

微生物絮凝剂絮凝特性的研究¹⁾

宫小燕 栾兆坤 王曙光 黎泽华

(中国科学院生态环境研究中心, 国家重点环境水化学实验室, 北京, 100085)

摘 要

考察了微生物絮凝剂产生菌 *Bacillus* sp. B-2 发酵生产絮凝剂的絮凝特性。研究表明, 该菌在生长过程中产生絮凝剂并将其分泌到细胞外, 每升发酵液可制得絮凝剂粗品 1.7 g, 絮凝活性最高达 97% 以上, 絮凝效能优于目前市售化学絮凝剂。该絮凝剂凝聚絮凝高岭土悬浊液最适宜的 pH 值在大于 7 的偏碱性条件, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} 等二价、三价金属离子对其絮凝具有促进作用, 且随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 促进作用加强。

关键词: 微生物絮凝剂, 凝聚絮凝作用, 絮凝特性。

微生物絮凝剂是一类由微生物产生并分泌到细胞外具有絮凝活性的代谢产物^[1]。微生物絮凝剂一般由多糖、蛋白质、DNA、纤维素、糖蛋白、聚氨基酸等高分子物质构成, 分子中含有多种官能团, 能使水中胶体悬浮物相互凝聚、沉淀^[2-4]。由于微生物絮凝剂大多为生物活性物质, 易于生物降解, 无二次污染, 它克服了无机和有机絮凝剂使用安全与环境污染方面的问题, 因而具有广阔的开发前景^[5-7]。目前, 研究者已将其应用于纸浆废水、染料废水处理以及污泥脱水、发酵液菌体去除等众多领域, 取得了良好的絮凝效果^[8,9]。

本文在筛选出微生物絮凝剂产生菌的基础上, 进一步研究了微生物絮凝剂絮凝高岭土悬浊液的絮凝特性。

1 实验部分

1.1 培养基及培养方法

培养基: 葡萄糖 2%, KH_2PO_4 0.3%, 无机氮和有机氮 0.1%, 无机盐 0.1%, pH 7.0。

培养方法: 采用本实验室筛选得到的絮凝剂产生菌 B-2。将菌接种于新鲜的斜面培养基, 活化 2d, 然后转接于液体培养基, 于 30℃, 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 2—3 d, 取发酵液测定絮凝活性。

1.2 絮凝活性的测定方法

1) 国家自然科学基金重点基金资助项目 (批准号: 59838300)。

用蒸馏水将高岭土配制成浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 的悬浊液, 取 50 ml, 加入 0.5 ml 1% 的 CaCl_2 溶液, 未有特殊说明时, 所有生物絮凝剂的絮凝活性测定实验均需加入 CaCl_2 溶液, 且加量不变. 然后加入一定量的絮凝剂 (发酵液), 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7. 操作程序为在快速搅拌 ($150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 过程中投加菌的培养液, 30s 后转入慢速搅拌 ($50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min, 然后静置 10 min, 在上清液液面下 2 cm 处取样测定剩余浊度和 pH 值. 以不加发酵液只加 CaCl_2 的高岭土悬浊液反应体系为对照.

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

式中, A 为对照上清液浊度, B 为样品上清液浊度.

1.3 絮凝剂的粗提

将发酵液在 $10000 \times g$ 下离心 30 min, 上清液中加入 3 倍体积的乙醇搅拌均匀, 混合物在 4°C 下静置一夜, 形成的沉淀物在 $10000 \times g$ 下离心 30 min 收集, 烘干恒重, 测得絮凝剂的产量.

2 结果与讨论

2.1 菌种的鉴定

对本实验室筛选到的絮凝剂产生菌 B-2 进行鉴定, 该菌在固体培养基上, 形成的菌落为淡黄色, 光滑、较小、较厚、凸起、边缘极其圆整, 在平板上呈珍珠状, 镜检为杆菌, 产芽孢, 经生理生化反应, 部分结果参见表 1, 参照伯杰氏菌种鉴定手册^[10]初步鉴定该菌种为芽孢杆菌, 将该菌命名为 *Bacillus* sp. B-2.

