

阳离子交换树脂法提取一株除铬 (VI) 优势菌 (*Bacillus* sp.) 的胞外聚合物^{*}

严杰能 许燕滨^{**} 段晓军 杜妍晔

(广东工业大学 环境科学与工程学院, 广州, 510006)

摘 要 采用阳离子交换树脂法对一株除铬优势菌 (*Bacillus* sp.) 的胞外聚合物 (EPS) 进行提取, 综合考察树脂量、振摇频率、提取时间三个主要因素对 EPS 提取效率的影响, 确定阳离子交换树脂法提取优势菌 *Bacillus* sp. 的最佳 EPS 提取条件. 试验结果表明: 当菌悬液 OD 为 0.833, 树脂量 20g, 振摇频率 120 r·min⁻¹, 提取时间 8h 时, EPS 的提取效果最佳, 提取量高达 132.15 μg·mL⁻¹ 菌悬液, 而 DNA 提取量仅 1.48 μg·mL⁻¹ 菌悬液.

关键词 除铬 (VI) 优势菌, 胞外聚合物, 阳离子交换树脂, 多糖, 蛋白质.

胞外聚合物 (EPS) 是一定环境条件下微生物分泌于体外的一种高分子粘性聚合物, 一般还包括一些细胞脱落物以及从环境中吸附的有机物. 随着废水生物处理系统的广泛应用, 胞外聚合物的研究引起了人们的关注^[1-2], 微生物在生长和各个阶段都能分泌出 EPS, 但要提取出足够量的 EPS 目前还比较困难^[3].

有关细菌 EPS 的提取研究^[4-7]多数采用直接离心提取工艺, 但这样的提取方法效率较低. 人们通过电镜发现超声波并不能完全使 EPS 层从细胞表面脱落, 化学试剂又很容易造成胞内物质外流, 污染样品, 采用阳离子树脂提取法有较突出的优点^[8]. 目前, 阳离子交换树脂法已成为国外学者研究 EPS 的常用提取手段^[8-9].

本文将采用阳离子交换树脂法并考察其对一株除铬 Cr(VI) 优势菌 EPS 的提取效果, 综合考察树脂量、提取时间和振摇频率三大因素, 筛选出菌株 EPS 的最佳提取条件.

1 实验方法

1.1 菌种的来源和预处理

菌种为一株高效除铬 Cr(VI) 优势菌, 隶属于 *Bacillus* sp. 属, 菌种为浅黄色杆菌, 菌体边缘光滑, 由实验室保存.

培养基 (g·L⁻¹): KH₂PO₄: 0.5 (NH₄)₂SO₄: 2.0 NH₄Cl: 0.1 Na₂SO₄: 0.5 CaCl₂: 0.1 NaHCO₃: 0.5 MgSO₄: 0.1 酵母膏: 2.0 乳酸钠: 3.0 微量金属补充液: 6mL 蒸馏水: 1L; pH: 6.8—7.2

菌种经活化传代和分离纯化后, 挑取菌苔接至液体培养基的试管中后, 32℃培养 24h, 移取 1mL 菌悬液接到液体培养基的三角瓶中, 32℃培养 24h, 640nm 下测定菌悬液 OD 值. 为保证每次试验所用的菌量恒定, 以初次培养的菌悬液 OD 值为标准, 若后来制备的菌悬液 OD 值大于初次值, 则利用经灭菌后的空白液体培养基稀释至与初次菌悬液 OD 值相同为止; 若小于初次值, 则要对菌悬液继续培养, 直至与初次菌悬液 OD 相同为止.

由于液体培养基组份中的蛋白质、多糖和 DNA 等会干扰 EPS 的提取和定量, 首先必须一次去除, 将菌液离心 10min (2000g) 后弃去上清液, 补充蒸馏水使其恢复到原体积 40mL

2009 年 7 月 27 日收稿.

^{*} 国家自然科学基金项目 (40801194).

