

生物絮凝剂产生菌的筛选及性能研究

潘多涛 刘桂萍 刘长风

(沈阳化工学院环境与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

摘要: 从林下土壤中筛选得一株产絮凝剂的细菌 XMX-1(其产生的絮凝剂命名为 XMX-1F); 研究表明: 玉米淀粉、玉米浆是廉价的碳氮源; 探讨了在絮凝体系中, 影响絮凝效果的因素。通过乙醇提取的方法, 从发酵液离心后的上清液中获得絮凝剂粗产品 7.685 g/L; 通过蒽酮反应、紫外扫描以及红外扫描等多种方法手段分析确认 XMX-1F 是以多糖为主的高分子絮凝剂, 多糖含量为 77.87%, 且具有较高的热稳定性; 在实际废水处理方面, XMX-1F 对洗煤废水、泥浆废水以及活性炭悬液等有悬浮颗粒的废水处理效果明显, 但脱色效果不明显, 通过 XMX-1F 对模拟洗煤废水的应用研究表明, 其应用到处理实际洗煤废水中的前景是可观的。

关键词: 微生物絮凝剂; 廉价培养基; 絮凝条件; 多糖; 红外光谱; 洗煤废水

中图分类号: Q935

引言

微生物絮凝剂是利用生物技术, 通过微生物发酵、分离提取而得到的一种新型、高效、安全、且能自然降解的新型水处理剂。与传统絮凝剂相比, 它不仅可以提高被絮凝物质的沉降性能, 而且对环境无二次污染, 使用方便、安全、应用范围广。

近 20 年来, 微生物絮凝剂已越来越引起人们的关注, 其中以日本仓根隆一郎筛选出的红平红球菌 (*R. Erythropolis*) 所产絮凝剂 NOC-1 的絮凝效果最好^[1]。目前对微生物絮凝剂的研究大多停留在实验室研究阶段, 远未达到大规模的应用和工业化生产阶段。制约微生物絮凝剂发展的关键问题在于生产成本过高和产量过低。

本文主要是从活性污泥和土壤中分离和筛选产絮凝剂细菌, 对其生产絮凝剂的培养基组分及其絮凝效果进行了讨论, 并进行了粗产品的提取及成分分析。

1 实验部分

1.1 菌种来源及培养基

菌种来源: 从沈阳北部污水处理厂的污泥、泡菜

水、味精厂废水、味精发酵废母液、淀粉厂废水及吉林采集样品进行初筛。目的菌为菌落较粘稠的、粗糙, 细胞具有荚膜的细菌^[2]。

基本培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 酵母膏 2, MgSO₄ 1, KH₂PO₄ 4, K₂HPO₄ 1。

1.2 目的菌株的分离筛选

样品经富集培养后, 以牛肉膏蛋白胨培养基为细菌分离培养基, 采用稀释法分离并纯化。

1.3 絮凝率测定方法

在 50 mL 烧杯中加入 4 g/L 的高岭土悬浊液 28 mL 及 1 mL 0.1 mol/L 的 CaCl₂ 溶液和 1.0 mL 发酵液 (或絮凝剂), 用六联搅拌机先快速搅拌 3 min, 再慢速搅拌 2 min, 静置 2 min, 取上清液于 550 nm 处测定吸光度 A₅₅₀, 以同时搅拌的、不加待测样品的高岭土悬浊液上清液测定的吸光度作为对照, 来确定发酵液或絮凝剂的絮凝活性 (用絮凝率来表征)^[3]。

$$\text{絮凝率} = \frac{A - B}{A}$$

其中: A 为对照组的 A₅₅₀, B 为待测样品的 A₅₅₀。

1.4 絮凝剂的提取

发酵液高速离心后所得上清液中加入 2 倍体积乙醇, 混匀后在 4℃ 下静置过夜, 析出的沉淀物在大容量低速离心机中以 3000 r/min 离心 20 min, 所得沉淀用丙酮洗涤, 最后真空干燥得絮凝剂粗品。将粗品制成一定浓度的溶液待用。

