

多粘类芽孢杆菌 GA1 产絮凝剂的培养基和分段培养工艺

杨朝晖, 陶然, 曾光明, 肖勇, 邓恩建

(湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082)

摘要: 对 1 株从土壤中筛选的产絮凝剂微生物 GA1 进行了研究. 该菌株经形态学特征、生理生化反应及 16S rDNA 序列 (GenBank 序列登陆号为 DQ166375) 相似性分析鉴定为多粘类芽孢杆菌, 并命名为 *Paenibacillus polymyxa* GA1. 对其进行了产絮凝剂培养条件和培养工艺的研究. 结果表明: GA1 产絮凝剂的最佳培养基成分 (g/L) 为蔗糖 40.0、酵母浸膏 4.0、 K_2HPO_4 5.0、 KH_2PO_4 2.0、NaCl 0.1、 $MgSO_4$ 0.2. 研究了该菌株产絮凝剂的最佳培养条件, 包括培养基的初始 pH、培养温度、摇床速度和接种量. 同时针对其产絮凝剂和菌体生长的关系, 首次将分段培养工艺应用于 GA1 产絮凝剂中, 即在培养的初期 24h 内采用菌体生长最佳培养条件, 在培养后期采用菌体产絮凝剂的最佳培养条件. 结果表明, 采用分段培养的工艺, 既可保证 GA1 絮凝剂的产量, 又能缩短培养周期.

关键词: 微生物絮凝剂; 多粘类芽孢杆菌; 培养基; 培养条件; 分段培养

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)07-1444-06

Culture Medium and Grading Culture Technics for Bioflocculant Production by *Paenibacillus polymyxa* GA1

YANG Zhao hui, TAO Ran, ZENG Guang-ming, XIAO Yong, DENG En-jian

(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A bacterial strain named GA1 which can produce bioflocculant with high flocculating activity was isolated from soil. The strain was identified as *Paenibacillus polymyxa* according to its morphological, physiological and biochemical characters, as well as 16S rDNA sequence (GenBank Accession number: DQ166375) similarity comparison. The results indicated that sucrose and yeast extract were the optimal carbon and nitrogen sources for bioflocculant production. Furthermore, the mass ratio of sucrose to yeast extract and the optimal sucrose concentration were ascertained. The optimum component proportion of medium (g/L) is sucrose 40.0, yeast extract 4.0, K_2HPO_4 5.0, KH_2PO_4 2.0, NaCl 0.1, $MgSO_4$ 0.2. The culture conditions including initial pH, temperature, agitation rate and inoculation quantity of strain GA1 were ascertained. Based on the relation of bacterium growth and bioflocculant production, grading culture was applied to bioflocculant production of GA1. The experimental result show that grading culture can keep high bioflocculant yield as well as shorten time of flocculant production.

Key words: bioflocculant; *Paenibacillus polymyxa*; culture medium; culture conditions; grading culture

微生物絮凝剂 (MBF) 是一类新型的水处理剂, 它是由产絮凝剂微生物在生长过程中分泌的天然有机高分子物质, 具有很好的除浊脱色能力, 应用范围很广. 与传统的无机絮凝剂和高分子合成絮凝剂相比, 微生物絮凝剂具有无毒易降解的优点, 不会给环境带来二次污染^[1], 因此越来越受到研究者的重视.

目前对微生物絮凝剂的研究大多停留在实验室研究阶段^[2~13], 远未达到大规模的应用和工业化生产阶段. 制约微生物絮凝剂发展的关键在于其生产成本过高和产量过低, 因此降低生产成本和提高絮凝剂产量是大规模工业化生产的关键. 本实验对 1 株产絮凝剂微生物多粘类芽孢杆菌 GA1, 从改进培养基成分和培养工艺入手, 将分段培养法运用

在其产絮凝剂的培养过程中, 既提高了絮凝剂产量, 又缩短培养周期.

1 材料与方法

1.1 试验菌种

试验所用的菌种为本实验室采用常规细菌分离方法从土壤中筛选的 1 株高效产絮凝剂微生物, 菌株编号为 GA1.

