

絮凝菌的筛选及乳制品废水培养条件优化

魏 炜,陈令薇,马振林,崔 鹏

(沈阳建筑大学市政与环境工程学院,辽宁 沈阳 110168)

摘要 目的 研究廉价乳制品废水作为培养基筛选高效絮凝菌,并对其进行培养条件优化试验,旨在降低絮凝剂生产成本的同时筛选出更稳定的优势菌种。方法 以稻田土壤、活性污泥为菌种来源,通过初筛以及复筛,共选出24株产絮菌,其中菌株C2絮凝效果最佳,并对菌株C2进行紫外诱变,得到一株高效产絮菌C2-5,并分别外加不同量葡萄糖、尿素、 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 以及改变pH值、发酵培养时间、发酵培养温度、发酵培养转速、接种量对产絮菌C2-5絮凝效果进行试验。结果 单因素试验得出产絮菌C2-5的最佳培养条件:外加质量浓度为0.5 g/L的尿素,质量浓度为5 g/L的 K_2HPO_4 ,质量浓度为2 g/L的 KH_2PO_4 ,pH值为7,培养时间为48 h,培养温度为30℃,培养转速为150 r/min,接种量为6%。结论 在最佳培养条件下,通过分离选育并诱变得到的高效产絮菌C2-5对高岭土悬浮液的絮凝效果明显。

关键词 乳制品废水;微生物絮凝剂;紫外诱变;培养条件

中图分类号 TU391

文献标志码 A

Screening of Flocculating Microorganism and its Culture Conditions Optimization Based on Dairy Wastewater as Culture Medium

WEI Wei, CHEN Lingwei, MA Zhenlin, CUI Peng

(School of Municipal and Environmental Engineering, Shenyang Jianzhu University, Shenyang, China, 110168)

Abstract: In order to reduce flocculant production cost and screen out more stable dominant strains, dairy wastewater as a cheap medium of efficient flocculant strains and the optimal culture conditions were studied. Paddy soil and activated sludge as the source of strains, 24 flocculent strains were selected through preliminary screening and re-screening. Among them, strain C2 had the best flocculation effect. High efficient flocculent bacteria C2-5 was obtained by UV mutagenesis. The flocculation effect of flocculent bacteria C2-5 was tested by adding glucose, urea, K_2HPO_4 and KH_2PO_4 , and changing pH value, fermentation time, fermentation temperature,

收稿日期:2020-12-09

基金项目:国家自然科学基金项目(51908377)

作者简介:魏炜(1960—),男,教授,主要从事环境污染控制与修复、污水处理方面研究。

fermentation speed and inoculation concentration. The best culture conditions for flocculent strain C2-5 through single factor experiments were urea with a mass concentration of 0.5 g/L, K_2HPO_4 with a mass concentration of 5g/L, KH_2PO_4 with a mass concentration of 2 g/L, and pH 7, the culture time 48 h, the culture temperature 30 °C, the culture speed 150 r/min, and the inoculum concentration 6%. Under the optimal flocculation conditions, the high-efficiency flocculant-producing bacteria C2-5 by separation, breeding and induction has obvious flocculation effect on the kaolin suspension.

Key words: dairy wastewater; microbial flocculant; UV mutagenesis; culture conditions

微生物絮凝剂 (Microbial flocculant, MBF) 是由絮凝微生物 (Flocculating Microorganism, FM) 即微生物絮凝剂产生菌在生长过程中产生的具有絮凝性能的天然高分子化合物^[1]。MBF 与无机絮凝剂、有机絮凝剂相比具有安全、廉价、高效、无毒、易生物降解、无二次污染等优点,是新型绿色环保水处理絮凝剂,应用前景广阔^[2]。但由于 FM 的培养成本较高,导致了 MBF 的生产成本较高,发展受到一定程度的限制,还未达到大规模工业化生产和应用阶段,仍需不断地深入研究。因此,可利用有机废水作为培养基,降低生产成本,筛选高效 FM。随着人们对身体健康的重视,乳制品的需求量在逐渐增加,其废水量也在快速增长。因此,笔者以乳制品废水作为廉价培养基筛选高效 FM,并对其进行紫外诱变后再次筛选优势菌,并对其培养条件进行优化,旨在降低微生物絮凝剂的生产成本的同时筛选出更稳定的优势菌种,使得制备出的微生物絮凝剂活性更高更稳定,以废治废、变废为宝。