1.5 絮凝剂性质分析

取适量絮凝剂溶液, 在 200~600 nm 范围内进

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 沈阳市科技基金项目 (1041029-1-02-05)

第一作者: 男, 1979 年生, 助教

E-mail: panduotao@126.com

行紫外扫描,考察特征吸收峰。

取适量絮凝剂溶液,分别用双缩脲试剂、茚三酮、 α -萘酚、蒽酮等显色剂进行显色反应。

取适量干燥的粗产品,进行红外光谱扫描。

通过苯酚-硫酸法^[4]测定微生物絮凝剂中的多糖含量。

1.6 实际废水处理应用

实际废水选取豆腐坊废水、水池泥浆废水、室内清洁废水及淀粉厂废水;模拟废水采用 8 g/L 的活性炭悬液、4 g/L 的膨润土悬液、粉煤灰浸液及 50 mg/L 的酸性大红溶液。

考察生物絮凝剂在模拟洗煤废水处理中的应用^[5]。模拟洗煤废水的配置:在煤场采集原煤样品,将适量的原煤研磨成细粉状。取煤粉过 200 目筛的细煤粉用自来水浸泡 24 h,制得 4 g/L 的模拟洗煤废水待处理。

2 结果与讨论

2.1 絮凝剂产生菌的筛选结果

经分离纯化以及实验室现有菌种共 46 株细菌,初筛获得 18 株有絮凝能力的菌株。经过复筛后,最终选定 10[#](XMX-1)为产絮凝高效菌株,发酵液絮凝率大于 95.49%。经革兰氏染色后,确定为革兰氏阴性菌,菌体形状为球状,菌落边缘不规则,突起,菌落周边有透明环带。菌种有待于进一步鉴定。

2.2 絮凝剂最佳产生条件

以不同的碳源、氮源代替基本培养基中的相应成分,经相同条件发酵后,测定絮凝率。价格低廉的玉米淀粉作为碳源、玉米浆(淀粉厂的副产品)作为氮源时效果最好。最终确定最佳发酵培养基配比为:玉米淀粉 10 g/L,玉米浆 20 mL/L, MgSO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 4 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, pH 5。

实验得温度 30℃ 有利于絮凝剂的合成;培养时间 72 h 较好,72 h 后絮凝率有一定程度下降;接种量 3%、装液量为 50 mL/250 mL 时较好。

2.3 絮凝条件对絮凝剂活性的影响

2.3.1 发酵液投加量对絮凝活性的影响

在 30 mL 高岭土悬浊液中加入不同体积的发酵液,絮凝效果与发酵液投加量并未出现正比关系:当用量大于 33.3 mL/L 后絮凝率急速下降,出现比较明显的絮凝恶化现象^[6]。曲线在 40 mL/L 处出现了波折,其原因可能是在此用量时,絮凝作用机理发生了变化,使絮凝率回升,但由于这不起主要作用,

絮凝率回升幅度较小,在这之后絮凝率大幅度降低。当用量为 20 mL/L 时,絮凝效果最好。这与多数文献所报道的相符。如图 1 所示。

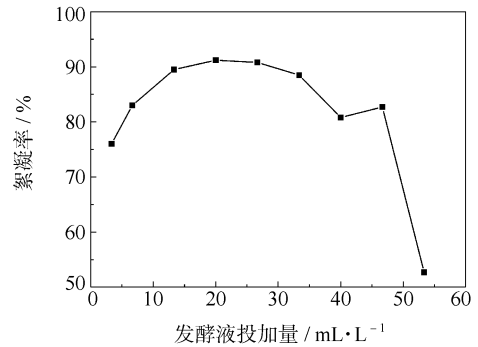


图 1 发酵液投加量对絮凝效果的影响

Fig. 1 Effect of culture broth concentration on flocculation

2.3.2 pH 对絮凝效果的影响

在 30 mL 高岭土悬浊液中加入 0.1 mL 发酵液调节 pH,考察 pH 在 3~10 的范围内对高岭土悬浊液的絮凝效果。如图 2 所示,XMX-1 的发酵液在 pH 值为 8.0~10.0 条件下有较高的絮凝活性。同时也可看出,XMX-1 的 pH 适应性为偏碱性。

