

絮凝剂产生菌的筛选研究

殷鸿洋¹ 李如意² 孙昭^{1*} 李壮壮¹ 计伟³

¹ 常州科清环保科技有限公司, 江苏 常州 213119

² 常州大学环境科学与工程学院, 江苏 常州 213164

³ 苏州苏震生物工程有限公司, 江苏 苏州 215228

[摘要] 随着经济的发展, 水污染也越来越严重, 微生物絮凝剂具有良好, 稳定絮凝沉降性能。对于活性污泥, 泥水, 印染废水等有很好的絮凝沉降效果。絮凝沉降作为水处理工艺的关键前置步骤, 对后续工艺运行成本以及运行状况有着重大影响, 然而绝大多数菌剂的构建多以针对特定污染物的降解为主, 很少涉及到微生物絮凝剂产生菌。本实验从实验室前期筛选的高效絮凝剂产生菌进行进行活化、富集、组配、高浓度氨氮水体驯化, 构建一组具有适应高浓度氨氮水体, 且依旧产生絮凝效果的复合菌群。而在构建复合菌群之前, 需要对絮凝剂产生菌进行初步的筛选与驯化。

[关键词] 絮凝剂; 复合菌群; 筛选

DOI: 10.33142/sca.v6i2.8595

中图分类号: X703.5

文献标识码: A

Study on Screening of Flocculant-producing Bacteria

YIN Hongyang¹, LI Ruyi², SUN Zhao^{1*}, LI Mumu¹, JI Wei³

¹ Changzhou Keqing Environmental Protection Technology Co., Ltd., Changzhou, Jiangsu, 213119, China

² School of Environmental Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu, 213164, China

³ Suzhou Suzhen Bioengineering Co., Ltd., Suzhou, Jiangsu, 215228, China

Abstract: With the development of economy, water pollution is becoming more and more serious, and microbial flocculant has good and stable flocculation and sedimentation performance. It has a good flocculation and sedimentation effect on activated sludge, muddy water and printing and dyeing wastewater. Flocculation and sedimentation, as the key pre-step of water treatment process, has a great influence on the operation cost and operation status of the subsequent process. However, the construction of most microbial agents mainly focuses on the degradation of specific pollutants, and rarely involves microbial flocculant-producing bacteria. In this experiment, activated, enriched, assembled and domesticated the high-concentration ammonia-nitrogen water from the high-efficiency flocculant-producing bacteria screened in the laboratory in the early stage, and constructed a group of compound flora which can adapt to the high-concentration ammonia-nitrogen water and still produce flocculation effect. Before constructing the complex flora, it is necessary to sift and domesticate the flocculant-producing bacteria.

Keywords: flocculant; complex flora; sift

微生物絮凝剂具有良好, 稳定的絮凝沉降性能, 对粉煤灰、泥水、河底沉积物、印染废水、果汁等都具有较好的絮凝沉降效果^[1]。絮凝沉降作为水处理工艺的关键前置步骤, 对后续工艺运行成本以及运行状况有着重大影响, 然而绝大多数菌剂的构建多以针对特定污染物的降解为主, 很少涉及到微生物絮凝剂产生菌^[2]。微生物絮凝剂产生菌的种类有很多, 主要涵盖有细菌、放线菌、真菌。目前已知的微生物絮凝剂产生菌可达 76 个种^[3-4]。

但是之前的研究中针对高氨氮以及高 SS 废水, 且如何保证絮凝剂产生菌能够适应, 并且发挥絮凝沉降性能是絮凝剂产生菌构建的复合菌群高效化降解与絮凝性能的研究少之又少^[5]。因此本实验从实验室前期筛选的高效絮凝剂产生菌进行进行活化、富集、组配、高浓度氨氮水体驯化, 构建一组具有适应高浓度氨氮水体, 且依旧产生絮凝效果的复合菌群。因此在构建复合菌群之前, 需要对絮凝剂产生菌进行

