

一株微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝特性

魏明宝, 叶长明, 任屹罡, 杨艳琴, 赵继红

(郑州轻工业学院 河南省表界面科学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要:从污水处理厂活性污泥中筛选出一株具有絮凝性能的菌株,初步鉴定为假单胞菌.对该菌株产生的絮凝剂对高岭土的絮凝效果进行了研究,结果表明:当发酵液 pH=7.0,投量体积分数为2.5%,助凝剂采用 CaCl₂ 且投量为 1.0 g/L 时,对 4.0 g/L 的高岭土悬液的絮凝效果最佳,絮凝率为 91.6%.絮凝剂主要成分为蛋白质,其活性成分主要分布在离心后沉淀中.

关键词:微生物絮凝剂;活性污泥;菌株筛选;絮凝活性

中图分类号:Q939.97 **文献标志码:**A

The screen and characterization of a microbial flocculant-producing bacterium

WEI Ming-bao, YE Chang-ming, REN Yi-gang, YANG Yan-qin, ZHAO Ji-hong

(He'nan Provincial Key Lab. of Surface and Interface Sci., Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A strain with flocculation activity was screened from return activated sludge from secondary settling tank and was identified as *Pseudomonas*. The effects of flocculant producing from this strain on kaolin suspension were investigated. The results showed that the flocculation effect on 4.0 g/L kaolin suspension was the best when fermentation liquor pH was 7.0, bioflocculant dosage was 2.5% (V/V), coagulant aid CaCl₂ dosage was 1.0 g/L and flocculation rate was 91.6%. The main components were protein, the active components of the flocculant mostly existed in deposition after centrifugation.

Key words: microbial flocculant; activated sludge; strain screen; flocculation activity

0 引言

微生物絮凝剂是一类由微生物分泌的,具有高效、无毒、无二次污染和易于生物降解等特点的新型絮凝剂,在生活污水和工业污水处理方面都有广泛的应用前景^[1].我国从1980年代开展对生物絮凝剂的研究,1990年代后期进入高潮,取得了相当的成就^[2-3].但我国生物絮凝剂的研制和应用大部分还处于实验室研究阶段,真正应用于工程实际的较少^[4].深入研究生物絮凝剂的特性,开发适应特定

废水的微生物絮凝剂,具有重要的经济意义.高岭土具有质地柔软、性能稳定、易分散、悬浮于水中等特性,可用其为介质测定絮凝性能.本文拟从活性污泥中筛选1株高效微生物絮凝剂的产生菌,对其产生的微生物絮凝剂的絮凝性能、活性分布、组分等进行研究.

1 实验

1.1 微生物絮凝剂产生菌的筛选

1.1.1 材料 菌种来源:郑州市五龙口污水处理厂

收稿日期:2012-02-13

基金项目:河南省重大公益项目(101100910300)

作者简介:魏明宝(1972—),男,河南省光山县人,郑州轻工业学院副教授,硕士,主要研究方向为环境微生物.

二沉池回流活性污泥。

分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(培养细菌用)、高氏1号培养基(培养放线菌用)、孟加拉红培养基(培养霉菌用)。

筛选培养基:葡萄糖 20 g,酵母浸膏 0.5 g,脲 0.5 g, K_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 2 g, NaCl 0.1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g,水 1 000 mL, pH = 7.0, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.2 筛选 将活性污泥中的微生物用稀释涂布平板法分离后,经划线分离纯化。分别接种到筛选培养基中,37 °C, 150 r/min 摇床培养,72 h 后取 1 mL 上清液,加到含 0.1 g 高岭土的 50 mL 比色试管中定容,调节 pH = 7.0,摇匀,使高岭土悬浊液絮凝成大颗粒的有絮凝活性的菌株。

将初筛获得的具有絮凝活性的菌株重复上述操作,比色管定容后静置几 min,取上清液于分光光度计在 550 nm 处测定上清液的吸光度,以不加培养液的菌株为对照。絮凝率

$$E = [(A - B) / A] \times 100\%$$

式中, A 为对照的吸光度值, B 为加入培养液的样品的吸光度值。

1.2 菌种鉴定

1.2.1 菌落形态观察 在牛肉膏蛋白胨培养基上观察微生物絮凝剂高效产生菌的菌落形态。

1.2.2 生理生化实验 为研究菌株的生理生化特性,参照生理生化实验方法进行淀粉水解、产硫化氢和油脂水解等实验^[5]。

1.3 絮凝特性实验

为了研究不同因素对絮凝性能的影响,通过单因素实验研究不同培养时间、絮凝活性分布、不同絮凝剂投加量、不同 pH 值、不同高岭土浓度、不同金属离子、不同 $CaCl_2$ 浓度对絮凝率的影响。将接种菌液以 2% 接种到液体培养基中,于 37 °C, 150 r/min 进行摇床培养^[6]。

