

李娜, 范祎立, 李雪, 等. 1 株微生物絮凝剂产生菌的分离、鉴定与絮凝剂的成分分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 288–292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.069

1 株微生物絮凝剂产生菌的分离、鉴定与絮凝剂的成分分析

李娜^{1,3}, 范祎立^{1,3}, 李雪², 李洪², 乔长晟^{1,2,3}

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津北洋百川生物技术有限公司, 天津 300457;

3. 天津市微生物代谢与发酵过程控制工程技术中心, 天津 300457)

摘要:从活性污泥中筛选分离得到产微生物絮凝剂的菌株 G1–3。经形态观察、生理生化特性分析以及基于 16S rDNA 系统进化分析, 该菌株鉴定为交替单胞菌属 (*Alteromonas*)。该菌株能在特定培养基中产生一种白色絮状沉淀, 其产率为 2.4 g/L, 且该絮状胞外产物对高岭土悬液的絮凝率可达 93.06%。经呈色反应分析, 该产物主要成分为多糖和蛋白质, 其中多糖含量为 31.38%, 蛋白质含量为 16.52%。通过高效液相色谱分析, 该胞外产物主要由天冬氨酸、亮氨酸、谷氨酸等 17 种氨基酸, 以及葡萄糖、核糖、半乳糖等 10 种单糖组成。

关键词:微生物絮凝剂; 产絮菌; 分离; 鉴定; 成分分析

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0288-05

絮凝技术是污水处理中效率高、应用广泛且成本低廉的常用方法之一。在含有悬浮颗粒 ($> 1.0 \mu\text{m}$) 和胶体物质 ($1.0 \sim 1.0 \mu\text{m}$) 水体的处理过程中, 絮凝剂能与这些颗粒物质及色素、重金属离子等污染物结合, 形成较大絮凝体沉降至水底, 以净化水体^[1]。而微生物絮凝剂是利用生物技术, 通过微生物发酵、分离提取而得到一种新型、高效、价廉的新型水处理絮凝剂^[2]。与传统絮凝剂相比, 微生物絮凝剂的二次污染小、安全性高、易被微生物降解、对环境友好, 应用领域比其他絮凝剂宽泛^[3], 使得其成为当下开发研究的重点。

本研究从活性污泥中筛选出 1 株生物絮凝剂产生菌

G1–3, 该菌在肉汤培养基中产生一种特殊的胞外产物, 呈白色絮状, 该产物具有优良的絮凝特性。本研究通过形态特征、生理生化特性及基于 16S rDNA 系统进化分析, 对该菌进行菌株鉴定, 并对白色絮状沉淀物进行成分分析, 旨在为微生物絮凝剂提供一种新材料, 扩大应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 絮凝剂产生菌 G1–3, 由笔者所在实验室从活性污泥中分离、筛选所得, 由中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC) 保藏, 编号为 CGMCC No.14457。

1.1.2 培养基 肉汤培养基: 牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 固体培养基琼脂添加量为 20.0 g, H₂O 1 000 mL, pH 值为 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 20 min。

PDA 固体培养基: 去皮马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, H₂O 1 000 mL, pH 值自然, 121 °C 条件下灭菌 20 min。

收稿日期: 2018-04-03

基金项目: 天津市科技计划 (编号: 16JCTPJC46100)。

作者简介: 李娜 (1992—), 女, 四川省安县人, 硕士研究生, 研究方向为轻工技术与工程。E-mail: 2268655218@qq.com。

通信作者: 乔长晟, 博士, 教授, 主要从事生物高分子材料的微生物制造。E-mail: qiaochangsheng@163.com。

存在状态及环境影响[J]. 地球化学, 2003, 32(2): 139–145.

[7] 郑袁明, 余柯, 吴泓涛, 等. 北京市城市公园土壤铅含量及其污染评价[J]. 地理研究, 2002, 21(4): 418–424.

