

高效絮凝菌的鉴定及絮凝特性研究

常玉广^{1,2}, 马放¹, 王博¹, 王弘宇¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, changyuguang@yahoo.com.cn;

2. 南京晓庄学院 生物化工与环境工程学院, 南京 211171)

摘要: 从含油废水曝气池活性污泥中筛选6株具有絮凝特性的菌株,命名为:F1、F2、F3、F4、F5、F6. 为了研究絮凝菌的分类及絮凝特性,采用16S rDNA序列方法对6株絮凝菌进行鉴定分类;利用紫外扫描光谱与红外光谱扫描光谱分析絮凝活性成分. 鉴定结果表明:6株絮凝菌分别与芽孢杆菌属、农杆菌属、库克菌属聚为一类,特征基本一致,具有99%同源性;絮凝测定结果显示,絮凝率在69%以上,其中F2、F3、F5、F6的絮凝率高于80%. 将上述4株絮凝菌进行双菌混合培养试验,结果显示:F2和F6组合絮凝活性最佳,均优于各单菌,絮凝剂的有效成分为多糖类物质.

关键词: 絮凝;16S rDNA序列;系统发育分析;多糖

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)10-1609-05

Identification and flocculent analysis on high efficient flocculation producing bacteria

CHANG Yu-guang^{1,2}, MA Fang¹, WANG Bo¹, WANG Hong-yu¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, changyuguang@yahoo.com.cn; 2. School Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

Abstract: Six strains with flocculent characteristic have been screened from oil-field wastewater, which are named as F1, F2, F3, F4, F5 and F6. They were identified and classified by 16SrDNA sequence. The flocculation species were analyzed through UV and IR scanning spectrophotometry. It is showed that the six strains belong to the same species with *Balillus* sp., *Agrobacterlum* sp., and *Kocurla* sp. and they have 99% homogeneous identity. The results of flocculent efficiency show that the flocculent efficiency of the six strains is more than 69%, among which the flocculent efficiencies of F2, F3, F5 and F6 are more than 80%. Mixed cultures were conducted pairwise among F2, F3, F5 and F6, and the results show that the combination of F2 and F6 strains exhibits the best flocculating efficiency and it is higher than that of any pure strain.

Key words: flocculation; 16SrDNA sequence; phylogenetic analysis; polysaccharide

微生物絮凝剂是微生物在发酵过程中分泌的高分子聚合物,其主要成分为多糖^[1]、蛋白质、糖蛋白和DNA等^[2-4],具有高效,无毒,絮凝效果好等特点,对一些工业废水、河水、泥浆废水等有较好的絮凝效果.因此,利用微生物发酵产生新的复合型生物絮凝剂的前景非常广阔^[5-8].

近年有关生物絮凝剂的报道较多,但大部分

研究集中于微生物絮凝剂的发酵效果、特性、影响因素的水平,因而能否培育出高效的优良絮凝菌种,是今后的主要研究方向,国内外学者已筛选到了细菌、真菌等几十种高效的生物絮凝剂产生菌株^[9-10].由哈尔滨工业大学马放教授率先提出的“复合型生物絮凝剂”的概念^[5],是以稻草、秸秆等廉价生物质材料为底物,利用纤维素降解菌群和絮凝菌群组成的复合型微生物絮凝剂产生菌菌群,进行两段式发酵后分离提取而获得生物絮凝剂.本文是在“复合型生物絮凝剂”概念的基础上开展深入研究,从基因水平鉴定絮凝微生物及对其进行分类,并且对产絮菌最佳菌群的构建、絮凝

收稿日期:2007-03-26.

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2004CB418505);
中国博士后科学基金资助项目(20070420671).

作者简介:常玉广(1973—),女,博士,讲师;

马放(1963—),男,教授,博士生导师.

试验以及絮凝成分进行了研究. 这不仅是对“复合型生物絮凝剂”概念的实际应用, 也为研究絮凝机理及复合型生物絮凝剂的开发提供了有利的理论基础.

