

# 复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 的优化条件

张玉玲<sup>1</sup>, 姚 军<sup>1,2</sup>, 赵晓波<sup>1</sup>, 曹春英<sup>3</sup>, 郑松志<sup>4</sup>

1. 吉林大学 环境与资源学院, 长春 130026
2. 长春市城建疏浚工程有限公司, 长春 130021
3. 沈阳广播电视大学, 沈阳 110166
4. 吉林大学 化学学院, 长春 130026

**摘要:**通过培养基成分减少、碳氮源影响因素、培养基成分含量优化、培养时外界条件等系列实验,对复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 的培养条件进行了优化。研究表明:该菌的培养条件受以上各因素的影响,培养基的最佳组成为葡萄糖 2.0 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $KH_2PO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g, 蒸馏水 1 L, 初始 pH=7; 培养基的外部培养条件为灭菌压力 0.06 MPa, 温度 20~30 °C, 振荡转速 100~140 r/min。降低了复合型微生物絮凝剂的转化成本, 提高了该菌的絮凝能力。

**关键词:**复合型; 微生物絮凝剂产生菌; 培养条件优化

**中图分类号:** X14      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1671-5888(2008)05-0864-05

## Optimum Conditions of Compound Bioflocculant Producing Bacterium YL3

ZHANG Yu-ling<sup>1</sup>, YAO Jun<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao-bo<sup>1</sup>, CAO Chun-ying<sup>3</sup>, ZHENG Song-zhi<sup>4</sup>

1. College of Environment and Resources, Jilin University, Changchun 130026, China
2. Dredging - Project Co. Ltd., Changchun 130021, China
3. Shenyang Broadcasting and TV University, Shenyang 110166, China
4. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130026, China

**Abstract:** The authors deal with the optimization for culture condition on compound bioflocculant producing bacterium by experimentations through the study of decreasing for composition of culture medium, influence of source to C and N, content of culture medium's composition and exoteric condition at culture time. The results indicated that the optimal components of the culture were glucose 2.0 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $KH_2PO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g, distilled water 1 L and the initial pH of the culture is 7. The external conditions of the culture medium were as follows: the sterilization pressure is 0.06 MPa, the temperature was 20 - 30 °C and the rotation speed of surge was 100 - 140 r/min. It reduced transform cost of compound bioflocculant and enhanced of the flocculating capability.

**Key words:** compound; bioflocculant producing bacterium; optimized on culture condition

**收稿日期:** 2007-11-30

**基金项目:** 国家“973”项目(2004CB418505); 吉林大学创新基金项目(419070200045)

**作者简介:** 张玉玲(1973—), 女, 内蒙古通辽人, 讲师, 博士, 主要从事水污染治理方面的研究, Tel: 0431-88502612, E-mail: zhangyl8@jlu.edu.cn

**通讯联系人:** 郑松志(1967—), 男, 广东中山人, 工程师, 主要从事近代有机分析方面的研究; E-mail: Zhengsongzhi@163.com。

目前,微生物絮凝剂<sup>[1-5]</sup>产生菌的培养条件主要集中在培养基成分的优化上<sup>[6-7]</sup>。但实际工程中,不仅需要优化微生物絮凝剂产生菌 YL3 的培养基成分,还需要考虑培养时外界环境条件的影响,如培养基灭菌压力、培养温度、振荡转数等。为了降低复合型微生物絮凝剂的转化成本,本文从减少培养基成分和碳氮源优化等实验着手,进行了培养基成分和培养时外界条件的系列实验,从而确定复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 的最佳培养条件。

## 1 实验内容

### 1.1 实验材料

高岭土采自吉林省白山市,菌种采自已经筛选出的复合型微生物絮凝剂产生菌。初始絮凝培养基组成为葡萄糖 10.0 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $KH_2PO_4$  2.0 g, NaCl 0.10 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g, 酵母膏 0.50 g, 尿素 0.50 g, 蒸馏水 1 L, 自然 pH 值。

