

# 絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件的优化

钟文文

(临沂师范学院生命科学学院, 山东临沂 276000)

**摘要:**采用常规的细菌分离纯化方法从土壤中分离出絮凝剂产生菌菌株, 经过驯化培养后, 以发酵液对高岭土混悬液的絮凝效果为指标, 筛选出1株高效絮凝剂产生菌。采用单因素试验方法和正交试验设计方法, 分析了影响絮凝效果的主要因素, 对菌株的最佳培养条件进行了优化研究。结果表明: 菌株S3产絮凝剂的最佳培养条件是碳源为葡萄糖(20 g/L), 氮源为酵母膏(2.5 g/L), 培养温度为28℃, 初始pH值为8, 通气量为50 r/min; 在此条件下, 絮凝率为92%左右。

**关键词:**微生物絮凝剂; 筛选; 培养条件; 正交设计

中图分类号:X505; Q938.1

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2008)01-0120-04

## Screening of Bioflocculant-producing Strains and Study on Optimization of Their Cultural Conditions

ZHONG Wen-wen

(College of Life Science, Linyi Normal University, Linyi Shandong 276000, China)

**Abstract:** In this study, strains of bioflocculant-producing microorganisms were screened from soil sample by conventional methods. 1 strain with high flocculating activity was obtained after rescreening with kaolin clay suspension flocculation. Then the effect of the cultural conditions and the medium composition and proportion on bioflocculant production was studied by single factor test and orthogonal design test. The experimental results showed that the medium composition and proportion and other cultural conditions had significant effect on bioflocculant production. The optimum culture conditions of strain S3 were as follows, carbon source was glucose (20 g/L), nitrogen source was yeast extract (2.5 g/L), cultural temperature 28℃, initial pH 7, rotating speed 50 r/min. Under this condition, the flocculating rate was about 92%.

**Key words:** Bioflocculant; Screening; Cultural conditions; Orthogonal design

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, 主要成分是糖蛋白、多糖、蛋白质、DNA等, 和传统絮凝剂相比, 具无毒、高效、可降解的特征。所以, 微生物絮凝剂已日益引起人们的重视, 有逐步取代传统絮凝剂的趋势<sup>[1]</sup>。能产生絮凝剂的微生物种类多、分布广<sup>[2]</sup>, 因此分离、筛选出高效优良的絮凝剂产生菌株具有重要意义。微生物絮凝剂的产生及絮凝效果的好坏受微生物生长环境及外界众多因素的影响<sup>[3]</sup>, 主要包括培养基的成分、培养基的pH值、培养温度、通

气量等<sup>[4]</sup>。本研究从土壤和生活污水中筛选絮凝剂产生菌, 通过分离、纯化、初筛、复筛获得2株来自土壤的絮凝活性较高的菌株, 并通过采用单因素试验设计方法和正交试验设计方法对其产生絮凝剂的培养条件进行了优化研究<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

取自临沂师范学院新校区草坪土壤和生活污水。

收稿日期:2007-03-31 修回日期:2007-08-24

作者简介:钟文文(1978-),女,硕士,讲师,从事微生物学的教学与研究工作。

## 1.2 培养基

分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基。

筛选培养基:葡萄糖 20 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, NaCl 0.1 g, 脲 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 水 1 000 mL, pH 7.0, 112℃ 灭菌 30 min。

保藏培养基:牛肉膏蛋白胨斜面培养基。

## 1.3 高岭土悬浊液

用分析天平称取 5 g 高岭土, 溶解于 1 000 mL 水中, 充分搅拌 5 min, 使其彻底分散后, 静置 10 min, 然后取其上清液用于测定絮凝率时使用(每次测定絮凝率时当场配制)。

## 1.4 絮凝剂产生菌的分离和筛选

1.4.1 分离、纯化<sup>[6]</sup> 利用分离培养基, 采用常规的稀释涂布平板法和平板划线法进行分离、纯化, 将获得的菌株保存在斜面培养基上保存并编号。

1.4.2 初筛 将编号后的菌株, 用接种环分别接种于装有 100 mL 筛选培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃, 160 r/min 恒温振荡培养 72 h, 所得培养液进行絮凝活性的初步测定, 在 10 mL 高岭土悬浊液中, 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初筛。

1.4.3 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 100 mL 筛选培养基的 250 mL 三角瓶中, 30℃, 160 r/min 恒温振荡培养 72 h 后, 测定培养液对高岭土悬浊液的絮凝活性, 进行复筛。