1.3.1 絮凝率随菌种培养时间的变化 在 250 mL 的三角瓶中装入 100 mL 通用发酵液体培养基,灭菌后接菌种,振荡培养,24 h 后取样,测定发酵液对高岭土悬液的絮凝率。

1.3.2 絮凝活性分布 将发酵液经 4 000 r/min 离心分离,沉淀,用与离心时发酵液等体积的蒸馏水溶解,然后分别测定对高岭土悬液的絮凝率。

1.3.3 絮凝剂投加量对絮凝率的影响 在 1.50 mL

的离心管中分别加入 0 mL, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.8 mL, 1.0 mL 的发酵菌液,用没有接种的发酵液体培养基定容至 1.0 mL,进行絮凝试验,计算絮凝率。

1.3.4 pH 值对絮凝率的影响 取 16 支比色管,各加入 20 mL 浓度为 4 g/L 的高岭土悬液,8 支加菌种发酵液,8 支加空白发酵液作为对照,分别调节高岭土悬液的 pH 值为 1,2,3,4,5,6,7,8,进行絮凝试验,计算絮凝率。

1.3.5 高岭土浓度对絮凝率的影响 在比色管中分别加入浓度为 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 6 g/L 的高岭土悬液,进行絮凝试验,计算絮凝率。

1.3.6 金属离子对絮凝活性的影响 在比色管中分别加入 0.5 mL 浓度为 0.1 g/L 的 $CaCl_2$, 0.2 g/L 的 NaCl, 0.05 g/L 的 $Al_2(SO_4)_3$, 0.1 g/L 的 $CuSO_4$, 0.1 g/L 的 $MgSO_4$ 和 0.5 mL 的无菌水进行试验,计算絮凝率。

1.3.7 不同 $CaCl_2$ 浓度的助凝效果比较 分别将 0.1 mL, 0.2 mL, 0.8 mL, 1.4 mL, 2.0 mL 质量分数为 2.5% 的 $CaCl_2$ 溶液加入比色管中进行试验,计算絮凝率。

1.4 微生物絮凝剂的 SEM 显微结构观察与红外光谱测试

1.4.1 微生物絮凝剂的提取制备 将得到的纯种菌株接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中,恒温摇床培养 24 h,然后接种到通用发酵培养基中培养 48 h。将得到的发酵液在 4 000 r/min 条件下离心,上清液在 10 000 r/min 条件下离心,沉淀于 65 °C 烘干。

1.4.2 SEM 显微结构观察 对样品表面用喷金处理后用日本 Jeol 公司生产的 JSM—6490LV 型扫描电子显微镜进行电镜扫描^[7]。

1.4.3 红外光谱测试 对样品压片后采用美国尼高力公司生产的 Nicolet5700 型傅里叶红外光谱仪进行红外光谱测试^[7]。

2 结果与讨论

2.1 筛选及鉴定结果

2.1.1 形态特征 筛选的高效絮凝剂产生菌经革兰氏染色阴性,细胞为杆状,无芽孢,无荚膜,无周生鞭毛。菌落初期形状为圆形,白色,边缘整齐,后期表面粗糙,菌落变黄,边缘不整齐,有单生鞭毛。光学显微镜下细菌形态如图 1 所示。



图1 细菌个体形态 (×1 000 倍)

2.1.2 生理生化特征 该菌可水解淀粉,不产生硫化氢,可水解油脂.好氧条件生长,结合个体形态特征、菌落形态特征及生理生化实验,参照《伯杰细菌鉴定手册》(第8版)^[8],该菌初步鉴定为假单胞菌属.

2.2 絮凝特性实验

2.2.1 絮凝率随菌种培养时间的变化 絮凝率随菌种培养时间变化的情况见图2.从图2可以看出,在培养到第4 d时,发酵液的絮凝率出现一个拐点,表明此时菌体内生化反应发生变化.在第4 d以前,发酵液絮凝率逐渐升高,在第4 d达到最大值,之后迅速下降,后又缓慢上升直至稳定.这可能是因为第4—6 d期间,发酵液的pH值持续降低,在第6 d达到最低值,之后可能由于微生物絮凝剂的产生,发酵液的pH值又逐渐增大,故其絮凝率升高并趋于稳定.

