

微生物絮凝剂产生菌的 筛选及其絮凝影响因素

张欣欣, 张永明, 李步祥

(上海师范大学 环境工程系, 上海 200234)

摘要: 采用常规的细菌分离纯化方法, 从活性污泥和农田土壤中筛选到 12 株微生物絮凝剂产生菌, 经复筛得到一株高效絮凝剂产生菌 MBFP-7. 以高岭土悬浮液为絮凝对象, 研究了温度、pH、微生物絮凝剂的投加量和 Ca^{2+} 对絮凝活性的影响; 探讨了微生物絮凝剂的絮凝机理.

关键词: 微生物絮凝剂; 筛选; 絮凝活性

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2004)04-0096-05

0 引言

微生物絮凝剂(MBF)是具有絮凝活性的微生物代谢产物, 主要成分有糖蛋白、粘多糖、纤维素、核酸和 DNA 等^[1]. 与传统的化学絮凝剂(铝盐、铁盐和聚丙烯酰胺)相比, 微生物絮凝剂安全无毒、生物可降解、无二次污染^[2], 有利于生态环境的保护.

自美国科学家从活性污泥中筛选到絮凝剂产生菌以来, 对生物絮凝的研究逐步深入. Suh 等^[3]从土壤中分离并鉴定了能产生优良絮凝物质的杆状菌株. Yokoi 等^[4]从杆状菌株培养中获得的谷氨酸(γ -PGA)是一种无毒高效的絮凝剂. 张木兰^[5]、辛宝平等^[6]从培养条件、结构及分子生物学研究等方面对微生物絮凝剂的研制和应用进行了综述. 柴晓利、陈洁等^[7]从肉联厂下水道筛选到 2 株絮凝剂产生菌, 初步鉴定为氮单胞菌, 实验发现对不同废水均有良好的絮凝效果, 并且对造纸、染料和皮革废水的脱色效果明显. 张永波等^[1]通过试验研究了微生物絮凝剂普鲁兰对不同原水的絮凝效果, 进而对其絮凝机理及应用条件进行了探讨.

本试验从土壤和活性污泥中筛选到微生物絮凝剂产生菌, 并对其所产生的絮凝活性进行初步研究.

1 材料和方法

1.1 菌种来源

分别取自上海市龙华水质净化厂和上海市长桥净水厂曝气池的活性污泥, 以及江西南昌和萍乡郊区农田土壤.

1.2 培养基

(1)可溶性淀粉 20 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, KNO_3 1 g, 蒸馏水 1L, pH = 7.0,

收稿日期: 2004-08-30

基金项目: 上海高等学校科学技术发展基金项目(03DZ09); 上海师范大学引进人才科研启动基金.

作者简介: 张欣欣(1978-), 女, 上海师范大学环境工程系硕士研究生; 张永明(1958-), 男, 上海师范大学环境工程系教授, 博士.

0.1MPa,121℃灭菌30min.

(2)葡萄糖20g,KH₂PO₄2g,K₂HPO₄5g,NaCl0.1g,(NH₄)₂SO₄0.2g,脲0.5g,酵母膏0.5g,蒸馏水1L,pH=7.5,0.07MPa,115℃灭菌30min.

(3)葡萄糖10g,酵母汁0.5g,(NH₄)₂SO₄0.5g,KH₂PO₄5.0g,K₂HPO₄2.0g,MgSO₄·7H₂O0.2g,NaCl0.1g,蒸馏水1L,pH=7~9,0.07MPa,115℃灭菌30min.

1.3 主要设备

YX280A 手提式不锈钢蒸汽消毒器;SPX-250B-Z 型生化培养箱;CA-1480-2 型垂直层流洁净工作台;TZ-2EH 台式恒温振荡培养箱;SP-2000 型可见分光光度计;TGL-16C 型台式离心机;DK-S-28 型电热恒温水浴锅;SGZ-1 数显浊度仪;XSZ-H 生物显微镜.

1.4 筛选方法

取样—样品预处理—富集培养—划线分离—菌种纯化^[8],平板及斜面在32℃生化培养箱培养,用此方法分离得到纯种菌株.经发酵培养,筛选出具有絮凝活性的絮凝剂产生菌.

初筛筛选出具有絮凝活性的絮凝剂产生菌12株,编号后,再用分光光度计复筛从中选出一株絮凝活性最高的菌株为MBFP-7.

1.5 液体发酵培养及絮凝剂分离方法

分别按上述培养基成分对分离纯化的菌株进行液体发酵培养,用250mL三角瓶装50mL培养基,接种从相应平板上纯化出的菌株.控制摇床速度为160r/min以调节通气量,培养温度为32±1℃,培养时间为24h.使用未离心的培养液作为絮凝剂直接对废水进行絮凝.