## 1.5 絮凝活性的测定<sup>[7]</sup>

在装有 5 g/L 的高岭土悬浊液的 100 mL 液体中, 加入 5 mL 1% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液作为助凝剂, 再加入 2 mL 的待测样品, 调 pH 值至 7.5 混合搅拌(快搅 1 min, 慢搅 5 min), 静置 10 min, 用分光光度计测定上清液在波长为 550 nm 处的吸光度, 同时以 2 mL 蒸馏水代替待测样品作为对照, 用下面的公式计算待测样品的絮凝率: 絮凝率(%)=(A-B)/A×100%。

其中, A 为对照在 550 nm 处的吸光度; B 为样品在 550 nm 处的吸光度。

## 1.6 培养条件的优化研究

1.6.1 单因素试验研究培养基成分对菌产絮凝剂的影响<sup>[8]</sup> 分别用不同的碳源、氮源和碳氮比替换筛选培养基中的碳源、氮源和碳氮比, 测定不同条件下培养液对高岭土悬浊液的絮凝率, 根据万方数据

絮凝率的大小确定最佳的碳源、氮源和碳氮比。

1.6.2 利用正交试验优化培养基成份配比和培养条件的研究<sup>[9]</sup> 确定了最佳的碳源和氮源后, 以最佳碳、氮源分别替代筛选培养基中的碳、氮源, 按照筛选培养基的培养条件, 选取碳源、氮源、培养基的初始 pH 值、培养温度和通气量为影响菌产絮凝剂的 5 个因素, 每因素选取 4 个水平值, 设计一个 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验, 测定在各条件下培养液对高岭土悬浊液的絮凝率。根据正交试验结果和方差分析结果得出各因素对菌种产絮凝剂影响的显著性大小和各因素最佳水平, 从而确定出菌产絮凝剂的最佳培养条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种分离、筛选结果

依据稀释涂布平板法共分离出 86 株单菌落, 通过初筛获得 19 株有絮凝活性的菌株, 根据复筛方法对其进行絮凝活性测定, 获得 1 株絮凝活性相对较高的絮凝剂产生菌, 编号为 S3, 对高岭土悬浊液的絮凝率为 91.6%。进一步通过传代培养证明其性能稳定, 在固体培养基上形成的菌落为浅黄色, 光滑、质软、凸起, 镜检为杆菌, 革兰氏染色阳性, 具有荚膜。

### 2.2 单因素试验研究培养基成分对菌产絮凝剂的影响

2.2.1 碳源对菌产絮凝剂的影响 以淀粉、蔗糖和乙醇分别替代筛选培养基中的碳源, 以葡萄糖(筛选培养基中的碳源)为对照, 其他培养条件不变, 对测试菌株进行培养。通过测定不同碳源下发酵液对高岭土悬浊液的絮凝率研究碳源对菌产絮凝剂的影响。试验结果见表 1。

从表 1 可以看出, 碳源对菌产絮凝剂的影响具有极显著的差异, 4 种测试碳源对絮凝剂产出的影响从高到低分别为葡萄糖>蔗糖>淀粉>乙醇, 多重比较结果表明不同碳源之间的差异也达到显著水平, 3 种替代碳源的效果均比对照碳源葡萄糖的差, 因此仍选择葡萄糖为该菌株的最佳碳源, 其发酵液的絮凝率最高, 达到 91.83%。

2.2.2 氮源对菌产絮凝剂的影响 以单一氮源硝酸钠、酵母膏、脲、硫酸铵和氯化铵分别替代筛选培养基中的复合氮源(酵母膏+脲+硫酸铵), 且保证氮原子浓度不变, 其他培养条件同上, 培养后通过测定不同氮源下发酵液对高岭土悬浊液的絮凝率研究氮源对菌产絮凝剂的影响。试验

结果见表 2。

从表 2 可以看出, 氮源对菌产絮凝剂的影响具有极显著的差异, 5 种测试氮源对絮凝剂产出的影响从高到低分别为酵母膏 > 硫酸铵 > 脲 > 硝酸钠 > 氯化铵, 多重比较结果表明不同氮源之间

也有显著差异。酵母膏作为单一氮源, 其发酵液的絮凝率最高, 达到 91.77%, 和复筛时培养基中的氮源为复合氮源时测定的絮凝率 91.6% 几乎相等, 说明酵母膏可以替代复合氮源, 作为该菌株的最佳氮源。