1.2 菌种鉴定

收稿日期: 2005-08-24; 修订日期: 2005-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50478053); 湖南省自然科学基金重点项目 (05JJ2004); 湖南省自然科学基金项目 (04JJ3004); 湖南大学科学基金重点项目

作者简介: 杨朝晖 (1963~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: yzh@hnu.cn

(1) 形态学鉴定 将菌株 GA1 进行革兰氏染色和芽孢染色^[14], 观察菌落形态, 并在显微镜下观察菌体形态。

(2) 生理生化鉴定 对菌株 GA1 的生理生化指标进行测定, 其结果依据《伯杰细菌分类手册》进行鉴定。

(3) 16S rDNA 序列相似性分析鉴定 将菌株 GA1 接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上培养 24h, 挑取少量菌落悬浮于 200μL 双蒸水中; 利用 DNA 提取试剂盒(天为时代 DP301-02) 提取模板。PCR 反应的正向引物为 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 反向引物为 1495R: CTACGGCTACCTTGTACGA, 反应体系组成为: DNA 模板, 1μL; dNTP 混合物, 5μL; *Taq* DNA 聚合酶, 1μL; 引物各 1μL; *Taq* DNA 聚合酶的 10× 反应缓冲液 5μL; 加无菌去离子水至终体积为 50μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃, 30s; 55℃, 45s; 72℃, 90s, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物的纯化和测序由上海博亚生物技术有限公司完成, 测序引物为 27F 和 1495R。测序结果提交 GenBank 进行 Blastn 同源性检索和相似性分析。

1.3 种子培养基及种子液培养

蛋白胨 10.0 g/L、牛肉膏 3.0 g/L、NaCl 5.0 g/L, pH7.0, 0.1MPa 灭菌 30min。于新鲜的 GA1 培养斜面上挑取少许菌落, 接种于至装有 15mL 种子培养基的 50mL 摇瓶内, 于 30℃、150 r/min 的摇床速度下培养 24h, 细菌浓度为 1.0×10^8 CFU/mL。将此培养液作为 GA1 产絮凝剂接种时的种子液。

1.4 产絮凝剂培养基^[15,16] 及培养过程

葡萄糖: 20.0 g/L、 K_2HPO_4 : 5.0 g/L、 KH_2PO_4 : 2.0 g/L、NaCl: 0.1 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$: 0.2 g/L、脲: 0.5 g/L、酵母浸膏: 0.5 g/L、 $MgSO_4$: 0.2 g/L, pH8.0, 0.07MPa 灭菌 30min。在无菌操作条件下以体积分数为 1% 的接种量接种种子液于含 150mL 培养基的 500mL 的锥形瓶中, 温度 30℃、摇床速度 150 r/min 下培养 72h。

1.5 絮凝剂的提取方法^[17]

菌株 GA1 产絮凝剂水平用絮凝剂产量来衡量。将菌株 GA1 的培养液在 6 000 r/min 下离心 30min, 收集上清液, 加入体积比为 2:1 的预冷无水丙酮(4℃), 置于 4℃ 的冰箱中静置沉淀 24h, 使产生的沉淀稳定。离心(4 000r/min) 收集沉淀, 用 4℃ 无水乙醇脱水数次, 脱水过程中将沉淀碾磨粉碎, 促进其脱水, 然后抽真空干燥沉淀至恒重, 得到絮凝剂的粗产

品, 为浅黄色粉末。该絮凝剂具有很高的絮凝活性, 当投加量为 0.1 g/L 时, 对 0.4% 的高岭土悬浮液絮凝率达到 94% 以上。

1.6 菌体生长的测定^[18]

通过细胞干重来衡量菌体的生长情况。将培养液在 6 000r/min 下离心 30min, 将沉淀用蒸馏水洗 3 次, 离心, 105℃ 下烘干至恒重。

2 结果与讨论

2.1 菌种鉴定

(1) 形态学特征 该菌株在牛肉膏蛋白胨固体琼脂培养基上菌落呈不规则状扩散, 在含有葡萄糖的琼脂培养基上菌落半透明、隆起、粘稠。该菌株细胞为杆状, 大小(0.6~0.8) μm × (2~5) μm, 革兰氏阳性, 有芽孢, 具荚膜;

