

絮凝性微生物的分离与筛选

洒威¹, 李刚² (1. 青海大学生态环境学院, 青海西宁 810016; 2. 西宁市水务局, 青海西宁 810000)

摘要 [目的]为了筛选具有高絮凝活性的产生菌。[方法]采用稀释涂布法、平板划线分离法筛选分离菌株,并且通过菌落形态观察、生理生化特性鉴定絮凝菌。[结果]从样品中初筛得到17株具有絮凝性的菌株,经复筛后得到4株高效(絮凝率>85%)絮凝菌,其中TS-4絮凝率为87.78%。TS-4为革兰氏阳性杆菌,属于芽孢杆菌科芽孢杆菌属。[结论]分离出的TS-4菌可用于废水的生物处理,为生产生物絮凝剂奠定基础。

关键词 絮凝性微生物;菌落形态;生理生化;筛选;分离

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-02047-03

Isolation and Screening of Flocculability Microorganism

SA Wei et al (College of Eco-environmental Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract [Objective] To screen strain with high flocculating activity. [Method] The diluted coating method and the flat crossed separation method were adopted to screen strains, and the flocculation stain were identified through colony morphological observation, physiological and biochemical characteristics observation. [Result] From the samples we screened seventeen flocculation strains, after rescreening the four efficient flocculation were got (flocculation rate > 85%), in which flocculation rate of TS-4 was 87.78%. TS-4 was Gram-positive bacteria, belonging to Bacillaceae *Bacillus*. [Conclusion] TS-4 can be used for biological treatment of waste water, which laid the foundation for the production of bio-flocculant.

Key words Flocculability microorganism; Colony morphology, Physiological and biochemical characteristics; Screening; Isolation

微生物絮凝剂是指在特定培养条件下,某些种类的细菌、真菌、放线菌等生长代谢到一定程度时产生的具有絮凝活性的高分子化合物,包括糖蛋白、多糖、蛋白质、纤维素和DNA等。具有分泌絮凝剂能力的微生物被称为絮凝剂微生物产生菌。相对于传统絮凝剂,微生物絮凝剂具有高效、无毒、无二次污染、能生物降解等优点。高效的絮凝剂产生菌能降低培养成本,可以用于去除城市建材废水的浊度,还可以用于包括味精、酱油、淀粉、啤酒等食品工业废水处理,在重金属废水的处理、贵金属废水的处理及贵金属回收方面也有重要的作用^[1-4]。目前,国外研究者已经开发出一系列微生物絮凝剂,有的已经应用到相关废水处理和工业处理。笔者开展了絮凝剂微生物的分离与筛选方面的研究,为进一步对絮凝剂的最佳培养条件和絮凝条件的研究提供可能。这对青海省水污染治理有着重要的意义,而且为青海省三江源区水环境的修复治理提供了可应用的前瞻性。

1 材料与方法

1.1 菌种来源 供试活性污泥来自青海省西宁市第二污水处理厂。

1.2 培养基

1.2.1 牛肉膏蛋白胨培养基。牛肉膏5 g/L,蛋白胨10 g/L,NaCl 5 g/L,pH 7.2~7.4。

1.2.2 高氏1号培养基。可溶性淀粉20 g/L,硝酸钾1 g/L,氯化钠0.5 g/L,磷酸氢二钾0.5 g/L,硫酸镁0.5 g/L,硫酸铁0.01 g/L,琼脂20 g/L,pH 7.2~7.4。

1.2.3 查氏培养基。硝酸钠2 g/L,磷酸二氢钾1 g/L,氯化钾0.5 g/L,硫酸铁0.01 g/L,硫酸镁0.5 g/L,蔗糖30 g/L,琼脂20 g/L,pH自然。

1.2.4 PDA培养基。马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,pH自然。

1.2.5 筛选培养基。葡萄糖20 g/L,磷酸二氢钾2 g/L,磷酸氢二钾5 g/L,氯化钠0.1 g/L,硫酸铵0.2 g/L,尿素0.5 g/L,酵母膏0.5 g/L,硫酸镁0.2 g/L,pH 8.0。

1.3 方法

1.3.1 富集培养。将样品倒入塑料烧瓶中,并在磁力搅拌器上振荡30 min,使样品与水充分混合,并使得样品中的细胞分散。在4种液体培养基(牛肉膏蛋白胨液体培养基、高氏1号液体培养基、查氏液体培养基、PDA液体培养基)中分别加入1 ml已经充分混合的样品。将加完样品后的4种培养基放在摇床上培养,培养条件为温度30℃、摇床速度150 r/min、时间48 h。