表 1 不同碳源对菌产絮凝剂的影响

Table 1 The influence of different carbon source on the microorganism producing flocculent

项目 Item	碳源 Carbon source				SS	MS	$F$ ( $p=0.01$ )
	葡萄糖 Glucose	淀粉 Starch	蔗糖 Sucrose	乙醇 Ethanol			
絮凝率/% Rate of flocculent	91.83 <sup>A</sup>	76.17 <sup>C</sup>	88.13 <sup>B</sup>	63.57 <sup>D</sup>	1472.716	490.905	671.706*

注:以上数据均为 3 次重复的平均值, 方差分析采用  $F$  检验和 SNK 法, \* 表示差异极显著。

Note: Data in talbe 1 are a mean of three repeats,  $F$  test and SNK were used for variance analysis, \* showed most significant difference.

表 2 不同氮源对菌产絮凝剂的影响

Table 2 The influence of different nitrogen source on the microorganism producing flocculent

项目 Item	氮源 Nitrogen source					SS	MS	$F$
	硝酸钠 Sodium nitrate	酵母膏 Ferment	脲 Urea	硫酸铵 Ammonium sulphate	氯化铵 Ammonium chloride			
絮凝率/% Rate of flocculent	79.17 <sup>C</sup>	91.77 <sup>A</sup>	80.12 <sup>C</sup>	87.55 <sup>B</sup>	48.53 <sup>D</sup>	3460.482	865.121	2775.313*

2.2.3 碳氮比对菌产絮凝剂的影响 培养基的碳源、氮源浓度比对微生物的生长和代谢具有很大的影响<sup>[10]</sup>。本试验中所用筛选培养基的碳氮原子比为 24.07, 以此为基础, 维持氮源的浓度不变, 通过改变葡萄糖的浓度, 使碳氮比分别为 5、10、15、20、25、30、35、40 和 50, 其他培养条件不变对测试菌株进行培养。通过测定不同碳氮比下发酵上清液对高岭土悬浊液的絮凝率研究碳氮比对菌产絮凝剂的影响。试验结果见表 3。

从表 3 可以看出, 碳氮比对菌产絮凝剂的能

力具有显著的影响, 表面上看, 碳氮比为 20~30 时, 产生絮凝剂的能力稳定的保持在较高的水平, 絮凝率最高达到 92.8%, 当碳氮比高于 30 时, 絮凝率迅速下降。通过多重比较发现, 碳氮比为 20 和 25 之间, 没有显著差异, 而 25 和 30 之间有显著差异, 出于经济的考虑, 选择 25 为最适碳氮比。而本试验所采用的筛选培养基的碳氮比为 24.07, 刚好位于适宜的碳氮比的区间, 说明筛选培养基的碳氮比是适合菌株 S3 产生絮凝剂的。

表 3 不同碳氮比对菌产絮凝剂的影响

Table 3 The influence of different C/N on the microorganism producing flocculent

项目 Item	碳氮比 Ratio of carbon and nitrogen								
	5	10	15	20	25	30	35	40	50
絮凝率/% Rate of flocculation	68.31 <sup>G</sup>	72.12 <sup>E</sup>	76.81 <sup>D</sup>	91.70 <sup>A</sup>	92.83 <sup>A</sup>	87.41 <sup>B</sup>	82.32 <sup>C</sup>	70.83 <sup>F</sup>	48.60 <sup>H</sup>
SS					4638.547				
MS					579.818				
F					1925.596*				

表 4 正交试验因素及水平

Table 4 The factors and levels of orthogonal design

水平 Level	因素 A 葡萄糖 (g/L) Glucose	因素 B 酵母膏 (g/L) Ferment	因素 C 温度 /°C Temperature	因素 D pH 通气量/(r/min) Amount of ventilation	因素 E		
1	10	2.5	25	6	50		
2	15	3	28	7	100		
3	20	3.5	30	8	150		
4	25	4	35	9	200		

综上所述, 菌株 S3 的最佳碳源为葡萄糖, 最佳氮源为酵母膏、适宜的碳氮比范围为 25。

### 2.3 利用正交试验优化培养基成份配比和培养条件的研究

以菌株 S3 的最佳碳源葡萄糖、最佳氮源酵母膏和培养温度、初始 pH 值、通气量为进行正交试验的 5 个因素(分别用 A、B、C、D、E 表示), 菌株正交试验因素及水平表见表 4, 正交试验设计及结果见表 5。