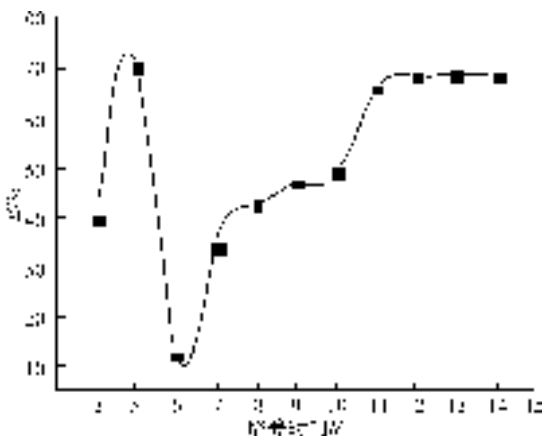


图2 絮凝率随菌种培养时间的变化

2.2.2 絮凝活性分布 微生物絮凝剂产生菌发酵液及其离心后的上清液和沉淀水溶液的絮凝率见图3.从图3可以看出,该菌产生的絮凝剂的

成分大部分在沉淀中,小部分位于上清液,没有离心的发酵液的絮凝率为54.5%,即沉淀的等体积水溶液比离心前的菌体发酵液的絮凝率要高.这与以往文献中报道的结果(絮凝活性物质大多存在于上清液中,而沉淀中几乎没有絮凝活性物质)不同,这说明该絮凝活性物质在离心时小部分被分泌到上清液中,大部分仍存在于细胞壁上.

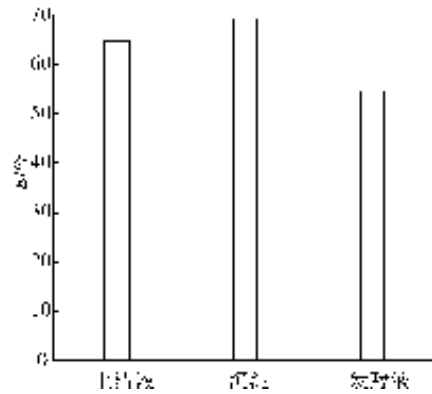


图3 絮凝剂的絮凝活性分布

2.2.3 絮凝剂投加量对絮凝率的影响 絮凝率随发酵菌液投加量变化的情况见图4.从图4可见,当菌体发酵液投加量为2.5% (V/V)时絮凝效果最好.这可能是因为絮凝剂投量不足时,不能有效形成架桥作用,达不到较好的絮凝效果;而絮凝剂投量过多时,又会使悬浮物产生互相排斥的电荷而无法沉淀.

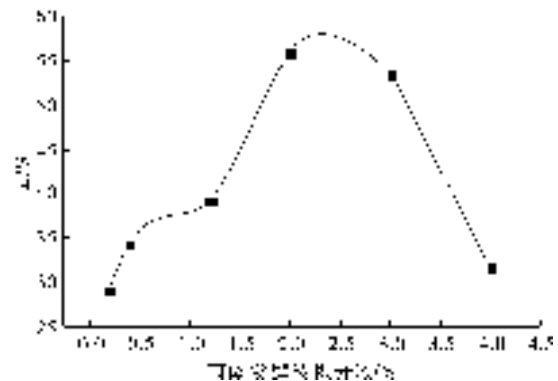


图4 絮凝剂投加量对絮凝率的影响

2.2.4 pH值对絮凝率的影响 絮凝率随高岭土悬液pH值变化的情况如图5所示.由图5可以看出,在溶液pH=6.8~7.8时,絮凝率较高.偏碱性条件下的絮凝效果好于偏酸性条件,这是因为溶液pH值改变了絮凝剂的带电状态,对于

微生物絮凝剂产生菌, 偏碱性的条件有利于絮凝剂架桥作用. 最佳 pH 值取 7.0.

