

文章编号:1673-1689(2007)02-0087-05

絮凝剂产生菌 *Diaphorobacter* Z-052 的发酵研究

周杰, 张苓花, 王运吉

(大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要:从污水处理厂活性污泥中筛选出 1 株有絮凝活性的细菌 Z-052,经分子生物学鉴定为 *Diaphorobacter* 属。对 Z-052 产絮凝剂的发酵条件进行了优化。研究结果表明,在优化培养基中,于 30 ℃ 培养 72 h,其发酵液对 4 g/L 高岭土悬液的絮凝活性可达 93.2%。Z-052 絮凝剂对活性炭、土壤、酵母等固体颗粒悬液的絮凝活性分别达到 95.1%、80.4% 和 72.4%。

关键词:生物絮凝剂; *Diaphorobacter* 属细菌; 培养条件

中图分类号: X 172

文献标识码: A

Study on Fermentation Condition of Bioflocculant by *Diaphorobacter* Z-052

ZHOU Jie, ZHANG Ling-hua, WANG Yun-ji

(College of Bio and Food Engineering Dalian Institute of Light Industry; Dalian 116034, China)

Abstract: A flocculant-producing strain was isolated from the activated sludge and identified as genus *Diaphorobacter*, which named as *Diaphorobacter* Z-052. The effect of initial pH, culture temperature and different ion on flocculant production was careful investigated. A highest flocculating activity was achieved at 93.2% by combination of the optimum culture conditions. Furthermore, the bioflocculant production by *Diaphorobacter* Z-052 treat active carbon, soil and yeast was study, 95.1%, 80.4% and 72.4% flocculating activity was observed at carbon, soil and yeast, respectively.

Key words: bioflocculant; *Diaphorobacter*; culture conditions

絮凝剂被广泛应用于废水处理、食品加工和化工等工业过程。目前使用的絮凝剂按其来源和性质可分为无机絮凝剂、有机高分子絮凝剂和天然生物高分子絮凝剂。无机絮凝剂不易降解,且其单体可能是神经毒剂和致癌、致突变因子,现在许多领域已禁止或限量使用^[1]。微生物絮凝剂是一类新型水处理药剂^[2-4],是一种具有安全、高效、可生物降解、不污染环境等特点的新型絮凝剂^[5],是从某些微生物获得的生物絮凝剂,包括利用微生物细胞壁提取物的絮凝剂、利用微生物代谢产物的絮凝剂

和直接利用微生物细胞的絮凝剂 3 大类。其中以微生物的代谢产物为主,主要包括糖蛋白、多糖、蛋白质等^[6-9]。

目前,国外已有微生物絮凝剂的工业生产,而国内仅限于筛选高效菌种、菌种培养条件、絮凝条件及絮凝性能等方面的研究,但这也是对微生物絮凝剂进行深入研究(如絮凝机理、菌种的遗传特性、工程菌的组建等)的基础^[10]。本文作者从活性污泥中筛选了絮凝剂产生菌株 *Diaphorobacter* Z-052,并对该菌株的发酵条件及絮凝剂的性质进行了研究。

收稿日期:2006-02-22.

基金项目:辽宁省省级高校发酵工程重点实验室资助项目(辽发重开 2004-002).

作者简介:周杰(1980-),女,辽宁沈阳人,酶及蛋白质工程硕士研究生. Email: redsky209@163.com

1 材料与方法

1.1 分离样品

大连市春柳河污水净化处理厂沉降池内活性污泥,污泥呈深褐色,固体状。取样时,弃其表面干燥污泥,取靠近表面的较湿润污泥。

1.2 培养基

细菌分离所用培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, H₂O 1L, pH 为 7.2~8.0;

种子培养基(g/dL):蔗糖 2, 酵母膏 0.2, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ 0.05; pH=7.0。

发酵基本培养基(g/dL):蔗糖 2, 酵母膏 0.2, KH₂PO₄ 0.05, MgSO₄ 0.05; pH=7.0。

1.3 实验方法

1.3.1 筛选与絮凝活性测定 样品经富集培养后,平板划线获得单菌落,纯化后编号。将分离纯化的各菌株接种在装有 50 mL 培养基的 250 mL 的三角烧瓶中,于 30 ℃、150 r/min 摇床培养 72 h,分别测定各培养液的絮凝活性。在 25 mL 的量筒中加入 23.5 mL 质量浓度为 4 g/L、pH 7.0 的高岭土悬浊液,1 mL 培养液以及 0.5 mL 1 g/dL CaCl₂ 溶液,混合搅拌 5 min,静置 10 min,在液面下 5 mL 处吸取一定量的上清液,用 721 型分光光度计测定其上清液在波长 550 nm 处的吸光度。同时以蒸馏水代替培养液作对照实验,并用以下公式计算其絮凝活性。