对表 5 进行分析, 从表中 R 值(极差)的大小可以看出各影响因素从大到小依次为: 葡萄糖

(A)>通气量(E)>培养温度(C)>酵母膏(B)>pH值(D)。其中前3个因素的极差较大,可以认为对菌产絮凝剂影响较大,因此在对该菌株进行生产应用时应特别注意严格控制这3个因素。另外两个因素酵母膏和初始pH值的极差较小,只有4.608和5.098,可以认为对菌产絮凝剂影响较小,即该菌株对这两个因素具有较广的适应范围。从表中K值(各因素各水平絮凝率平均值)可以得出各因素的最佳水平为:葡萄糖20,通气量50,培养温度28,酵母膏2.5,初始pH值8。

表5 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验设计及结果

Table 5 The orthogonal design and analysis of result

试验号 Number	因素 Factors					絮凝率/% Rate of flocculation S3
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	68.25
2	1	2	2	2	2	74.40
3	1	3	3	3	3	53.48
4	1	4	4	4	4	50.54
5	2	1	2	3	4	87.34
6	2	2	1	4	3	77.37
7	2	3	4	1	2	82.32
8	2	4	3	2	1	85.49
9	3	1	3	4	2	91.23
10	3	2	4	3	1	89.26
11	3	3	1	2	4	76.33
12	3	4	2	1	3	87.28
13	4	1	4	2	3	64.62
14	4	2	3	1	4	51.98
15	4	3	2	4	1	88.29
16	4	4	1	3	2	80.14
K1	61.668	77.860	75.523	72.458	82.823	
K2	83.130	73.253	84.328	75.210	82.023	
K3	86.025	75.105	70.545	77.555	70.688	
K4	71.258	75.863	71.685	76.858	66.548	
R	24.358	4.608	13.783	5.098	16.275	

## 2.4 优化培养条件下的絮凝试验

在上述试验得出的优化培养条件下,经多次培养及絮凝活性测定,絮凝率在92%左右。

## 3 结论

筛选出1株具有高效絮凝活性的微生物,通过单因素试验方法和正交试验设计方法,优化了菌产絮凝剂的培养条件。试验结果表明:菌株S3产絮凝剂的最佳培养条件是碳源为葡萄糖(20 g/L),氮源为酵母膏(2.5 g/L),培养温度为28℃,初始pH值为8,通气量为50 r/min;在优化培养条件下,絮凝率在92%左右。

## 参考文献:

- [1] 余荣升,徐龙君.微生物絮凝剂的现状与前景分析[J].环境污染防治,2003,25(2):77-79.
- [2] 时红,牛志卿,李晋.微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养研究[J].生物技术,2003,13(1):25-27.
- [3] 程金平,郑敏,张兰英,等.影响微生物絮凝剂产生的因素研究[J].环境科学与技术,2001,25(3):28-31.
- [4] Kurane R, Takda K, Suzuki T. Screening for and characteristics of microbial flocculants[J]. Agric Biol Chem, 1986,50(9):2301-2307.
- [5] 陶然,杨朝晖.微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及其培养条件的优化研究[J].中国生物工程杂志,2005,25(8):76-81.
- [6] 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,1998.
- [7] Deng S B, Bai R B, Hu X M, et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch waste water treatment[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 60 (5):588-593.
- [8] 张通,卢文玉,田春.絮凝剂产生菌培养基的研究[J].应用与环境生物学报,2003,9(1):67-70.
- [9] 杜荣春.生物统计学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2004.242-248.
- [10] Nakamura J, Miyashiro, Hirose Y. Screening isolation, and some properties of microbial cell flocculants[J]. Agric. Biol. Chem., 1976, 40(2): 377-383.