初步的筛选与驯化^[6]。万鹰昕^[7]从污水处理厂筛选出两株具有较好絮凝性能的菌株, 分别为 *Galactomyces* sp (M-2) 和白地霉属 *Geotrichum candidum* (J-5)。

1 材料和方法

1.1 实验仪器与设备

实验中所用的仪器与设备见表 1 所示。

1.2 实验药剂

盐酸 (AR)、氢氧化钠 (AR)、氯化钠 (AR)、硫酸镁 (AR)、磷酸氢二钾 (AR); 牛肉膏、蛋白胨、琼脂为生物制剂; 尿素 (AR)、酵母膏 (AR)、磷酸二氢钾 (AR)、硫酸铵 (AR); 高岭土为化学纯试剂。

1.2.1 培养基

一般用 LB 培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 蒸馏水 1000mL, pH7.4~7.6。

KB 培养基: 蛋白胨 20g, 磷酸氢二钾 (KH₂PO₄) 1.5g,

表 1 絮凝剂产生菌筛选试验仪器与设备

名称	型号	生产厂家
立式压力蒸汽灭菌锅	YXQ-50G	浙江纳德科学仪器有限公司
生化培养箱	LRH-250F	浙江赛德仪器设备有限公司
电热恒温水浴锅	DK-S28	上海仪天科学仪器有限公司
高速冷冻型微量离心机	D3024R	拓赫机电科技(上海)有限公司
超净工作台	双人单面超净工作台	郑州赛热达窑炉有限公司
紫外可见光光度计	T60	上海荆和分析仪器有限公司
酸度计	HACH HQ11D	青岛明博环保科技有限公司
数显恒温双头磁力搅拌器	HJ-2A	常州市伟嘉仪器制造有限公司
生物显微镜	KP-PH36T-500X	科普艾斯科技(深圳)有限公司

硫酸镁 1.5g, 琼脂 10g, 蒸馏水 1000mL, pH7.2±0.2

通用发酵培养基: 葡萄糖 20.00g, 尿素 0.50g, 酵母膏 0.50g, 磷酸氢二钾 5.00g, 磷酸二氢钾 2.00g, 氯化钠 0.10g, 硫酸铵 0.20g, 硫酸镁 0.20g, 蒸馏水 1.00L, pH 值: 7.5。

为防止培养基中的葡萄糖在 121℃ 灭菌出现焦糖化, 含有葡萄糖的培养基采用高压蒸汽灭菌法, 温度为 115℃, 30min。所有培养基加入 2% 的琼脂即为对应的固体培养基。

1.2.2 模拟废水

高浓度氨氮废水, 成分如下: 葡萄糖 5.0g, 硫酸铵 ((NH₄)₂SO₄) 5g, 氯化钠 (NaCl) 1.0g, 磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 0.5g, 硫酸镁 (MgSO₄·7H₂O) 0.25g, 高岭土 0.5g, 蒸馏水 1000ml, pH7.2~7.4;

1.3 实验方法

对实验室保藏的四株絮凝剂产生菌, 配制活化培养基进行活化, 将活化好的营养琼脂培养基进行菌株复壮, 复壮 2~3 代保证菌株的活性稳定^[8]。采用通用发酵培养基进行发酵, 控制统一 OD 值, 利用高岭土法测量 OD₅₅₀, 计算絮凝率, 挑选最佳菌株作为后续实验菌株。将筛选出的最佳菌株, 后续进行驯化提高氨氮浓度。筛选出的菌株首先进行了菌株互作关系的测定, 明确菌株之间的相互作用。

1.3.1 菌株活化与复壮

实验室保藏的絮凝剂产生菌保存在 4℃ 低温环境下, 为了保证微生物能顺利稳定发挥絮凝特性, 对四株菌株进行活化。四株菌株分别为 C1: 枯草芽孢杆菌、C2: 伯克氏菌、C3: 荧光假单胞菌、C4: 苏云金芽孢杆菌。