1 试验

1.1 乳制品废水

乳制品废水主要来源于乳制品生产车间的容器、管道、设备的清洗水,可视为乳制品的稀释液,属于高浓度有机废水,主要污染成分为乳脂肪、乳蛋白以及乳糖等,其 COD 质量浓度通常在 2 000 ~ 3 000 mg/L。

1.2 菌种来源

菌源取自沈阳建筑大学校园稻田土壤,

沈阳市上夹河污水厂活性污泥。

1.3 培养基

种子培养基^[3]:蒸馏水 1 000 mL、葡萄糖 10 g、尿素 0.5 g、酵母膏 0.5 g、NaCl 0.1 g、 KH_2PO_4 2 g、 K_2HPO_4 5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、pH 为 7.0,在 121 °C 下灭菌 30 min。添加 15 g 琼脂即为固体分离培养基。发酵培养基:乳品废水(COD 质量浓度为 2 875 mg/L)、尿素 0.5 g、 K_2HPO_4 5 g、 KH_2PO_4 2 g、pH 为 7.0,在 121 °C 下灭菌 30 min。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株的富集培养及分离

在无菌条件下,取采集到的样品于无菌水中,充分振荡后稀释至适宜浓度的菌悬液,并采用平板涂布法在分离培养基上进行接种。在 30 °C 下倒置于恒温培养箱中培养 24 ~ 48 h。用接种环挑取不同形态的单个菌落进行划线分离、纯化培养。将其接种于保藏培养基上,在 4 °C 冰箱内保存备用。

1.4.2 菌株的初筛、复筛

在无菌条件下,用接种环从保藏培养基上挑取适量菌接种在装有 100 mL 种子液的锥形瓶中,放置在 30 °C,150 r/min 的恒温振荡培养箱下培养 24 h,获得菌株的种子液。在发酵培养基中加入适量种子液,放置在 30 °C,150 r/min 的恒温振荡培养箱下培养 48 h。吸取菌株的发酵液加入到装有高岭土悬浊液的锥形瓶中振荡,静置后进行菌株初筛,选取能产生沉淀或者层状或者片状的聚集物的菌株。进行复筛,通过测定絮凝率,选

择絮凝效果较好的菌株。

1.4.3 絮凝率的测定

吸取 2 mL 菌株的发酵液加入到 100 mL 质量浓度为 5 g/L 的高岭土悬浊液中,再加入质量分数为 1% 的 CaCl_2 溶液 5 mL 作为助凝剂,振荡 20 min,静置 10 min。取上清液于分光光度计 550 nm 处测定其吸光度值。同时,以未接种的发酵培养基作对照空白,在 550 nm 处测定吸光度值,并计算其絮凝率:

$$E = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: E 为絮凝率,%; A_0 为空白对照组上清液的吸光度; A_1 为加入发酵液絮凝之后上清液的吸光度。

1.4.4 紫外诱变

生长曲线测定^[4]:采用比浊法测定产絮菌的生长曲线。在 30 ℃ 下,将筛选得到的优势菌活化培养,按照体积分数为 5% 的接种量接种到液体牛肉膏蛋白胨培养基中培养,前 24 h 每 2 h 取一次样,后每隔 6 h 取一次样。以未接种的培养基(采用相同的方法进行灭菌和培养)作为对照组,使用分光光度计在波长 600 nm 处测定吸光度值(OD_{600})。以 OD_{600} 来表示产絮菌的生长曲线,确定菌株的生长对数期。

将筛选得到的絮凝率较好的菌株培养至对数生长期,用无菌水将稀释到 1×10^{-6} ,取 5 mL 菌悬液于培养皿内,置于距紫外灯下方 30 cm 处,分别照射 0 s、20 s、40 s、60 s、80 s、100 s、120 s、140 s,避光条件下 4 ℃ 冷藏 2 h 后,取 0.1 mL 菌液涂布于固体培养基上,做 3 组平行样,于 30 ℃ 下,避光培养 2~3 d,通过平板计数,计算不同紫外诱变时间对原始菌株的致死率^[5]:

$$Z = (B_0 - B_1) / B_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: Z 为致死率,%; B_0 为对照组的菌落数,个; B_1 为紫外线处理后的菌落数,个。

