

彭桂香, 卢秋雁, 孔慧清, 等. 生物絮凝高活性菌株筛选及发酵优化[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 66-72.

生物絮凝高活性菌株筛选及发酵优化

彭桂香¹, 卢秋雁², 孔慧清², 李雄², 万涛³, 卢钰升³, 谭志远³

(1 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室/华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642;
2 广东天辰生物技术有限公司, 广东 广州 510070; 3 华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】从种植野生稻的稻田土壤中分离筛选对环境无污染、具有高效生物絮凝活性的菌株。【方法】采用 VM 培养基从药用野生稻中分离 135 个菌株, 以发酵液对高岭土悬液絮凝效果为指标, 筛选到絮凝活性高的菌株 YH39。【结果和结论】16S rDNA 序列分析表明, 该菌株与越南伯克霍尔德菌 *Burkholderia vietnamiensis* 有 98.6% 的相似性。YH39 产絮凝剂最佳碳源为葡萄糖, 最佳氮源为硝酸钾。发酵动力学研究表明, 菌株 YH39 发酵培养 16 h, 菌体浓度和絮凝活性达到最高值。对絮凝剂成分分析表明, 絮凝剂为多糖, 具有很好的耐热性, 在 60 ℃ 下加热 30 min, 絮凝活性不改变。应用研究结果表明, 此絮凝剂对 3 种印染废水均有很好的絮凝效果, 不仅可以高效地降低废水的 COD_{Cr}, 还有很好的脱色效果。

关键词:微生物絮凝剂; 絮凝活性; 菌株筛选; 发酵优化
中图分类号:X703.1; Q931.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)01-0066-07

Screening bioflocculant strains and optimization of fermentation

PENG Guixiang¹, LU Qiuyan², KONG Huiqing², LI Xiong², WAN Tao³, LU Yusheng³, TAN Zhiyuan³

(1 Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control/College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Tianchen Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510070, China; 3 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】This study aimed at isolating and screening of efficiently biological flocculation strains from the paddy field of the planted wild rice. 【Method】A high bioflocculant strain YH39 was obtained from the screening of kaolin suspension flocculation effects of 135 strains isolated from *Oryza officinalis* on VM medium. 【Result and conclusion】16S rDNA sequences analysis showed that the strain YH39 was closely related to the known species *Burkholderia cepacia* with 98.6% similarity. The best carbon and nitrogen sources for producing flocculation were glucose and potassium nitrate, respectively. The fermentation kinetics analysis showed that strain YH39 reached the highest values of biomass concentration and flocculating activity in 16 h. Flocculant composition analysis indicated that the bioflocculant components were polysaccharide with good heat resistance, which was heated at 60 ℃ for 30 min without losing flocculating activity. The application of bioflocculation of three kinds of dyeing wastewater show that the fermentation liquid has good flocculating effects on dyeing wastewater with effective decolorization and reduces COD_{Cr} in dyeing wastewater.

收稿日期:2013-03-08 优先出版时间:2014-01-03
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0822.002.html>
作者简介:彭桂香(1968—),女,副教授,博士,E-mail:gxpeng@scau.edu.cn;通信作者:谭志远(1968—),男,教授,博士,E-mail:zytan@scau.edu.cn
基金项目:973 计划项目(2010CB126502);国家自然科学基金(31370052);广东省科技计划项目(2010B090400434, 2012B010300018);农业部南方植物营养与肥料重点实验室和广东省养分资源循环利用与耕地保育重点实验室开放基金资助项目(TFS2011-04);广东省烟草专卖局资助项目(粤烟科[2012]26号)

Key words: microbial flocculant; flocculating activity; screening strain; optimization of fermentation

凡能使水溶液中的溶质、胶体或悬浮颗粒产生絮状沉淀物的物质叫絮凝剂^[1-2]。按照药剂使用化合物的类型,絮凝剂可分为无机絮凝剂、有机絮凝剂和生物絮凝剂3大类^[3]。在絮凝技术发展史上,无机盐类絮凝剂(如含有铝离子的无机盐类絮凝剂)一方面毒害水生生物和微生物;另一方面通过食物链和饮用水最终危害人类健康^[4-5]。有机合成高分子絮凝剂聚丙烯酰胺(Polyacrylamide, PAM)具有用量少、絮凝速度快的优点,但残留物不易被生物降解,且其单体有强烈的神经毒性和“三致”效应(致畸、致癌、致突变),造成二次污染,也限制了它的应用^[6-9]。

微生物絮凝剂是一类由微生物产生的代谢产物,主要成分有糖蛋白、多糖、蛋白质、纤维素和DNA等^[10-11]。可以通过微生物发酵、提取、精制而得,具有生物分解性和安全性,是新型、高效、无毒、无二次性污染的水处理剂。它具有广谱的絮凝活性、可生物降解及应用安全性,显示了它在废水脱色、含高悬浮物的废水处理、乳浊液的处理、畜产废水的处理、活性污泥的处理、食品加工和发酵工业等方面的应用前景,已经成为国内外新型水处理剂研究和开发的热点^[12-17]。但是目前对微生物絮凝剂的应用研究多处于实验室阶段,还未见大规模的工业化应用^[18-20]。

