

# 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其鉴定

## Screening and Identification of Strains for Producing Microbial Flocculants

胡玉平<sup>1</sup>, 胡波<sup>2</sup>, 夏璐<sup>1</sup>

HU Yu-ping<sup>1</sup>, HU Bo<sup>2</sup>, XIA Lu<sup>1</sup>

(1. 广西民族大学, 广西南宁 530006; 2. 广西师范学院, 广西南宁 530001)

(1. Guangxi University of Nationalities, Nanning, Guangxi, 530006, China; 2. Guangxi Teacher Education University, Nanning, Guangxi, 530001, China)

**摘要:**采用稀释法和划线纯培养法, 从土壤、湖水及湖底淤泥样品中培养分离出 16 株细菌, 筛选获得 2 株高效微生物絮凝剂的生产菌株, 利用其发酵液进行絮凝实验并进行菌种鉴定。结果表明, 两株高效生产微生物絮凝剂的絮凝率均达到 90% 以上, 两菌株初步鉴定为氮单胞菌 (*Azomonas* sp.) 和动胶菌属 (*Zoogloea ramigera*)。

**关键词:**微生物絮凝剂 菌种 筛选 鉴定

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2007)01-0078-03

**Abstract:** Sixteen strains are isolated from the samples of soil, sewage and sludge of a lake using the pure culture law and the dilution. It is found that two out of 16 strains are high effective in producing flocculants. The fermentation solutions of these two strains are tested, and their flocculation rates reach 90% upward. These two stains are identified as *Azomonas* sp. and *Zoogloea ramigera*.

**Key words:** microbial flocculants, strains, screening, identification

微生物絮凝剂 (Microbial flocculant, 简称 MBF) 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<sup>[1~4]</sup>。具有良好的絮凝沉淀性能, 安全、无毒, 易于生物降解<sup>[5~7]</sup>。已知的微生物絮凝剂有糖蛋白、多糖、纤维素和 DNA 等<sup>[7~9]</sup>。微生物絮凝剂具有安全、高效、可生物降解和对环境无害等优点, 并且能产絮凝剂的微生物种类多, 生长快, 易于采取生物工程手段实现产业化, 因而微生物絮凝剂的开发是大有前途的。但是, 絮凝剂用量大, 成本高等问题给微生物絮凝剂在工业上广泛应用造成了巨大障碍<sup>[10]</sup>。因此, 寻找高效絮凝剂产生菌, 提高絮凝活性, 降低絮凝剂用量已经成为絮凝剂能否在工业中得到推广应用的关键所在。

本试验从土壤、湖水、湖底淤泥中筛选到 2 株高效 MBF 产生菌, 并进行了菌种鉴定。该菌的絮凝率高, 用量少, 具有良好的应用前景。

收稿日期: 2006-10-13

作者简介: 胡玉平 (1975-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事化工环保和环境微生物方面的研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源 菌种的样品采集于广西民族大学校园花圃中的土壤, 南宁市西乡塘区相思湖的湖水和湖底淤泥中。每个地方采集 3 份, 共 9 份样品。

### 1.1.2 实验仪器

Xsp-16A 型光学显微镜, LRH-250A 生化培养箱, XYJ-3 型台式高速离心机, 721 分光光度计, HZ24 型迂回振荡器, YX-280D 手提式高压蒸汽消毒器, HG303-3 电热鼓风干燥箱, 万用电炉, HCTP12B-1 架盘药物天平, TD18 分析天平, HHS21-6 电热恒温水浴锅。

### 1.1.3 培养基的配方及培养条件

分离培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 蒸馏水 1000ml, pH 值 7.0~7.2; 1kg/cm<sup>2</sup>, 灭菌 30 min (加 15%~20% 琼脂粉制成固体培养基)。

发酵培养基: 葡萄糖 20g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2g, NaCl 0.1g, 脲 0.5g, 酵母膏 0.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, 蒸馏水 1000ml, pH

值 7.5~8.5, 1kg/cm<sup>2</sup>, 灭菌 30 min(加 15%~20%琼脂粉制成固体培养基)。

保藏培养基: 牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 蒸馏水 1000 ml, pH 值 7.2, 1kg/cm<sup>2</sup>, 灭菌 30 min, 分装入试管, 制成斜面。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 高效菌种筛选方法

筛选方法分为初筛和复筛两个阶段, 具体筛选工艺流程为: 样品采集及其预处理→增殖培养→选择性培养→选择性培养→选择性培养→选择性平板培养(划线或涂布)→挑选菌落(营养琼脂平板或斜面)→初筛→单胞分离→复筛→产微生物絮凝剂菌种。