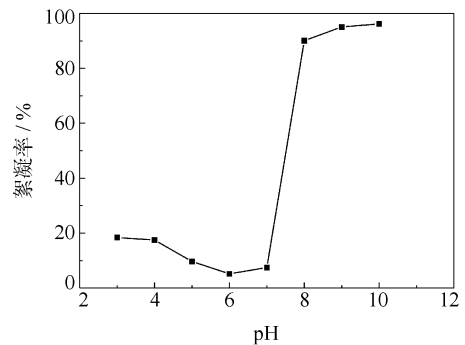


图 2 pH 对絮凝效果的影响

Fig. 2 Effect of pH on flocculation

2.3.3 金属离子对絮凝效果的影响

在 30 mL 的絮凝体系中,分别加入 1 mL 浓度为 0.1 mol/L 的金属离子溶液。结果表明 Ca²⁺ 和 Fe²⁺ 对絮凝活性有显著的促进作用,其中以 Ca²⁺ 的影响最大;Fe³⁺ 对絮凝活性有明显的抑制作用,这可能由于 Fe³⁺ 的存在使得絮凝剂分子的空间构型发生了变化^[7],从而影响了絮凝能力。由于 Fe²⁺ 会给絮凝体系带入颜色,因此选择 Ca²⁺ 作为助凝剂来使用。需要说明的是,在图 3 中 Zn²⁺ 的加入导致絮凝率出现负值,原因是絮凝体系为碱性,加入 Zn²⁺ 后产生 Zn(OH)₂ 絮状沉淀,Zn(OH)₂ 本身具有较

强的絮凝能力(常被用做处理浑浊水的沉降剂^[8]), 所以计算所得絮凝率出现负值。

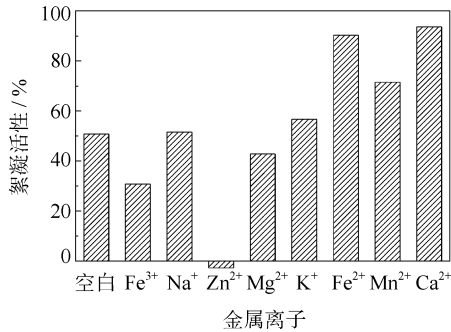


图 3 金属离子对絮凝效果的影响
Fig. 3 Effect of cation on flocculation

2.3.4 CaCl₂ 投加量对絮凝活性的影响

CaCl₂ 作为助凝剂,其投加量的多少也直接影响了絮凝效果。在 30 mL 絮凝体系中加入不同体积的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液。结果表明, CaCl₂ 的投加量由 0 上升到 0.002 mol/L 时, Ca²⁺ 离子加强了高聚物之间、高聚物与悬浮颗粒、悬浮颗粒之间的相互作用,对高聚物的形成架桥、网捕以及形成絮体起到了正效应。但絮凝活性与添加 CaCl₂ 的量并不是正相关,在 CaCl₂ 的投加量超过 0.004 mol/L 后,絮凝活性并没有显著的变化。这与 Yokoi^[9]、姚俊^[10] 等人报道的结论相近。因此,处理高岭土悬液使用 CaCl₂ 作为助凝剂,其最佳用量为 0.002 mol/L。絮凝效果如图 4 所示。

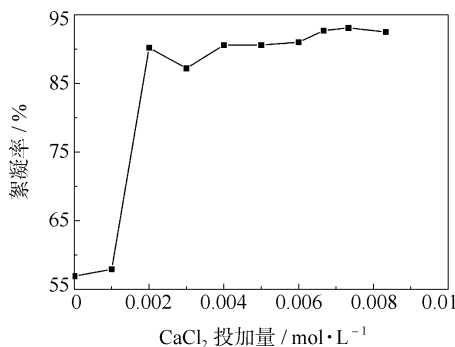


图 4 CaCl₂ 投加量对絮凝效果的影响
Fig. 4 Effect of CaCl₂ concentration on flocculation

2.4 絮凝剂的性质分析

2.4.1 絮凝剂的提取

从 40 mL XMx-1 发酵液离心后的上清液提取获得 0.3074 g 粗产品(7.685 g/L)。将此产品命名为 XMx-1F(下同),将粗品溶于适量水中配置成 150 mg/L 的絮凝剂溶液。