1 试验

1.1 材料

1.1.1 菌株

高效絮凝菌来源于含油废水曝气池污泥中的泥样, 是由黑龙江省环境生物技术重点实验室分离开发的.

1.1.2 培养基

筛选培养基: 每升含葡萄糖 10 g, K_2HPO_4 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, KH_2PO_4 2 g, NaCl 0.1 g, 尿素 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, pH7.5. 絮凝菌分离培养基: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[11].

1.2 絮凝活性测定

取 5 g 高岭土加至 1 000 mL 的烧杯中, 然后依次加入自来水 1 000 mL, 10% 的 $CaCl_2$ 溶液 1.0 mL 和 10 mL 发酵液, 并且调节溶液 pH 至 7.2, 之后将烧杯溶液放在搅拌仪上搅拌(快搅、慢搅)使之充分混合, 静置 20 min 后于波长 550 nm 处测定吸光度 (B). 以蒸馏水代替培养液作空白对照, 于波长 550 nm 处测定吸光度 (A).

通过絮凝率 F 来表示絮凝活性, 公式如下^[12]

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

1.3 16SrDNA 序列的扩增和分析

1.3.1 絮凝菌基因组 DNA 的提取

方法参照文献[13].

1.3.2 16SrDNA 序列的 PCR 扩增反应

PCR 反应以基因组 DNA 为模板, 用通用引物扩增 16SrDNA 片段. 正向引物为 BSF8/20: 5'-

AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG - 3'; 反向引物为 BSR1541/20: 5' - AAGGAGGTG AACCCAG CCGCA - 3', 引物由大连宝生物公司合成. PCR 反应体系 (100 μ L) 为: 10 \times Buffer 10 μ L, dNTP 8 μ L, 引物 BSF8/20 3 μ L, 引物 BSR1541/20 3 μ L, 模板 DNA 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, dH_2O 74.5 μ L. 反应程序: 94 $^{\circ}C$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1.5 min, 55 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 然后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min. PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接后, 由大连宝生物基因公司测序.

1.4 絮凝菌系统发育树的构建

将测得的 6 株絮凝菌株的 16S rDNA 序列通过 BLAST 程序在 GenBank 数据库上进行相似性比对分析, 调出同源性 99% 的菌株 16SrDNA 序列, 并利用序列比对软件 ClustalX1.8、系统发育分析软件 PHYLIP3.6 及进化树生成软件 Treeview 构建系统发育树和序列同源性的比较.

1.5 絮凝菌的菌群构建

将絮凝菌按照 (1: 1) 比例进行每两株复配培养, 测其絮凝率.

1.6 絮凝剂的成分分析

用红外光谱扫描分析絮凝剂中的特征基团, 确定絮凝剂中的有效成分.

1.7 絮凝剂的成分分析

将絮凝剂粗品分别用紫外扫描测定蛋白质、核酸; 用红外光谱扫描分析絮凝剂中的特征基团, 确定絮凝剂中的有效成分.

2 结果与讨论

2.1 絮凝菌的形态特征与生理生化测定

将 6 株絮凝菌编号为: F1、F2、F3、F4、F5、F6.