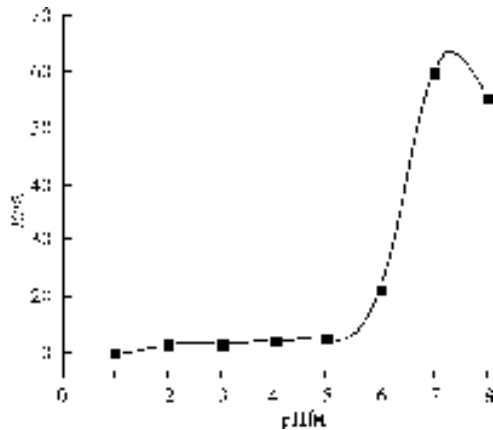


图 5 pH 值对絮凝率的影响

2.2.5 高岭土浓度对絮凝率的影响 絮凝率随高岭土浓度的变化如图 6 所示. 由图 6 可以看出, 高岭土悬液浓度为 4.0 g/L 左右时, 絮凝效果较好. 这可能是当高岭土浓度太高时, 絮凝剂不足, 不能有效形成架桥; 当高岭土浓度太低时, 絮凝剂相对过剩, 使悬浮物产生互相排斥的电荷无法有效沉淀.

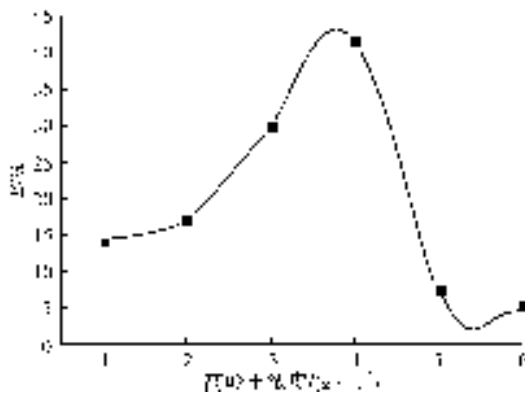


图 6 高岭土浓度对絮凝率的影响

2.2.6 金属离子对絮凝活性的影响 实验结果见表 1. 由表 1 可知, 不同金属离子对微生物絮凝剂絮凝效果的影响各异. Cu^{2+} 助凝效果差, 不宜作为助凝剂; Ca^{2+} 絮凝效果最好, 且空白对照和絮凝后的吸光度值最低. 因此选择 CaCl_2 作为助凝剂, 其助凝效果好并且较为经济.

2.2.7 不同 CaCl_2 浓度的助凝效果比较 不同 CaCl_2 浓度的助凝效果如图 7 所示. 由图 7 可知, CaCl_2 浓度低于 1.0 g/L 时, 絮凝率随着 CaCl_2 浓度的增大而增加; 当 CaCl_2 浓度高于 1.0 g/L 时,

絮凝率则随着 CaCl_2 浓度的增加而降低. CaCl_2 的最佳投加量为 1.0 g/L 左右.

表 1 金属离子对絮凝活性的影响

溶液组成	A 样品	A 空白	絮凝率 E/%
高岭土 + Na^+	0.110	0.891	87.7
高岭土 + Ca^{2+}	0.096	0.872	89.0
高岭土 + Al^{3+}	0.170	0.892	80.9
高岭土 + Mg^{2+}	0.175	0.896	80.5
高岭土 + Cu^{2+}	0.833	0.890	6.4
高岭土 + 无菌水	0.159	0.939	83.1

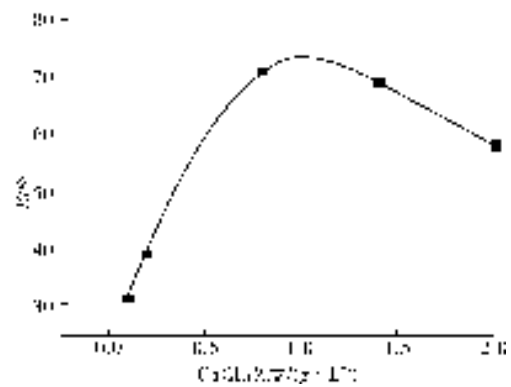


图 7 CaCl_2 浓度对絮凝率的影响

2.2.8 最优条件下絮凝剂絮凝效果 发酵 4 d 条件下产生的发酵液投加量为 2.5% (V/V), 高岭土浓度为 4.0 g/L, pH = 7.0, CaCl_2 浓度为 1.0 g/L 时, 絮凝剂的絮凝率为 91.6%.

2.3 微生物絮凝剂的化学组成分析

2.3.1 微生物絮凝剂的电镜扫描结果 经冷冻干燥后得到干燥的微生物絮凝剂, 其电镜扫描结果见图 8. 由图 8 可见, 该菌产生的微生物絮凝剂的形态几乎全为杆状, 颗粒大小在 60 μm 左右.