2.4.2 微生物絮凝剂的热稳定性

将絮凝剂溶液于 100 °C 水浴加热,以 100 °C 高温开始加热后 XMx-1F 的絮凝活性有大幅度下降,随着加热的进行,在 30 min 以内,絮凝活性保持在 80% 以上。在加热超过 30 min 后,絮凝活性下降幅度加大。由于 XMx-1F 的热稳定性较好,其有效絮凝成份不应是蛋白质,而应是多糖。

2.4.3 微生物絮凝剂的 pH 稳定性

取适量配置好的絮凝剂溶液,平均分成 6 份。调整每等份溶液的 pH 到不同值,在 4 °C 下放置 24 h,在室温下测定其对高岭土悬液的絮凝活性,结果如图 5 所示。pH 在 6~10.5 范围内 XMx-1F 的稳定性较好(XMx-1F 原溶液 pH 为 7.5),絮凝活性均在 80% 以上。在强酸性条件下, XMx-1F 的 pH 稳定性较差,这可能由于 XMx-1F 在强酸性环境下容易分解的缘故。

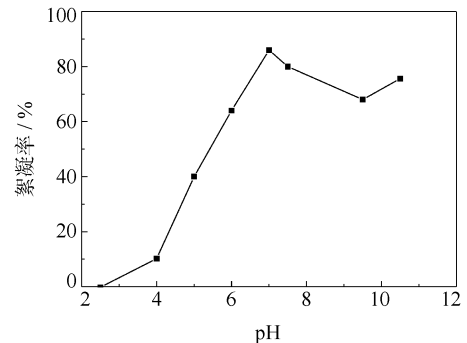


图 5 XMx-1 所产絮凝剂的 pH 稳定性
Fig. 5 pH stability of the flocculant of XMx-1

2.4.4 微生物絮凝剂粗产品的成分分析

在 200~600 nm 范围内紫外扫描絮凝剂 XMx-1F 溶液,结果如图 6 所示。XMx-1F 的紫外扫描曲线为一条平滑曲线,没有特征吸收峰。这说明絮凝剂中几乎不含有核酸(260 nm 有吸收峰)和蛋白质(280 nm 有吸收峰)。因此可以定性判断该絮凝剂的有效成分不是蛋白质或核酸。

取适量絮凝剂溶液,分别用双缩脲试剂、茚三酮、 α -萘酚、蒽酮等显色剂进行生化反应。茚三酮、双缩脲试剂均无颜色反应,进一步肯定 XMx-1 所产絮凝剂中不含蛋白质(或氨基酸); α -萘酚、蒽酮均有显色反应,判断产品中主要成分是多糖。

图 7 为 XMx-1F 干品的红外光谱扫描图。和其他多糖的红外光谱图对比^[11-13],图 7 的谱图是较为典型的多糖红外光谱图,3418 cm⁻¹处强而宽的吸收峰是分子内的一OH 伸缩振动所导致形成的。