本研究根据耕作后药用野生稻水稻田比栽培稻水稻田能够很快变得澄清这一现象,从野生稻中分离出1株具有开发和应用潜力的高絮凝活性的微生物絮凝剂产生菌。以高岭土悬浊液为处理对象,对它的生长及产微生物絮凝剂的影响因素进行探索,掌握其产微生物絮凝剂的最佳条件,研究其高效的絮凝特性,为微生物絮凝剂的研制开发提供基础理论和应用依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和培养基

菌株是从华南农业大学试验地药用野生稻 *Oryza officinalis* 植株分离而来,共分离到135个菌株。筛选到的絮凝活性高的菌株参考 Peng 等^[21]方法进行16S rRNA 基因扩增及序列分析。

采用 VM 固体培养基活化菌株,VM^[21]液体培养基作为絮凝剂产生菌的筛选培养基。其中固体培养基中加入终质量浓度为 $20\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂。

1.2 絮凝剂产生菌的筛选及活性测定

将分离后保藏的135个菌株用平板划线法接入 VM 固体培养基上,培养24 h,用接种环从平板上挑

一环活化后的菌株接种到装有50 mL VM 培养液的250 mL 三角瓶中,将三角瓶置于恒温振荡器中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养24 h后测定各菌株培养液对高岭土悬液的絮凝活性。

用絮凝率来定量表征絮凝活性,在150 mL 三角瓶中加入高岭土0.5 g,再加入100 mL 蒸馏水,配成质量浓度为 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高岭土悬液,加入1 mL 细菌培养液[细菌培养液浓度用紫外分光光度计 UV-1201(北京瑞利分析仪器公司)测其在600 nm 处的光密度($D_{600\text{ nm}}$)来表示,培养液 $D_{600\text{ nm}} = 1$],再加入1 mL $0.2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液,摇匀,用 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调 pH 为8.0,搅拌60 s,静置5 min,取上清液,测定其在波长550 nm 下的光密度($D_{550\text{ nm}}$)。以空白培养液代替细菌培养液做对照^[22]。

$$\text{絮凝率} = \frac{A - B}{A} \times 100\%,$$

式中, A 为对照上层清液的 $D_{550\text{ nm}}$; B 为样品上层清液的 $D_{550\text{ nm}}$ 。

1.3 培养温度以及培养基中碳源、氮源和初始 pH 对絮凝活性的影响

培养温度对絮凝活性的影响:培养液灭菌冷却后,接入菌 YH39,将各三角瓶分别置入温度设置为25、30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡器中,3个重复,每隔6 h 测絮凝活性,共培养48 h。

碳源利用采用 Biolog 测定^[21]。用麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、糊精、淀粉、乳糖分别代替 VM 培养基中的碳源,将50 mL 培养液装入250 mL 三角瓶中,分别接种已活化24 h 的菌株 YH39。在恒温振荡器中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养24 h后测其絮凝活性。

用硝酸钠、氯化铵、硝酸钾、硫酸铵、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨分别代替 VM 培养基中的氮源,将培养液50 mL 装入250 mL 三角瓶中,分别接种已活化24 h 的菌株 YH39。在恒温振荡器中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养24 h后测其絮凝活性。

培养液初始 pH 对絮凝活性的影响:三角瓶中的培养液的初始 pH 用 φ 为10% 的 HCl 或10% 的 NaOH 分别调成5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,3个重复,灭菌冷却后,接入菌 YH39。在恒温振荡器中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后测絮凝活性。

1.4 发酵参数

在7.5 L 发酵罐(上海保兴生物工程设备有限公司)上进行发酵,发酵过程的温度设定为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,罐压为0.05 MPa,装液量为3 L,接种量为3%,发酵初期搅

拌转速设置为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 通气量 $2.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 发酵第 12 小时搅拌, 转速升到 $125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 通气量升到 $4.0 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. 通过测定菌体浓度(用 $D_{600 \text{ nm}}$ 表示)、pH、溶氧、发酵液的絮凝活性等参数, 描述该生产菌株的发酵动力学规律.

1.5 絮凝体系的 pH 和金属离子对絮凝活性的影响

用 φ 为 10% 的 HCl 或 10% 的 NaOH 将三角瓶中高岭土悬液的 pH 分别调为 4、5、6、7、8、9、10、11、12, 然后再加入 1 mL 发酵液和 1 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液, 测其絮凝率. 每个 pH 梯度做 3 个重复.

分别用 1 mL 浓度为 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 、 NaCl 、 CaCl_2 、 FeCl_2 、 AlCl_3 、 MnSO_4 溶液, 代替 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液加入到高岭土悬液中, 测其絮凝率. 以不加金属离子做空白对照.