[8] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[9] 李子芳, 吴锡冬. 植物丙二醛含量测定试验设计方案[J]. 天津农业科学, 2016, 22(9): 49–51.

[10] 朱海生, 刘建汀, 陈敏敏, 等. 丝瓜铜锌超氧化物歧化酶 Cu/Zn-SOD 基因家族的克隆与表达分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(17): 3391–3404.

[11] 徐学华. 北方地区 7 种主要绿化树种对铅镉胁迫的生理生态响应[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.

[12] 燕平梅, 章良山. 水分胁迫下脯氨酸的累积及其可能的意义[J]. 太原师范专科学校学报, 2000(4): 27–28.

[13] 袁祖丽. Cd、Pb 污染对烤烟生理特性及生长发育的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2006.

[14] Ruley A T, Sharma N C, Sahi S V. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(11): 899–906.

[15] 麻占威, 吴永贵, 付天岭, 等. 不同粒径铅锌冶炼废渣中重金属分布特征[J]. 环境科学与技术, 2015(4): 149–154.

[16] 王兰, 刘方, 王俭, 等. 铅锌矿渣酸性淋溶下重金属释放特征及其对植物幼苗生长的影响[J]. 生态学杂志, 2010, 29(6): 1121–1126.

[17] 付天岭, 吴永贵, 曾艳, 等. 水可溶性有机物在铅锌废渣生态修复中的应用[J]. 环境工程学报, 2017, 11(2): 1178–1184.

[18] 朱光旭, 肖化云, 郭庆军, 等. 锌冶炼渣堆场优势植物的重金属累积特征研究[J]. 生态环境学报, 2016, 25(8): 1395–1400.

1.2 方法

1.2.1 微生物絮凝剂产生菌的筛选 取天津市某污水处理厂的活性污泥,取合适浓度的经无菌水稀释的稀释液分别在肉汤固体培养基和 PDA 固体培养基平板上涂布,于 37 ℃ 培养 24 h。挑选其中形态各异的单菌落进行分离纯化,将纯化后的菌株接种于 100 mL 肉汤培养基中,于 37 ℃、200 r/min 摇床培养 20 h,备用。

在 100 mL 量筒内加入 0.4 g 高岭土、4 mL 1% 的 CaCl_2 溶液、2 mL 菌株发酵液,在 200 r/min 转速快速搅拌 5 min,然后 80 r/min,慢速搅拌 10 min,静置一段时间,测上清液在 550 nm 处的吸光度,根据吸光度计算絮凝率。计算公式为

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

其中, μ 表示絮凝率, A 表示参照上清液的浊度, B 表示加入发酵液絮凝之后上清液的浊度^[4]。

1.2.2 菌株形态观察 将菌株接种于肉汤固体培养基上,通过 3 区划线得单菌落,观察其形态。

扫描电镜下观察菌株 G1-3 的微观形态:2.5% 戊二醛固定,0.1 mol/L PBS 清洗 3~4 次,1% OsO_4 固定,0.1 mol/L PBS 清洗 3~4 次,分别用 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇,体积比为 2:1 的乙醇与醋酸戊酯、体积比为 1:1 的乙醇与醋酸戊酯依次脱水,纯戊酯脱水 30 min,临界点干燥,喷金,于扫描电镜下观察^[5]。

1.2.3 胞外絮状产物成分分析 样品的多糖定性采用莫氏试验、斐林试验,蛋白质定性采用茚三酮试验、双缩脲反应,糖的定量测定采用苯酚-硫酸法,蛋白质定量测定采用考马斯亮蓝法,具体操作参见文献^[6]。

1.2.4 高效液相色谱分析氨基酸与单糖 发酵液中的白色絮状物 5 000 r/min 离心经 3 次无菌水离心、洗涤,用真空冷冻干燥器干燥,取固体,经水解预处理后,采用高效液相色谱法分析其中的氨基酸与单糖组成。