^{**} 通讯作者 (责任作者), E-mail: hopeybxu@tmu.com

1.2 阳离子树脂法提取 EPS

采用阳离子交换树脂(001×7型,上海树脂厂)提取,提取方法的详细步骤如下:用蒸馏水反复清洗树脂4—5次,除去阳离子交换树脂中的可溶性杂质;取制备好的菌悬液40ml于2000g下离心10min,弃去上清液并补充蒸馏水至原体积,再在2000g下离心3min,再弃去上清液并补充蒸馏水至原体积,重复2次,除去液体培养基中的杂质;加入一定量的阳离子交换树脂于250ml的三角瓶中,将上述得到的40ml样品加入其中摇匀,放入摇瓶柜中振荡提取;将提取后的样品移至10ml的离心管中,在8000g下离心10min,上清液经0.45μm滤膜过滤,得到的无色透明溶液为EPS待测样品。

1.3 EPS的分析方法

EPS含量以多糖和蛋白质表示,提取方法对细菌细胞的损坏程度以DNA含量表示,多糖采用蒽酮比色法^[10-11]测定;蛋白质采用Bradford法^[12-13]测定;DNA采用二苯胺显色法^[11,14]测定。

2 结果与讨论

2.1 影响因素的确定

以树脂量、提取时间、振摇频率为影响因素,吸光度0.848的菌液为样品,采用正交表 $L_9(3^4)$,做3水平3因素正交实验,见表1。结果表明,较优的EPS提取条件为:树脂量10g,提取时间8h,振摇频率 $125r\cdot min^{-1}$,此时EPS的提取效率为: $54.90\mu g\cdot ml^{-1}$ 。根据极差分析,见表2,各因素的影响按从大到小排序为:树脂量>振荡频率>提取时间。

表 1 水平因素
Table 1 Levels of factors

项目	因素		
	树脂量 /g	振摇频率 / $r\cdot min^{-1}$	提取时间 /h
水平 1	10	100	4
水平 2	30	125	6
水平 3	50	150	8

表 2 正交试验结果及极差分析
Table 2 Results and range analysis of orthogonal experiment

项目	试验			EPS / $\mu g\cdot ml^{-1}$
	树脂量 /g	提取时间 /h	摇床的振摇频率 / $r\cdot min^{-1}$	
1	1(10)	1(4)	1(100)	38.21
2	1(10)	2(6)	2(125)	54.90
3	1(10)	3(8)	3(150)	46.00
4	2(30)	1(4)	2(125)	36.01
5	2(30)	2(6)	3(150)	30.42
6	2(30)	3(8)	1(100)	29.09
7	3(50)	1(4)	3(150)	20.51
8	3(50)	2(6)	1(100)	23.46
9	3(50)	3(8)	2(125)	37.90
γ_1	46.37	31.58	30.25	
γ_2	31.84	36.26	42.94	
γ_3	27.29	37.66	32.31	
极差(R)	19.08	6.09	12.68	

2.2 树脂量的确定

640nm下吸光度为1.159的菌悬液作试验样品,树脂量为10—60g,在振摇频率为 $125r\cdot min^{-1}$ 下

提取 8h, 考察树脂量对 EPS提取效果的影响. 试验结果见图 1, 图中数据为 3次平行试验结果的算术平均值.

从图 1可以看出, 当树脂投加量为 20g时, EPS的提取效果最好, 而树脂投加量大于 20g时, EPS的提取量反而有下降的趋势, 一方面是因为钠型阳离子树脂与带负离子的多糖发生反应引起, 另一方面可能是阳离子交换树脂对 EPS有少量吸附造成; 另外, 从图 1还可以看出蛋白质是除铬优势菌 EPS的主要成分, 多糖含量较少. 图 1表明阳离子交换树脂投加量与 EPS的提取量之间并不存在正比的关系, 这与部分用阳离子交换树脂提取活性污泥 EPS的研究报道^[8-11]是不一致的, 可见, 提取对象也是影响树脂投加量的因素之一.