1.6 絮凝活性成分分布和耐热性

将发酵液离心, 分别测定发酵液、发酵上清液、菌细胞悬液的絮凝活性. 从同一个三角瓶中取出发酵液, 分别以 60、80、100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min, 另一管不加热. 室温冷却后, 测各管中发酵液的絮凝活性, 每管取样 3 次做重复测定.

1.7 絮凝剂的提取和成分分析

培养液先稀释 1 倍, 离心收集上清液, 加入 3 倍体积的 φ 为 95% 乙醇溶液, 震荡混匀; $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 收集沉淀. 沉淀重新溶于水, 加入 0.5 倍体积的氯仿和正丁醇(体积比为 5:2), 震荡混匀、离心、收集含多糖的上相液. 上相液中加入 3 倍体积的 φ 为 95% 乙醇溶液, 收集沉淀. 按上述方法重复 2 次, 收集沉淀, 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 得絮凝剂粗提品, 计算每升培养液提取絮凝剂质量.

光谱测定、molish 反应、蒽酮反应、双缩脲反应、茚三酮反应参照文献[23-24]进行.

1.8 印染废水处理

3 种废水分别来源于广州兴利洗染厂洗牛仔褲产生的废水, 该废水呈蓝色; 佛山市高明区汇益纺织实业有限公司染布产生的废水; 佛山市高明区骏有纺织印染有限公司染布产生的废水. 在处理之前先用 pH 计测各种废水的 pH、用紫外分光光度计测 $D_{550 \text{ nm}}$, 重铬酸钾法^[25]测化学耗氧量 (COD_{Cr}).

分别采用微生物絮凝剂(发酵离心上相液代替)、 φ 为 1% 的聚合碱式铝稀释液、 φ 为 1% 的聚合碱式铝稀释液 + φ 为 1% 的聚丙烯酰胺溶液处理 100 mL 上述 3 种废水. 每处理 100 mL 废水加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液 2 mL, YH39 发酵离心上相液 1 mL, 用 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH. 用 1 mL φ 为 1% 的聚合碱式铝稀释液处理 100 mL 的印染废水. 用聚合

碱式铝和聚丙烯酰胺联合处理废水, 则先加聚合碱式铝稀释液 0.5 mL, 摇匀, 再加聚丙烯酰胺稀释液 0.2 mL. 每次处理均在加入絮凝剂后充分搅拌 60 s, 再静置 20 min, 测废水上相液的 $D_{550 \text{ nm}}$ 、 COD_{Cr} 和 pH.

2 结果与分析

2.1 产微生物絮凝剂的菌株筛选和菌落特征

从 135 株菌中筛选到的具有絮凝活性的菌株 YH39, 高岭土悬液的絮凝试验中发现, 菌株 YH39 发酵液的絮凝活性最高, 对高岭土悬液的絮凝率可达 87.7%, 其沉淀高岭土的速度最快, 且沉淀后的颗粒大而稳定.

菌株 YH39 为革兰阴性菌, 有荚膜. 菌落在 VM 琼脂平皿中培养 24 h, 生长良好, 生长速度快, 菌落大且凸起、边缘圆整、光滑、无色、不透明、潮湿, 挑起有黏稠样物质, 无特殊的味道.

将所测得的 YH39 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库相关序列进行比对, 结果显示与越南伯克霍尔德菌 *Burkholderia vietnamiensis* G4 的相似性为 98.6%.

2.2 培养基中的碳源和氮源对絮凝活性的影响

菌株对不同碳源的利用情况见表 1. YH39 可以利用葡萄糖、蔗糖、糊精、麦芽糖等常见糖, 但不可以利用淀粉、尿素等作为碳源, YH39 不能利用甘氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、L-亮氨酸等氨基酸作为碳源生长, 但能够利用苯丙氨酸、脯氨酸、组氨酸、色氨酸、天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-丙氨酸、D-丙氨酸、L-羟脯氨酸等氨基酸作为碳源生长.

不同碳源对絮凝活性的影响见图 1 I. 由图 1 I 可知, 加入不同的碳源培养后, 培养液的絮凝活性差异较大, 以葡萄糖为碳源时, 培养液的絮凝率最高, 蔗糖、糊精次之, 而以淀粉为碳源时, 发现菌株不能生长, 培养液无絮凝活性, 且由于淀粉不可溶, 絮凝率测得为负值. 所以在以后的培养中菌株 YH39 采用廉价高效的葡萄糖为产絮凝剂的碳源.