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

A:对照上清液在 550 nm 处的吸光度;B:样品上清液在 550 nm 处的吸光度。

1.3.2 菌种鉴定 用 Takara(大连)有限公司试剂盒进行 16sr1A PCR 扩增,用 Takara(大连)有限公司试剂盒回收 PCR 产物。PCR 产物序列测定测序反应使用试剂盒 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Kit (PERKIN ELMER),在 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪上进行,由 Takara(大连)有限公司完成。

1.3.3 培养时间与絮凝活性的关系 在 250 mL 的三角瓶中装入 50 mL 发酵基本培养基,按 2.5% 接种量接种,在 30 ℃、150 r/min 条件下摇床培养,每隔 12 h 取样一次,测其絮凝活性。

1.3.4 生物量的测定方法 培养液于 550 nm 波长下测定吸光度。

1.3.5 培养液各组分别絮凝活性 将培养液于 20 ℃、5 000 r/min 离心 30 min,取上清液。菌体用无菌水洗涤后悬浮在与上清液等体积的无菌水中,定

量测定培养液、上清液及菌细胞悬液对高岭土的絮凝活性。

1.3.6 培养基成分对菌产絮凝剂的影响 采用不同碳源和氮源在相同的培养条件下进行培养,以絮凝活性为指标,确定最适的碳源和氮源。采用单因素实验,确定培养基的最佳 C/N 比。

(1) 碳源对菌絮凝剂活性的影响:在酵母膏为 0.2 g/dL, KH₂PO₄ 0.05 g/dL, MgSO₄ 0.05 g/dL 的培养基中分别加入 2 g/dL 的不同碳源,调 pH=7.0。

(2) 氮源对菌絮凝剂活性的影响:在蔗糖为 2 g/dL, KH₂PO₄ 0.05 g/dL, MgSO₄ 0.05 g/dL 的培养基中分别加入 0.2 g/dL 的不同氮源,调 pH=7.0。

1.3.7 氮源浓度对菌絮凝剂活性的影响 在蔗糖为 2 g/dL, KH₂PO₄ 0.05 g/dL, MgSO₄ 0.05 g/dL 的培养基中分别加入 1、0.4、0.2、0.1 g/dL 的酵母膏,调 pH 为 7.0。

1.3.8 优化产絮凝剂的培养条件

1) 培养基初始 pH

以发酵基本培养基为基础,改变初始 pH,在 30 ℃和 150 r/min 条件下摇床培养 72 h。按 1.3.1 方法进行絮凝活性测定。

2) 培养温度

以发酵基本培养基为基础,分别采取不同培养温度,在 150 r/min 条件下摇床培养 72 h。按 1.3.1 方法进行絮凝活性测定。

3) 金属离子对絮凝剂生产的影响

在蔗糖 2 g/dL 和酵母膏 0.2 g/dL 中的培养基分别加入质量浓度为 0.05 g/dL 的不同种类的无机离子进行考察,在 30 ℃和 150 r/min 条件下摇床培养 72 h。以空白为对照。按方法 1.3.1 进行絮凝活性测定。

1.3.9 絮凝剂对不同固体颗粒悬液的絮凝性 配制 10 g/L 的活性炭、土壤、湿酵母悬液,用 0.5 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节 pH 至 7.0。向 25 mL 的量筒中加入 23.5 mL 各种固体颗粒悬液、1 mL 含微生物絮凝剂的培养液和 0.5 mL 1 g/dL 的 CaCl₂ 溶液。另配纯固体颗粒悬液和只加 0.5 mL 1 g/dL CaCl₂ 的溶液作对比试验。分别搅拌不同时间后,静置 10 min 测定各悬液的絮凝活性。

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选和鉴定

按方法“1.3.1”筛选出 15 株有絮凝活性的菌

株,选取活性最高的命名为 Z-052,经 16S rDNA PCR 扩增后再经序列分析测定该菌株为 *Diaphorobacter* 属。

2.2 培养时间与絮凝活性的关系

按方法“1.3.3”测定培养时间与絮凝活性的关系,结果如图 1 所示。由图 1 可知,随着培养时间的增加,絮凝活性逐步提高,培养 24 h 时,絮凝活性达 80.7%,72 h 时絮凝活性达到最高 90.3%,随后活性逐渐下降。