(2) 生理生化鉴定 该菌株为化能异养, 好氧或兼性厌氧。能利用葡萄糖发酵产酸产气, 接触酶阳性, 水解淀粉, VP 试验呈阳性、不产生吲哚。依据《伯杰氏细菌鉴定手册》初步判定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

(3) 16S rDNA 序列相似性分析 利用通用引物 27F 和 1495R 对提取到的 GA1 菌株的 DNA 样品进行扩增, 将得到的 16S rDNA 的测序结果提交到 GenBank, 登录号为 DQ166375。Blastn 同源性检索结果表明, 该菌株的 16S rDNA 与 *Paenibacillus polymyxa* 的 16S rDNA 相似性最大, 达到 99%。综合以上结果可以认为菌株 GA1 为多粘类芽孢杆菌, 将其命名为 *Paenibacillus polymyxa* GA1(下文简称 GA1)。

2.2 碳源和氮源对 GA1 产絮凝剂的影响

在不改变 GA1 产絮凝剂培养基其它成分的情况下, 用不同的碳源和氮源分别替换产絮凝剂培养基的葡萄糖和 $(NH_4)_2SO_4$ 、脲、酵母浸膏, 得到各培养液中絮凝剂的产量和菌体生长量, 见图 1 和图 2。

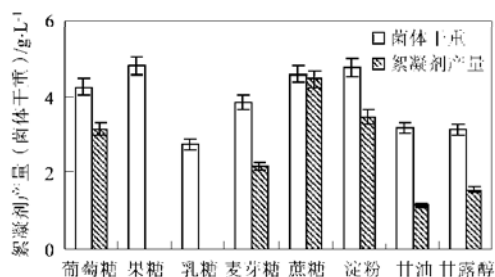


图 1 碳源对 GA1 产絮凝剂的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on biofloculant yield of GA1

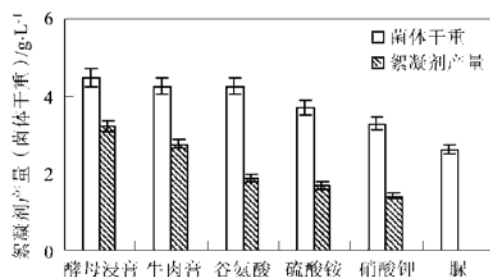


图2 氮源对GA1产絮凝剂的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on bioflocculant yield of GA1

图1和图2分别列出了部分碳源和氮源对GA1菌体生长和絮凝剂合成的影响。由图1可知,菌株GA1能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、甘油、甘露醇合成絮凝剂,其中以蔗糖效果最好,产量达到4.45 g/L;在果糖和乳糖作为碳源时,该菌生长旺盛但不合成絮凝剂。实验还发现在甲醇、乙醇、乙酸、油脂和纤维素作为碳源时,该菌生长缓慢或不生长,不合成絮凝剂。由图2可看出,该菌在有酵母浸膏、牛肉膏复杂有机氮源时,絮凝剂产量高;在硫酸铵、硝酸钾等无机氮源和谷氨酸等简单的有机氮源下,尽管菌体生长旺盛,但絮凝剂产量较低;而在脲作氮源时菌体生长缓慢且不能合成絮凝剂。

上述实验表明,该菌株产絮凝剂的最佳碳源是蔗糖,最佳氮源是酵母浸膏。而在工业化生产中,可以选用含蔗糖或淀粉的原料和成分较复杂的有机氮源作为该菌产絮凝剂的替代培养基。实验还发现,絮凝剂的合成需要一定的菌体量,但并不一定伴随菌体的生长而发生,在果糖和乳糖做碳源时,菌体能够生长但不合成絮凝剂,在用脲作氮源时也是如此。类似的情况也出现在 REA-11 絮凝剂合成过程中^[18]。因此可以判断絮凝剂的合成对于GA1菌体的生长并不是必要的,絮凝剂是作为菌体的次生代谢产物伴随着菌体的生长而合成的。