配置活化培养基: 采用通用 LB 培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, pH7.4~7.6。

a. 首先用玻璃棒取牛肉膏于称量纸上准确量地取 3g 待用, 用取样勺依次准确称量其余试剂(取样勺不可混用)。

b. 于 1000mL 烧杯中准确加入 1000mL 蒸馏水, 于电炉上加热至 50℃, 将称量好的牛肉膏, 拿取称量纸一角, 放入烧杯中, 用玻璃棒助其从称量纸脱落溶解, 然后拿出称量纸, 等到牛肉膏完全溶解后, 再依次加入蛋白胨, 氯

化钠, 琼脂(注: 每一试剂溶解后, 方可加入下一试剂。)加热至琼脂完全溶解, 关闭电炉, 补足水分到刻度。待温度降至 50℃ 左右调节 pH。逐片加入氢氧化钠(注: 时刻记录 pH, 防止过量反调)

c. 分装: 将调节好的培养基, 分装到三个 500mL 三角瓶中, 同时准备 500mL 蒸馏水配制无菌水, 无菌棉封闭瓶口, 报纸包扎, 高压蒸汽灭菌锅内 121℃, 20min 灭菌。

d. 将实验所需一次性培养皿, 涂布器, 于超净台中, 预先紫外灭菌 10min。

e. 于无菌操作台中, 倒出 12 个培养基, 分别挑取一环菌种, 接入装配好的三个培养基中, 依次编号, 分别加入一环无菌水放入剩下三个培养基, 依次编号, 作为对照。待培养基冷却后, 倒置平板。

f. 将培养基放入, 恒温培养箱中, 于 30℃, 培养 24h。观察生长情况

g. KB 培养基对应的荧光假单胞菌操作步骤同普通 LB 培养基。

选择菌株良好的培养基, 作为复壮菌株来源。重复 d, e, f 三个这步骤。共计两次, 保证菌株次生 2~3 代。

1.3.2 菌株生长曲线的绘制

为了确保后续实验接种时候的菌株浓度相同, 且后续实验的菌株浓度变量控制方便, 对四株菌株进行了生长曲线的绘制。

1.3.3 菌株发酵培养与絮凝率测定

为了进行初步的菌株的最佳絮凝率单一菌株的挑选, 以便后续实验的需要。在对菌株活化发酵富集后, 进行了四株菌株的絮凝效果的比对, 采用高岭土测量絮凝率的方法, 控制菌株的 OD_{550nm} 在 1.2, 吸取菌株 1mL, 浓度稀释 50 倍检测吸光度, 筛选最优菌株。为了测定与筛选活化与复壮之后的菌株的各自絮凝效果。具体步骤如下所示: 向 100mL 比色管中, 加入 0.4g 高岭土, 5mL 的 1% 的氯化钙 (CaCl₂) 溶液, 1mL 加菌的发酵培养液, 定容至 100mL 刻度线, 将比色管作 15 个上下自然翻转, 使得悬浊液混合均匀, 翻转完毕后, 静置 5min。取比色管中 50mL 位置

处的处理液，用分光光度计，在 550nm 的波长条件下，测定吸光度 A (OD₅₅₀)，同时以加蒸馏水（高压蒸汽灭菌）至相同刻度的高岭土悬浊液，作为空白对照，测定吸光度 B。以测定的吸光度 B 作为评价依据，如公式 1 所示。

$$\text{絮凝率 (FE)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式中：A 为对照组比色管 50mL 处 OD_{550nm} 处吸光度；B 为实验组比色管 50mL 处 OD_{550nm} 处吸光度，每个样品重复三次，计算平均值。

配置高岭土悬浊液进行菌液的发酵絮凝率测定，向 100mL 比色管中，加入 0.4g 高岭土，5mL 的 1% 的氯化钙 (CaCl₂) 溶液，1mL 加菌的发酵培养液，定容至 100mL 刻度线，将比色管作 15 个上下自然翻转，使得悬浊液混合均匀，翻转完毕后，静置 5min。取比色管中 50mL 位置处的处理液，用分光光度计，在 550nm 的波长条件下，测定吸光度 A (OD₅₅₀)。