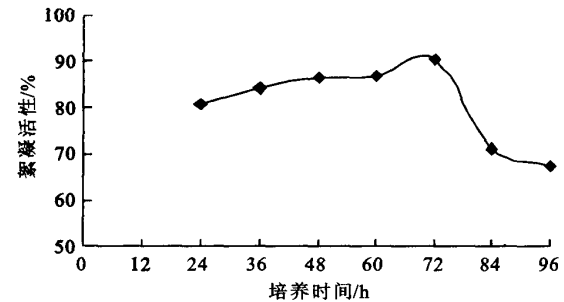


图 1 培养时间与絮凝活性关系
Fig. 1 Time course of the flocculating activity

2.3 培养体系中各组分的絮凝活性

按方法“1.3.5”测定培养液中各组分的絮凝活性,结果如图 2 所示。由图 2 可知,培养菌悬液絮凝活性为 91.5%,上清液的絮凝活性为 90%,菌体絮凝活性为 5.5%,说明絮凝成分主要分布在发酵液中,是细胞胞外分泌产物。

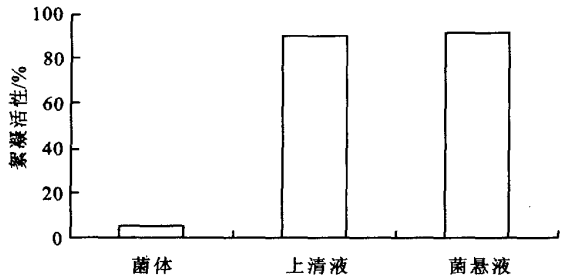


图 2 培养体系中各组分的絮凝活性
Fig. 2 Distribution of flocculating activity in culture broth and cell

2.4 培养基成分对菌产絮凝剂的影响

2.4.1 碳源对菌产絮凝剂的影响 按方法“1.3.6”测定碳源对菌产絮凝剂的影响,结果如表 1 所示。由表 1 可知,培养基的成分对菌体分泌的代谢产物有较大的影响。以葡萄糖为碳源时培养液的絮凝活性为 83.2%,以蔗糖为碳源时,其培养液的絮凝活性最高为 87.1%。

2.4.2 氮源对菌产絮凝剂的影响 按方法“1.3.6

(2)”测定氮源对菌产絮凝剂的影响,结果如表 2 所示。由表 2 可知,Z-052 能够在以无机氮为氮源的培养基中生长,但絮凝活性较低。而有机氮源有利于菌体产絮凝剂,以酵母膏为氮源时其培养液的絮凝活性达到最高 90.6%。

表 1 碳源对菌产絮凝剂的影响
Tab. 1 Effect of carbon sources in culture media on flocculant production

碳源	絮凝率/%	光密度
葡萄糖	83.2	0.35
蔗糖	87.1	0.322
淀粉	34	0.581
乳糖	51	0.349
果糖	34	0.101
D-半乳糖	50.7	0.332

表 2 氮源对菌产絮凝剂的影响
Tab. 2 Effect of nitrogen sources on flocculatn production

氮 源	絮凝率/%	光密度
牛肉膏	84	0.498
酵母膏	90.6	0.521
氯化铵	52.9	0.432
硝酸钠	63	1.324
硫酸铵	50.5	0.441
尿素	53.6	0.709
蛋白胨	88.5	0.434

2.5 氮源质量浓度对菌产絮凝剂的影响 按方法“1.3.7”测定氮源质量浓度对菌产絮凝剂的影响,结果如图 3 所示。

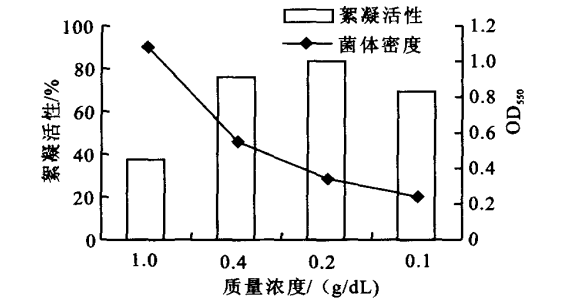


图 3 氮源质量浓度对菌产絮凝剂的影响
Fig. 3 Effect of nitrogen source density on flocculant production