菌种初筛: (1) 将从原始菌源取来的湖水、湖底淤泥和土壤分别溶于无菌水中, 稀释成: 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>, 3种稀释度, 涂布于分离培养基平板上, 做3个平行样, 用30℃的生化培养箱培养, 长出菌落后, 反复进行平板划线分离, 直到长出单个菌落。(2) 将分离到的单个菌落接种到发酵培养基平板上, 30℃生化培养箱培养3~5d, 挑选出在平板上生长旺盛、较有粘性的单个菌落, 再进行多次划线分离, 直至用镜检确定菌体为较纯的单菌落后编号, 并接种于保藏培养基上进行保存。(3) 稀释、富集培养、平板划线所获取的单个菌落, 经纯化后编号。将编号后的菌株, 用接种环分别接种于装有100 ml 发酵培养基的250 ml 三角瓶中, 30℃, 160r/min 恒温振荡培养72h, 所得培养液在100 ml 浓度为5g/L的高岭土悬浊液液体中, 以几滴菌株发酵液能否使高岭土悬浊液絮凝沉淀及絮凝程度的大小来进行絮凝活性的初步测定。

菌种复筛: 将初筛所得的, 有絮凝活性的菌株, 用接种环分别接种于装有100ml 发酵培养基的250ml 三角瓶中, 30℃, 160r/min 恒温振荡培养72h后, 将所得的培养液用离心机在3000r/min 下离心30min, 测定菌株发酵液离心后上清液对高岭土悬浊液的絮凝活性。以絮凝率的高低来判断絮凝活性的优劣。

### 1.2.2 絮凝率的测定方法

絮凝效果用絮凝率来表征。在100 ml 量筒中加入80 ml 蒸馏水, 0.4g 高岭土(化学纯, 平均粒度为4.5 μm), 5ml 1%的CaCl<sub>2</sub>溶液, 2ml 上清液待测样品, 再加蒸馏水至100 ml, 调节pH值至7.0, 然后倒入150 ml 烧杯中, 放在磁力搅拌器上快速搅拌1 min, 慢速搅拌5 min, 静置10 min, 以吸管吸取一定深度的上清液于721型分光光度计550 nm处测定吸光度, 同时以不加含絮凝剂的上清液作对照实验, 并用以下公式计算其絮凝率。

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

式中A为对照上清液在550 nm处的吸光度, B为样品上清液在550 nm处的吸光度。

### 1.2.3 菌种的鉴定方法

首先观察菌株在培养基中的生长状态, 再通过巨大菌落观察和载片培养, 根据2株菌株的生理及生化特征, 并参照伯杰氏菌种鉴定手册, 确定菌株的属和种<sup>[11~13]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌种分离结果

湖水、湖底淤泥和土壤样品经稀释涂布平板培养, 共分离出16株单菌落, 其中, 从广西民族大学校园花圃土壤所采样品中分离出8株单菌落, 编号为T<sub>1</sub>~T<sub>8</sub>; 从相思湖湖水所采样品中分离出5株单菌落, 编号为S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub>; 从相思湖湖底淤泥所采样品中分离出3株单菌落, 编号为N<sub>1</sub>~N<sub>3</sub>。详见表1。

表1 菌种分离结果

Table 1 The bacterium separates result

样 品 Sample	菌落数量(个) Amount of bacterial colony
土壤 Soil	1 <sup>#</sup> 3
	2 <sup>#</sup> 2
	3 <sup>#</sup> 3
湖水 Lake water	1 <sup>#</sup> 1
	2 <sup>#</sup> 2
	3 <sup>#</sup> 2
游泥 Sullage	1 <sup>#</sup> 2
	2 <sup>#</sup> 0
	3 <sup>#</sup> 1

### 2.2 菌种筛选结果

分离出的菌株T<sub>1</sub>~T<sub>8</sub>、S<sub>1</sub>~S<sub>5</sub>和N<sub>1</sub>~N<sub>3</sub>共16株单菌落的絮凝率如表2所示。

由表2可知, 除T<sub>4</sub>和S<sub>3</sub>这两菌株外(其絮凝率为零), 其他菌株都有不同程度的絮凝活性, 其中絮凝率在80%以上的有5株, 最终选定絮凝率超过90%的T<sub>7</sub>和N<sub>2</sub>作为微生物絮凝剂高效菌株。

表2 单菌株的絮凝率

Table 2 The flocculation rate of bacterial strain

菌株 Bacterial strain	絮凝率 Flocculation rate(%)	菌株 Bacterial strain	絮凝率 Flocculation rate(%)
T <sub>1</sub>	84.7	N <sub>1</sub>	77.3
T <sub>2</sub>	6.6	N <sub>2</sub>	91.6
T <sub>3</sub>	80.5	N <sub>3</sub>	23.0
T <sub>4</sub>	0	S <sub>1</sub>	75.9
T <sub>5</sub>	61.7	S <sub>2</sub>	52.4
T <sub>6</sub>	88.0	S <sub>3</sub>	0
T <sub>7</sub>	92.9	S <sub>4</sub>	30.0
T <sub>8</sub>	48.3	S <sub>5</sub>	78.4