1.2.4.1 单糖组成测定 称取冻干的样品 2 mg,加入 2 mol/L 三氟乙酸溶液 0.5 mL,在 120 ℃ 条件下水解 120 min,氮吹仪吹干。向水解干燥后得到的单糖样品中加入溶于无水甲醇、0.5 mol/L 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)试剂和 0.3 mol/L NaOH 溶液各 0.5 mL,充分混匀后,水浴 70 ℃ 反应 30 min。冷却至室温,加入 0.3 mol/L HCl 0.5 mL,充分混匀,加入 0.5 mL 氯仿,充分震荡萃取,离心后用 0.22 μm 滤膜过滤后上机。

1.2.4.2 氨基酸组成测定 取一定质量样品于 20 mL 水解管中,加入 16 mL 6 mol/L 的盐酸溶液,真空脱气 30 min,充氮封管,110 ℃ 下水解 22~24 h,冷却后定容至 50 mL。取 1 mL 水解液于小瓶中,真空脱酸抽干,加入 1 mL 0.02 mol/L 盐酸溶液,充分溶解。精密量取上述溶液 500 μL ,置于 5 mL 塑料离心管中,加入 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液 250 μL ,混匀,加入 0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 25 μL ,混匀,室温放置 1 h 后,加 2 mL 正己烷,剧烈振摇,放置 10 min,取下层溶液用 0.22 μm 的水相膜滤膜过滤后上机分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

经固体平板划线分离,从活性污泥中得到 5 株菌株,经纯

化、培养后,发现其中 1 株菌能在液体培养基中产生一种白色絮状沉淀(图 1)。以对高岭土悬浊液的絮凝活性为指标,该絮状沉淀的絮凝率可达 93.2%,且该菌絮凝特性稳定,将该菌命名为 G1-3。



图1 菌 G1-3 在发酵液中产生白色絮状沉淀

2.2 形态观察

G1-3 菌株在肉汤固体培养基上呈白色圆形不透明菌落,其表面光滑、有黏性、边缘整齐,菌落大小为 1~2 d/mm。通过扫描电镜观察菌株 G1-3 表面形态呈椭圆状,一端较圆,一端较尖(图 2)。

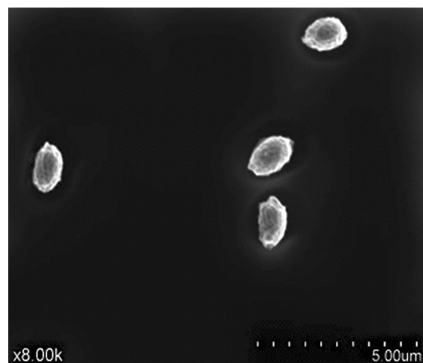


图2 G1-3 的形态照片

2.3 G1-3 的生理生化特征

对菌株 G1-3 进行生理生化分析,根据 VITEK 全自动微生物检测系统的分析,菌株 G1-3 的生理生化特征见表 1。菌 G1-3 可利用葡萄糖为唯一碳源生长,但不能利用麦芽糖、蔗糖、甘露糖、阿拉伯糖等作为唯一碳源生长;在生长过程中,能产生 H_2S ,且 L -脯氨酸芳胺酶、 L -苹果酸盐同化为阳性。鉴定结果表明,G1-3 菌株的形态和生理生化特性与交替单胞菌属较为一致。

2.4 16S rDNA 序列测序

对菌株 G1-3 测序,经过提取 DNA、PCR 扩增、连接转化等操作,应用 BLAST 程序、NCBI 数据库里的信息进行同源性搜索,进行分子生物学鉴定,绘制出系统进化树见图 3。根据 Blast 结果,G1-3 属于 γ -变形菌纲(*Gammaproteo bacterium*)交替单胞菌属(*Alteromonadales*),与 *Alteromonadales bacterium* DN3-1 亲源关系最近。