2.3 碳源和氮源的比例与浓度对GA1产絮凝剂的影响

培养基中碳源和氮源的比例是影响絮凝微生物产絮凝剂的一个重要的因素^[18,19]。用蔗糖作为碳源,酵母浸膏作为氮源,蔗糖浓度固定为20.0 g/L,按不同的碳源/氮源比(质量分数)加入酵母浸膏。实验结果如图3所示。

根据图3的结果,蔗糖/酵母浸膏的质量比在10时该菌能充分利用营养物质合成絮凝剂,使产量达到最大值;大于10或小于10絮凝剂的产量都会

有所下降,导致营养成分的浪费。按照蔗糖/酵母浸膏质量比10,取不同的蔗糖浓度培养GA1,得到GA1在不同蔗糖浓度下的絮凝剂产量,见图4。从图4中可知,当蔗糖浓度在50.0 g/L时,絮凝剂的产量最高,达到16.46 g/L。但从对营养物质的利用效率上看,蔗糖浓度在40.0 g/L时絮凝剂的产率(即平均每g蔗糖所产生的絮凝剂)最高,达到0.358 g。从经济节约的角度上考虑,采用蔗糖浓度为40.0 g/L,以达到充分利用营养物质的目的。

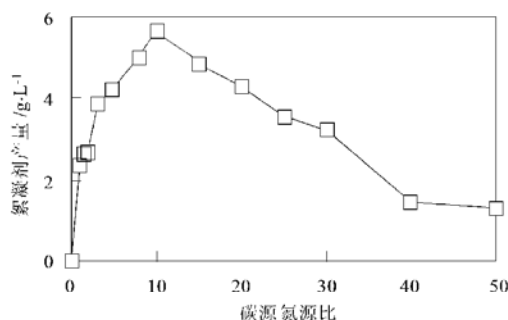


图3 碳源/氮源比对GA1产絮凝剂的影响

Fig. 3 Effect of mass ratio of carbon/nitrogen on GA1 bioflocculant production

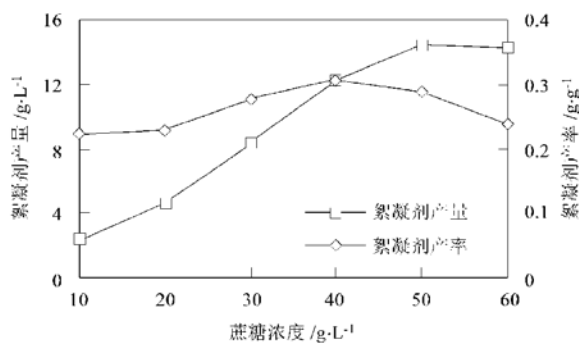


图4 蔗糖浓度对GA1产絮凝剂的影响

Fig. 4 Effect of sucrose concentration on GA1 bioflocculant production

综合上述试验可知GA1产絮凝剂的最佳培养基成分(g/L)为蔗糖40.0、酵母浸膏4.0、K₂HPO₄5.0、KH₂PO₄2.0、NaCl0.1、MgSO₄0.2。

2.4 培养条件对GA1菌体生长和产絮凝剂的影响

以最佳培养基为基础,探讨培养基初始pH值、培养温度、摇床速度、接种量对GA1产絮凝剂和菌体生长的影响,结果见图5。

结果表明,GA1产絮凝剂的培养基初始pH范围较广,pH6~9均可以合成絮凝剂,而且偏酸和偏碱比中性环境好,曲线成驼峰状,以pH6.5为最好。

而菌体生长在 pH7.0 最好, 偏酸和偏碱则不利菌体生长. 另外还发现在 GA1 的培养过程中, 培养液的 pH 值会有所下降, 说明 GA1 在生长代谢中产生

酸性物质. 将提取出的絮凝剂粗产品溶于水后, 溶液呈酸性, 说明絮凝剂的产生导致培养液 pH 值的下降.