由图 3 可知,氮源质量浓度对菌体生长影响较大,随着培养基中氮含量的减少生物量随之减少。

氮含量较高时有利于菌体的生长,但不利于絮凝剂的生成,当氮源质量分数为 1 g/dL 时,其培养液的光密度可达 1.078,絮凝活性为 37.9%。氮源为 0.2 g/dL 时,培养液的光密度为 0.341,絮凝活性达到最高 83.7%。

2.6 絮凝剂发酵条件优化

2.6.1 培养基初始 pH 对絮凝剂生成的影响 按方法“1.3.8(1)”考察培养基初始 pH 对菌产絮凝剂的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可知,pH 为 6 时,其培养液的絮凝活性为 85.9%,当 pH 达到 8 时,其培养液的絮凝活性达到最高 87.0%。可见该菌适应 pH 范围比较广泛,在中性范围内菌体生长情况较好,絮凝剂产量较高。

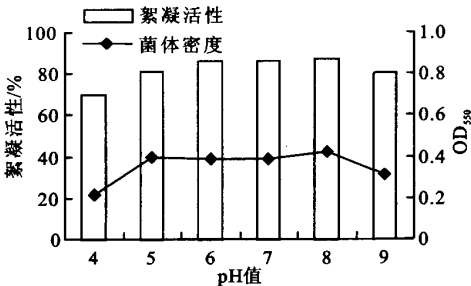


图 4 培养基初始 pH 对絮凝剂生成的影响

Fig. 4 Effect of initial pH on flocculant production

2.6.2 培养温度对絮凝剂生成的影响 按方法“1.3.8(2)”考察培养温度对絮凝剂生成的影响,结果如图 5 所示。由图 5 可知,27 ℃时培养液絮凝活性可达 87.6%,30 ℃时培养液絮凝活性达最高 90.0%,33 ℃培养后絮凝活性下降为 85.2%,37 ℃培养后絮凝活性继续下降到 83.4%。

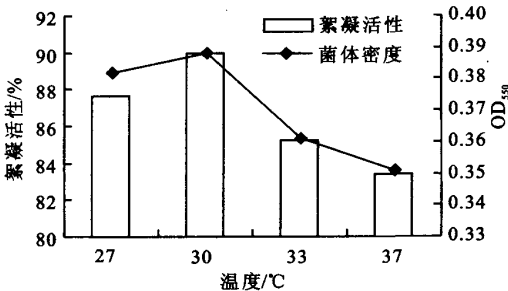


图 5 培养温度对絮凝剂生成的影响

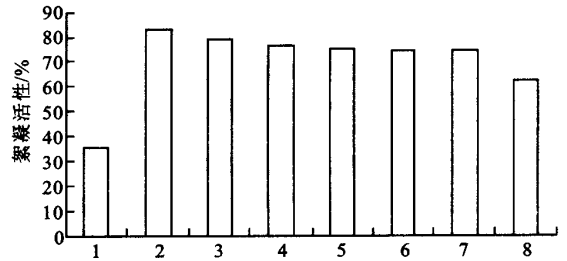
Fig. 5 Effect of temperature on flocculant production

2.6.3 金属离子对絮凝剂生成的影响 按方法“1.3.8(3)”考察金属离子对絮凝剂生成的影响,结果如图 6 所示。由图 6 可知,培养基中添加各种无机离子对絮凝剂的产生都有不同程度的促进作用,培养基中添加 Mg^{2+} 对絮凝剂的产生效果最好,其絮凝活性可达 83.1%。

2.6.4 优化培养条件下的絮凝活性 根据以上实验结论,以蔗糖 2 g/dL、酵母膏 0.2 g/dL、脲 0.05 g/dL、 $NaNO_3$ 0.05 g/dL、 KH_2PO_4 0.05 g/dL、 $MgSO_4$ 0.05 g/dL、KCl 0.05 g/dL、NaCl 0.05 g/dL、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/dL、pH=8.0 为优化培养基,于 30 ℃、150 r/min 条件下摇床培养 72 h,其发酵上清液对高岭土悬液的絮凝率可达 93.2%。