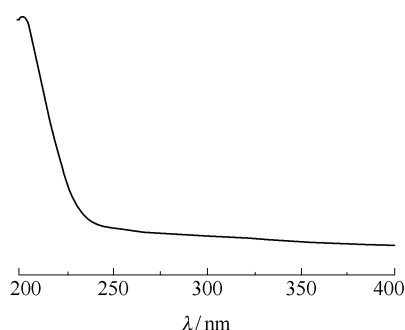


图6 XMX-1F溶液的紫外扫描谱图

Fig. 6 Ultraviolet spectroscopy of XMX-1F

2927 cm^{-1} 是 C—H 不对称伸缩振动的结果, 同时 1443 cm^{-1} 出现的峰表明有 $-\text{CH}_2$ 存在, 此区域的吸收峰是糖类的特征峰。1660 cm^{-1} 是由多糖中的乙酰氨基 ($-\text{NHCOCH}_3$) 的 C=O 键伸缩振动造成的。1384 cm^{-1} 处为羧基 $-\text{COO}^-$ 中的 C=O 对称伸缩振动。1023 cm^{-1} 的强吸收峰是糖环中的 C—O—C 反对称伸缩振动吸收谱带。XMX-1F 的红外光谱显示了糖的特征结构外, 还有酰胺结构的特征吸收峰, XMX-1F 的主要成分很可能为一种氨基多糖。

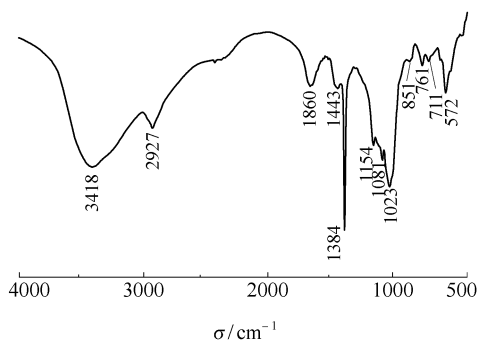


图7 XMX-1F的红外扫描谱图

Fig. 7 Infrared spectra of XMX-1F

以上实验确定 XMX-1 所产絮凝剂中不含蛋白质, 多糖的含量测定得 XMX-1F 中多糖的含量为 5.984 g/L, 占产物总量的 77.87%。这与红外光谱扫描的结果一致。

2.5 实际废水处理效果

2.5.1 微生物絮凝剂处理实际废水

选用了多种实际废水和模拟废水进行絮凝实验。表 1 为实验结果。

由表 1 可以看出, XMX-1F 对水池泥浆废水效果明显。对室内清洁废水及淀粉厂废水也有絮凝效果, 有较明显的沉淀, 但上层液体脱色效果不佳。对于模拟废水, XMX-1F 的絮凝效果较好, 活性炭悬液

以及粉煤灰浸液上清液都变得澄清。从实际处理效果看, XMX-1F 对有悬浮颗粒的废水处理效果明显, 但脱色效果不明显。

表 1 XMX-1F 对实际废水的处理效果

Tab. 1 Wastewater flocculating test by XMX-1F

实际废水	絮凝效果	模拟废水	絮凝效果
豆腐坊废水	不好	活性炭悬液	好
水池泥浆废水	好	膨润土悬液	较好
室内清洁废水	一般, 脱色不明显	粉煤灰浸液	好
淀粉厂废水	一般, 脱色不明显	酸性大红溶液	脱色不明显

2.5.2 微生物絮凝剂处理模拟洗煤废水

考察絮凝剂的投加量和金属离子对处理模拟洗煤废水的影响。XMX-1F 的投加量为 0.3 mL (絮凝体系 30 mL) 时其对模拟洗煤废水的絮凝活性达到最高 85.9%, 之后随着投加量的加大, 出现絮凝恶化现象。Fe²⁺ 和 Ca²⁺ 对絮凝活性的促进作用明显, CaCl₂ 作为普遍使用的助凝剂在洗煤废水中依然适用。Fe³⁺ 的加入降低了絮凝剂的絮凝活性。

配置 0.1% 的聚丙烯酰胺溶液, 取 1 mL 对模拟洗煤废水进行处理。结果显示, PAM 对模拟洗煤废水的絮凝率为 73.7%, 而同时测定的 1 mL XMX-1F 溶液对模拟洗煤废水的絮凝率达到 83.9%。

3 结论

从不同地点采集的土样、泥样及污水处理厂活性污泥中分离得到 46 株细菌, 并筛选确定了一株微生物絮凝剂高效菌株 10# (XMX-1), 该菌为短杆状的革兰氏阴性菌。采用玉米淀粉和玉米将作为碳氮源的廉价培养基。