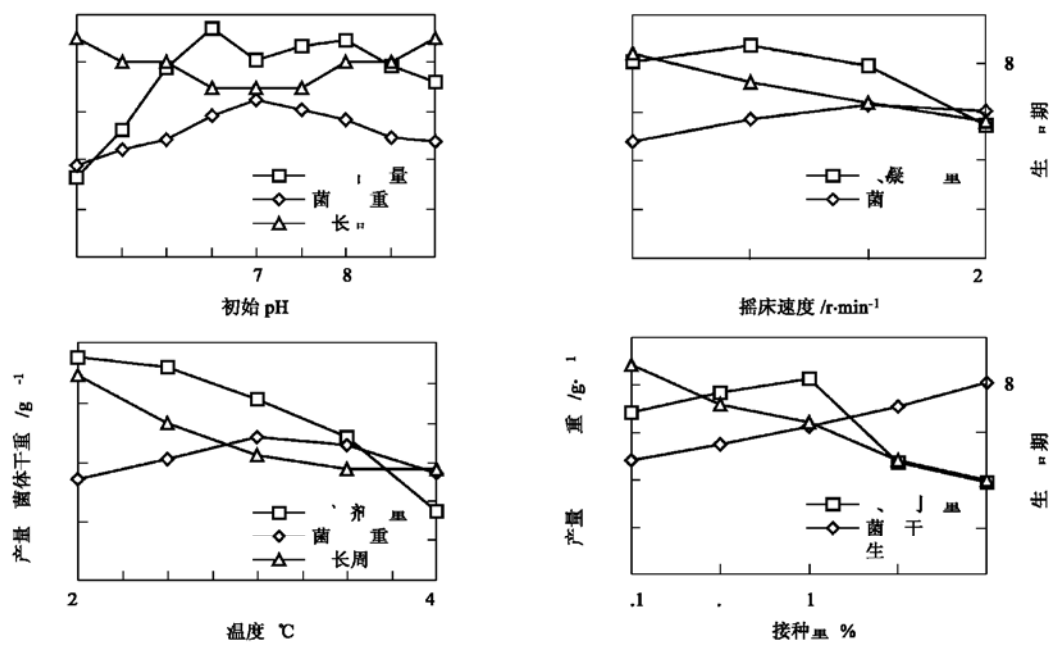


图 5 不同的培养条件对 GA1 菌体生长和产絮凝剂的影响

Fig. 5 Effect of different culture conditions on GA1 growth and biofloculant production

较低的温度 ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) 有利于 GA1 产絮凝剂, 但菌体生长缓慢, 产絮凝剂的周期 (即达到最大絮凝剂产量的时间) 较长; 而当温度较高时 ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), 菌体生长快, 菌体量较大, 营养物质用于菌体生长的消耗较大, 絮凝剂的产量则有所下降. 说明较低温度能很好的促进菌体产絮凝剂, 宜采用 25°C 的培养温度.

摇床速度对 GA1 菌体生长和产絮凝剂的影响和温度相似, 从图 5 可以看出, 较高的摇床速度能够促进菌体的生长繁殖, 而较低的摇床速度则促进菌体产絮凝剂. 当摇床速度较高时, 培养液的通气量较大, 溶解氧得到及时的补充, 菌体代谢旺盛, 有利于菌体的生长繁殖; 而当摇床速度较小时, 培养液中溶解氧水平较低, 菌体虽生长缓慢, 但有利于产絮凝剂, 絮凝剂的产量高.

接种量也是影响 GA1 产絮凝剂的一个因素. 接种量过大, 培养液中细菌的初始浓度高, 生长初期细菌生长繁殖则会消耗大量的营养底物, 导致絮凝剂产量下降; 而接种量过小, 培养液中细菌浓度低, 使得培养周期延长. 图 5 显示接种量为 1% 时最好, 即使培养液中菌体细胞的初始浓度保持在 1.0×10^6 CFU/mL 左右.