由透射电镜观察 (图 1), 6 株菌中只有 F1 为

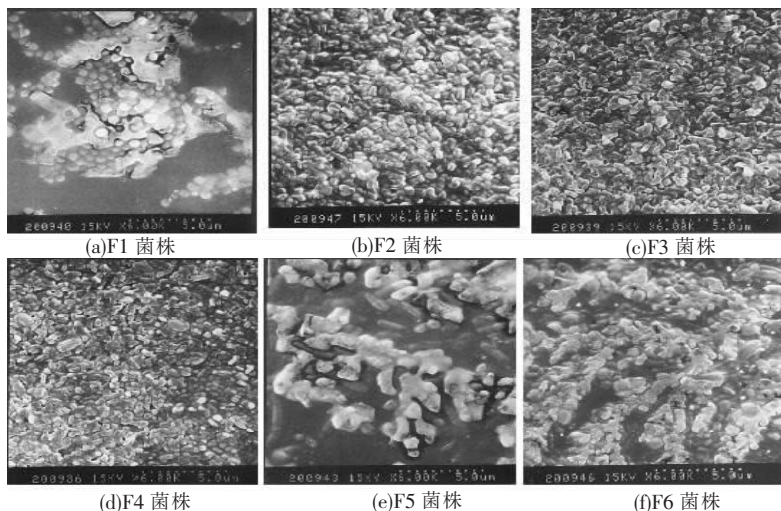


图 1 絮凝菌的电镜观察图

球状菌,其余为杆状菌.这些菌株的菌落形态都是圆形,直径较大,表面都光滑,颜色多为乳白色,只有 F1 菌落为桔红色,絮凝菌的形态特征见表 1,生理生化特性分析见表 2,并参照伯杰氏菌种鉴

定手册,对 6 株絮凝菌进行菌种鉴定,初步确定 F1 为库克菌属 (*Kocuria* sp.), F2 为农杆菌属 (*Agrobacterium* sp.), F3、F4、F5、F6 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.).

表 1 絮凝菌体的形态特性

项目	F1	F2	F3	F4	F5	F6
革兰氏染色	G ⁻	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺
芽孢	-	+	+	+	+	+
菌体形状	球状	杆状	微杆状	微杆状	微杆状	杆状
菌落大小/mm	0.5~1.0	2~3	1~2	1.5~2.0	1.2~2.0	1~2
菌落形状	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形	圆形
菌落颜色	桔红色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色

注:“+”表示阳性,有芽孢产生;“-”表示阴性,无芽孢产生.

表 2 絮凝菌的生理生化特性

项目	F1	F2	F3	F4	F5	F6
过氧化氢酶	+	+	+	-	-	+
淀粉水解	+	-	-	-	-	+
油脂利用	+	+	+	+	+	+
产吡啶	-	-	+	+	-	-
甲基红试验	+	+	+	+	+	+
乙酰甲基醇试验	-	-	+	-	-	-
柠檬酸盐	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶*	+	+	+	+	+	+
产 NH ₃	+	+	+	+	+	+
产 H ₂ S	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	-	-	-	-	+
葡萄糖*	-	-	-	-	-	-
乳糖*	-	-	-	-	-	-
蔗糖*	+	+	+	+	+	-
明胶液化	+	-	-	-	-	-

注:“+”表示阳性,有此项反应;“-”表示阴性,无此项反应.在*试验中,“+”表示产酸,“-”表示不产酸.

2.2 构建系统发育树

测序结果表明:F1、F2、F3、F4、F5、F6 的 16SrDNA 的核苷酸序列为 1 518 bp、1 478 bp、1 477 bp、1 477 bp、1 544 bp、1 544 bp(图 2).