对致死率为 70%~80% 的菌株发酵培养后测定絮凝率,选取一株絮凝性能最佳的菌株作为目标试验对象。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

从土壤、活性污泥中共筛出 24 株菌,初筛后得到 11 株有明显絮凝效果的菌株,经过复筛,发现从活性污泥中筛选得到的编号为 C2 菌株的絮凝效果最好,絮凝率可达 76.23%。因此,试验研究以 C2 为目标对象。

2.2 生长曲线

图 1 为 C2 菌株的生长曲线。由图 1 可以看出, OD_{600} 值在 0~6 h 基本不变,此时菌株 C2 处于迟缓期;在 6~24 h OD_{600} 值迅速增加,菌株 C2 进入对数生长期;在 24~48 h OD_{600} 值保持稳定,此时菌株 C2 到达稳定期;48 h 后 OD_{600} 值逐渐下降,菌株 C2 开始进入衰亡期。选择对数生长期的菌株 C2 进行诱变可以增加其正向突变的概率。经试验,选定培养 18 h 后的菌株进行紫外诱变。

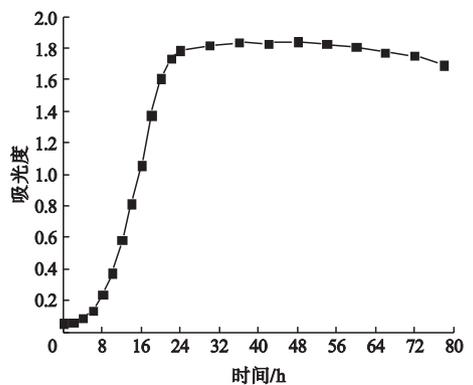


图 1 C2 菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain C2

2.3 紫外诱变筛选优良菌

适合的致死率有利于优良产絮菌的挑选,通常菌株紫外诱变的致死率在 70%~80% 时,可达到最佳的诱变效果^[4]。图 2 为 C2 菌株紫外诱变致死率。由图可知,C2 的致死率随着照射时间的增加逐渐上升,照射时间少于 100 s,菌株 C2 致死率低于 70%;照射时间多于 100 s,菌株 C2 致死率高于 80%,均不在最佳诱变范围内。在 100 s 时

菌株 C2 的致死率为 77.24%, 为最佳诱变时间。将菌株 C2 在紫外灯下照射 100 s 后培养, 并测定絮凝率, 筛选出一株絮凝性能较好的菌株 C2-5, 絮凝率可达 80.42%。

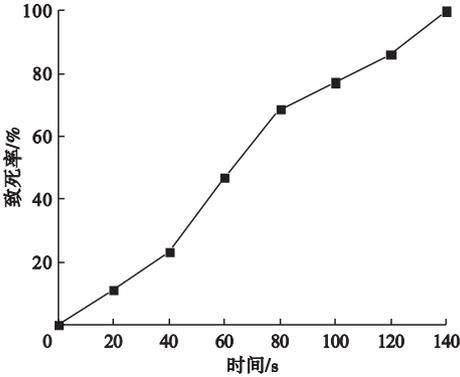


图 2 C2 菌株紫外诱变致死率

Fig. 2 UV mutagenic lethality of strain C2

2.4 产絮菌 C2-5 的发酵培养条件优化

2.4.1 外加不同量葡萄糖

通常大部分微生物对单糖的利用率更高, 且单糖的成本较低。在微生物的发酵培养中, 单糖中的葡萄糖是经常使用的外加碳源^[6]。为了降低成本以及研究外加碳源对 C2-5 絮凝性能的影响, 选定葡萄糖为外加碳源进行试验。按照 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L 的质量浓度向乳制品废水中加入葡萄糖, 其余培养条件不变, 对其进行发酵培养并检测其絮凝性能。外加不同量葡萄糖对菌株 C2-5 絮凝率的影响如图 3 所示。