1.3.4 菌株互作关系测定

选择 C2, C3 作为絮凝剂产生菌菌群组建菌株，进行挑选出最佳的组合（即絮凝率最高的组合），将其与单一的菌株的相同条件下的絮凝率进行比较。看是否高于单一的菌种絮凝率，以检测复建菌种之间的关系，是拮抗，还是协同。C2 与 C3 按照 1:1 总 2%V/V 接种比在 550nm 波长下测定吸光度，计算 FE，与各自的絮凝率进行对比。

1.3.5 絮凝剂产生菌的组配

控制纯菌液 OD₅₅₀=1，对两株菌进行 C2: C3=1:1、C2: C3=1:3、C2: C3=1:5、C2: C3=3:1、C2: C3=5:1 共计 5 个梯度的不同体积配比实验，在 400.00 mg/L 氨氮浓度下，确定最佳配比^[8]。在 30℃，180 r/min，pH7.2~7.4 条件下培养 72 h，测定絮凝剂产生菌对废水的絮凝率与氨氮降解率。然后对其进行 500.00、800.00、1000.00 mg/L 高氨氮废水驯化，驯化三代，提高其耐受性^[9]。

2 结果与分析

2.1 菌株活化与复壮

菌株活化过程中的平板照片如图 1 所示：

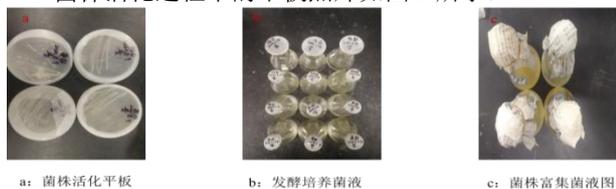


图 1 四株菌株活化平板

采用三线法，对四株菌株进行平板培养基实验，四株菌株的平板活化结果表明，菌株的生理活性依然很好，在相对的平板培养基上呈现出快速的生长率。且在液体培养基以及发酵富集培养基上，均显露出良好的生长状态。

2.2 菌株生长曲线的绘制

具体菌株的生长曲线测定数据如表 2 所示。

表 2 菌株 OD_{550nm} 吸光度测定数据

时间 (h)	枯草芽孢杆菌	伯克氏菌	荧光假单胞菌	苏云金芽孢杆菌
1	0.018	0.03	0.041	0.028
3	0.008	0.097	0.241	0.022
5	0.012	0.317	0.56	0.038
7	0.016	0.758	0.889	0.238
18	1.057	1.095	1.13	1.11
24	--	--	1.352	1.327
28	1.323	1.425	1.417	1.349
32	1.531	1.5	1.509	1.516
42	1.981	1.469	1.447	1.466
46	2.264	1.385	1.385	--
50	1.891	--	--	--

四株菌株的生长曲线图如图 2 所示。

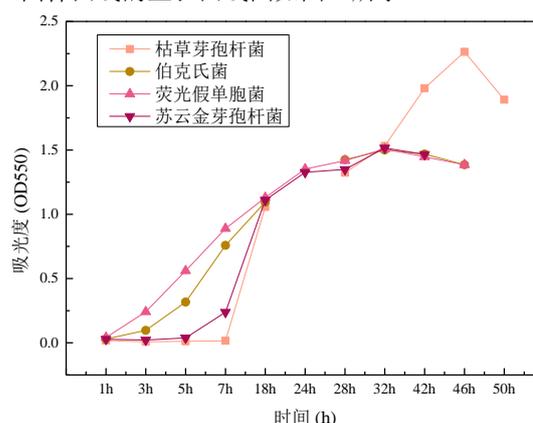


图 2 四株菌株生长曲线

菌株生长曲线结果表明，菌株 OD_{550nm} 处的吸光值在 1.1 左右，四株菌株，全部属于对数生长期，所以通过菌株生长曲线控制菌株的 OD 值，保证后续的接种。