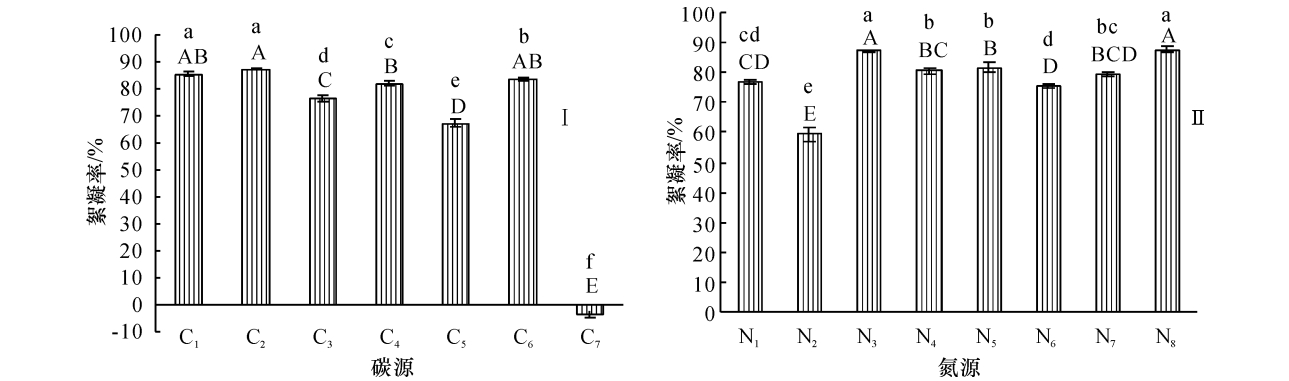
不同氮源对絮凝活性的影响见图 1 II. 由图 1 II 可知, 加入不同的氮源培养后, 培养液的絮凝活性差异较大, 以蛋白胨为碳源时, 培养液的絮凝率最高, 为 87.6%, 其次为硝酸钾, 絮凝率高达 87.1%, 这 2 种氮源效果几乎差不多, 但由于硝酸钾作为氮源比蛋白胨要经济得多, 在实际应用中比较可行. 故在以后的试验中采用硝酸钾为 YH39 产絮凝剂的氮源.

表 1 菌株 YH39 碳源利用情况¹⁾

Tab.1 The utilization of carbon sources by strain YH39

碳源	情况	碳源	情况	碳源	情况	碳源	情况	碳源	情况
糊精	+	甲硫氨酸	-	山梨醇	+	松三糖	-	L-鼠李糖	-
淀粉	-	苯丙氨酸	+	木糖醇	-	松二糖	-	L-羟脯氨酸	+
吐温 40	+	天冬氨酸	+	己六醇	+	D-核糖	-	羟甲基纤维素	-
吐温 80	+	苯甲酸钠	+	肌醇	+	塔格糖	-	D-葡萄糖醛酸盐	+
香草酸	+	氨基乙醇	+	甘油	-	海藻糖	-	半乳糖醛酸盐	+
癸二酸	+	柠檬酸钠	+	D-木糖	+	甘露醇	+	羟基苯乙酸	-
蔗糖	+	马尿酸钠	+	木糖	+	甘氨酸	-	N-乙酰葡萄糖胺	+
衣康酸	+	琥珀酸钠	+	菊糖	-	丁二胺	+	L-谷氨酰胺	+
麦芽糖	+	D-葡萄糖	+	甲酸钠	+	L-谷氨酸	+	葡萄糖酸钠	+
乌头酸	+	D-甘露糖	+	乙酸钠	+	L-丙氨酸	+	脱氧胆酸钠	-
D-乳糖	+	α-酮戊二酸	-	丙酸钙	+	D-丙氨酸	+	侧金盏花醇	-
苹果酸	+	γ-氨基丁酸	+	水杨苷	-	L-阿糖醇	+	鸟氨酸盐酸盐	-
山梨糖	-	苦杏仁苷	-	草酸钠	-	丝氨酸	-	酒石酸钾钠	-
L-果糖	+	龙胆二糖	-	乳酸钠	+	精氨酸	+	D-阿拉伯糖	-
D-果糖	+	丙酮酸钠	+	苏氨酸	-	胱氨酸	-	D-纤维二糖	-
密二糖	-	D-半乳糖	+	赖氨酸	-	尿素	-	L-阿拉伯糖	-

1)“-”不生长;“+”生长.



C₁:蔗糖,C₂: 葡萄糖,C₃: 果糖,C₄: 麦芽糖,C₅: 乳糖,C₆: 糊精,C₇: 淀粉;N₁:硝酸钠,N₂ 氯化铵:,N₃:硝酸钾,N₄:硫酸铵,N₅:硝酸铵,N₆:牛肉膏,N₇:酵母膏,N₈:蛋白胨;各图中柱子上方凡是有一个相同大、小写字母者,分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异不显著(Duncan’s 法).