2.5 G1-3 菌株的生长特性

将菌株 G1-3 接种至 100 mL 肉汤培养基中,于 200 r/min 3 ℃ 条件培养,测定菌株 G1-3 菌体在 2、4、6、8、10、12、24 h 的生长情况。根据发酵液在波长 600 nm 处的吸光度,制得该菌株生长曲线,由图 4 可知,G1-3 仅培养 6 h

表 1 G1-3 生理生化特性

编号	英文名称	中文名称	结果
1	Ala - Phe - Pro - ARYLAMIDASE	丙氨酸 - 苯丙氨酸 - 脯氨酸芳胺酶	-
2	ADONITOL	侧金盏花醇	-
3	L - Pyrrolydonyl - ARYLAMIDASE	吡咯烷基芳胺酶	-
4	L - ARABITOL	L - 阿拉伯糖	-
5	D - CELLOBIOSE	D - 纤维二糖	-
6	BETA - GALACTOSIDASE	β - 半乳糖苷酶	-
7	H ₂ S PRODUCTION	H ₂ S 产生	+
8	BETA - N - ACETYL - GLUCOSAMINIDASE	β - N - 乙酰葡萄糖苷酶	-
9	Glutamyl Arylamidase pNA	谷氨酰芳胺酶	-
10	D - GLUCOSE	D - 葡萄糖	+
11	GAMMA - GLUTAMYL - TRANSFERASE	γ - 谷氨酰转移酶	-
12	FERMENTATION/ GLUCOSE	葡萄糖发酵	-
13	BETA - GLUCOSIDASE	β - 葡萄糖苷酶	-
14	D - MALTOSE	D - 麦芽糖	-
15	D - MANNITOL	D - 甘露醇	-
16	D - MANNOSE	D - 甘露糖	-
17	BETA - XYLOSIDASE	β - 木糖苷酶	-
18	BETA - Alanine arylamidase pNA	β - 丙氨酸芳胺酶	-
19	L - Proline ARYLAMIDASE	L - 脯氨酸芳胺酶	+
20	LIPASE	脂酶	-
21	PALATINOSE	异麦芽糖	-
22	Tyrosine ARYLAMIDASE	酪氨酸芳胺酶	+
23	UREASE	尿素酶	-
24	D - SORBITOL	D - 山梨醇	-
25	SACCHAROSE/SUCROSE	蔗糖	-
26	D - TAGATOSE	D - 塔格糖	-
27	D - TREHALOSE	D - 海藻糖	-
28	CITRATE(SODIUM)	柠檬酸盐(钠)	-
29	MALONATE	丙二酸盐	-
30	5 - KETO - D - GLUCONATE	5 - 酮 - 葡萄糖苷	-
31	L - LACTATE alkalinisation	乳酸盐产碱	-
32	ALPHA - GLUCOSIDASE	α - 葡萄糖	-
33	SUCCINATE alkalinisation	琥珀酸盐产碱	-
34	Beta - N - ACETYL - GALACTOSAMINIDASE	N - 乙酰 - β - 半乳糖氨酶	-
35	ALPHA - GALACTOSIDASE	α - 半乳糖苷酶	-
36	PHOSPHATASE	磷酸酶	-
37	Glycine ARYLAMIDASE	氨基乙酸芳胺酶	-
38	ORNITHINE DECARBOXYLASE	鸟氨酸脱羧酶	-
39	LYSINE DECARBOXYLASE	赖氨酸脱羧酶	-
40	DECARBOXYLASE BASE	脱羧酶阴性控制	-
41	L - HISTIDINE assimilation	组氨酸同化	-
43	BETA - GLUCORONIDASE	β - 葡萄糖苷酸酶	-
44	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)	O/129 耐受	-
45	Glu - Gly - Arg - ARYLAMIDASE	谷氨酸 - 甘氨酸 - 精氨酸芳胺酶	-
46	L - MALATE assimilation	L - 苹果酸盐同化	+
48	L - LACTATE assimilation	L - 乳酸盐同化	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