### 2.3 菌种鉴定结果

高效菌株 T<sub>7</sub> 和 N<sub>2</sub> 的菌落外部特征和生理生化特征分别见表 3 和表 4。

表 3 菌落外部特征

Table 3 The outside characteristic of bacterial colony

菌株编号 Number of bacterial strain	菌落形态特征 The characteristic of bacterial colony
T <sub>7</sub>	米黄色、表面凸状、浑浊、有粘性、球状、生长快 Beige, the surface gibbosity, opacity, toughness, sphere, quick growth
N <sub>2</sub>	乳白色、圆形、半透明、有光泽、极粘稠、表面微凸、生长快 Milky white, rotundity, semitransparent, luster, thickness, the surface's gibbosity, quick growth

表 4 菌种鉴定结果

Table 4 The bacterium identify result

实验项目 Experiment project	鉴定结果 Identify result	
	T <sub>7</sub>	N <sub>2</sub>
革兰氏染色 Gram's staining	G <sup>-</sup>	G <sup>-</sup>
肉汤培养 Bouillon cultivates	浑浊 Opacity	半透明 Semitransparent
接触酶 Contact enzyme	+	++
葡萄糖利用 The use of glucose	产酸、产气 Produce acid, produce gas	产酸、不产气 Produce acid, produce no gas
需氧性 Aerobic	好氧 Oxic	兼氧 Anoxic
无氮培养 No nitrogen cultivates	+	+
甲基红试验 Experiment of methyl red	+	-
色素产生 Product of Pigment	-	-

根据表 3 和表 4 的菌落形态特征和生理及生化特征,并参照伯杰氏菌种鉴定手册,初步鉴定 T<sub>7</sub> 属氮单胞菌 (*Azomonas* sp.), N<sub>2</sub> 为动胶菌属 (*Zoogloea ramigera*)。

### 3 结论

(1)以土壤、湖水和湖底淤泥为试验样品,经稀释、富集培养、平板划线进行菌种分离和纯化,依据稀释涂布平板法共分离出 16 株菌。

(2)经过菌种初筛和复筛,在 16 株菌中最终选定了 T<sub>7</sub> 和 N<sub>2</sub> 作为微生物絮凝剂高效产生菌进行试验,它们的上清液对 5g/L 高岭土悬液的絮凝率均达到

90%以上。

(3)通过对筛选二高效菌株 T<sub>7</sub> 和 N<sub>2</sub> 的菌落形态观察及生理及生化特征实验,鉴定高效菌 T<sub>7</sub> 属氮单胞菌, N<sub>2</sub> 为动胶菌属。

### 参考文献:

- [1] 王镇,王孔星,谢裕敏,等. 几株絮凝剂产生菌的特性研究[J]. 微生物学报,1995,35(2):121-129.
- [2] 黄民生,孙萍,朱莉. 微生物絮凝剂的研制及其絮凝条件[J]. 环境科学,2000,21(1):23-26.
- [3] 宫小燕,王竞,周集体. 絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化[J]. 环境科学研究,1999,12(4):9-11.
- [4] JIN S N, G S K, SANG O L, et al. Biofloculant Produced by *Aspergillus* sp J S42[J]. Biosci Biotech Biochem, 1996, 60(2):325-327.
- [5] TAKAGI H, KADOWAKI K. Flocculant production by *Peacilomyces* sp taxonomic studies and culture conditions for production[J]. Agric Biol Chem, 1985, 49(11):3151-3157.
- [6] TOEDA K, KURANE R. Microbial flocculant from *Alcaigenes cupidus* KT201[J]. Agric Biol Chem, 1991, 55(11):2793-2799.
- [7] KURANE R, TAKADA K, SUZUKI T. Screening for and characteristics of microbial flocculants [J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(9):2301-2307.
- [8] ZHANG J, LIU Z, WANG S, et al. Characterization of a biofloculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp NU-2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(4-5):517-522.
- [9] YOKOI H, YOSHIDA T, HIROSE J, et al. Biopolymer flocculant produced by an *Pseudomonas* sp [J]. Biotechnology Techniques, 1998, 12(7):511-514.
- [10] 邓述波,胡筱敏,罗茜. 高效生物絮凝剂的培养条件及特性[J]. 东北大学学报,1999,20(5):525-528.
- [11] 中国科学院微生物研究所细菌组. 一般细菌常用鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1978.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] 诸葛键,王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.

(责任编辑:邓大玉)