1.6 絮凝实验

取发酵培养液进行絮凝活性的初步测定.首先进行初筛,在200mL烧杯中加入5g/L的高岭土悬浊液100mL,加几滴培养液到此悬浊液中,用玻璃棒搅拌,目测,使高岭土悬浊液絮凝成大颗粒的为有絮凝活性的菌株.

将初筛获得的有絮凝活性的菌株发酵培养,再进行复筛,所得培养液进行如下絮凝活性测定:在200mL烧杯中加入5g/L的高岭土悬浊液100mL,4mL1%CaCl₂溶液和2mL培养液,用玻璃棒搅拌,静置10min后,用SGZ-1数显浊度仪测定其上清液浊度.同时以蒸馏水代替培养液和CaCl₂溶液作对照实验.絮凝效果以浊度去除率作为测试标准,公式如下^[2]:

$$\text{絮凝率} = (A - B) / A \times 100\%$$

A 对照上清液的浊度(吸光度)值;B 样品上清液的浊度(吸光度)值.

复筛到一株高效微生物絮凝剂产生菌后,在后续的实验研究中,为消除培养液颜色的影响,在探讨温度、pH和微生物絮凝剂的投加量对絮凝效果产生影响时,用SP-2000型可见分光光度计代替SGZ-1数显浊度仪来测定上清液的浊度,即用吸光光度值来代替浊度值.

2 结果与讨论

2.1 微生物絮凝剂产生菌的筛选

本试验筛选到有絮凝能力的微生物12株,表1为各菌种的絮凝活性及其来源.其中,从活性污泥中筛选到4株,从土壤中筛选到8株.经复筛后,发现MBFP-7菌的絮凝活性最高.以MBFP-7作为本次实验的微生物絮凝剂产生菌.图5和图7分别为自然沉降和加入MBFP-7产生的絮凝剂后显微镜下拍摄到的高岭土颗粒,从图中可以看出加入絮凝剂后的高岭土颗粒的粒径明显增大并且粘合成絮状物.

2.2 发酵液对絮凝效果的影响

对浓度相同,温度均为室温,pH值为8.0的高岭土悬浊液,加入4mL1%CaCl₂溶液,分别投加离心和未离心的MBFP-7发酵液2mL,以此来判别是MBFP-7菌体还是其代谢产物具有絮凝作用.结果如表2所示,离心和未离心的发酵液两者的絮凝效果相近.由此可判定MBFP-7产生的絮凝剂是其代谢

产物.

表1 微生物絮凝剂的絮凝活性及菌种来源

序号	菌株编号	絮凝率(%)	样品来源	序号	菌株编号	絮凝率(%)	样品来源
1	MBFC1	69.2	活性污泥	7	MBFN8	71	土壤
2	MBFC2	81.8	活性污泥	8	MBFP3	85.1	土壤
3	MBFP6	85	土壤	9	MBFN5	83.6	土壤
4	MBFP7	92.8	土壤	10	MBFS1	60.5	活性污泥
5	MBFN6	79.8	土壤	11	MBFS2	40.5	活性污泥
6	MBFN7	81.9	土壤	12	MBFN10	40.9	土壤

表2 离心和未离心发酵液的吸光度

项目	对照吸光度值	吸光度值
发酵液(离心)	0.696	0.152
发酵液(未离心)	0.696	0.146

2.3 温度对絮凝效果的影响

对浓度相同, pH 值均为 8.0 的高岭土悬浊液, 改变其温度, 以 MBFP-7 的发酵液为絮凝剂做絮凝实验, 其结果如图 1 所示. 由图 1 可见, 当高岭土悬浊液温度在 10 ~ 30 °C 之间时, 温度的变化对 MBF 的絮凝效果影响不大. 可见 MBFP-7 菌产生的絮凝剂对温度的适应范围很广. 而在现阶段水处理中被广泛应用的铝盐的最佳温度为 25 ~ 30 °C. 铝盐投加到水中, 起絮凝作用的是它的各种水解产物, 由于温度影响其水解的速度, 因此, 温度对絮凝作用的影响也很大. 这也反映了 MBFP-7 菌产生的絮凝剂直接对悬浮物起絮凝作用.

2.4 pH 对絮凝效果的影响

对浓度相同, 温度均为室温的高岭土悬浊液, 改变其 pH 值, 以 MBFP-7 的发酵液为絮凝剂做絮凝实验, 其结果见图 2.