就呈现指数生长,培养至 18 h 达到稳定期。

采用干重法,测定菌株 G1-3 菌体在肉汤培养基中生长 2、4、6、8、10、12、24 h 时菌株胞外絮状产物的产量。胞外产物较菌株生长晚 2 h,培养至 8 h 时开始快速生成,而至 22 h 就基本停止,产量在此时达最高,为 2.4 g/L。且当培养超过 48 h 时,发酵液中无该白色絮状物,该胞外产物被分解。

2.6 絮凝率测定

根据来源不同,生物絮凝剂可分为 3 类^[7]:微生物细胞,如某些细菌、酵母;微生物细胞提取物,如酵母细胞壁的葡聚糖;微生物细胞代谢产物。为探究该菌株絮凝活性成分的分
布情况,对比发酵液、胞外絮状产物、菌细胞悬液、去菌体上清液对高岭土悬浊液的絮凝效果。由图 6 可知,胞外产物对高

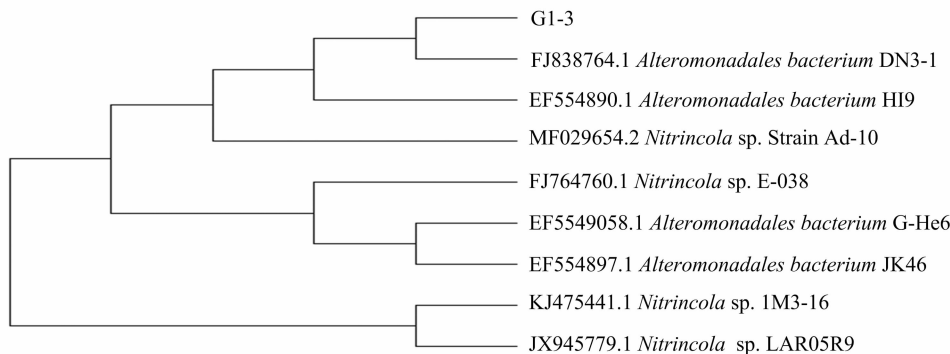


图3 G1-3 菌株的 16S rDNA 序列的系统进化树

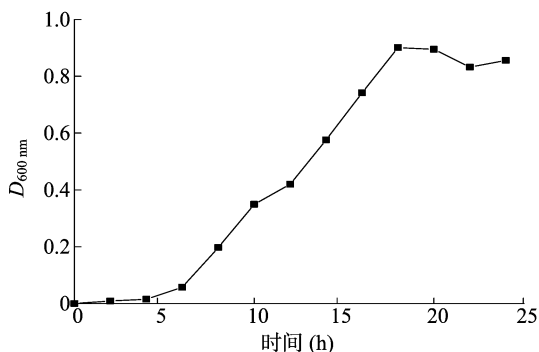


图4 G1-3 菌株 24 h 内生长曲线

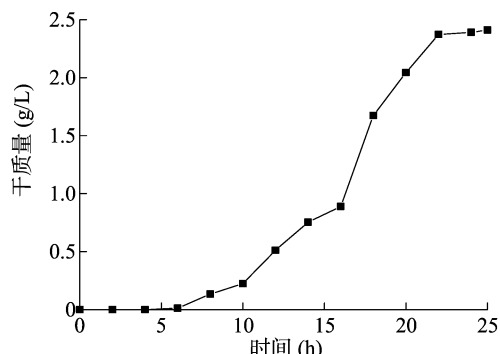


图5 G1-3 菌株胞外絮状产物生长曲线

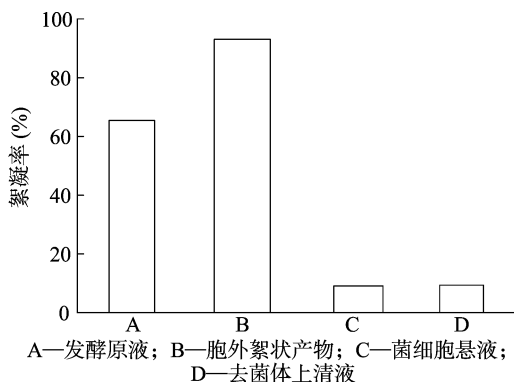


图6 发酵液中絮凝活性成分的分布情况

岭土的絮凝效率高达 93.06%，而发酵液原液只有 65.48%，菌细胞悬液以及去菌体上清液的絮凝率仅为 10% 左右，这充分说明 G1-3 菌株的絮凝特性与菌体细胞无关，主要由其细胞代谢产物产生。

该絮凝菌产生的生物絮凝剂为白色絮状物，存在于菌体

外的培养液中，由微生物分泌到胞外。根据絮凝机理，这些胞外产物可能与水中的杂质通过吸附架桥作用、电中和作用、卷扫作用等^[8-10]对水中杂质进行絮凝沉降，以达到水质澄清目的。

2.7 成分分析

2.7.1 外形观察 G1-3 菌株的白色絮状物在培养过程中，沉淀聚集在一起，肉眼观察为半透明膜状(图 7)。经真空冷冻干燥后，呈乳白色疏松层叠状，在电子显微镜下进行扫描观察，可以观察到絮凝物质呈现折叠膜状结构(图 8)。