2.5 分段培养工艺

综合上述的这些因素对 GA1 菌体生长和产絮凝剂的影响, 多粘类芽孢杆菌 GA1 产絮凝剂的最佳条件与菌体生长的最佳条件并不一致. 因此, 在利用 GA1 生产絮凝剂时应选用最佳的产絮凝剂的碳源和氮源, 以及产絮凝剂最合适的培养条件. 但是在最佳产絮凝剂的培养条件下, 菌体生长代谢缓慢, 产絮凝剂的周期较长. 结合 GA1 最佳的菌体生长条件和最佳的产絮凝剂条件, 将整个培养过程分为 2 段, 即在培养的初期的 24h 内采用菌体最佳的生长条件 (培养温度为 30°C , 摇床速度为 150 r/min), 在培养的后期 32h 采用菌体最佳产絮凝剂的培养条件 (培养温度为 25°C , 摇床速度为 100 r/min), 最大限度地利用营养物质合成絮凝剂. 图 6 是在不同的培养方式下, GA1 产絮凝剂和菌体生长的关系图.

从图 6 可以看出, 在温度为 30°C , 摇床速度为 150 r/min 下, 菌体生长快, 细菌浓度高, 絮凝剂产量达到最大的时间短, 但由于菌体生长消耗大量的营养物质导致絮凝剂产量低; 在温度为 25°C , 摇床速度为 100 r/min 下, 絮凝剂的产量高, 但产絮凝剂周期长, 其原因在于菌体在低温和低溶解氧水平下生长代谢慢, 培养液中细菌浓度低, 细菌生长周期长; 而采用分段培养法能够提高培养液中的细菌浓度,

在缩短产絮凝剂周期的同时又能保证絮凝剂的产量在一个较高的水平. 采用分段培养法, GA1 絮凝剂

的产量可以高达 17.42 g/L, 同时又能产絮凝剂周期缩短到 56h.

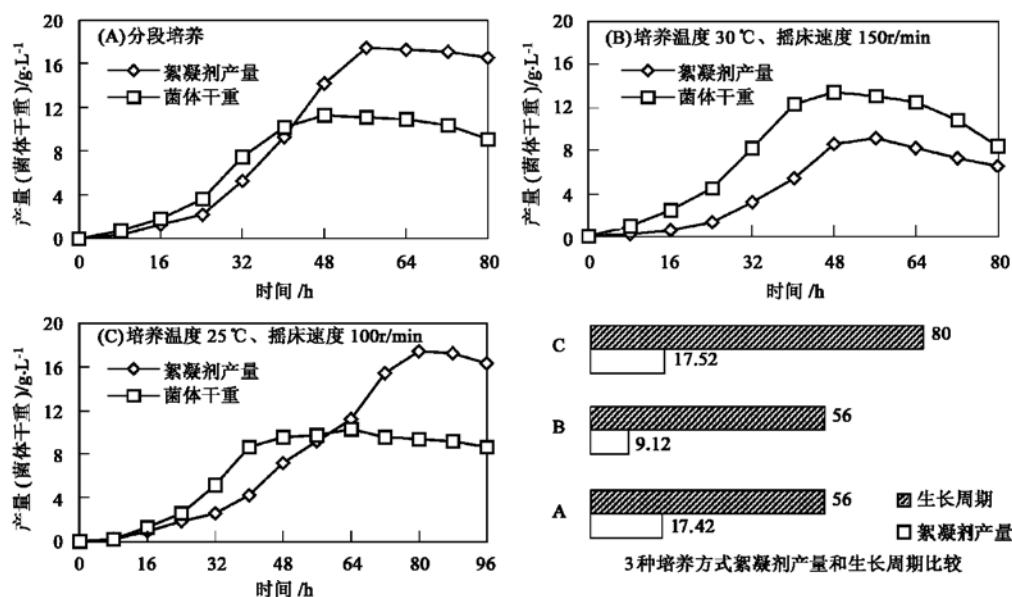


图 6 不同的培养方式下 GA1 菌体生长和产絮凝剂曲线

Fig. 6 The course of GA1 growth and biofloculant production on different culture technics

因此, 运用分段培养法能够很好的解决菌株 GA1 的菌体生长和产絮凝剂之间的矛盾, 能够保证培养液在合适的菌细胞浓度范围内最大限度的利用原料合成次生代谢物质微生物絮凝剂, 从而使产量保持在较高的水平, 同时又能缩短培养周期. 该培养方法能够为其它微生物发酵生产次生代谢物质提供借鉴作用.