### 1.2 絮凝率测定

在 250 mL 锥形瓶中加入 pH=7.0 的 5.0 g/L 高岭土悬浊液 50 mL, 1.00 mL 1%  $CaCl_2$ , 0.50 mL 发酵液, 用低速磁力搅拌器混合, 调 pH 值至 6.0~7.0 后搅拌 3 min, 静置 2 min; 取上清液于 752 型分光光度计测定  $OD_{550nm}$  值, 以不加发酵液的上清液  $OD_{550nm}$  值作为对照, 通过  $OD_{550nm}$  值减少来确定絮凝程度, 用絮凝率定量表示絮凝活性: 絮凝率 =  $[(A - B) / A] \times 100\%$ 。A 为不加发酵液的上清液  $OD_{550nm}$  值; B 为加发酵液的上清液  $OD_{550nm}$  值。

### 1.3 培养条件优化实验

(1) 培养基成分减少实验。相对于初始絮凝培养基成分, 分别减少了如下组分: 1. NaCl; 2. 脲; 3. NaCl、脲、酵母膏; 4. NaCl、脲、 $K_2HPO_4$ ; 5. NaCl、脲、 $KH_2PO_4$ ; 6. NaCl、脲、 $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 。在 6 个 250 mL 锥形瓶中, 分别加入以上 6 种不同组分的培养液 50 mL, 再分别加入 0.50 mL 种子培养液, 在 120 r/min、30 °C 恒温振荡器中培养 72 h 后, 进行絮凝试验, 根据计算所得絮凝率确定优化后培养基组成。

(2) 氮源影响因素实验。在实验(1)的基础上, 把培养基中的硫酸铵分别换成如下氮源: 1. 硝酸钾; 2. 硫酸铵; 3. 甘氨酸; 4. 硝酸钠; 5. 硝酸铵; 6. 氯化铵; 7. 脲。进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳氮源。

(3) 碳源影响因素实验。在实验(2)的基础上, 把培养基中的葡萄糖分别换成如下不同碳源: 1. 葡萄糖; 2. 果糖; 3. 蔗糖; 4. 淀粉; 5. 乳糖; 6. 麦芽糖; 7. 草酸钠; 8. 碳酸钠。进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳碳源。

(4) 无机盐影响因素实验。在实验(3)的基础上, 把培养基中所得硫酸镁分别换成如下不同物质: 1. 氯化镁; 2. 氯化钙; 3. 硫酸铁; 4. 硫酸铜; 5. 硫酸镁; 6. 硫酸亚铁; 7. 氯化锌。进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳无机盐类。

(5) 培养基成分含量优化试验。在以上优化出最佳培养基组成的基础上, 进行培养基成分含量的优化实验, 其中碳源质量浓度分别为 10.0、5.0、2.0、1.0、0.50 g/L; 磷酸氢二钾质量浓度分别为 5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.50 g/L; 磷酸二氢钾质量浓度分别为: 0.50、0.10、0.15、0.20、0.30 g/L; 无机盐质量浓度分别为: 0.025、0.050、0.10、0.20、0.30 g/L。进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳培养基成分含量。

(6) 培养基初始 pH 值影响实验。pH 值分别为 5、6、7、8、9、10、11 时, 进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳 pH 值。

(7) 培养基外部条件对絮凝活性的影响实验。分别考察灭菌压力、培养温度、振荡转速对复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 絮凝率的影响。其中灭菌压力分别为 0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11 MPa。培养温度分别为 10、20、30、40、50 °C; 振荡转速分别为 60、80、100、120、140、160 r/min。进行同实验(1)条件一致的培养和絮凝实验, 根据计算所得絮凝率确定最佳培养基外部条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基成分减少实验

培养基的组成不同时, 其对微生物的生长和代谢都会产生影响。通过培养基成分减因素实验所得结果如图 1 所示。

由图 1 可知, 当序号为 3 时, 絮凝率达到了 96.40%, 此时培养基的成分不加入 NaCl、脲, 说明这两种成分抑制该复合菌产絮凝剂的活性。通过本试验, 优化后的培养基组成为葡萄糖 10.0 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $KH_2PO_4$  2.0 g,  $MgSO_4 \cdot$