图7 白色絮状胞外产物

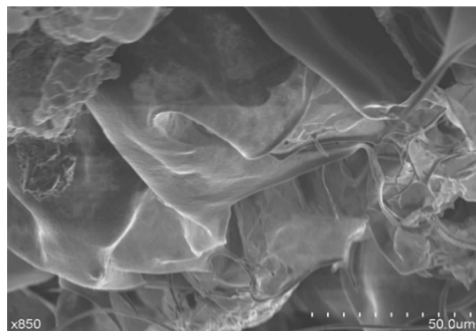


图8 絮凝剂样品电镜扫描

2.7.2 蛋白质与糖定性定量分析 根据文献报道，当下生物絮凝剂的化学组成可分为以下几类^[11]：糖类物质，多肽、蛋白质和 DNA，脂类物质，目前已发现的以多糖类物质为主，脂类最少。为探究 G1-3 菌株胞外絮状产物的成分，对其进行分析。蛋白质定性试验时，样品在茚三酮试验中出现蓝紫色，结果呈阳性；且在双缩脲试验中，出现紫玫瑰色，呈阳性，确定 G1-3 胞外絮状物中含有蛋白质。糖定性试验时，样品在莫氏试验中出现紫红色环，为阳性，在斐林试验中，无红色或黄

色的氧化亚铜沉淀生成,可认定该 G1-3 胞外絮状产物中含有多糖,但还原糖含量微弱。

根据考马斯亮蓝试验结果,测定样品中蛋白质含量为 16.52%;根据苯酚-硫酸试验,测定其总糖含量为 31.38%。上述结果表明,该产物以糖类物质为主。

2.7.3 氨基酸与单糖的分析 样品经水解预处理后,通过高效液相色谱分析其氨基酸含量(表 2)。经水解后,发现该胞外产物含有 17 种氨基酸,其中天冬氨酸含量最高,达 1.993 g/kg,而亮氨酸和谷氨酸分别为 1.908、1.760 g/kg,精氨酸、丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸的含量均达 1.000 g/kg 以上。

表 2 氨基酸含量		
编号	氨基酸名称	含量 (g/kg)
1	天冬氨酸	1.993
2	谷氨酸	1.760
3	胱氨酸	0.170
4	丝氨酸	0.677
5	甘氨酸	1.530
6	组氨酸	0.287
7	精氨酸	1.681
8	苏氨酸	0.936
9	丙氨酸	1.673
10	脯氨酸	1.644
11	酪氨酸	0.588
12	缬氨酸	0.981
13	蛋氨酸	0.473
14	异亮氨酸	0.947
15	亮氨酸	1.908
16	苯丙氨酸	1.088
17	赖氨酸	0.926