图 1 培养液中碳源和氮源对絮凝活性的影响

Fig.1 The biofloculant effects of different carbon and nitrogen sources utilized by strain YH39

2.3 培养温度和初始 pH 对絮凝活性的影响

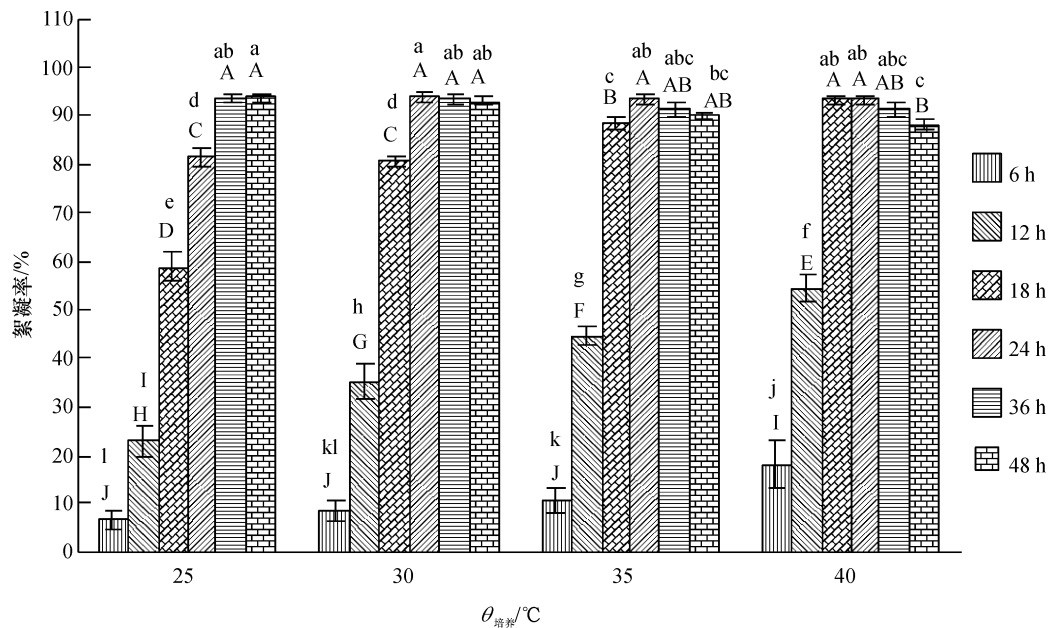
培养温度对絮凝活性的影响见图 2,在 25~40℃各温度梯度下,培养液的最高絮凝活性差异不显著,均可达到 94%左右,但温度越高,絮凝活性达到最高所需的培养时间越少,如在 25℃时达到最高絮凝活性所需时间为 48 h,而 40℃所需时间仅为 18 h,且从图 2 中还可得知,培养温度越高,达到最高絮凝活性后,随培养时间的延长,絮凝活性降低的速度越快.

菌株 YH39 在初始 pH 为 5.5~7.5 的范围内均可以较好的产絮凝活性物质,尤其是在初始 pH 为 6~7 之间产絮凝活性物质最多,培养液的絮凝率高达 94%.而当初始 pH 在碱性条件下,培养液的絮凝活性显著下降,特别是在初始 pH 为 9 时,培养液的絮凝率仅为 28.9%.

2.4 发酵过程动力学的研究

发酵过程中,溶氧量在发酵开始 4 h 后急剧下降,同时此阶段发酵液 pH 随之下降,在发酵第 10 小时溶氧量下降到 16.2 mg·L⁻¹,pH 下降到 6.19.在发酵第 16 小时,pH 开始回升,溶氧量也开始回升,此后,发酵液的 pH 和溶氧量一直上升.如果剔除在发酵第 12 小时提高搅拌转速和通气量的影响,发酵液的溶氧与 pH 几乎呈一致的变化趋势.

在发酵第 18 小时之前,菌体浓度(D_{600nm})迅速升高,随着菌体浓度不断地增大,发酵液的絮凝活性也不断增大,在发酵第 18 小时菌体浓度达到最高,发酵液的絮凝活性也达到最高,而在发酵第 18~36 h,菌体浓度不断下降,发酵液的絮凝活性维持在高位不再增加(图 3).



同一培养温度不同柱子上方凡是有个相同大、小写字母者,分别表示在 0.01、0.05 水平差异不显著 (Duncan's 法)。
图 2 不同培养温度对絮凝活性的影响

Fig. 2 Effects of different culture temperatures on the flocculation activity

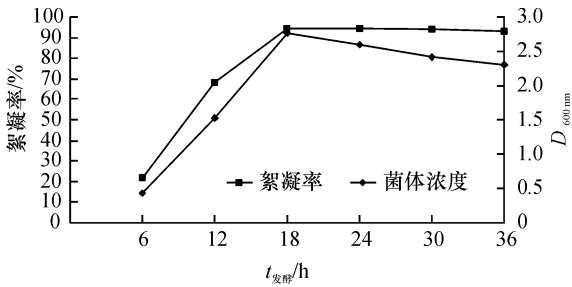


图 3 发酵过程菌体浓度和絮凝活性的动态变化
Fig. 3 The dynamic changes of biomass concentration and flocculating activity in the fermentation process

在整个发酵阶段,菌株 YH39 的生长延迟期非常短,在发酵第 4 小时菌株进入对数生长期,pH、溶氧量迅速下降,菌体浓度和发酵液的絮凝活性也迅速增加.在发酵第 16 小时,pH、溶氧量开始回升,菌体浓度也几乎达到最高值.菌株生长的稳定期非常短,发酵第 18—36 小时,菌株的生长进入衰亡期,菌体浓度下降很快,pH、溶氧量继续回升.在发酵过程中絮凝活性与菌体浓度呈现了一定的相关性.