1.3.2 分离纯化与菌种保藏。富集培养48 h后将液体培养基按 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度稀释,稀释后分别接种4种固体培养基,接种后将平板倒置于37℃的恒温培养箱中培养,培养48~72 h后观察菌落生长情况^[5];分别从培养后长出的菌落中挑取少许细胞,划线分离,待有单独菌落出现时涂片镜检,若菌体不纯,则需要再次划线分离,直至完全纯化;把分离纯化并编号的纯菌株接种到上述培养基的斜面上,置于恒温培养箱中,培养好后装入液体石蜡,于4℃冰箱中保存备用。

1.3.3 初筛。用250 ml三角瓶盛60 ml培养基,将已编号的各种纯菌株制成菌悬液,按接种量为5%~10%(V/V)分别接入筛选培养基中,150 r/min,30℃,培养72 h后对所得培养液进行絮凝活性的初步检查。在100 ml量筒中加入浓度0.4%高岭土悬浮液至刻度,再加1 ml高岭土,轻摇。经目测,能使高岭土悬浮液絮凝成大颗粒的为有絮凝活性的菌株。

1.3.4 复筛。采用紫外分光光度法测定菌株絮凝性能^[6]。在三角瓶中加入50 ml筛选培养基,在121℃高压锅灭菌30 min。然后,接种所分离得到的纯菌种,培养条件为温度30

℃、摇床速度 150 r/min、时间 72 h。将菌株培养液在离心机上离心(转速 3 000 r/min、时间 30 min)后,取菌株培养液上清液,测定高岭土悬浮液的絮凝率。在 100 ml 量筒中加入浓度 0.4% 高岭土,同时加入 80 ml 蒸馏水、11% CaCl₂、2 ml 菌液上清液,与不加菌株培养液的高岭土悬浮液相比,通过浊度的减少定量表示絮凝率。絮凝效果以絮凝率(*Rf*)为测试标准。絮凝率的计算公式为:

$$Rf = (A - B) / A \times 100\%$$

式中,*A* 为空白上清液在 550 nm 的吸光值;*B* 为空白上清液在 550 nm 的吸光值。

1.3.5 菌种的鉴定。将经过复筛后所产絮凝剂活性较高的菌株作为目标菌株进行培养特征的观察,并作有关生理生化特征鉴定,鉴定菌株所在属和种^[6-9]。

2 结果与分析

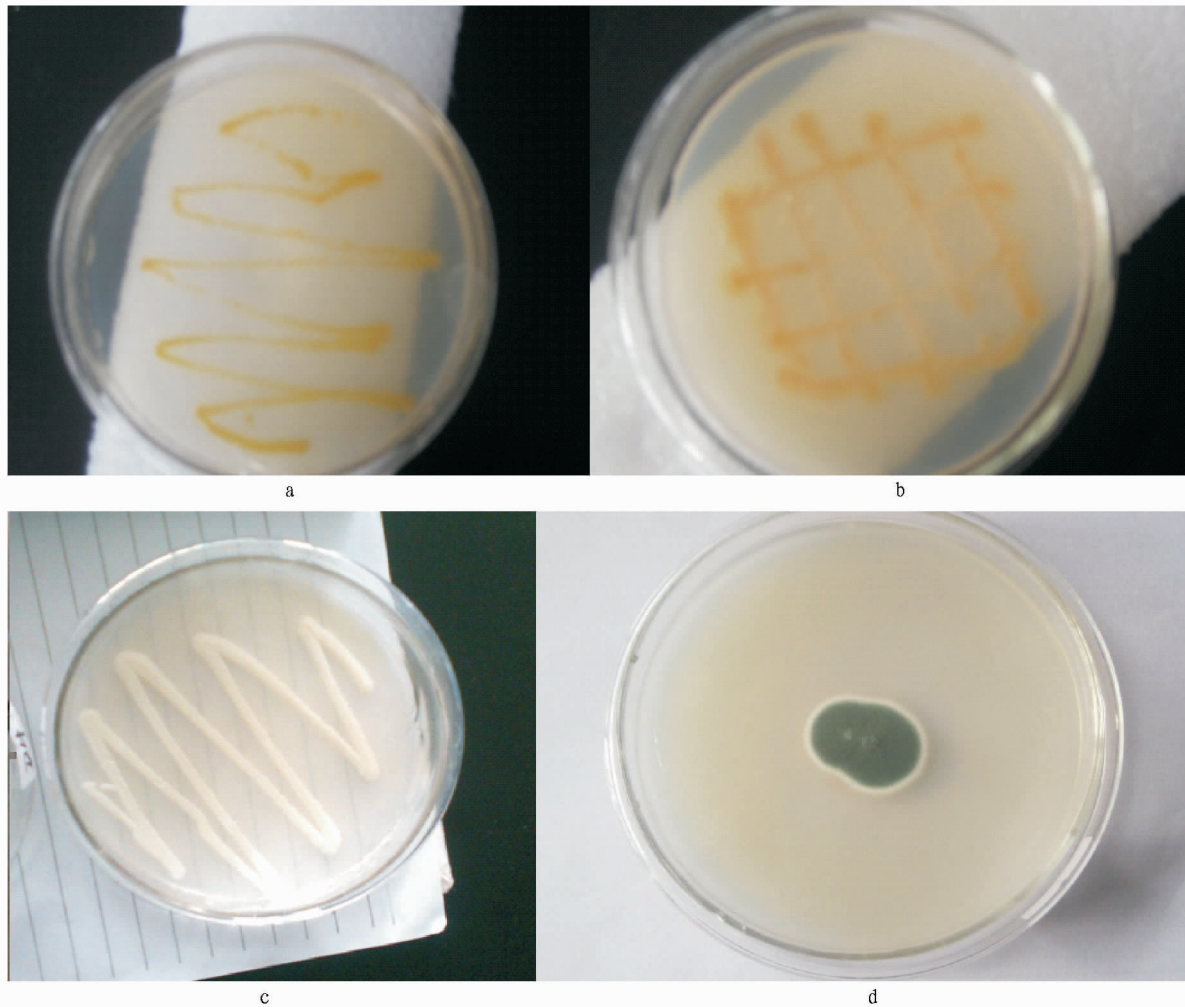
2.1 菌株的筛选 利用牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 1 号培养基、查氏培养基、PDA 培养基及筛选培养基,采用富集培养、稀释涂布法和平板划线分离法从样品中分离出 17 株具

