絮凝率均可达 90% 以上。

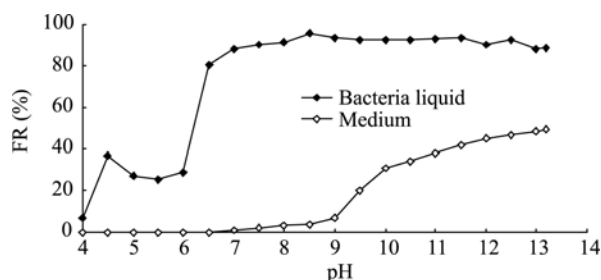


图 4 絮凝率随 pH 变化曲线

Fig. 4 The curve of flocculating rate in terms of pH dependencies

可见 TJ-3 的稳定性高, 絮凝能力强。但是微生物絮凝剂的絮凝机理比较复杂, 有吸附架桥作用、中和作用、卷扫作用等^[10,11], 因此絮凝率不能一直随 pH 值增大而增大。当 pH 值为 8.5 时, TJ-3 菌液絮凝率最大, 为 95.6%。

2.5.2 最佳 CaCl_2 溶液投加量: 检测 TJ-3 菌液对高岭土悬浊液的絮凝率随 CaCl_2 溶液投加量的变化如图 5 所示。

从图 5 可以看出, 当 1% CaCl_2 溶液投加量 1.5 mL 时, 絮凝率几乎维持在 96% 以上。可见当有助凝剂时, TJ-3 的稳定性和絮凝能力都极强。当 1% CaCl_2 溶液投加量为 3.5 mL 时, TJ-3 菌液絮凝率达到最大, 为 97.2%。

2.5.3 最佳菌液投加量: 检测 TJ-3 菌液对高岭土悬浊液的絮凝率随菌液投加量的变化如图 6 所示。

从图 6 可以看出, 随着菌液的增加, 絮凝率逐渐升高, 当菌液投加量为 1.5 mL 时, 絮凝率达到最大, 为 98.2%, 絮凝能力极强。但是当菌液投加量超过一定值时, 絮凝率反而有所下降, 是由于絮凝剂过量会导致再稳现象。

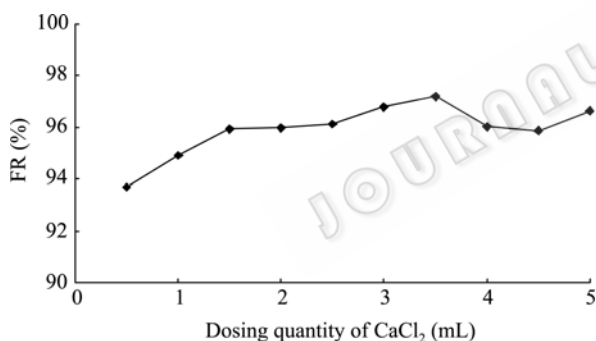


图 5 絮凝率随 CaCl_2 溶液投加量变化曲线

Fig. 5 The curve of flocculating rate in terms of CaCl_2 Solution dosing quantity

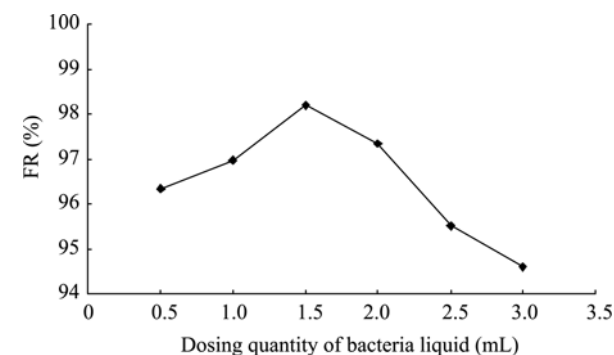


图 6 絮凝率随 TJ-3 菌液投加量变化曲线

Fig. 6 The curve of flocculating rate in terms of bioflocculant dosing quantity

3 结论

(1) 从污泥中提取出一株高效 MBF 产生菌 TJ-3。生理生化试验分析, 接触酶实验呈阳性, 严格好氧, 甲基红染色实验呈阴性, 淀粉水解实验呈阳性, 并且水解淀粉的能力较强, 属于革兰氏阴性菌, 呈短杆状。并且经过 16S rDNA 同源序列测序分析, 确定其属于铜绿假单胞菌, 相似率为 99.99%。

(2) 从生长曲线中看出, TJ-3 的生长稳定期长, 产 MBF 稳定。在特定实验条件下, MBF 产生菌 TJ-3 的菌液絮凝率为 88.2%, 离心上清液的絮凝率达到了 92%, 有效絮凝成分主要存在于分泌物中。

(3) MBF 产生菌 TJ-3 所产 MBF 稳定性好、絮凝能力强, 对 pH 值的适应范围较广, 当 $\text{pH} > 6.5$ 时, 絮凝率维持在 88% 以上, 且在 pH 值 7~9 范围内均可保证 90% 以上的絮凝率。本研究得出 TJ-3 的最佳絮凝条件为 pH 8.5、1% CaCl_2 溶液 3.5 mL、菌液 1.5 mL, 最高絮凝率为 98.2%。

参考文献

- [1] 费文砚, 吴 娟. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝活性的研究. 安徽科技, 2007, 5: 47-49.
- [2] Deng SB, Bai RB, Hu XM, et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnology*, 2003, 60: 588-593.
- [3] Salehizadeh H, Vossoughi M, Alemzadeh I. Some investigations on bioflocculant producing bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 5(1): 39-44.
- [4] 朱艳彬, 冯 旻, 杨基先, 等. 复合型生物絮凝剂产生菌筛选及絮凝机理研究. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(6): 759-762.
- [5] 邓述波, 余 刚, 蒋展鹏, 等. 微生物絮凝剂在给水处理中的应用研究. 中国给水排水, 2001, 17(2): 5-7.
- [6] Kurane R, Takeda K, Suzuki T. Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(9): 2301-2307.
- [7] 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.
- [8] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000, pp.294-298.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Levy NY, Magdassi V. Flocculations of bentonite particles by a cyanobacterial bioflocculant. *Colloids and Surfaces*, 1990, 48: 337-349.
- [11] 邓述波, 余 刚, 蒋展鹏, 等. 生物絮凝剂 MBFA9J21 的絮凝剂理研究. 水处理技术, 2001, 27(1): 22-25.