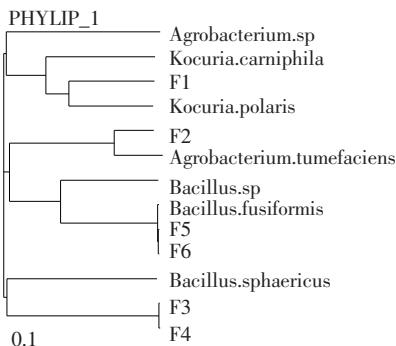


图 2 絮凝菌的 16S rDNA 序列系统发育树

将 6 株絮凝菌的 16SrDNA 序列用 BLAST 软件与 GenBank 中已发表的 16SrDNA 序列进行同

源性比较,选取同源性在 95% 以上的细菌序列.根据 16S rDNA 序列同源性构建系统发育树,从进化树可以看出,6 株絮凝菌分别与 *Bacillus* sp.、*Agrobacterium* sp.、*Kocuria Polar* 各归为同一簇族群.其中 F3、F4、F5、F6 最接近于 *Bacillus* sp.,该菌株在系统发育地位上属于芽孢杆菌属.F1 接近于库克菌属 *Kocuria* sp.,F2 与农杆菌属 *Agrobacterium* sp. 归为同一族群,利用 BLAST 的序列比对结果表明,各菌株与相似性菌属的相似性均为 99%.结合菌株的形态学和生理学特性,可基本确定分离的菌株的属为 *Bacillus* sp.、*Agrobacterium* sp.、*Kocuria* sp..

2.3 絮凝活性的测定

由絮凝菌的电镜照片来看,F5 菌株和 F6 菌株有大量的粘液性物质产生,细菌易粘连在一起,形成膜状物质,说明这两株菌的分泌代谢很旺盛,

而絮凝效果的产生也是来源于微生物的代谢产物,有报道具有絮凝活性的细菌多数均形成胞外多糖^[14]. 因此,在絮凝菌发酵液中含有影响絮凝活性的物质. 结果表明,絮凝率达69%以上,其中4株絮凝率在80%以上,分别为F2、F3、F5、F6. 在混凝过程中,菌株F2的发酵液混凝产生的矾花大,沉降速度快,从图3可以看出,F2絮凝率最高,其他菌株也同样表现了高絮凝特点.

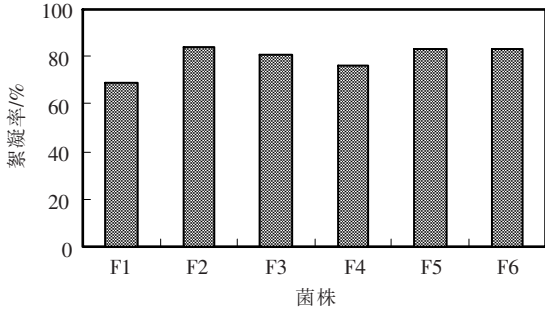


图3 絮凝菌的絮凝率示意图

2.4 絮凝菌的菌群构建

将絮凝率高于80%的4株絮凝菌F2、F3、F5、F6按照(1:1)比例进行每两株复配培养,测其絮凝率. 尽管这4株菌单独培养时絮凝率都在80%以上,但从表3可以看出,每两株菌混合培养之后,并不是絮凝率都有所提高,有的反而降低了. 根据生态位的理论^[7],不同菌株能够在一起共存,是因为它们之间通过协调作用出现了生态位的分离,从而避免了种群间激烈的竞争. 因此,混合培养絮凝率较单株菌培养有所降低,这两株菌之间存在生态位的重叠,导致它们不能共同生长或生长力下降,影响了代谢产物的增加,也就是絮凝活性物质减少,从而絮凝率降低;而F2和F6的混合培养后的絮凝率较原来有一定的提高,说明它们能够在一起共同生长,其生态位出现了分离,所以絮凝率提高. 由表3可以看出:F2和F6菌株组合所得发酵液絮凝率为93.1%,其效果优于其他各组,同时也优于各个单菌. 这可以由生态位来解释,另外,在Kurane R和Matsuyama研究结果中也有阐述,混合培养的条件下不同微生物之间的相互作用促进微生物絮凝剂的产生^[15]. 因此,采用F2和F6作为复合型生物絮凝剂产生菌,用于生产复合型生物絮凝剂,并对这两株菌进行进一步的研究.