有絮凝活性的菌株。经复筛后,得到 4 株絮凝活性较高的菌株。由表 1 可知,TS-4 菌株的絮凝活性最高,达 87.78%。

表 1 菌株复筛结果

编号	絮凝率//%	絮体大小
TS-2	77.99	较大
TS-3	76.28	较大
TS-4	87.78	大
TS-5	76.85	较大

2.2 菌落形态特征 将 4 种菌株接种到牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 培养基中,35 ℃ 恒温培养 48 h。由图 1 可知,TS-2 中等菌落,表面光滑,不透明,圆形,扁平,边缘呈锯齿状,有光泽,挑起黏稠状,乳黄色;TS-3 中等菌落,粗糙,不透明,不规则状,扁平,边缘细毛状,无光泽,挑起黏稠状,淡黄色;TS-4 大型菌落,表面粗糙,不透明,念珠状,隆起,边缘整齐,无光泽,挑起黏稠状,乳白色;TS-5 菌落大,发散状,边缘为白色,中央为绿色,孢子呈散射状。



注:a~d 分别为 TS-2、TS-3、TS-4、TS-5。

图 1 菌落形态

2.3 染色与个体形态 经过革兰氏染色后,用显微镜观察 TS-2、TS-3、TS-4、TS-5 菌株的大小、形态。由图 2 可知,TS-2

革兰氏染色阴性,直或者微弯曲的杆菌形状,无芽孢;TS-3 革兰氏染色阴性,粗短杆菌形状,单个存在,极少数以单链存

在,无芽孢;TS-4 革兰氏染色阳性,细胞呈梭杆状,中间生芽孢;TS-5 真菌(青霉),分生孢子梗有横隔,粗糙。TS-5 是真

菌,未经过革兰氏染色。

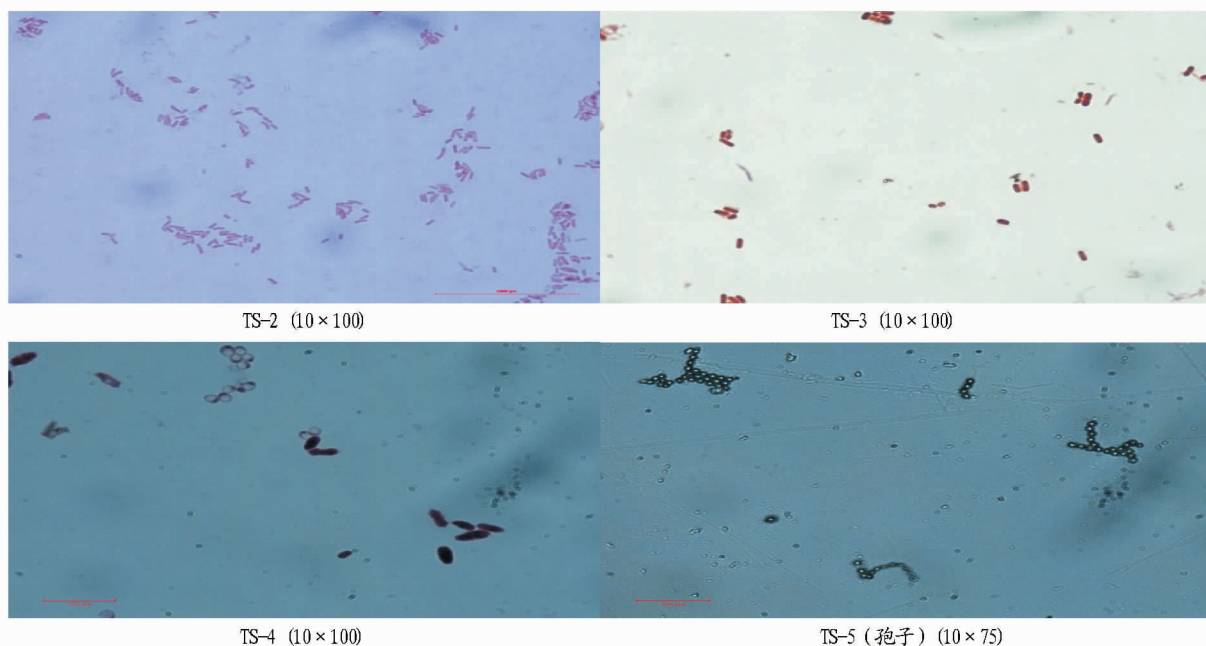


图 2 菌体镜检结果

2.4 生理生化特征 综合表 2,并参照《简明第八版伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》,对各菌株进行鉴定。TS-2 为假单胞菌科黄单胞菌属(*Xanthomonas pseudo-monadaceae*);TS-3 为甲基单胞菌科布鲁氏菌属(*Brucella methylomonadaceae*);TS-4 为芽孢杆菌科芽孢杆菌属(*Bacillaceae bacillus*);TS-5 为真菌青霉(*Penicillium fungus*)。

表 2 菌株生理生化特性试验结果

项目	TS-2	TS-3	TS-4
柠檬酸盐	+	+	+
产吲哚	+	-	-
液化明胶	-	-	-
水解淀粉	-	-	-
甲基红	+	-	+
产 H ₂ S	-	-	-
葡萄糖氧化发酵	- 不产气	- 不产气	- 不产气
蔗糖氧化发酵	- 不产气	- 不产气	- 不产气
石蕊牛奶	-	-	-

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

3 结论