3 结论

(1) 多粘类芽孢杆菌 GA1 产絮凝剂以蔗糖作为碳源, 酵母浸膏作为氮源时最好.

其最佳的培养基成分(g/L) 为: 蔗糖 40.0、酵母浸膏 4.0、 K_2HPO_4 5.0、 KH_2PO_4 2.0、NaCl 0.1、 $MgSO_4$ 0.2.

(2) 该菌株产絮凝剂的培养基初始 pH 范围较广, 以 pH6.5 左右为最好; 接种量为使培养液中菌体细胞的初始浓度保持在在 1.0×10^6 CFU/mL 左右为宜; 产絮凝剂的最适温度在 25℃ 左右, 摇床速度约为 100 r/min. 菌体生长的最适温度在 30℃ 左右, 摇床速度约为 150 r/min.

(3) 采用分段培养法的工艺, 将整个培养过程分为 2 段, 即在培养的初期 24h, 培养温度为 30℃, 摇床速度为 150 r/min, 培养后期 32h 的温度为 25℃, 摇床速度为 100 r/min. 采用分段培养法能最大限度

的利用菌体来合成絮凝剂, 保证絮凝剂的产量 (17.42 g/L), 同时又能将生长周期缩短到 56h.

参考文献:

- [1] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants recent trends and biotechnological importance[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(5): 371~ 385.
- [2] Kumar C G, Joo H S, Choi J W, et al. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. F-450[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(7): 673~ 681.
- [3] Sheng G P, Yu H Q, Yu Z. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(1): 125~ 130.
- [4] Salehizadeh H, Vossoughi M, Alemzadeh I. Some investigations on biofloculant producing bacteria [J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 5(1): 39~ 44.
- [5] 刘紫鹃, 徐桂云, 刘志培, 等. 絮凝剂 BP25 的化学组成及结构研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(3): 348~ 352.
- [6] 秦培勇, 张通, 陈翠仙. 微生物絮凝剂 MBFTRJ21 的絮凝机理[J]. 环境科学, 2004, 25(3): 69~ 72.
- [7] 刘紫鹃, 刘志培, 杨惠. 巨大芽孢杆菌 A25 产生物絮凝剂的研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(Suppl): 47~ 52.
- [8] Li Y, He N, Guan H, et al. A novel polygalacturonic acid biofloculant REA-11 produced by *Corynebacterium glutamicum*: a proposed biosynthetic pathway and experimental confirmation[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 63(2): 200~ 206.

- [9] Zhang J, Liu Z, Wang S, *et al.* Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU-2 [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59**(4): 517~ 522.
- [10] He N, Li Y, Chen J, *et al.* Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2002, **11** (3): 137~ 148.
- [11] 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.
- [12] Kumar C G, Joo H S, Kavali R, *et al.* Characterization of an extracellular biopolymer flocculant from a haloalkalophilic *Bacillus* isolate [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, **20** (8): 837~ 843.
- [13] 朱艳彬, 杨基先, 马放, 等. 复合型生物絮凝剂产生菌筛选及絮凝机理研究 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2004, **36**(6): 759 ~ 692.
- [14] 沈萍, 李秀荣, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001. 69~ 77.
- [15] 程金平, 郑敏, 张兰英. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及产絮凝剂的周期研究 [J]. *环境科学与技术*, 2001, **94**(2): 12~ 15.
- [16] 王镇, 王孔星, 谢裕敏, 等. 几株絮凝剂产生菌的特性研究 [J]. *微生物学报*, 1995, **35**(2): 121~ 129.
- [17] Shih I L, Van Y T, Yeh L C, *et al.* Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus Licheniformis* and its flocculation properties [J]. *Bioresource Technology*, 2001, **78** (3): 267~ 272.
- [18] He N, Li Y, Chen J. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Bioresource Technology*, 2004, **94**(1): 99~ 105.
- [19] Jang J H, Ike M, Shin M K, *et al.* Production of a novel bioflocculant by fed-batch culture of *Citrobacter* sp. [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**(8): 593~ 597.