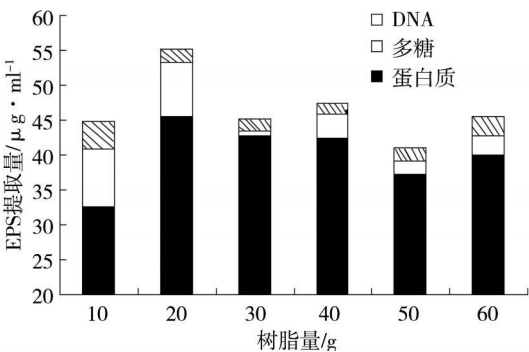


图 1 树脂投加量对 EPS和 DNA提取的影响
Fig 1 Effect of the cation resin on the extraction of EPS and DNA

为了验证阳离子交换树脂对 EPS是否有吸附作用, 利用 EPS提取液在振摇时间为 8 h, 频率为 120r·m⁻¹进行了试验补充, 并将 3次平行试验数据的算术平均值列入表 3. 结果表明, 阳离子交换树脂对 EPS有很少量的吸附作用.

表 3 阳离子交换树脂对 EPS的吸附试验
Table 3 Test of EPS adsorbed by cation exchange resin

树脂量 /g		10	20	30	40	50
吸附前	糖 /μg·mL ⁻¹	4.44	4.62	3.07	3.62	3.29
	蛋白质 /μg·mL ⁻¹	78.68	97.59	87.36	84.58	86.33
吸附后	糖 /μg·mL ⁻¹	4.39	4.57	3.07	3.49	3.18
	蛋白质 /μg·mL ⁻¹	78.23	96.43	86.83	82.38	85.70

2.3 振摇频率的确定

以 640nm下吸光度为 1.001的菌悬液作试验样品, 取树脂量 20g, 分别在振摇频率为 10Q、11Q、12Q、13Q、14Q和 150r·m⁻¹下提取 8h, 考察振摇频率对 EPS提取效果的影响. 试验结果见图 2.

从图 2可以看出, 多糖和蛋白质在振摇频率为 120r·m⁻¹时都出现最好的提取效果, 分别为 6.77μg·mL⁻¹和 78.52μg·mL⁻¹; 从图 2还可以看出, 多糖在振摇频率较低时提取量已接近最大值, 说明在采用阳离子树脂提取除铬优势菌 EPS的过程中, 多糖比蛋白质更容易被提取出来. 当振摇频率大于 120r·m⁻¹时, EPS提取量有明显的下降, 这说明频率增大使树脂与菌体之间的有效碰撞减少, 从而降低了阳离子交换树脂的离子交换作用. 另外, 振摇频率在 100—150r·m⁻¹之间时, DNA提取量在 0.5—3μg·mL⁻¹范围波动, 可见, 振摇频率在 100—150r·m⁻¹时, 对除铬优势菌细胞的破坏程度相当低.

2.4 最佳提取时间

以 640nm下吸光度为 0.759的菌悬液作试验样品, 取树脂量为 20g, 在振摇频率为 120r·m⁻¹下, 分别考察提取时间在 4、5、6、7、8、9和 10h下 EPS的提取效果. 试验结果见图 3.

从图 3可以看出, 随着提取时间的增大, 多糖含量的变化很小, 而蛋白质含量逐渐增加, EPS含

量在 8h 已接近最大值, 当提取时间大于 8h 时, EPS 提取量基本维持在 $115\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$ 左右, 因此选择 8h 为 EPS 的最佳提取时间; 同时, 图 3 再次说明多糖比蛋白质容易被提取, 在 4 h 之前已达到最大提取量. 从图 3 还可知, DNA 含量在 $0.2\text{—}1.2\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$ 左右范围内波动, 说明阳离子交换树脂对细胞的破坏程度十分低, 提取效果非常好.