表 1 菌种鉴定
Table 1 Strain identification

革兰氏染色		+	芽孢	+	水解反应	淀粉 明胶	+
产 酸 产 气	葡萄糖	+	形状	杆状	过氧化氢酶		+
	蔗糖	+	大小(μm)	$0.4 \times 0.6 - 0.8 \times 1.2$	甲基红试验(M-R)		+
	木糖醇	+	柠檬酸生长	—	乙醇氧化		—
	麦芽糖	+	H_2S 产生试验	+	运动性		—
	乳糖	+	运动性	—	乙酸氧化		—

2.2 菌 *Bacillus* sp. B-2 的生长曲线

在 250 ml 三角瓶中, 将活化后的菌 *Bacillus* sp. B-2 接种于 50 ml 的液体培养基上, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养, 每隔 12 h 取样分析菌的生长量 (以菌数计)、絮凝活性和发酵液的 pH 值, 结果如图 1 所示. 由图 1 可知, 在培养初期, 培养液的 pH 值趋于降低, 随着菌体的生长, 培养液处理高岭土悬浊液后的浊度也降低, 即发酵液的絮凝活性增加, 60h 时菌体浓度达到最大, 相应絮凝活性也达到最高 (在 36—60h 之间其絮凝活性稳定且都很高), pH 值降到最低. 当培养至 72 h 时菌体进入衰亡期, 絮凝活性随之降低, 使高岭土悬浊液的浊度升高, 并伴随着发酵液粘度下降, pH 值趋于稳定. 由于菌体进

入衰亡期, 菌体自融胞内物质排放到发酵液中, 其中的酶类降解发酵液中的絮凝活性物质, 从而使发酵液絮凝活性降低, 粘度下降. 絮凝活性与菌生长量呈正相关, 表明存在于培养液中引起絮凝的物质是由菌合成分泌到胞外的, 而不是细胞自融造成的. 分析上述结果, 菌的最佳培养时间为 60 h, 此时每升培养液可得到絮凝剂粗品约 1.7 g, 其产量相对较高^[5].

2.3 絮凝活性的分布

为了进一步确定起主要絮凝作用的究竟是菌体细胞还是发酵液中的物质, 对菌细胞悬液、离心去菌体发酵液、不除菌发酵液及上清液加入乙醇沉淀后的上清液进行絮凝活性测定, 结果如图 2 所示. 菌悬液的絮凝活性不到 20%, 去菌体上清液加入乙醇沉淀后的上清液, 被除去部分絮凝剂后其絮凝活性也降低到 20% 以下, 而去菌体发酵液和未除菌体发酵液的絮凝活性均在较高的水平上 (93.6%), 说明絮凝物质主要存在于发酵液中, 是由微生物分泌到胞外. 也说明菌体的存在不干扰对高岭土悬浊液的絮凝效果, 利于该絮凝剂的应用.

2.4 絮凝反应体系 pH 值对絮凝活性的影响

pH 值不仅影响絮凝剂的表面电荷性质、形态结构, 还影响水体中悬浮物质的电荷性质, 从而影响到它们的相互作用, 因此, pH 值是影响絮凝的重要因素. 在 pH 3—6 的酸性条件下, 其絮凝作用很弱, 当 pH 值超过 7 时, 絮凝活性迅速提高, 并维持在较高的水平上 (图 3). 因此, 确定微生物絮凝剂絮凝高岭土的 pH 值为 7—8.

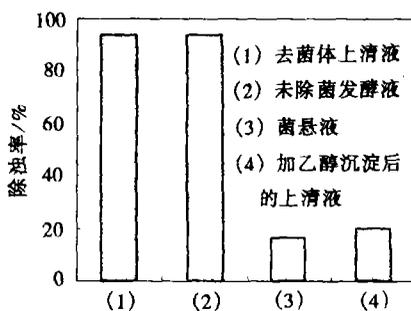


图 2 絮凝活性的分布

Fig. 2 Distribution of flocculating activity

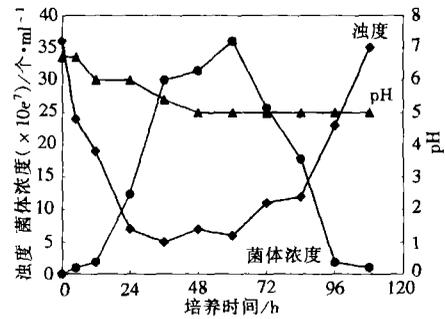


图 1 菌 *Bacillus* sp. B-2 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Bacillus* sp. B-2