2.3 菌株发酵与絮凝率测定

测定菌发酵培养液絮凝率如表 3 所示。实验室保藏四株菌株的初步絮凝率测定结果如图 2-3 所示，结果表明 C2, C3 具有相对较高的单菌絮凝率。C3 最高，絮凝率为 24.0%，C2 达到 17.5%。其他两株菌的絮凝效果很差，推测一方面是菌株的高浓度氨氮耐受性差，另一方面是菌株自身的原有产絮凝剂效果不强。而未经过驯化的 C2、C3 则快速的适应了高浓度废水，并且分泌出大量絮凝物质。因此挑选 C2、C3 作为后续絮凝剂产生菌复配菌株来源。

表 3 菌株絮凝率测定结果

名称	平行 1 (%)	平行 2 (%)	平行 3 (%)
C1	0.03659	0.06098	0.03659
C2	0.19512	0.15854	0.17073
C3	0.21951	0.2439	0.2561
C4	0.14634	0.13415	0.14634

具体絮凝率测定如图 3 所示。

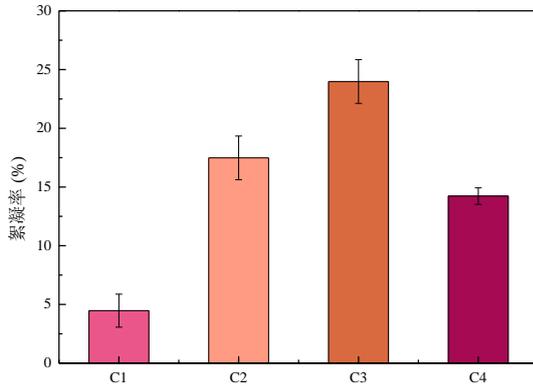


图 3 菌株发酵液絮凝率测定

2.4 菌株互作关系测定

具体测定数据见表 4。

表 4 菌株互作关系表

组合	平行 1 (%)	平行 2 (%)	平行 3 (%)
C2	0.19512	0.15854	0.17073
C3	0.21951	0.2439	0.2561
C2+C3	0.7037	0.51852	0.48148

具体菌株互作关系图形展示如图 4 所示。

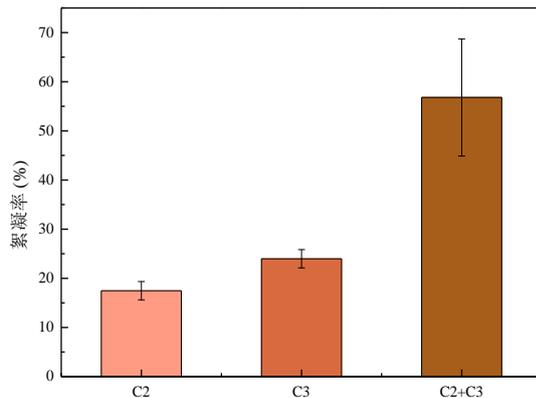


图 4 菌株互作关系测定

菌株互作关系表明，与单独的 C2、C3 在该条件下的絮凝率相比，C2+C3 的复合菌群，在该工况下，具有 56.8% 的絮凝率。高于单独的两株菌株的絮凝率，说明二者在该条件下呈现协同作用。所以后续选择该两株菌株作为最终的复合菌群中的絮凝剂产生菌使用。

2.5 絮凝剂产生菌的组配

不同配比下的复合菌对高浓度氨氮模拟废水的絮凝与降解效果如图 2 所示，当接种比为 C2:C3=3:1 的时候，二者呈现最高的絮凝率为 40.2%，此时的氨氮降解率为 3.8%。当 C2:C3=1:5 时，该配比下的复合菌的絮凝率最低，为 4.4%，此时对应的氨氮降解率同样是 3.8%。而且从整体的配比可知，当 C2:C3=5:1 的时候，虽然絮凝率有所下降，但是依然要高出前三组，因此推测 C2 对絮凝