采用高效液相色谱分析单糖含量,由表 3 可知,经水解后,发现该胞外产物含有 10 种单糖,以葡萄糖、核糖、半乳糖为主,其含量明显高于其他糖类,葡萄糖含量高达 428.37 mg/kg,而核糖与半乳糖含量分别为 270.59、224.95 mg/kg。

3 结论

从活性污泥中分离得到 1 株生物絮凝剂产生菌 G1-3,经形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 基因序列鉴定,其属于交替单胞菌属(*Alteromonadales*)。

关于 G1-3 菌株絮凝活性成分的分布,以高岭土絮凝率为指标,其胞外产物絮凝率为 93.06%,其发酵液原液絮凝率较低,且菌细胞悬液以及去菌体上清液无絮凝特性。

生物絮凝剂的化学性质:茛三酮显色试验呈蓝色,双缩脲反应呈阳性;莫氏反应中浓硫酸与样品试剂混合液分界面有清晰的紫环出现。表明 G1-3 菌株的胞外絮状产物中含有

表 3 单糖含量		
编号	单糖名称	含量 (mg/kg)
1	甘露糖	93.73
2	核糖	270.59
3	鼠李糖	26.45
4	葡萄糖醛酸	68.07
5	半乳糖醛酸	17.79
6	葡萄糖	428.37
7	半乳糖	224.95
8	木糖	0.94
9	阿拉伯糖	5.78
10	岩藻糖	68.12

多糖和蛋白质,根据试验,多糖含量明显高于蛋白质含量,糖与蛋白质比为 1.9:1。

G1-3 菌株的白色絮状产物经分离、真空冷冻干燥后,呈乳白色疏松层叠状,经高效液相色谱分析,该白色絮状沉淀中含 17 种氨基酸,以天冬氨酸、亮氨酸、谷氨酸、精氨酸为主,含 10 种单糖,以葡萄糖、核糖、半乳糖为主。

参考文献:

[1]封培,王世梅,周立祥. 生物絮凝剂产生菌的分离鉴定及其在饮用水除浊上的作用[J]. 环境科学学报,2009,29(8):1666-1671.

[2]赵风,张蔚萍,胡庆华. 微生物絮凝剂的絮凝机理及应用研究[J]. 环境与可持续发展,2009(2):6-8.

[3]孙鹏轩. 微生物絮凝剂的研究进展及应用现状[J]. 环境保护与循环经济,2013(1):53-55.

[4]王雪. 生物絮凝剂混菌发酵条件优化及动力学分析[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2009.

[5]孙镇平,李佳,刘洪红,等. 不同处理技术对环境扫描电镜下细菌原始形态的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2013(1):41-43.

[6]王薇. 产絮凝合成生物絮凝剂特性及絮凝成分解析[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2009.

[7]马放,段妹悦,孔祥震,等. 微生物絮凝剂的研究现状及其发展趋势[J]. 中国给水排水,2012,28(2):14-17.

[8]董晓斌. 新型生物絮凝剂的研究与应用[J]. 甘肃联合大学学报(自然科学版),2006,20(1):52-54.

[9]Li Y M, Li Q, Hao D K, et al. Characterization and flocculation mechanism of an alkali-activated polysaccharide flocculant from *Arthrobacter* sp. B4[J]. Bioresource Technology, 2014, 170:574-577.

[10]Kumar C G, Joo H S, Choi J W, et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 34:673-681.

[11]王兰,唐静,赵璇. 微生物絮凝剂絮凝机理的研究方法[J]. 环境工程学报,2011,5(3):481-488.