2.5 复合型生物絮凝剂的絮凝活性分布

对复合型生物絮凝剂F2和F6的发酵原液、上清液、细胞悬浮液三者的絮凝率进行了测定. 由图4可知,发酵原液活性最高,为96.61%,分别高于上清液、细胞悬浮液1.91%、35.53%. 通过絮凝

率的测定可知上清液的絮凝率很高,说明絮凝活性物质主要存在于上清液中,生物絮凝是利用微生物细胞代谢产物的絮凝剂,絮凝剂有效成分存在于发酵液中. 而细胞悬浮液絮凝的效果较低(相对絮凝剂的效果),表明絮凝菌产生的胞外物大部分分泌至胞外液中. 因此,在后续实验中,以发酵上清液为对象,来研究生物絮凝剂的分离纯化.

表3 不同两株絮凝菌混合培养的絮凝率

组别	絮凝率/%	组别	絮凝率/%
F2 + F3	73.2	F3 + F5	85.6
F2 + F5	74.9	F3 + F6	70.4
F2 + F6	93.1	F5 + F6	81.2

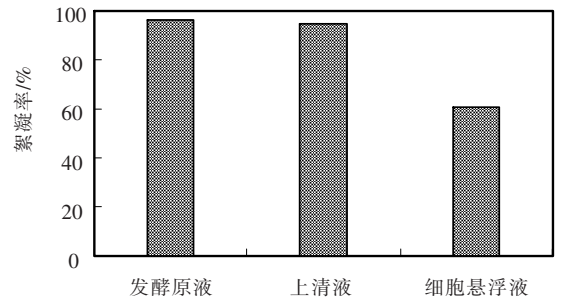


图4 絮凝活性分布图

2.6 复合型微生物絮凝剂的成分分析

2.6.1 紫外扫描分析

絮凝菌发酵液上清液的紫外扫描结果见图5. 曲线为平滑曲线,没有特征吸收峰(蛋白质在280 nm有吸收峰,核酸在260 nm有吸收峰),说明絮凝剂中几乎不含有核酸和蛋白质. 因此,可以定性判断该絮凝剂的有效成分不是蛋白质或核酸.

2.6.2 红外光谱扫描

将生物絮凝剂提纯后进行红外光谱扫描,结果见图6. 谱图是较为典型的多糖红外光谱图,2926 cm^{-1} 是C—H不对称伸缩振动的结果,此区域的吸收峰是糖类的特征峰. 1647 cm^{-1} 是由于多糖中的乙酰氨基(—NHCOCH₃)的C=O键伸缩振动造成的. 在图中1541 cm^{-1} 和1508 cm^{-1} 处的峰为N—H的变角振动,此峰说明多糖中的一NH—是乙酰化的. 在3443 cm^{-1} 处强而宽的吸收峰是分子内的—OH伸缩振动所导致的. 1733 cm^{-1} 为—COOH中的C=O键伸缩振动的结果. 在1385 cm^{-1} 处为羧基—COO⁻中的C=O对称伸缩振动. 1063 cm^{-1} 的强吸收峰是酯内的C—O—C反对称伸缩振动吸收谱带. 879 cm^{-1} 为呋喃糖或羟基呋喃环的吸收峰,是由环和取代基的伸缩振动及次甲基的横向振动所致. 因此,可以判断CBF中含有羧基,分别以—COO⁻和COOH的形式存在. 此外,将絮凝剂溶液摊放在平板玻璃

片上,使其干燥成膜,结果发现,形成的薄膜韧性很强,从某种程度上表明絮凝剂的链型为线性.