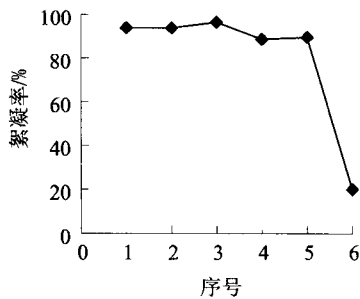


图1 培养基成分减因素分析

Fig. 1 Analysis of short-of-one-element in the culture

7H<sub>2</sub>O 0.20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.20 g, 酵母膏 0.50 g, 蒸馏水 1 L, 自然 pH 值。

## 2.2 碳、氮源、无机营养盐对絮凝活性影响

氮源的作用主要是提供微生物合成细胞蛋白质的物质。不同微生物对氮源的要求不同,氮源主要有无机氮源和有机氮源两大类。由图2可知,在多种氮源中,2号硫酸铵对絮凝活性的影响最为有利。

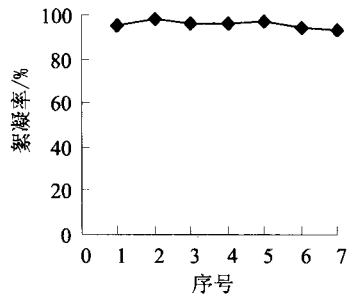


图2 不同氮源对絮凝活性的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on the flocculation activity

碳源的主要作用是构成微生物细胞的含碳物质(碳架)和供给微生物生长、繁殖及运动所需要的能量。由于微生物种类繁多,因此它们对碳源的要求极为广泛。从简单的无机碳化合物到复杂的天然有机含碳化合物,都可作为碳源。由图3可知,碳源中1号葡萄糖、2号蔗糖、3号果糖对絮凝活性影响等价,在本实验条件下,3种碳源的絮凝率都达到了100%,但参照3种药品的市场价格可知,葡萄糖的价格最低。其它有机和无机碳源效果也较好,说明该复合型微生物絮凝剂产生菌利用碳源能力较强。

无机离子在微生物体内的作用是不可忽视的,它是微生物生长所必需的营养物质。有的元素虽然

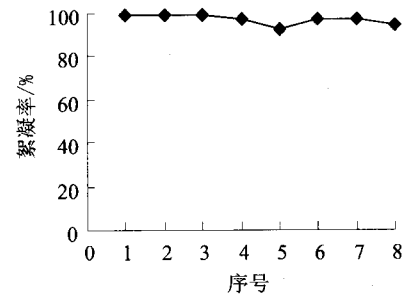


图3 不同碳源对絮凝活性的影响

Fig. 3 Effects of different carbon sources on the flocculation activity

在微生物体内含量甚少,但却是酶活性基团的组成部分,同时也是调节细胞渗透压、氢离子浓度、氧化还原电位及维持pH值平衡等的重要成分,是细胞本身组成必不可少的元素。甚至,有些微生物可以利用无机盐作为能源。从图4可知,无机盐对该复合型微生物产生菌的絮凝活性影响较大。镁盐、铁盐、钙盐对絮凝剂的产生较为有利,其中最佳无机盐为硫酸镁,而硫酸铜和氯化锌使复合型微生物絮凝活性消失,即铜盐和锌盐不利于絮凝剂的产生。

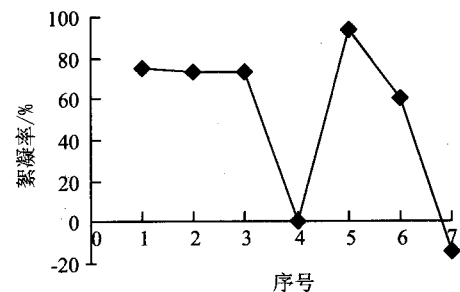


图4 不同无机盐对絮凝活性的影响

Fig. 4 Effects of different kinds of inorganic salt on the flocculation activity

## 2.3 基质含量对絮凝活性影响

培养基的基质含量不同,对于微生物絮凝剂的活性也是有一定影响的,通过实验,结果如图5—7所示。

为了该复合型微生物絮凝剂的后续实验及生产工艺研究,进行最佳培养基成分的含量确定。由图5—7可知,培养基的成分为葡萄糖2.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O 5.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.20 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.20 g, 蒸馏水1 L, pH值为7。