2.7 絮凝剂对不同固体颗粒悬液的絮凝性

按方法“1.3.9”测定絮凝剂对不同固体颗粒悬液的絮凝性,结果如图 7 所示。由图 7 可知,当搅拌 15 min 后絮凝剂对各悬液的絮凝活性基本稳定,絮凝剂对活性炭悬液的絮凝活性可达 95.2%,对土壤悬液的絮凝活性可达 80.4%,对酵母细胞悬液的絮凝活性可达 72.4%。对 3 种固体颗粒悬液的絮凝率均超过 70%。此结果表明絮凝剂絮凝能力较强,絮凝对象比较广。



1. 空白; 2. $MgSO_4$; 3. $FeCl_3$; 4. KH_2PO_4 ; 5. $CaCl_2$; 6. $FeSO_4$; 7. NaCl; 8. $CuSO_4$

图 6 金属离子对絮凝剂生成的影响

Fig. 6 Effect of different in culture on flocculatr production

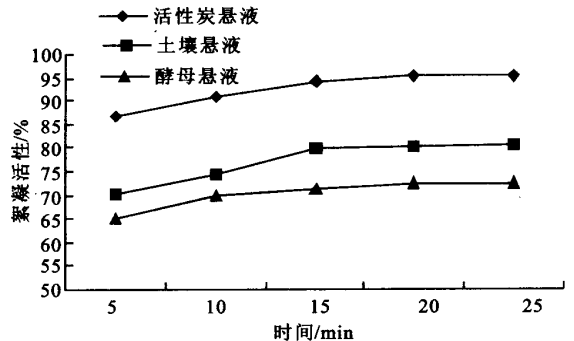


图 7 絮凝剂对不同固体颗粒悬液的絮凝性

Fig. 7 Effect of flocculatr on removing substances

3 结 论

从活性污泥筛选出 1 株具有高絮凝活性的菌 Z-052,经分子生物学鉴定该菌属于 *Diaphorobact-*

er 属细菌。对该细菌所作的发酵条件的研究结果表明,Z-052 的最佳培养基及培养条件为:蔗糖 2 g/dL,酵母膏 0.2 g/dL, KH_2PO_4 0.05 g/dL, Mg-SO_4 0.05 g/dL, KCl 0.05 g/dL, NaCl 0.05 g/dL,

pH 8.0,温度为 30 ℃,摇床培养 3 d,培养液对高岭土悬液的絮凝率为 93.2%。Z-052 絮凝剂对活性炭、土壤、酵母等固体颗粒悬液的絮凝活性分别达到 95.1%、80.4%和 72.4%。

参考文献(References):

- [1] Toeda K, Kurane R. Microbial flocculant from *alcalagene cupidue* KT201[J]. **Agric Biol Chem**, 1991, 55(11): 2793—2799.
- [2] H Salehizadeh M, Vossoughi I Alemzadeh. Some investigations on bioflocculant producing bacteria[J]. **J Biotech Eng**, 2000, 5(1): 39—44.
- [3] Fujita M, Ike M, Hira T. Bioflocculation production from lowermolecular fatty acids as a novel strategy for utilization of sludge digestion liquor[J]. **Water Sci & Tech**, 2001, 44(10): 231—236.
- [4] 尹华, 彭辉, 贾宗剑, 等. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝除浊性能[J]. 城市环境与城市生态, 2000, 13(1): 8—10.
YIN Hua, PENG Hui, JIA Zong-jian, et al. Screening for bio-flocculants microorganisms and its performance for turbidity removal[J]. **Urban Environment & Urban Ecology**, 2000, 13(1): 8—10. (in Chinese)
- [5] 王镇. 几株絮凝剂产生菌的特性研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(2): 121—129.
WANG Zhen. Studies on bioflocculant-producing microorganisms[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1995, 35(2): 121—129. (in Chinese)
- [6] Takeda M. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* [J]. **Agric Biol Chem**, 1991, 55(10): 2663—2664.
- [7] Takagi H. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces* [J]. **Agric Biol Chem**, 1985, 49(11): 3159—3164.
- [8] Toeda K. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201[J]. **Agric Biol Chem**, 1991, 55(11): 2793—2799.
- [9] Nakamura J. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ 7002[J]. **Agric Biol Chem**, 1976, 40(3): 619—624.
- [10] 余莉萍, 尹华, 彭辉. 一株产微生物絮凝剂菌株的筛选及特性[J]. 上海环境科学, 2002, 21(8): 459—462.
YU Li-ping, YIN Hua, PENG Hui. Screen and characteristics of a strain of flocculant—producing microorganism[J]. **Shanghai Environmental Sciences**, 2002, 21(8): 459—462. (in Chinese)

(责任编辑: 杨 萌)