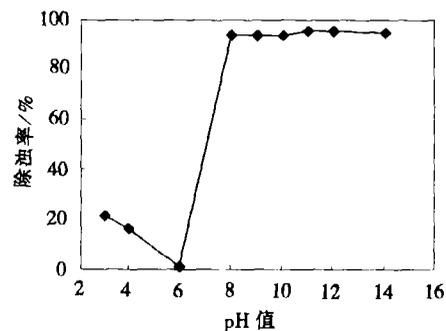


图 3 pH 值对絮凝活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on flocculating activity

2.5 絮凝剂浓度和 CaCl_2 浓度对絮凝活性的影响

改变微生物絮凝剂的浓度, 如图 4 所示, 当絮凝剂的浓度在 $0-10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时, 随着絮凝剂浓度的增加, 絮凝活性逐渐增强, 并在 $10-15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 的浓度范围内絮凝活性保持

在 90% 以上，当浓度超过 $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时，絮凝活性急剧下降，并在 $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时降至 0，说明在较高的浓度范围内出现了絮凝恶化，因此，确定絮凝剂的适宜加量为 $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 。

改变添加在混凝体系中 CaCl_2 溶液的浓度，并调节反应体系的 pH 值至 7—8，同时以不加絮凝剂的絮凝反应为对照，结果如图 5 所示。 CaCl_2 （浓度为 1%）也是影响絮凝活性的重要因素，在 $0\text{—}58 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 的范围内，絮凝活性由 0 上升到 97.9%，并且随着浓度的增加絮凝活性稳定在 100%，既使高浓度对絮凝也没有抑制作用。同时可以看到在没有微生物絮凝剂的情况下，对高岭土的去效率几乎为零，说明 CaCl_2 浓度的增加可以促进絮凝剂絮凝活性的提高，而 CaCl_2 本身对高岭土的絮凝作用很小。

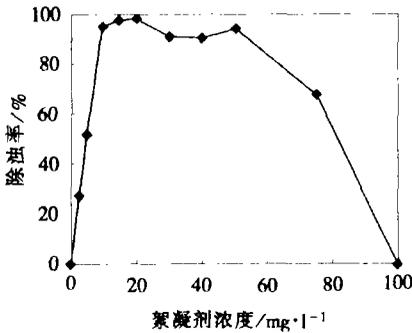


图 4 絮凝剂浓度对絮凝活性的影响

Fig. 4 Effect of concentration of flocculant on flocculating activity

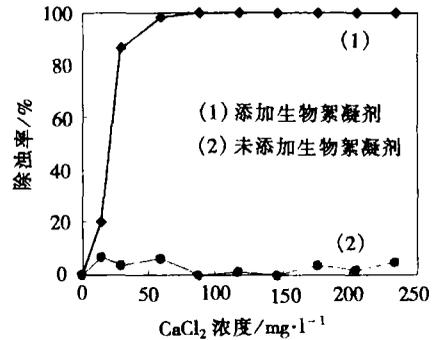


图 5 CaCl_2 浓度对絮凝活性的影响

Fig. 5 Effect of CaCl_2 concentration on flocculating activity

2.6 高岭土浓度对絮凝活性的影响

微生物絮凝剂的浓度固定为 $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ，在不同的 CaCl_2 浓度下，测定高岭土浓度的变化对微生物絮凝剂絮凝能力的影响。如图 6 所示，随着高岭土浓度的提高，微生物絮凝剂对高岭土的去效率有一最佳值，而且随着 CaCl_2 溶液浓度的增加而增加，同时说明微生物絮凝剂的适宜浓度与高岭土以及 CaCl_2 的浓度是相关的。

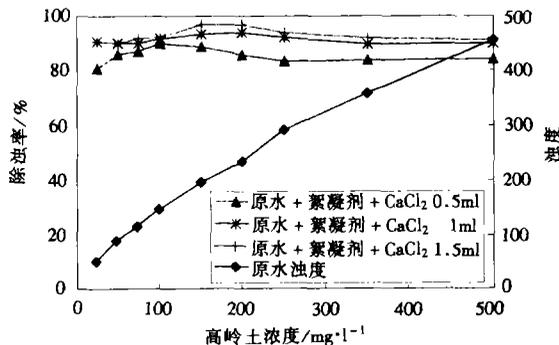


图 6 高岭土浓度对絮凝活性的影响

Fig. 6 Effect of kaolin clay concentration on flocculating activity

2.7 不同阳离子对絮凝活性的影响

将各种无机盐配制成不同浓度的溶液, 取一定量加入高岭土悬浊液与微生物絮凝剂的反应体系中, 以确定其对絮凝活性的影响, 结果如表 2 所示.