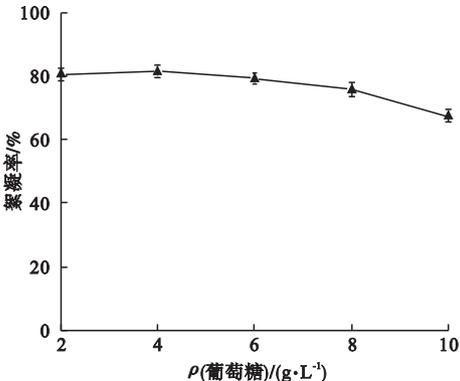


图 3 葡萄糖对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 3 Effect of glucose on the flocculation rate of strain C2-5

由图 3 可知, 菌株 C2-5 的絮凝率随着葡萄糖质量浓度的提高小幅度的增加而后逐渐降低。投加质量浓度为 4 g/L 的葡萄糖时, 絮凝率高达 81.54%, 但增幅仅为 1.12%, 为降低经济成本, 利用产絮菌 C2-5 制备 MBF 的过程中无需外加碳源。

2.4.2 外加不同量尿素

尿素是氮源中最有利于微生物生长繁殖以及 MBF 产生的物质。为了提高絮凝率, 选定尿素为外加氮源进行试验。按照 0.1 g/L、0.3 g/L、0.5 g/L、0.7 g/L、0.9 g/L 的质量浓度加入尿素, 其余培养条件不变, 对 C2-5 发酵培养并检测其絮凝性能。外加不同量尿素对菌株 C2-5 絮凝率的影响如图 4 所示。

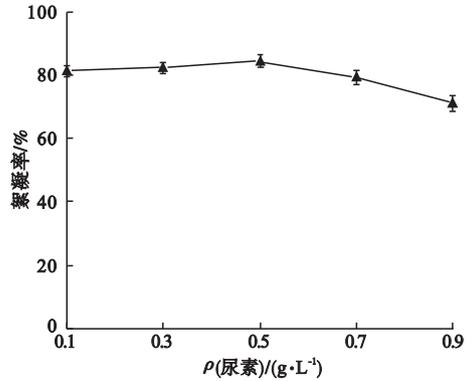


图 4 尿素对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 4 Effect of urea on flocculation rate of strain C2-5

由图 4 可知, 随着尿素投加量的增加, 菌株 C2-5 絮凝性能先提高后逐渐降低, 说明均适量的氮源有利于产絮菌 C2-5 的生长以及 MBF 的合成。尿素质量浓度为 0.5 g/L 时, C2-5 的絮凝率最佳, 其值为 84.58%。

2.4.3 外加不同量 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4

适量的磷酸盐有利于 MBF 的产生^[7-8]。为了提升 C2-5 的絮凝性能, 笔者以 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 为外加磷源进行试验。按照质量比为 $m(K_2HPO_4) : m(KH_2PO_4) = 2.5 : 1$ 的比例添加磷源, 按照 3.5 g/L、7 g/L、10.5 g/L、14 g/L、17.5 g/L 的质量浓度向乳制品废水中投加 $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, 其余培

养条件不变,对 C2-5 发酵培养并检测其絮凝性能。外加不同量 $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ 对菌株 C2-5 絮凝率的影响如图 5 所示。由图 5 可知,产絮菌 C2-5 絮凝性能随着 $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ 投加量的增加先上升后下降,当 $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ 质量浓度为 7 g/L 时,絮凝率达到 85.13% ,效果最佳。

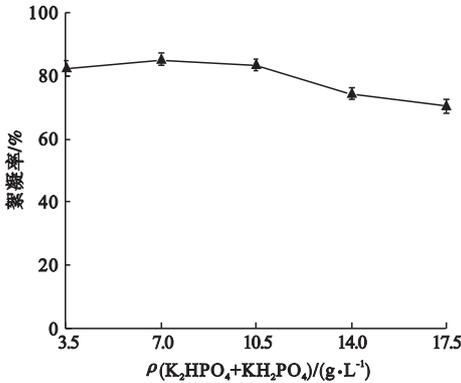


图 5 $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ 对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 5 Effect of $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ on flocculation rate of strain C2-5

2.4.4 发酵培养 pH 值

试验采用浓度为 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 对乳制品废水的 pH 值进行调节。调节 pH 值为 4、5、6、7、8、9,其余培养条件不变,对 C2-5 发酵培养并检测其絮凝性能。不同 pH 值对菌株 C2-5 发酵培养后的絮凝效果的影响如图 6 所示。