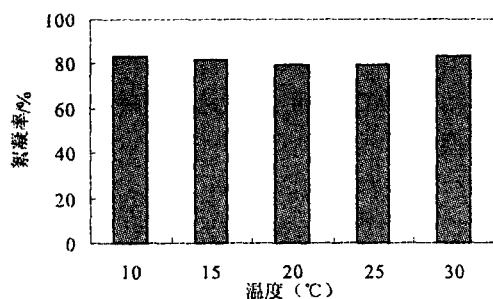


图1 温度对絮凝效果的影响

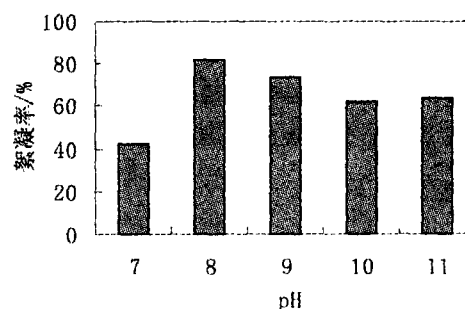


图2 pH对絮凝效果的影响

由图 2 可见, 高岭土悬浊液的 pH 对 MBFP-7 发酵液的絮凝效果影响很大, 当高岭土悬浊液为碱性时, MBFP-7 产生的絮凝剂才会对其有絮凝效果; 当高岭土悬浊液的 pH 为 8.0 ~ 9.0, MBFP-7 培养液的絮凝效果最好, 最高达到 82%. 这是因为高岭土晶体的层与层之间主要依靠 O 与 OH 离子之间的微弱残余键或范德华力进行结合, 因而结合很弱, 层理易于裂开及滑移, 在水溶液中容易呈分散悬浮状态^[9]. 在碱性条件下, 由于 OH⁻ 离子的影响, 增加了 O 与 OH 离子之间的结合力, 使高岭土粒子之间的

结合力增加了,再加上絮凝剂的作用,导致高岭土颗粒变大.

2.5 絮凝剂投加量对絮凝效果的影响

对浓度相同,温度均为室温,pH值为8.0的高岭土悬浊液,改变MBFP-7的发酵液的投加量,其絮凝效果见图3.当MBFP-7的发酵液的投加量分别为1、2、3、4、6mL时,以投加量为2.0mL效果最理想.即当原水悬浮物含量为 $5000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,絮凝剂的最适投加量为 $20\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$.由图3还可以看出,当不投加量絮凝剂而只投加 Ca^{2+} 时,其絮凝率只有13.5%,这说明仅有 Ca^{2+} 离子其絮凝作用是不够的,而生物絮凝剂在絮凝过程中起到了很重要的作用.

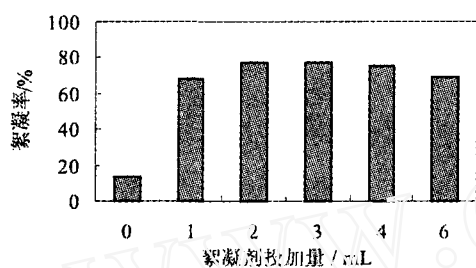


图3 絮凝剂投加量对絮凝效果的影响

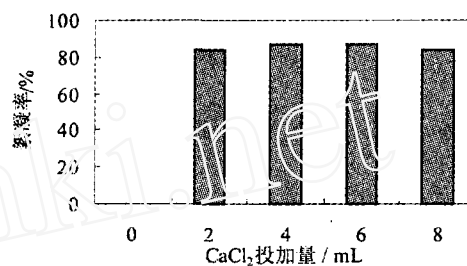


图4 Ca^{2+} 浓度对絮凝效果的影响

2.6 Ca^{2+} 投加量对絮凝效果的影响

在室温条件下,对100mL浓度相同,pH值为8.0的高岭土悬浊液,加入MBFP-7的发酵液2mL,改变1%的 CaCl_2 溶液的投加量,结果如图4所示.当不投加 Ca^{2+} 时,没有絮凝作用,这说明只有同时投加 Ca^{2+} 和生物絮凝剂时,才对高岭土絮凝有显著作用.

由图4可见,当浓度为1%的 CaCl_2 溶液的加入量为4mL时,絮凝效果最理想.图5~图7为显微镜下拍摄到的不同情况下高岭土颗粒的照片,从图中可以看出仅仅加入絮凝剂后,高岭土聚合成一定粒径的颗粒,但基本上还是呈分散状态.当有 Ca^{2+} 存在的情况下,分散的高岭土颗粒由于架桥作用而粘合在一起形成絮状物.根据二价阳离子架桥理论^[10],由于高岭土悬浊液中胶粒带负电,当投入电解质 CaCl_2 后, Ca^{2+} 通过架桥负性的官能团,促进了生物絮凝,图8为二价阳离子架桥示意图.这些照片也证实了二价阳离子架桥作用的存在.