# 絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件的优化

作者: 钟文文, ZHONG Wen-wen  
作者单位: 临沂师范学院生命科学学院, 山东临沂, 276000  
刊名: 西北农业学报 [ISTIC PKU]  
英文刊名: ACTA AGRICULTRAE BOREALI-OCCIDENTALIS SINICA  
年, 卷(期): 2008, 17(1)  
被引用次数: 3次

## 参考文献(10条)

1. 余荣升;徐龙君 微生物絮凝剂的现状与前景分析[期刊论文]-环境污染与防治 2003(02)
2. 时红;牛志卿;李晋 微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养研究[期刊论文]-生物技术 2003(01)
3. 程金平;郑敏;张兰英 影响微生物絮凝剂产生的因素研究[期刊论文]-环境科学与技术 2001(03)
4. Kurane R;Takda K;Suzuki T Screening for and characteristics of microbial flocculants 1986(09)
5. 陶然;杨朝晖 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及其培养条件的优化研究[期刊论文]-中国生物工程杂志 2005(08)
6. 谷葛键;王正祥 工业微生物实验技术手册 1998
7. Deng S B;Bai R B;Hu X M Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch waste water treatment[外文期刊] 2003(05)
8. 张通;卢文玉;田春 絮凝剂产生菌培养基的研究[期刊论文]-应用与环境生物学报 2003(01)
9. 杜荣骞 生物统计学 2004
10. Nakamura J;Miyashiro;Hirose Y Screening isolation, and some properties of microbial cell flocculants 1976(02)

## 本文读者也读过(10条)

1. 张新建. 李红梅. 黄玉杰. 王加宁. 杨合同. 王晓. ZHANG Xin-jian. LI Hong-mei. HUANG Yu-jie. WANG Jia-ning. YANG He-tong. WANG Xiao 高效絮凝剂产生菌的筛选及絮凝活性研究[期刊论文]-微生物学杂志2008, 28(6)
2. 万鹰昕. 何珊. 吴丽萍 絯凝剂产生菌的筛选及应用[期刊论文]-地球与环境2008, 36(2)
3. 杨耿. 阮红. 罗晶. YANG Geng. RUAN Hong. LUO Jing 絯凝剂产生菌的筛选及其絮凝活性的测定[期刊论文]-浙江大学学报(理学版) 2008, 35(2)
4. 王正林. 冯贵颖. 岳晓勤. 单丽伟. 王月红. 刘晓荣 絯凝剂产生菌的筛选及产生絮凝剂的影响因素研究[期刊论文]-西北农林科技大学学报(自然科学版) 2003, 31(2)
5. 李旭. 李小明. 杨麒. 曾光明. LI Xu. LI Xiao-ming. YANG Qi. ZENG Guang-ming 一株絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝特性研究[期刊论文]-生物技术2007, 17(1)
6. 刘占英. 张通. 张冬艳. 田春. 李永丽. LIU Zhanying. ZHANG Tong. ZHANG Dongyan. Tian Chun. Li Yongli 絯凝天然碱碱泥的絮凝剂产生菌的筛选及最佳产絮条件研究[期刊论文]-环境科学学报2006, 26(3)
7. 何丽明. 杨润蕾. 吕志堂. 边振江. 张利平. HE Li-ming. YANG Run-lei. LU Zhi-tang. BIAN Zhen-jiang. ZHANG Li-ping 衡水湖样品中粘细菌的分离与纯化[期刊论文]-河北大学学报(自然科学版) 2006, 26(1)
8. 张香美. 马同锁. 张红兵. ZHANG Xiang-mei. MA Tong-suo. ZHANG Hong-bing 一株新型絮凝剂产生菌的筛选及其特性研究[期刊论文]-工业用水与废水2006, 37(4)
9. 周杰. 张苓花. 王运吉. ZHOU Jie. ZHANG Ling-hua. WANG Yun-ji 絯凝剂产生菌Diaphorobacter Z-052的发酵研究[期刊论文]-食品与生物技术学报2007, 26(2)
10. 湛雪辉. 湛含辉. 姜涛. 胡岳华. 张晓琪 微生物絮凝剂产生菌的筛选及絮凝特性研究[期刊论文]-环境科学与技术 2003, 26(2)

### 引证文献(3条)

1. 赵凤. 张蔚萍. 胡庆华 微生物絮凝剂的絮凝机理及应用研究[期刊论文]-环境与可持续发展 2009(2)
2. 刘小真. 梁越. 汪月华. 肖远东 土壤微生物絮凝剂菌株的筛选及其培养条件优化[期刊论文]-江西农业大学学报 2011(4)
3. 王显蕾. 杨亚提. 张瑞. 张守文. 陈玉亮. 肖旋 不同改性玉米淀粉絮凝剂的制备及其应用初步研究[期刊论文]-西北农业学报 2009(2)

引用本文格式: 钟文文, ZHONG Wen-wen 絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件的优化[期刊论文]-西北农业学报 2008(1)