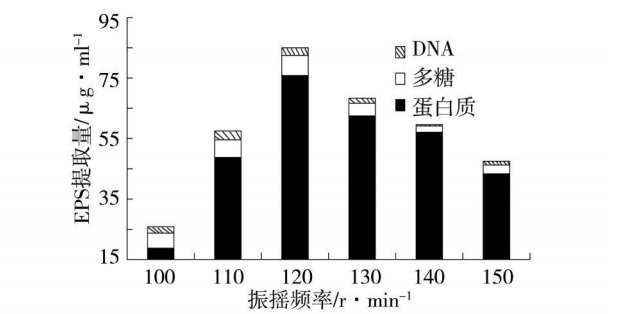


图 2 振摇频率对 EPS 提取和 DNA 提取的影响
Fig 2 Effect of the shaking frequency on the extraction of EPS and DNA

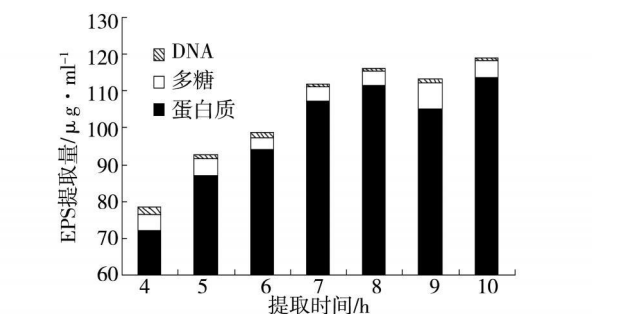


图 3 提取时间对 EPS 提取效果影响
Fig 3 Effect of the extracting time on the extraction of EPS and DNA

2.5 重现性试验

以 640nm 下吸光度为 0.833 的菌悬液作试验样品, 在树脂量为 20g 振摇频率为 $120\text{r}\cdot\text{m in}^{-1}$ 和提取时间 8h 的条件下做重现性试验, 试验结果见表 4. 从表 4 中结果可以看出, 在上述条件下进行的 5 个试验中 EPS 及其各成分含量的相对标准偏差较低, 有很好的重现性; 进一步说明阳离子交换树脂法具有良好的提取效果同时, 对微生物细胞的破坏程度低, 对除铬优势菌 EPS 特性的进一步研究具有重要意义.

表 4 重现性试验结果				
Table 4 Results of the repetitive experiment				
试验	多糖 / $\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$	蛋白质 / $\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$	DNA / $\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$	EPS / $\mu\text{g}\cdot\text{m l}^{-1}$
1	6.63	125.57	1.61	132.20
2	6.08	126.29	1.45	132.37
3	6.77	128.79	1.29	135.55
4	6.22	123.79	1.45	130.00
5	7.18	123.43	1.61	130.61
平均值	6.58	125.57	1.48	132.15
RSD(%)	6.69	1.72	9.09	1.63

综上所述, 正交试验和极差分析表明, 影响 EPS 提取效果最大的因素为树脂量, 其次为振荡频率, 提取时间影响最小. 确定当树脂量为 20g 振摇频率为 $120\text{r}\cdot\text{m in}^{-1}$, 提取时间为 8h 时, 为除铬优势菌 EPS 提取的最佳条件. 研究发现, 在采用阳离子树脂提取除铬优势菌 EPS 的过程中, 多糖在 4 h 内已达到最大提取量, 而蛋白质在 8h 后才达到最大提取量, 说明多糖与细胞结合较松散, 因而更容易被提取出来. 重现性试验结果表明: EPS 及其各成分的相对标准偏差在 1.63—9.09% 之间, 重现性很好, 说明采用阳离子胶换树法提取 EPS 具有高效、稳定、可靠等优点.