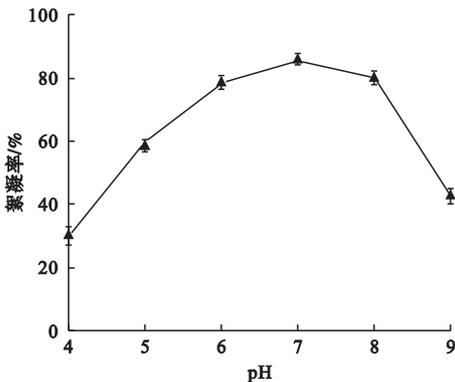


图 6 pH 值对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 6 Effect of pH value on flocculation rate of strain C2-5

由图 6 可知,菌株 C2-5 的絮凝性能随发

酵培养 pH 值的增加,呈现先增加后降低的趋势。pH 值为 7.0 时,菌株 C2-5 的絮凝率最高,达到 85.73% 。pH 值过低或过高的培养环境不利于 C2-5 对营养物质的吸收,影响其生长和 MBF 的产生,导致絮凝效果不佳。故培养基 pH 值为 7.0 时,菌株 C2-5 产 MBF 的条件最佳。

2.4.5 发酵培养时间

对菌株 C2-5 分别培养 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h,其余培养条件不变,其絮凝效果如图 7 所示。

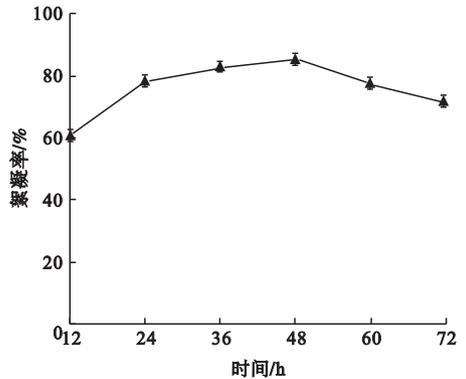


图 7 发酵培养时间对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 7 Effect of fermentation time on flocculation rate of strain C2-5

由图 7 可知,菌株 C2-5 随着发酵培养时间的增加,其絮凝性能也在提高,这可能是菌株 C2-5 充分吸收营养物质进行生长。菌株 C2-5 在 36 ~ 48 h 时间段内絮凝性能趋于稳定,在 48 h 时絮凝率达到 85.47% ,可能是 C2-5 菌体达到一定质量浓度,MBF 产量逐渐稳定。48 h 后,营养物质减少,菌株 C2-5 开始衰亡,MBF 产量开始减少,其絮凝性能开始逐渐降低^[9]。可见,合适的发酵培养时间利于菌体生长,C2-5 的最佳发酵培养时间为 48 h。

2.4.6 发酵培养温度

试验分别在温度为 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下,且保持其余培养条件不变,对菌株 C2-5 进行发酵培养。不同温度对 C2-5 絮凝能力的影响如图 8 所示。

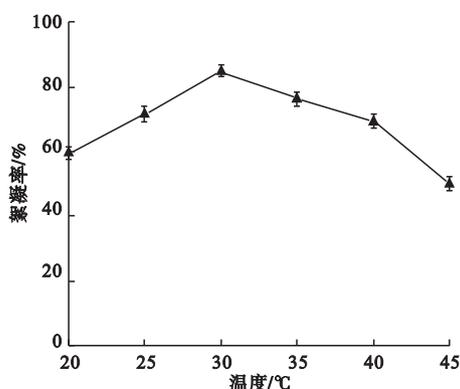


图8 发酵培养温度对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 8 Effect of fermentation temperature on flocculation rate of strain C2-5

由图8可知,在20~30℃温度内,絮凝率在不断提高,当培养温度在30℃时菌株C2-5的絮凝能力最强,絮凝率达到84.83%。说明了在一定范围内提升温度有利于C2-5的生长及其代谢物的产生,并且在最适温度下酶的活性可以达到最大。当温度高于30℃,影响了C2-5产MBF,絮凝能力持续下降^[10]。因此,30℃为菌株C2-5产絮的最佳发酵培养温度。