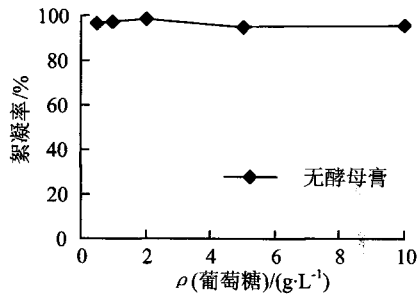


图 5 葡萄糖含量对絮凝活性的影响

Fig. 5 Effects of concentration of glucose on the flocculation activity

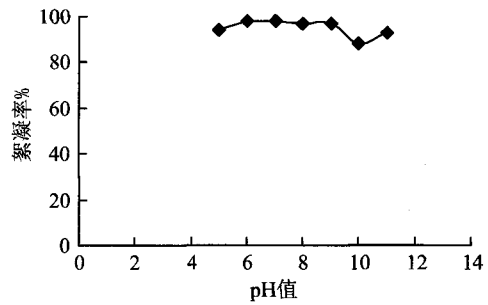


图 8 培养基初始 pH 值对絮凝活性的影响

Fig. 8 Effects of various initial pH on the pressures on flocculation activity

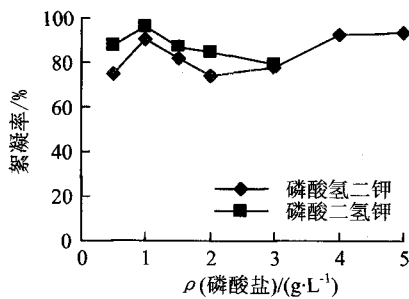


图 6 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾含量对絮凝活性的影响

Fig. 6 Effects of concentrations of  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$  on the the flocculation activity

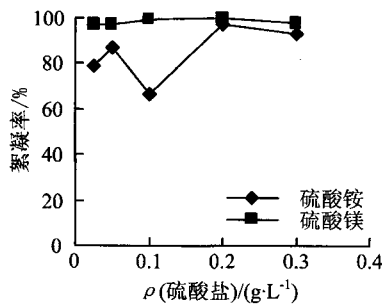


图 7 硫酸铵、硫酸镁含量对絮凝活性的影响

Fig. 7 Effects of concentrations of  $(NH_4)_2SO_4$  and  $MgSO_4$  on the flocculation activity

2.4 初始 pH 值对絮凝活性影响

任何微生物只有在一定的环境中才能生长,适合微生物生长代谢的 pH 值往往有一定的范围或确切的值,实验结果如图 8 所示。由图 8 可知,该复合型微生物絮凝剂产生菌的培养初始 pH 值为 6~9 时,絮凝率均在 90% 以上,说明该复合菌的絮凝条件比较温和。

2.5 培养基外部条件对絮凝活性的影响

2.5.1 灭菌压力

灭菌压力对培养基的成分有一定的影响,由表 1 可知,絮凝活性与培养基灭菌压力之间不是正相关。即在 0.05~0.07 MPa 区间时,絮凝活性较好,且在 0.06 MPa 时,絮凝活性最高;而当压力在 0.08 MPa 时,絮凝活性降到最低点 68.1%,之后絮凝活性又有所升高。从而说明复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 絮凝活性的压力阈值为 0.08 MPa。

2.5.2 培养温度

不同絮凝剂产生菌有不同的产絮凝剂的适宜温度。如表 1 所示,复合型微生物絮凝剂产生菌的培养温度为 20~40 ℃。

表 1 培养基外部条件影响

Table 1 Effect of the exterior conditions of the culture

灭菌压力		培养温度		振荡转速	
压力/MPa	絮凝率/%	温度/℃	絮凝率/%	转数/(r·min <sup>-1</sup> )	絮凝率/%
0.05	92.9	10	80.2	60	82.0
0.06	98.5	20	93.0	80	89.1
0.07	94.7	30	100.0	100	98.9
0.08	68.1	40	98.7	120	99.3
0.09	83.2	50	83.1	140	98.0
	89.5			160	95.9