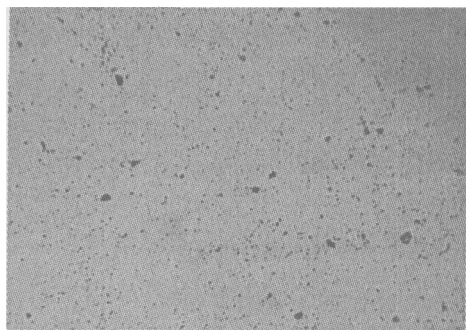


图5 自然沉降的高岭土颗粒

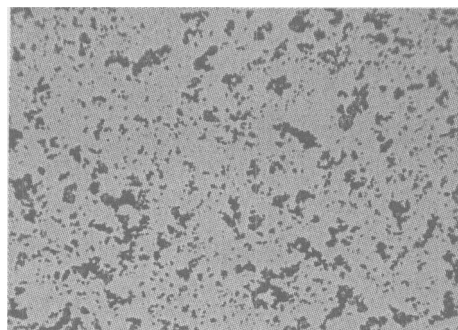


图6 只加絮凝剂的高岭土絮体

3 结论

- (1) 从土壤和活性污泥中均能筛选到微生物絮凝剂产生菌,但土壤中的絮凝剂产生菌相对于活性污泥较为丰富,且絮凝效果也相对较好.
- (2) MBFP-7发酵液中起絮凝作用的主要是微生物絮凝剂产生菌的代谢产物.
- (3) MBFP-7菌产生的絮凝剂对温度的适应范围很广,当温度在 $10\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ 时,温度的变化对絮凝效

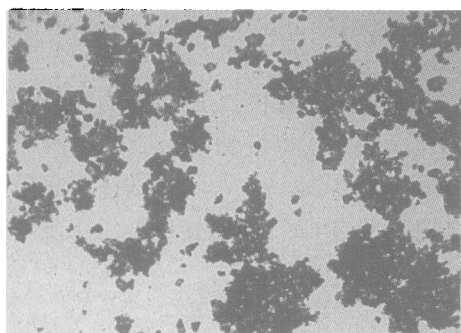
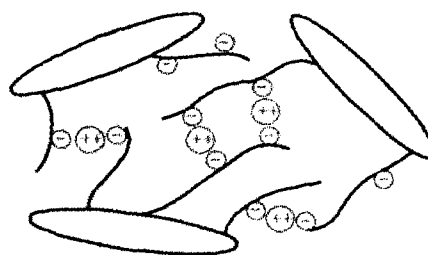
图7 加入 Ca^{2+} 和絮凝剂的高岭土絮体

图8 二价阳离子架桥示意图

果基本没有影响;高岭土悬浊液的最佳 pH 值为 8.0~9.0;微生物絮凝剂的投加量以 2.0mL/100mL 废水为最佳。

(4) Ca^{2+} 的投加对 MBFP-7 絮凝剂的絮凝效果影响很大,主要是通过二价阳离子架桥作用来提高絮凝效果,其最佳投加量为 4.0mL1% 的 CaCl_2 溶液 2.0mL/100mL 废水。

参考文献:

- [1] 张永波,杨开,周毅,等.微生物絮凝剂普鲁兰絮凝机理初探[J].上海环境科学,2001,20(9):448-450.
- [2] 郑怀礼.生物絮凝剂与絮凝技术[M].北京:化学工业出版社,2004.93.
- [3] SUH H H, KWON G S, LEE C H, et al. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. Dp-152[J]. Journal of Fermentation and bioengineering, 1997, 84 (2):108-112.
- [4] YOKOI H. Flocculation properties of poly (γ glutamic acid) produced by *Bacillus*[J]. Journal of Fermentation and bioengineering, 1996, 82 (1):84-87.
- [5] 张木兰.新型高效、无毒水处理剂——微生物絮凝剂的开发与应用[J].工业水处理,1996,16(1):7-8.
- [6] 辛宝平,庄源益,李彤,等.生物絮凝剂的研究和应用[J].环境科学进展,1998,6(5):57-62.
- [7] 柴晓利,陈洁,王猛,等.微生物絮凝剂产生菌的筛选[J].环境污染与防治,2001,23(3):113-115.
- [8] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [9] 西北轻工业学院,等.陶瓷工艺学[M].北京:轻工业出版社,1980.
- [10] DAVID C S, MATTHEW J H. Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation [J]. Water Research, 2002, 36:527-538.

Isolation of microbial flocculant-producing strains and analysis on flocculation factor

ZHANG Xin-xin, ZHANG Yong-ming, LI Bu-xiang

(Department of Environmental Engineering, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: 12 strains, which can produce microbial flocculant, were isolated from activated sludge and soil by means of the regular bacteria isolation and purification method. And a strain named MBFP-7, which can produce bioflocculant with high flocculating activity, was found out from the 12 strains. Kaolin suspension was treated with MBF and show that the temperature, pH, the amount of MBF and Ca^{2+} influence the flocculating activity. And then this paper studied the flocculating mechanism of MBF.

Key words: microbial flocculant; isolation; flocculating activity