表 2 不同离子对絮凝活性的影响
Table 2 Effect of various salts on flocculating activity

离子浓度 ($g \cdot l^{-1}$)	除浊率/%										
	NaCl	KCl	K ₂ SO ₄	KNO ₃	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	MnCl ₂	FeCl ₃	Al ₂ (SO ₄) ₃	CuSO ₄	CaCl ₂
100	5.6	0	0	0	0	91.7	97.9	0	95.1	*	98.6
10	0	0	0	0	0	35.6	99.3	0	97.3	91.3	98.6
1	0	0	0	0	0	23.5	0	27.5	0	0	26.2

* 表示 Cu 对絮凝有促进作用, 但由于 Cu²⁺ 颜色的干扰, 浊度难以测定.

在实验所用的离子中, 一价离子如 Na⁺, K⁺ 等对絮凝没有促进作用, 而 Mg²⁺, Mn²⁺, Al³⁺, Cu²⁺, Ca²⁺ 等二价和三价离子对絮凝都有促进作用, 但 Fe³⁺ 是例外, 其对絮凝有抑制作用, 根据文献[11], Ca²⁺, Mg²⁺ 或 Al³⁺ 等二价或三价离子的存在, 一方面能有效降低胶体的表面电荷, 压缩双电层, 使胶粒发生聚集作用, 另一方面加强高分子物质与胶粒间的吸附作用, 促进架桥形成. 而微生物絮凝剂为高分子絮凝剂, 因而上述离子对其具有相同的作用. 阴离子带有负电荷, 水体中大多数胶体和悬浮物带有负电荷, 因此, 阴离子对絮凝作用的影响很小.

2.8 温度对絮凝活性的影响

温度也是影响絮凝的重要因素, 图 7 显示了将絮凝剂在 100℃ 的水浴中加热不同的时间后, 再絮凝高岭土的絮凝效果.

当加热时间在 20 min 以内时, 随着加热时间的延长, 絮凝活性升高, 从反应动力学的角度来看, 随着温度的升高, 反应速率常数增加, 反应速度加快, 但是当加热时间过长, 超过 20 min, 絮凝剂受热失活, 结构发生变化, 而降低了絮凝活性, 加热 25 min 时, 絮凝活性降低了 30%, 35 min 时, 降低了 75%.

2.9 微生物絮凝剂 (MB) 与其它絮凝剂处理高岭土悬浊液效果的比较

为比较微生物絮凝剂与目前常用絮凝剂的絮凝效果, 把目前常用的絮凝剂配成一定浓度的溶液, 在高岭土悬浊液中各加入 0.5 ml, 并调节 pH 值至 7—8, 测定其对高岭土的絮凝率; 微生物絮凝剂对高岭土絮凝效果的操作与微生物絮凝剂浓度影响的操作相同, 结果如图 8 所示. 在 0—60 mg·l⁻¹ 的浓度范围内, 微生物絮凝剂的絮凝效果要明显好于其它类型的絮凝剂, 当浓度超过 60 mg·l⁻¹ 时, 微生物絮凝剂的絮凝效果下降, 而 Al₂(SO₄)₃ 的絮凝能力显著提高, 聚合氯化铝也有所提高, 只有聚丙烯酰胺的絮凝活性始终较低, 因此, 在相同的絮凝条件下, 达到相同的絮凝效果所需要的微生物絮凝剂的浓度低, 在絮凝固悬物时, 微生物絮凝剂较其它絮凝剂具有明显的优势.