2.5 絮凝体系的 pH 和金属离子对絮凝活性的影响

絮凝体系的 pH 对絮凝活性的影响见图 4.该絮凝剂在酸性条件下的絮凝率非常低,而在碱性条件下,絮凝活性很好,絮凝率随着 pH 的升高而增加,当 pH 为 8 时絮凝率达到 96.1%,但再增加高岭土悬液的 pH 对絮凝率的提高不显著.

与不加离子的空白对照相比,Na⁺对絮凝活性无促进作用,Fe²⁺对絮凝活性有抑制作用,而其他各金属离子对絮凝活性均有显著的促进作用,其中又以

<http://xuebao.scau.edu.cn>

Ca²⁺的助凝效果最好,Mg²⁺次之,结果说明,此絮凝剂需在 Ca²⁺等阳离子的助凝作用下才能表现好的絮凝活性.

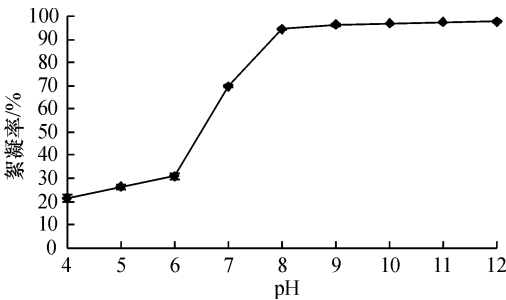


图 4 絮凝体系 pH 对絮凝活性的影响
Fig. 4 The flocculation effects with different pH values

2.6 絮凝活性成分分布、耐热性及成分

发酵液、离心后的上清液及菌细胞悬液絮凝效果分析表明,具有絮凝活性的成分大部分存在于发酵离心后的上清液中,其絮凝率达 93.0% 左右,离心后菌体制成的菌细胞悬液的絮凝活性非常低,絮凝率仅为 10% 左右.这说明絮凝活性成分是菌体在生长过程中分泌到发酵液中的代谢产物,菌体本身几乎不起絮凝作用.对离心上清液和发酵液分别加热至 60、80 和 100 °C,随着温度的升高,发酵液的絮凝活性有所降低.发酵液在 100 °C 加热 30 min 后,对高岭土的絮凝率仍然维持在 91%,而在 60 °C 加热 30 min 后,絮凝活性与不加热差异不显著,说明此絮凝剂的耐热性较好.

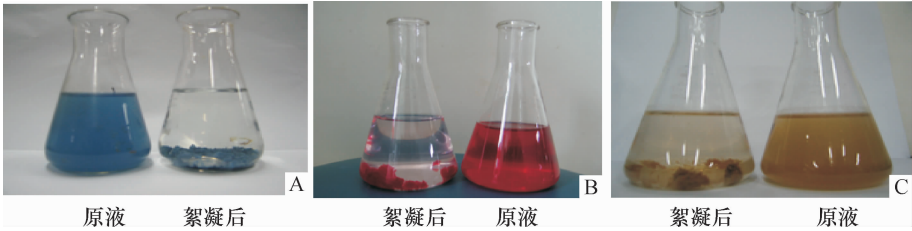
采用高速离心、乙醇沉淀、干燥等过程后得到絮凝剂粗提品.经检测,絮凝剂粗提品的 1 000 倍稀释

液的絮凝率为 86.2%。絮凝剂粗提品的稀释液在 260 和 280 nm 处未发现特征吸收峰,初步表明絮凝剂成分中无核酸类物质和蛋白质。进一步的双缩脲反应及茚三酮反应试验结果表明,絮凝剂成分中无蛋白质或氨基酸成分。Molish 反应和蒽酮反应结果表明,絮凝剂中含有糖类物质。

2.7 废水处理

用粗提取的絮凝剂处理广州市兴利洗水厂废水,废水的 $D_{550\text{ nm}}$ 由 0.974 下降到 0.021, COD_{Cr} 由 418.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 115.7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;用该絮凝剂处理佛山

市高明区汇益废水,废水的 $D_{550\text{ nm}}$ 由 0.729 下降到 0.083, COD_{Cr} 由 421.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 165.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;用粗提取的絮凝剂处理佛山市高明区骏有废水,废水的 $D_{550\text{ nm}}$ 由 0.948 下降到 0.034, COD_{Cr} 由 519.6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降到 114.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 说明用该絮凝剂处理 3 种不同废水的生物絮凝效果显著(图 5),脱色率与化学絮凝剂(聚合碱式铝、聚合碱式铝 + 聚丙烯酰胺)相当, COD_{Cr} 的去除率均比这 2 种化学絮凝剂低。但试验中的 3 种废水经微生物絮凝剂处理后,剩余 COD_{Cr} 不是很高,达到 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的国家二级排放标准。