2.3.2 微生物絮凝剂的红外光谱分析 微生物絮凝剂的红外光谱图见图 9. 微生物絮凝剂的红外光谱图显示其具有蛋白质特征. 在 3 200 ~ 3 500 cm^{-1} 内有强且宽的吸收峰, 波峰在 3 296.8 cm^{-1} 处, 为 N—H 键伸缩振动; 在 1 020 ~ 1 220 cm^{-1} 有一吸收峰, 最大吸收波长在 1 116.1 cm^{-1} 处, 为 C—N 键伸缩振动, 说明絮凝剂中含有— NH_2 ; 在 2 500 ~ 3 000 cm^{-1} 处有一中强吸收峰, 最大吸收波长在 2 927.2 cm^{-1} 处, 为 O—H 键伸缩振动. 1 653.9 cm^{-1} 处的吸收峰是 C=O 伸缩振动形成的, 1 240.9 cm^{-1} 处的吸收峰是 C—O 键伸缩振动形成的, 说明絮凝剂中含有—COOH. 又因

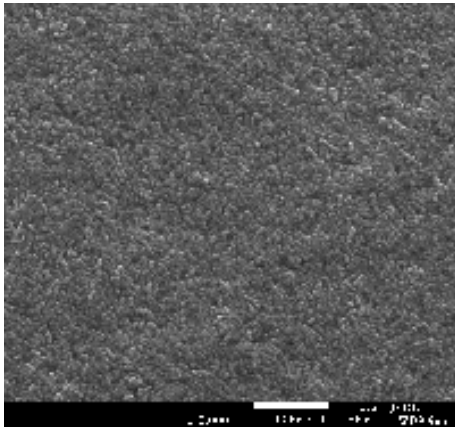


图8 微生物絮凝剂的电镜扫描图

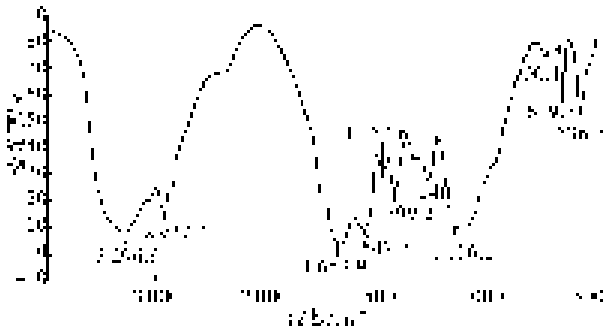


图9 微生物絮凝剂的红外光谱图

3 296.8 cm^{-1} 处的吸收峰是 N—H 键伸缩振动形成的,1 653.9 cm^{-1} 处的吸收峰是 C=O 伸缩振动形成的,说明絮凝剂中含有—CONH。

3 结论

从郑州市五龙口污水处理厂二沉池回流污

泥中筛选得到一株具有良好絮凝活性的微生物絮凝剂产生菌,该菌经初步鉴定为假单胞菌属。培养 4 d 的该菌株发酵液对浓度为 4.0 g/L 的高岭土悬液最佳絮凝条件为:发酵液加入量体积分数为 2.5%,溶液 pH = 7.0,助凝剂采用 CaCl_2 ,投加量为 1.0 g/L。该条件下絮凝率为 91.6%。该菌产生的微生物絮凝剂在电镜扫描下为杆状,由红外光谱图分析知其主要成分为蛋白质,其活性成分主要分布在离心后的沉淀中。

参考文献:

- [1] 袁辉洲,王志. 微生物絮凝剂的絮凝性能及其絮凝形态研究[J]. 环境科学与技术,2010,33(6):76.
- [2] 夏莉莉,赵晓祥,卢嘉. 复合微生物絮凝剂产生菌 XL₁ 的优化条件[J]. 环境科学导刊,2011,30(1):10.
- [3] 罗平,智芳芳,黄程峰,等. 絮凝剂产生菌的筛选鉴定及其在废水处理中的应用[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2011,31(2):188.
- [4] 易华. 生物絮凝剂的研究及应用现状[J]. 大庆师范学院学报:自然科学版,2006,26(2):57.
- [5] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京大学出版社,2008.
- [6] 屹立,赵吉,刘君,等. 高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝特性分析[J]. 中国给水排水,2007,23(21):62.
- [7] 朱富坤,刘彬彬,闫永胜,等. 微生物絮凝剂 PF₂ 的成分分析及絮凝机制研究[J]. 环境污染与防治,2008,30(2):37.
- [8] 布钦南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京:科学出版社,1984:284-285.