2.4.7 发酵培养转速

在转速分别为110 r/min、130 r/min、150 r/min、170 r/min、190 r/min条件下,且其余培养条件不变时进行试验。对C2-5絮凝能力的影响如图9所示。

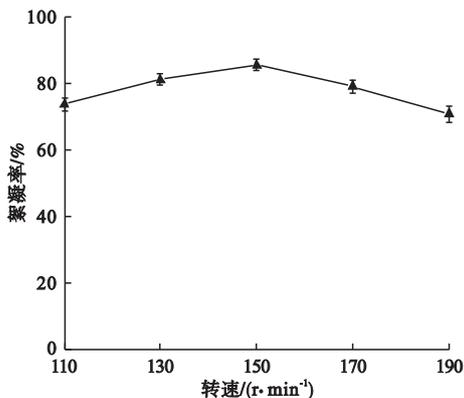


图9 发酵培养转速对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 9 Effect of fermentation speed on flocculation rate of strain C2-5

由图9可知,当发酵转速为150 r/min时,

菌株C2-5的絮凝率最佳达85.72%。这是因为转速影响了培养过程的通气量以及溶解氧含量,发酵转速低于150 r/min时,会导致溶解氧含量较低,不利于菌株C2-5的生长;发酵转速高于150 r/min时,培养基晃动剧烈,影响菌株C2-5吸取营养生长。这两种情况均会导致MBF产生量减少,以至于絮凝效果不佳^[11]。因而,150 r/min为菌株C2-5产絮的最佳发酵培养转速。

2.4.8 发酵培养接种量

试验按照2%、4%、6%、8%、10%的接种量投加种子液,其余培养条件不变,对菌株C2-5进行发酵培养。不同接种量对菌株C2-5絮凝性能的影响如图10所示。从图10可知,合适的接种量有利于微生物的生长,并且能提高絮凝率^[12-13]。接种量在2%~6%时,菌株C2-5絮凝能力不断增大,在6%时,絮凝率达到86.26%。接种量低于6%时,菌株C2-5在培养周期内不能达到适宜的菌体浓度,不利于MBF的积累;接种量高于6%时,菌株C2-5絮凝能力逐渐减弱,这可能是菌株C2-5初始浓度过高,吸收营养物质较快,影响了MBF的生成。因此,菌株C2-5产絮的最佳发酵培养接种量为6%。

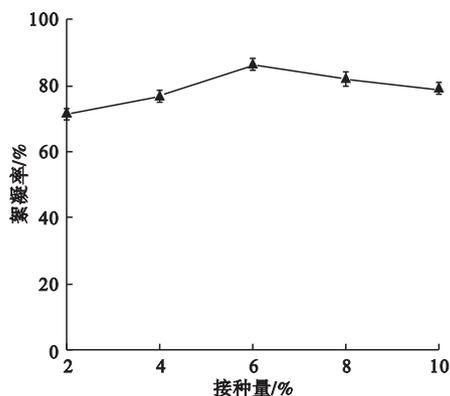


图10 接种量对菌株 C2-5 絮凝率的影响

Fig. 10 Effect of inoculation concentration on flocculation rate of strain C2-5

3 结论

(1)从校园稻田土壤和污水厂活性污泥

中筛选出 24 株微生物絮凝剂产生菌,其中 11 株有明显絮凝效果。菌株 C2 的絮凝能力最强,絮凝率为 76.23%。

(2) 选择培养 18 h 的菌株 C2 进行紫外诱变,在紫外灯下照射 100 s 时,致死率达 77.24%,为最佳诱变条件。并在该条件下筛选出一株高效产絮菌 C2-5,絮凝率可达 80.42%。

(3) 通过单因素试验可得到诱变优势菌 C2-5 的最佳培养条件:外加质量浓度为 0.5 g/L 的尿素,质量浓度为 5 g/L 的 K_2HPO_4 ,质量浓度为 2 g/L 的 KH_2PO_4 ,pH 值为 7,发酵培养时间为 48 h,发酵培养温度为 30 ℃,发酵培养转速为 150 r/min,接种量为 6%。