A:广州市兴利洗染厂废水;B:佛山市高明区汇益废水;C:佛山市高明区骏有废水。

图 5 絮凝剂对 3 种不同印染废水的处理效果

Fig. 5 Effects of biofloculants on the three types of different dyeing wastewater

3 讨论与结论

目前国内外的研究者主要从污水、活性污泥或土壤中筛选和分离微生物絮凝剂产生菌,而对产絮凝剂的植物内生菌的筛选还很少报道。本研究筛选到 1 株分离自药用野生稻 *Oryza officinalis* 能产絮凝剂的固氮菌株 YH39,表明微生物絮凝剂产生菌的来源非常广泛。

Shih 等^[26]报道地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* CCRC12826 的受试碳源中,葡萄糖、果糖、乳糖均不利于絮凝剂合成,而戊烯二酸、柠檬酸、甘油则是絮凝剂合成的有利碳源,地衣芽孢杆菌 CCRC12826 能利用氯化铵作为氮源合成絮凝剂,其他铵盐如硫酸铵则效果不佳,使用硝酸铵时甚至无法合成絮凝剂。彭辉等^[27]认为蔗糖是 TH6 产絮凝剂的良好碳源,产生的菌量相对较多,其次为葡萄糖,而以其他物质为碳源时,絮凝率较低,以硝酸钠为氮源,絮凝效果最好,产生的菌量也最多,而以硫酸铵作氮源时,虽然菌体生长较旺盛,但培养液絮凝活性很差。由此可见不同种类的微生物产絮凝剂最适的碳源、氮源相差很大。在本研究中发现 YH39 产絮凝剂最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为硝酸钾。研究还发现无机盐 MgSO_4 和 FeSO_4 代替 Döbereiner-basic 和 Fe(III) EDTA 加入基础培养液中,培养液的絮凝活性不受影响。但如果不加入这些无机盐,培养液会产酸, pH 下降明显,非常不利于絮凝剂的合成,这与游映玖^[28]研究得出 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 会抑制培养基中絮凝剂的分泌的

结果不同,但与黄晓武等^[29]研究的结果相似。可能是不同的微生物合成絮凝剂的机制不同。

培养温度主要影响菌株 YH39 的絮凝活性达到最高时所需的培养时间,而对其絮凝活性的最高值影响不显著,但培养温度高会在培养后期不利于絮凝活性的稳定。虽然从生理生化试验中发现菌株 YH39 可以在 pH 4 ~ 9 的环境中正常生长,但菌株 YH39 在 pH 为 6 ~ 7 的中性条件下培养,发酵液的絮凝活性最好,过酸或过碱的环境均不利于絮凝剂的合成。菌株 YH39 在装液量低和摇床转速高的条件下,培养液的絮凝活性要显著高于装液量高和摇床转速低的条件下的絮凝活性,这表明充足的氧气供给有利于此菌产微生物絮凝剂,这与大部分其他微生物絮凝剂生产菌类似。接种量在 0.2% ~ 4.0% 之间,絮凝活性变化不显著,但当接种量超过 8% 时,絮凝活性显著下降。主要原因可能是接种量过高会带入过多种子液里的代谢废物到发酵液中,从而影响絮凝活性。

该絮凝剂在 pH 8 以上的碱性环境中能表现出较高的絮凝活性,不适宜处理酸性较强的废水,絮凝剂的絮凝能力受 pH 影响的原因是酸碱度的变化会改变生物聚合物的带电状态和中和电荷的能力以及被絮凝物质的颗粒带电情况^[30]。目前从国内外对微生物絮凝剂的提取和成分鉴定结果来看,大部分微生物絮凝剂属于多糖类物质,泰国的 Dermim 等^[31]分离到克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp. S11,其所产絮凝剂通过红外光谱分析及各种化学分析,确定是一种酸

性多糖. 本研究获得絮凝剂的粗提品, 初步确定其成分为多糖类物质.

印染废水成分复杂、色度大、浓度高且生物难降解物质多, 是较难处理的工业废水之一. 本研究的絮凝剂对3种印染废水的脱色率与传统的化学絮凝剂差不多, 但生物絮凝剂不会造成二次污染. 虽然生物絮凝剂对废水 COD_{Cr} 的去除率比传统絮凝剂低, 但应用此絮凝剂处理这3种废水后, 其 COD_{Cr} 、pH 能够达到国家二级排放标准, 显示了此絮凝剂的应用前景.