20 mL/L 的发酵液投加量、pH8.0 ~ 10.0、0.002 mol/L 的 CaCl₂ 作为助凝剂时 XMX-1F 的絮凝效果最佳。

通过乙醇提取、丙酮洗涤、真空干燥的方式, 对 XMX-1 所产絮凝剂进行了提取, 粗产品的产量为 7.685 g/L。经过对 XMX-1F 的样品进行紫外扫描分析, 蛋白和糖的显色反应以及红外扫描分析, 确认是以氨基多糖为主的高分子絮凝剂, 多糖含量为 77.87%。且 XMX-1F 具有较高的热稳定性。

在实际废水处理方面, XMX-1F 对废水处理效果很好, 尤其是模拟洗煤废水、泥浆废水以及活性炭悬液等高浊度的废水, 但脱色效果不明显。通过 XMX-1F 对模拟洗煤废水的应用研究表明, 有望应

用到处理实际洗煤废水中。

参考文献:

- [1] Takeda M, Kurane R. A protein bioflocculant produced by rhodococcus erythropolis[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(10): 2663-2664.
- [2] 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.
- [3] 王兰. 生物絮凝剂絮凝活性评价方法的探讨[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 57-59.
- [4] Breccia J D, Catro G R, Baigori M D, et al. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78: 469-472.
- [5] 李亚峰, 刘铁成, 曹丽丹. 洗煤废水难处理的原因及处理方法研究[J]. 矿业安全与环保, 1999(2): 1-3.
- [6] 马放, 冯昊, 李淑更, 等. 复合型微生物絮凝剂的絮凝作用[J]. 黑龙江科技学院学报, 2004, 14(3): 140-144.
- [7] 惠明, 田青, 马晓娜, 等. 枯草芽孢杆菌 B53 产聚 γ -谷氨酸的絮凝特性[J]. 生物技术, 2006, 16(4): 68-70.
- [8] 施抒伟, 徐祖选. 浑浊水样六价铬测定过程预处理[J]. 福建环境, 1999, 16(2): 34-36.
- [9] Yokoi H, Arima T, Hirose J, et al. Flocculation properties of poly(γ -glutamic acid) produced by Bacillus subtilis[J]. J Ferment Bioeng, 1996, 82: 84-87.
- [10] 姚俊, 徐虹. 生物絮凝剂 γ -聚谷氨酸絮凝性能研究[J]. 生物加工过程, 2004, 2(1): 35-39.
- [11] 康学军, 曲见松, 顾忠泽. 白芷多糖的分析[J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(4): 533-535.
- [12] 马放, 张金凤, 远立江, 等. 复合型生物絮凝剂成分分析及其絮凝机理的研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(11): 1491-1496.
- [13] 何玲玲, 王新. 苦丁茶冬青叶多糖的提取与鉴定[J]. 沈阳化工学院学报, 2006, 20(1): 12-15.

Screening of microbe producing flocculant and characteristics of microbial flocculant

PAN DuoTao LIU GuiPing LIU ChangFeng

(Department of Environmental and Biological Engineering, Shenyang Institute of Chemical Technology, Shenyang Liaoning, 110142, China)

Abstract: In this study, a strain which had the highest flocculating activity was screened from soil, and named XMX-1 (the bioflocculant produced by XMX-1 named XMX-1F). The research showed that, the cornstarch and the corn steep liquor were chosen as carbon and nitrogen source; the flocculating conditions were studied. 7.685 g/L XMX-1F raw product was obtained from the supernatant by using ethanol. The XMX-1F was mainly composed of polysaccharide, which is determined by Anthrone reaction, ultraviolet spectroscopy method and Infrared spectra. The polysaccharide content was 77.87%, in addition XMX-1F was more thermostable when treated at 100 °C for 30 min. In the treatment of high SS waste water, including coal-washing waste water, soil suspension and activate carbon power suspension, XMX-1F showed high flocculating activity, but the capability of decolorizing was not obviously. Study on XMX-1F flocculating coal-washing wastewater indicated the actual application potential of XMX-1F.

Key words: bioflocculant; cost-effective medium; flocculating conditions; polysaccharide; Infrared spectra; coal-washing