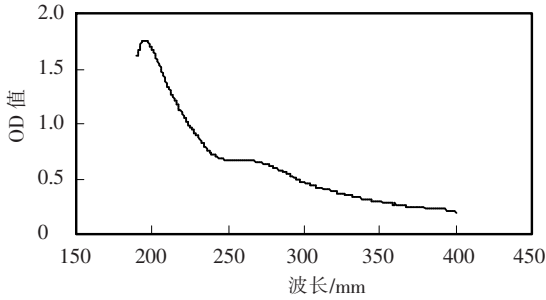


图 5 紫外扫描图谱

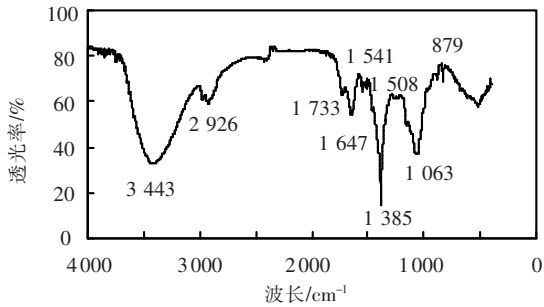


图 6 CBF 的红外光谱图

3 结 论

1) 絮凝测定结果表明絮凝率达 69% 以上. 其中 4 株絮凝率达 80% 以上,表明这 6 株絮凝菌具有很强的絮凝特性.

2) 根据絮凝菌形态和生理生化特征鉴定及 16SrDNA 序列系统发育分析, *Agrobacterium* sp. 与 F2 聚为一类, *Bacillus* sp. 与絮凝菌 F3、F4、F5、F6 聚为一类, *Kocuria* sp. 与絮凝菌 F1 聚为一类,序列同源性 99%,但该 6 株絮凝菌尚不能定种,有待于进一步分析.

3) 在菌群构建中,F2 和 F6 菌株按照 1: 1 比例混合培养发酵液絮凝率可达 93.1%,这种组合的复合型生物絮凝剂絮凝率优于各个单菌的絮凝率,也优于其他双菌组合.

4) 在絮凝剂的成分分析中,紫外扫描图谱分析絮凝剂中不含有蛋白质和核酸,红外光谱分析絮凝剂的有效成分为多糖类物质.

参考文献:

[1] WANG W, MA F, YUE X L, *et al.* Purification and characterization of compound bioflocculant [C]//The

2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. Shanghai: IEEE, 2008.

[2] 吕向红. 微生物絮凝剂[J]. 化工环保,1994,15:211-218.

[3] NAKAMURA J. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculants produced by *Aspergillus Sojae* AJ7002[J]. *Agric Biol Chem*,1976,40(3):619-624.

[4] ZHANG Tong,LIN Zhe. Microbial flocculant and its application in environmental protection [J]. *Environmental Sciences*, 1999, 1(1):1-12.

[5] 马放. 复合生物絮凝剂的开发与应用研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2004.

[6] MA Fang,WANG Bo,FAN Chun, *et al.* Security evaluation of compounded microbial flocculant [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*,2004,11(1):38-42.

[7] 马放,刘俊良,李淑更. 复合型微生物絮凝剂的开发[J]. *中国给水排水*,2003,19(4):1-4.

[8] ZOUBOULIS A I, CHAI X L, KATSOYIANNIS I A. The application of bioflocculant for the removal of humic acids from stabilized landfill leachates [J]. *J Environ Manag*, 2004,70:35-41.

[9] SHENG Y L, ZHANG Q, SHENG Y R, *et al.* Screening and flocculating properties of bioflocculant-producing microorganisms [J]. *Journal of University of Science and Technology Beijing, Mineral, Metallurgy, Material*, 2006,13(4):289-292.

[10] YIM J H, KIM S J, AHN S H, *et al.* Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03 [J]. *Biore-source Technology*, 2007,98(2):361-367.

[11] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002.

[12] NAKAMURA J, MIYASHIRO S. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants[J]. *Agric Biol Chem*, 1976, 46 (2): 377-383.

[13] [美]J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔,著. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.

[14] 李文鹏,刘士清,廖昌珑. 冻冻芽孢杆菌(*B. acillus mucilaginosus* YNUCC0001)絮凝剂生产、絮凝特性及其系统发育学分析[J]. *土壤通报*,2005,36(4):583-587.

[15] KURANE R, MATSUYAMA H. Production of a bioflocculant by mixed culture [J]. *Biosci, Biotechnol, Biochem*,1994, 58: 1589-1594.

(编辑 刘 彤)