2.5.3 振荡转速

微生物在培养时,通过培养箱的一定振荡转速,为微生物絮凝提供其通气量,从而提供其生长代谢时所需的氧气。由表 1 可知,当振荡转速由小变大时,其絮凝活性有一个峰值,即当振荡转速由低转速增加到 120 r/min 时,絮凝活性达到最大,而继续增加转速,其絮凝活性反而下降。说明通气量影响该复合型微生物絮凝剂产生菌的絮凝活性,且有一个

最佳值。

### 3 结论

经过对复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 进行培养条件优化,可以得出以下结论:

(1)复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 吸收碳源和氮源的能力都很强,都能利用相应种类的无机和有机物质作为营养产生絮凝剂。无机营养盐中镁盐、铁盐、钙盐对絮凝剂的产生较为有利,其中最佳无机盐为硫酸镁,而硫酸铜和氯化锌使复合型微生物絮凝活性消失,即铜盐和锌盐不利于絮凝剂的产生。

(2)复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 培养的外部条件不容忽视,压力和温度影响较大。

(3)经过本实验,得出复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 培养基的组成为葡萄糖 2.0 g,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5.0 g,  $KH_2PO_4$  1.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$  0.20 g, 蒸馏水 1 L, 初始 pH = 7。培养基的外部培养条件:灭菌压力为 0.06 MPa, 温度为 20 ~ 30 °C, 振荡转速为 100 ~ 140 r/min。

本研究成果为复合型微生物絮凝剂产生菌 YL3 的前期基础研究,为充分系统研究复合型微生物絮凝剂提供了参考依据。

#### 参考文献(References):

- [1] Zhang Lan-ying, Zhang Yu-ling, Yao Jun. Study on nSrDNA appraisal of high yield flocculant compound [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2007, 23(2): 1 - 4.
- [2] 张玉玲, 张兰英, 任何军, 等. 高产絮凝剂复合菌的基因分型及絮凝剂应用效果研究[J]. 中国给水排水, 2006, 22(11): 35 - 40.
- ZHANG Yu-ling, ZHANG Lan-ying, REN He-jun, et al. Gene's dividing-form of high yield flocculant's compound bacteria and the study of applied effect on flocculant[J]. China Water Wastewater, 2006, 22(11): 35 - 40.
- [3] 杜宝山, 张玉玲, 张兰英, 等. 复合型微生物絮凝剂产生菌生长周期中参数变化[J]. 吉林大学学报(理学版), 2007, 45(1): 138 - 142.
- DU Bao-shan, ZHANG Yu-ling, ZHANG Lan-ying, et al. Change on parameter in growth cycle of compound bioflocculant product bacterium [J]. Journal of Jilin University (Science Edition): 2007, 45(1): 138 - 142.
- [4] 张玉玲, 张兰英, 王显胜, 等. 出芽短梗霉吸附水体中共存 Cr(VI)、Cd(II) 重金属离子研究[J]. 吉林大学学报(地球科学版), 2005, 35(3): 403 - 406.
- ZHANG Yu-ling, ZHANG Lan-ying, WANG Xian-sheng, et al. Study on adsorbing chromium (VI) and cadmium (II) ions coexisting in water body by aureobacidium pullulans [J]. Journal of Jilin University (Earth Science Edition), 2005, 35(3): 403 - 406.
- [5] 郑怀礼, 张海彦, 钱力. 微生物絮凝剂的研究进展[J]. 现代化工, 2003, 10(23): 22 - 24.
- ZHENG Huai-li, ZHANG Hai-yan, QIAN Li. Studying process on microbe flocculation [J]. Modern Chemical Industry, 2003, 10(23): 22 - 24.
- [6] Kurane R. Correlation between flocculant production and morphological changes in Rhodococcus erythropolis S-1 [J]. Ferment Bioengin, 1991, 72(6): 498 - 500.
- [7] 程树培, 崔益斌, 杨柳燕. 高絮凝性微生物育种生物技术与研究进展[J]. 环境科学进展, 1995, 3(1): 65 - 69.
- CHENG Shu-pei, CUI Yi-bin, YANG Liu-yan. Breeding technology on high yield flocculant and studying process [J]. Advances in Environmental Science, 1995, 3(1): 65 - 69.