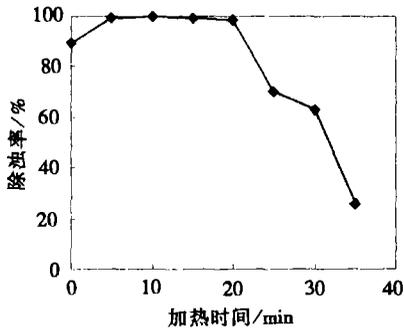


图 7 温度对絮凝活性的影响

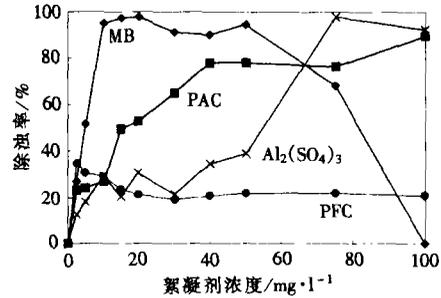


图 8 不同絮凝剂的絮凝效果比较

Fig. 7 Effect of temperature on flocculating activity Fig. 8 Comparison of various flocculant in common use

3 小结

对本实验室筛选到的一株絮凝剂产生菌鉴定为芽孢杆菌，命名为 *Bacillus* sp. B-2，以高岭土悬浊液为检测物质研究了菌 *Bacillus* sp. B-2 产生的絮凝剂具有以下特点：

(1) 菌在生长的同时产生并积累絮凝剂，将其分泌到细胞外，起絮凝作用的物质主要存在于发酵液中。

(2) 在适宜的培养条件下，每升发酵液可得到絮凝剂 1.7 g 左右，对高岭土悬浊液絮凝的适宜用量与 CaCl_2 溶液的浓度及高岭土的浓度有关。

(3) pH 值、温度等条件都影响絮凝剂的絮凝效果，适宜的 pH 值为大于 7 的中性偏碱性范围内，当 100°C 水浴 25 min 时絮凝活性降低 30%，35 min 时，降低了 75%。

(4) Ca^{2+} ， Mg^{2+} ， Mn^{2+} ， Cu^{2+} 等二价离子对絮凝有促进作用，三价离子中 Al^{3+} 具有促进作用，而 Fe^{3+} 则抑制絮凝作用。

(5) 与目前常用的无机和有机絮凝剂相比，该微生物絮凝剂对高岭土悬浊液具有良好的絮凝效果，且絮凝剂用量少。

参 考 文 献

- [1] Jin S N, Gi S K, Sang O L et al., Biofloculant Produced by *Aspergillus* sp. JS-42. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1996, **60** (2) :325—327
- [2] Kazuo S, Hajime T, DNA as a Flocculation Factor in *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **45** (12) : 2869—2876
- [3] Junji N, Shigeyoshi M, Yoshio H, Condition for Production of Microbial Cell Flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7002. *Agric. Biol. Chem.*, 1976, **40** (7) :1341—1347
- [4] Minoru T, Ryuichiro K, Jun-ichi K et al., A Protein Biofloculant Produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55** (10) :2663—2664
- [5] 王镇, 王孔星, 几株絮凝剂产生菌的特性研究. *微生物学报*, 1995, **35** (2) :121—129
- [6] Kazuki T, Ryuichiro K, Microbial Flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55** (11) :2793—2799
- [7] Minoru T, Jun-ichi K, Hiroshi M et al., Factors Affecting the Activity of a Protein Biofloculant Produced by *Nocardia*

- amarae*. *J. Ferment Bioeng.*, 1992, **74** (6) :408—409
- [8] Ryuichiro K, Yasuhiro N, Microbial Flocculation of Waste Liquids and Oil Emulsion by a Bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55** (4) :1127—1129
- [9] Ryuichiro K, Diyoshi T, Tomoo S, Screening for and Characteristics of Microbial Flocculants. *Agric. Biol. Chem.*, 1986, **50** (9) :2301—2307
- [10] 布坎南 R E, 吉本斯 N E, 伯杰细菌鉴定手册, 第八版, 科学出版社, 1984
- [11] 严熙世, 范瑾初, 给水工程. 中国建筑工业出版社, 1995

2000 年 12 月 6 日收到.

STUDIES ON CHARACTERISTICS OF MICROBIAL FLOCCULANT

Gong Xiaoyan Luan Zhaokun Wang Shuguang Li Zehua

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Beijing, 100085)

ABSTRACT

Flocculation characteristics of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. B-2 were studied. It showed that *Bacillus* sp. B-2 produced extracellular flocculant with the highest flocculation activity of 97% superior to common used organic or inorganic flocculant during its growth. Under the optimum conditions, the amount of flocculant production was $1.7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. The suitable pH value for the flocculant to flocculate Kaolin clay suspension was higher than 7. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} facilitate flocculation activity of microbial flocculant and the flocculating activity was intensified with increase in Ca^{2+} concentration.

Keywords: microbial flocculant, flocculation, flocculating characteristic.