参 考 文 献

[1] 李延军, 李秀芬, 华兆哲等, 好氧颗粒污泥胞外聚合物的产生及其分布 [J]. 环境化学, 2006, 25 (4) : 440—443

[2] 刘燕, 王越兴, 莫华娟等, 有机底物对活性污泥胞外聚合物的影响 [J]. 环境化学, 2004, 23 (3) : 253—256

[3] Ushin a M, Brian R G, Elizabeth A H et al, Cd Adsorption onto Pseudomonas Putida in the Presence and Absence of Extracellular Polymeric Substances [J], Geochim. Cosmochim., 2008, 72 : 5885—5895

[4] 苏春彦, 康春莉, 郭平等, 天然水优势菌胞外聚合物及主要成分对 Cd^{2+} 的吸附特征 [J]. 应用化学, 2006, 23 (11) :

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1186—1188

[5] 苏春彦, 康春莉, 董德明, 自然水体细菌胞外有机组分吸附铅镉红外光谱特征 [J]. 长春理工大学学报, 2005, 28 (4) : 111—112

[6] Zhang S J, Xu C, Peter H, Chemical Composition and ^{234}Th (IV) Binding of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Produced by the Marine Diatom *Amphora* sp. [J]. *Marine Chemistry*, 2008, 112: 81—92

[7] Gilles G, Francois B, Asmaa S et al., Effect of pH on Cadmium and Lead Binding by Extracellular Polymeric Substances (EPS) Extracted from Environmental Bacterial Strains [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 63: 48—54

[8] Janette T, Bryne T N, Fred J W et al., The Effect of Extracellular Polymers (EPS) on the Protein Adsorption Characteristics of the Thermophile *Bacillus licheniformis* S-86 [J]. *Chemical Geology*, 2008, 247: 1—15

[9] Monnet F, Vaillant N, Himia A et al., Treatment of Domestic Wastewater Using the Nutrient Film Technique (NFT) to Produce Horticultural Roses [J]. *Water Res.*, 2002, 36 (4) : 3489—3496

[10] 龙向宇, 龙腾锐, 唐然等, 阳离子交换树脂提取活性污泥胞外聚合物的研究 [J]. 中国给水排水, 2008, 24 (3) : 30—33

[11] Adar Sunil S, Lee Duu-Jong, Extraction of Extracellular Polymeric Substances from Aerobic Granules with Compact Interior Structure [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154: 1120—1126

[12] Zhang B, Sun B, Jin M et al., Extraction and Analysis of Extracellular Polymeric Substances in Membrane Fouling in Submerged MBR [J]. *Desalination*, 2008, 227: 286—294

[13] Nur C, Guven O, Extracellular Polysaccharides Produced by Cooling Water Tower Biofilm Bacteria and Their Possible Degradation [J]. *Biofouling*, 2008, 24 (2) : 129—135

[14] Adar Sunil S, Lee Duu-Jong, Lai J Y, Effects of Aeration Intensity on Formation of Phenotyped Aerobic Granules and Extracellular Polymeric Substances [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 77: 175—182

EXTRACTION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCE FROM A Cr(VI)-REMOVAL PREDOMINATED STRAIN (*Bacillus* sp.) BY CATION RESIN METHOD

YAN Jie-neng XU Yan-bin DUAN Xiao-jun DU Yan-ye

(Faculty of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou, 510006, China)

ABSTRACT

Cation resin method was used to extract the EPS of a Cr(VI)-removal predominant strain (*Bacillus* sp.), and the optimum extraction conditions including the cation resin dose, shaking frequency and extracting time were obtained. The experimental results showed that when the OD value of the bacterial suspension liquid was 0.833, with 20g cation resin, $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ and 8 h extracting time, the extraction capacity of EPS was $132.15\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. And the extraction capacity of DNA was only $1.48\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The cation resin method was efficient and reliable for the EPS extraction of the Cr(VI)-removal predominant strain (*Bacillus* sp.).

Keywords Cr(VI)-removal predominant strain, extracellular polymeric substance, cation resin, polysaccharide, protein