通过平板分离、初筛和复筛,从活性污泥中筛选到 4 株絮凝活性比较高的菌株。通过进一步筛选、比较,获得一株絮凝活性较高、絮凝性能稳定的菌株 TS-4。通过菌落、菌体形态观察及部分生理生化试验,初步鉴定菌株 TS-4 为芽孢

杆菌科(*Bacillaceae*)芽孢杆菌(*Bacillus*)。菌株 TS-4 的絮凝率为 87.78%,经过培养条件的优化,其絮凝性进一步提高,可用于污水处理。研究还表明,大多数的絮凝剂产生菌主要为细菌,放线菌、真菌较少见。

参考文献

- [1] 闫永胜,刘彬彬,毛艳丽,等.一株 *Pseudomonas* sp. 的分离鉴定与所产絮凝剂性能研究[J]. 环境科学与技术,2008,31(6):40-43.
- [2] 张悦周,吴耀国,胡思海,等.微生物絮凝剂的研究与应用进展[J]. 化工进展,2008,7(3):340-347.
- [3] 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):62-66.
- [4] 湛雪辉,湛含辉,姜涛,等.微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝特性研究[J]. 环境科学与技术,2003,26(2):11-12.
- [5] 陶然,杨朝晖,曾光明,等.微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及其培养条件的优化研究[J]. 中国生物工程杂志,2005,25(8):76-81.
- [6] 钟文文.微生物絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化的研究[J]. 环境工程学报,2007,1(8):140-144.
- [7] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4版.北京:高等教育出版社,2007:235-250.
- [8] 东秀珠,蔡妙音.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:98-246.
- [9] J·G·霍而特.简明第八版伯杰细菌鉴定手册[M].济南:山东大学出版社,1988:213.
- [10] ZHOU A H,LIANG S K,SHAN B T. Screening of a novel bioflocculant-producing strain and research on its flocculation[J]. Agricultural Science & Technology,2012,13(9):1997-2000,2005.
- [11] 邓冬梅,彭晓春,陈志良,等.2种微生物絮凝剂高效产生菌的筛选和培养条件的优化[J]. 安徽农业科学,2011,39(19):11386-11387,11393.