参考文献:

- [1] 俞淑红. 新型高效微生物絮凝剂在废水处理中的应用[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2011, 31(10): 40-45.
- [2] 周群英, 高延耀. 环境工程微生物学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 340.
- [3] 胡勇有, 高健. 微生物絮凝剂的研究与应用进展[J]. 环境科学进展, 1999, 7(4): 24-29.
- [4] 崔蕴霞, 肖锦. 铝盐絮凝剂及其环境效应[J]. 工业水处理, 1998, 18(3): 6-9.
- [5] 吕新之. 铝的污染和危害[J]. 环境保护, 1998(5): 38-39.
- [6] 焦扬, 高海宁, 郑秀芳, 等. 微生物絮凝剂的絮凝性及抗氧化性研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(10): 130-133.
- [7] 王兰, 唐静, 赵璇. 微生物絮凝剂絮凝机理的研究方法[J]. 环境工程学报, 2011, 5(3): 481-488.
- [8] 任文萍, 柴涛. 微生物絮凝剂的研究及在废水处理中的应用[J]. 广州化工, 2011, 39(12): 34-35.
- [9] 宋京津, 李科林. 微生物絮凝剂处理重金属废水及贵金属回收的研究进展[J]. 消费导刊, 2011(6): 130-131.
- [10] 张艳君, 张志强, 戴晓晴, 等. 微生物絮凝剂廉价制备的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 434-436.
- [11] 雷青娟, 张正国. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝特性的研究[J]. 安徽农学通报, 2011, 17(13): 29-31.
- [12] 魏炜, 李英燕, 王天蛟, 等. 微生物絮凝剂絮凝特性研究[J]. 沈阳建筑大学学报: 自然科学版, 2011, 27(6): 1168-1172.
- [13] 张冬, 向艳丽, 彭其安, 等. 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及絮凝试验[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(1): 66-68.
- [14] COSA S, MABINYA L V, OLANIRAN A O, et al. Bio-flocculant production by *Virgibacillus* sp. Rob isolated from the bottom sediment of Algoa Bay in the Eastern Cape, South Africa[J]. Molecules, 2011, 16(3): 2431-2442.
- [15] NIE M, YIN X, JIA J, et al. Production of a novel bio-flocculant MNXY1 by *Klebsiella pneumoniae* strain NY1 and application in precipitation of cyanobacteria and municipal wastewater treatment[J]. J Appl Microbiol, 2011, 111(3): 547-558.
- [16] NONTEMBISO P, SEKELWA C, LEONARD M V, et al.

Assessment of bioflocculant production by *Bacillus* sp. Gilbert, a marine bacterium isolated from the bottom sediment of Algoa Bay[J]. Mar Drugs, 2011, 9(7): 1232-1242.

- [17] PATIL S V, PATIL C D, SALUNKE B K, et al. Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163(4): 463-472.
- [18] 何宁, 李寅, 陈坚, 等. 生物絮凝剂的最新研究进展及其应用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 104-108.
- [19] COSA S, MABINYA L V, OLANIRAN A O, et al. Production and characterization of bioflocculant produced by *Halobacillus* sp. Mvuyo isolated from bottom sediment of Algoa Bay[J]. Environ Technol, 2012, 33(7/8/9): 967-973.
- [20] MABINYA L V, COSA S, NWODO U, et al. Studies on bioflocculant production by *Arthrobacter* sp. Raats, a freshwater bacteria isolated from Tyume River, South Africa[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(1): 1054-1065.
- [21] PENG Guixiang, ZHANG Wu, LUO Huifen, et al. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(7): 1650-1655.
- [22] DENG S B, BAI R B, HU X M, et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60(5): 588-593.
- [23] 朱艳彬, 马放, 杨基先, 等. 絮凝剂复配与复合型絮凝剂研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2010, 42(8): 1254-1258.
- [24] 朱艳彬, 马放, 黄君礼, 等. 生物絮凝剂絮凝特性与絮凝条件优化研究[J]. 中国给水排水, 2006, 22(3): 4-8.
- [25] 刘燕萍. COD_{Cr} 测定中影响因素的探讨[J]. 化学分析计量, 2011, 20(1): 90-91.
- [26] SHIH I L, VAN Y T, YEH L C, et al. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties[J]. Bioresour Technol, 2001, 78(3): 267-272.
- [27] 彭辉, 尹华, 梁郁强, 等. 微生物絮凝剂产生菌的培养及其化学特征初探[J]. 环境科学与技术, 2002, 25(1): 6-7.
- [28] 游映玖. 微生物絮凝剂的研究现状和成果[J]. 环境科学与技术, 2002, 25(1): 43-45.
- [29] 黄晓武, 胡勇有, 浦跃武. 微生物絮凝剂产生菌的筛选和特性研究[J]. 工业用水与废水, 2002, 33(3): 5-7.
- [30] 尹华, 李桂娇, 彭辉, 等. 微生物絮凝剂 TH6 的絮凝特性研究[J]. 重庆环境科学, 2002, 24(2): 38-39.
- [31] DERMLIM W, PRASERTSAN P, DOELLE H. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52(5): 698-703.

【责任编辑 周志红】