率的提高起主要作用，这也解释了为什么随着 C2 的含量增加，氨氮降解率略有提升。各配比对于氨氮的降解无显著差别，维持在 4% 左右。推测，该两株菌，主要利用水体中的碳源以及少许的氮源作为营养源，且菌株虽然经过驯化，但是考虑到驯化周期可能较短，高浓度氨氮对菌株产生抑制作用，这也是为什么氨氮降解率相比 300.00 mg/L 氨氮浓度有所下降，但整体絮凝率依然不低于前人研究^[10]。所以后续选用 C2:C3=3:1 作为最佳絮凝剂产生菌的配比，用来与挑选出的氨氮降解菌构建复合菌群。

具体的絮凝率测定结果见表 5 所示：

表 5 组配菌株絮凝率测定表

样品	备注	OD550	FE (%)	OD420	降解率 (%)
空白 1		2.674		1.706	
空白 2		2.674		1.706	
空白 3		2.674		1.706	
C2:C3=1:1	平行 1	2.513	5.88%	1.617	5.23%
C2:C3=1:1	平行 2	2.489	6.78%	1.678	1.65%
C2:C3=1:1	平行 3	2.488	6.82%	1.665	2.41%
C2:C3=1:3	平行 1	2.471	7.45%	1.580	7.40%
C2:C3=1:3	平行 2	2.322	13.03%	1.652	3.17%
C2:C3=1:3	平行 3	2.312	13.41%	1.654	3.06%
C2:C3=1:5	平行 1	2.531	5.21%	1.637	4.05%
C2:C3=1:5	平行 2	2.565	3.93%	1.646	3.53%
C2:C3=1:5	平行 3	2.563	4.01%	1.641	3.82%
C2:C3=5:1	平行 1	2.151	19.44%	1.596	6.46%
C2:C3=5:1	平行 2	2.241	16.07%	1.636	4.11%
C2:C3=5:1	平行 3	2.245	15.92%	1.637	4.05%
C2:C3=3:1	平行 1	1.565	41.39%	1.669	2.17%
C2:C3=3:1	平行 2	1.611	39.66%	1.627	4.64%
C2:C3=3:1	平行 3	1.614	39.55%	1.629	4.52%

具体绘制的图形表示，如图 5 所示：

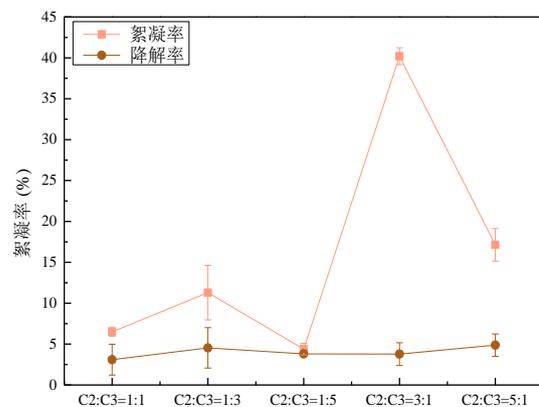


图 5 絮凝剂产生菌组配测定结果图

3 讨论

本文主要研究了保藏的四株絮凝剂产生菌在高浓度

氨氮废水下的絮凝效果,并对此进行筛选与组配,具体结果如下所示:(1)四株絮凝剂产生菌种 C2, C3 絮凝率最高,C2、C3 初期液体培养基测定有 17.5%与 24.0%的絮凝率;(2)C2, C3 互作关系表明:二者在体积比 1:1,总接种比为 2%时候有 70.37%的絮凝率,二者呈现协同结果;(3)C2, C3 最佳体积比为 3:1,此时在 1000mg/L 高浓度畜禽模拟废水中有 40.2%絮凝率。