参考文献

- [1] 马放,段姝悦,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.
(MA Fang,DUAN Shuyue,KONG Xiangzhen,et al. Present status and development trend of studies on microbial flocculants [J]. China water & wastewater,2012,28(2):14-17.)
- [2] ZHONG C, XU A, CHEN L, et al. Production of a bioflocculant from chromotropic acid waste water and its application in steroid estrogen removal [J]. Colloids surf B: biointerfaces,2014,122:729-737.
- [3] 王爽.以预处理污泥为底物生产微生物絮凝剂的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2015.
(WANG Shuang. Research on producing bioflocculant by preprocessed sludge [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology,2015.)
- [4] 王犁烨,陈新军,卢丕超,等.紫外诱变选育高产酒精及酸的酿酒酵母[J].中国酿造,2019,38(1):104-108.
(WANG Liye, CHEN Xinjun, LU Pichao, et al. Breeding of saccharomyces cerevisiae with high-yield alcohol and acid by ultraviolet mutation [J]. China brewing,2019,38(1):104-108.)
- [5] 王博,王虹,欧阳晓芳,等.紫外诱变选育高原环境絮凝菌及其絮凝条件优化[J].环境科学研究,2018,31(9):1603-1611.
(WANG Bo, WANG Hong, OUYANG Xiaofang, et al. Mutation breeding of flocculating microorganism in plateau area by ultraviolet and its application by optimization [J]. Research of environmental sciences,2018,31(9):1603-1611.)
- [6] 熊星滢.淀粉废水培养黑曲霉产微生物絮凝

剂及应用研究[D].成都:成都理工大学,2016.

- (XIONG Xingying. Practical study on the method of producing bioflocculant by culturing Aspergillus niger from starch wastewater [D]. Chengdu: Chengdu University of Technology,2016.)
- [7] 郭俊元,张宇哲,赵净.淀粉废水生产微生物絮凝剂及发酵动力学特征[J].中国环境科学,2016,36(9):2681-2688.
(GUO Junyuan ZHANG Yuzhe, ZHAO Jing. Production and fermentation kinetics characteristics of a bioflocculant by using potato starch wastewater [J]. China environmental science, 2016, 36(9): 2681-2688.)
- [8] GUO J Y, LAU A K, ZHANG Y Z, et al. Characterization and flocculation mechanism of a bioflocculant from potato starch wastewater [J]. Applied microbiology & biotechnology, 2015,99(14):5855-5861.
- [9] 罗平,杨林玉,卫宏毅.微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养条件优化[J].工业用水与废水,2017,48(1):50-55.
(LUO Ping, YANG Linyu, WEI Hongyi. Screening of bioflocculant-producing bacteria and optimization of its cultivation conditions [J]. Industrial water & wastewater, 2017, 48(1):50-55.)
- [10] 马菲菲,贺琨,胡子全,等.生活污水絮凝微生物筛选及其培养条件的优化[J].安全与环境学报,2015,15(4):211-215.
(MA Feifei, HE Kun, HU Ziquan, et al. Screening of the compound microbial flocculants from the domestic sewage and the culture condition optimization [J]. Journal of safety and environment,2015,15(4):211-215.)
- [11] 李琳,马放,赵丹,等.微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J].中国给水排水,2015,31(11):86-88.
(LI Lin, MA Fang, ZHAO Dan, et al. Screening and Identification of bioflocculant-producing bacteria and optimization of their culture conditions [J]. China water & wastewater,2015,31(11):86-88.)
- [12] 彭翠珍,宗绪岩,徐勇,等.酿酒废水产微生物絮凝剂菌株的筛选及发酵条件优化[J].中国酿造,2017,36(9):92-97.
(PENG Cuizhen, ZONG Xuyan, XU Yong, et al. Screening of bioflocculant-producing strains from liquor production wastewater and optimization of fermentation conditions [J]. China brewing,2017,36(9):92-97.)
- [13] 樊晓梅.反硝化聚磷菌吸磷能力和生长特性研究[J].沈阳建筑大学学报(自然科学版),2017,33(1):119-126.
(FAN Xiaomei. Research on the phosphorus absorption ability and growth characteristics of denitrifying phosphorus-accumulating organisms [J]. Journal of Shenyang jianzhu university (natural science),2017,33(1):119-126.)

(责任编辑:徐玉梅 英文审校:唐玉兰)