絮凝剂产生菌的筛选的研究表明,菌株在相对的平板培养基上呈现出快速的生长率。菌株 OD550nm 处的吸光值在 1.1 左右,四株菌株,全部属于对数生长期,所以通过菌株生长曲线控制菌株的 OD 值,保证后续的接种。为了测量四株菌株的絮凝率,我们发现 C3 的絮凝率最高为 24.0%,C2 达到 17.5%。而其他两株菌的絮凝效果很差,可能一方面是菌株的高浓度氨氮耐受性差,另一方面是菌株自身的原有产絮凝剂效果不强。而未经过驯化的 C2、C3 则快速的适应了高浓度废水,并且分泌出大量絮凝物质。因此选取 C2, C3 作为絮凝剂产生菌复配菌株来源。C2+C3 的复合菌群,在该工况下,具有 56.8%的絮凝率。高于单独的两株菌株的絮凝率,说明二者在该条件下呈现协同作用。而当接种比为 C2:C3=3:1 的时候,二者呈现最高的絮凝率为 40.2%,此时的氨氮降解率为 3.8%。当 C2:C3=1:5 时,该配比下的复合菌的絮凝率最低,为 4.4%,此时对应的氨氮降解率同样是 3.8%。而且从整体的配比可知,当 C2:C3=5:1 的时候,虽然絮凝率有所下降,但是依然要高出前三组,因此推测 C2 对絮凝率的提高起主要作用,最后选用 C2,C3 的体积比为 3:1,此时在 1000mg/L 高浓度畜禽模拟废水中有 40.2%絮凝率。

4 结论

本章节主要研究了保藏的四株絮凝剂产生菌在高浓度氨氮废水下的絮凝效果,并对此进行筛选与组配,具体结果如下所示:(1)四株絮凝剂产生菌种 C2, C3 絮凝率最高,C2、C3 初期液体培养基测定有 17.5%与 24.0%的絮凝率。(2)C2, C3 互作关系表明:二者在体积比 1:1,总接种比为 2%时候有 70.37%的絮凝率,二者呈现协同结果。(3)C2, C3 最佳体积比为 3:1,此时在 1000mg/L 高浓度畜禽模拟废水中有 40.2%絮凝率。

[参考文献]

- [1]张薇.一株高效微生物絮凝剂产生菌的分离、鉴定及其对富营养化水体的处理研究[D].四川:四川师范大学,2015.
 - [2]陈红菊,王慧,孔维祯,等.氨氮降解菌的筛选、鉴定与复合菌水质调控效果研究[J].水生生物学报,2019,43(4):875-883.
 - [3]孙筱君,沈琦,吴逸飞,等.氨氮降解微生物的筛选和初步应用[J].浙江农业学报,2020,32(9):1683-1691.
 - [4]章沙沙,柳增善,周红梅,等.微生物絮凝剂研究及在污水领域的应用现状[J].环境保护科学,2022,48(1):74-80.
 - [5]魏炜,马振林,陈令薇.微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝性能优化研究[C].南昌:中国环境科学学会 2021 年科学技术年会——环境工程技术创新与应用分会场论文集,2021.
 - [6]蔡芬芬,王欢.微生物絮凝剂产生菌培养基的优化[J].现代农业研究,2020,26(4):33-35.
 - [7]万鹰昕,何珊,吴丽萍.絮凝剂产生菌的筛选及应用[J].地球与环境,2008(2):179-182.
 - [8]程艳茹,龚继文,封丽,等.水处理中微生物絮凝剂产生菌的选育及应用[J].环境监测管理与技术,2019,31(2):6-46.
 - [9]H. D, LYU MY, JUN L, et al. Screening of high flocculant-producing bacteria strain and optimizing of culture conditions for wheat distillery wastewater[J].New BIOTECHNOLOGY,2018,44(1):34-6.
 - [10]ZE DT, WEN S, ZHANG KY,et al. Enhanced passivation of lead with immobilized phosphate solubilizing bacteria beads loaded with biochar/nanoscale zero valent iron composite[J]. Journal of Hazardous Materials,2020,384(3):5.
- 作者简介:殷鸿洋(1994.4-),女,研究生,工程师,研究方向:污染控制技术;通讯作者:孙昭(1996.12-),男,工程师,研究方向:环境工程。