

海藻酸钠固定化絮凝菌的絮凝性研究

何艳洁, 张志众, 李泓升, 山楠

(唐山学院 新材料与化学工程学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 研究通过多重筛选, 从植物根系土壤中筛得一株絮凝效果较好的菌种。该絮凝菌为一种杆状、革兰氏阳性菌, 对高岭土悬浊液的絮凝率为 39.35%。对该絮凝菌进行海藻酸钠固定化处理, 对比分析海藻酸钠固定化前后絮凝菌的絮凝效果, 以探究适宜的固定化条件。结果表明: 海藻酸钠浓度为 3%, 絮凝菌湿菌体与浓度为 3% 的海藻酸钠的体积比为 1:1, CaCl_2 浓度为 4% 时达到最优固定化条件, 此时该固定化絮凝菌的絮凝率可达 75.78%。

关键词: 海藻酸钠; 固定化; 微生物絮凝剂; 絮凝菌; 絮凝率

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-349X(2023)06-0048-05

DOI: 10.16160/j.cnki.tsxyxb.2023.06.010

Study on Flocculation of Flocculating Bacteria Immobilized by Sodium Alginate

HE Yan-jie, ZHANG Zhi-zhong, LI Hong-sheng, SHAN Nan

(School of New Materials and Chemical Engineering, Tangshan University, Tangshan 063000, China)

Abstract: In this study, a strain of bacteria with better flocculation effect was screened from the rhizosphere soil of plants by multiple screening, which were rod-shaped and gram-positive, with the flocculation rate in kaolin suspension being 39.35%. Through the immobilization of the flocculating bacteria with sodium alginate, their flocculation effect before and after the immobilization was compared and analyzed, so as to explore the suitable immobilization conditions. The results showed that, with the concentration of sodium alginate being 3%, the volume ratio of wet bacteria to 3% sodium alginate being 1:1, and the concentration of CaCl_2 being 4%, the flocculation rate of the immobilized flocculating bacteria could reach 75.78%.

Key Words: sodium alginate; immobilized; microbial flocculant; flocculating bacteria; flocculation rate

基金项目: 唐山市科技计划项目(22130207H); 唐山学院横向科研项目(TSXY-KJC-2022117); 唐山学院博创基金(1401903)

作者简介: 何艳洁(1984—), 女, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 研究方向为水处理生物学及环境工程微生物学;

张志众(1979—), 男, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 研究方向为物理性污染控制及环境工程水处理工艺。

0 引言

絮凝沉降法是污水处理过程中常用的处理工艺,其应用范围广,在处理城镇生活污水、工业废水过程中发挥着重要的作用^[1]。污水在进行絮凝沉降的过程中要投加一定量的絮凝剂。根据性质不同,可将絮凝剂分为无机絮凝剂、有机合成絮凝剂和微生物絮凝剂三大类。随着科学技术的进步,微生物絮凝剂凭借其较高的细胞密度、较快的反应性能以及较低的污染程度等优点^[2],逐渐成为应用范围最广的环保型水处理剂。

微生物絮凝剂也称生物絮凝剂,根据其来源和物质组成的不同,分为胞外代谢产物絮凝剂、胞内提取物絮凝剂和菌体絮凝剂^[3],它们一般为高分子化合物。微生物絮凝剂能有效地絮凝污水中的悬浮物和有机物,使之含量明显下降,进而达到良好的处理效果,而且更加环保,不容易引起二次污染^[4-5]。絮凝菌为能产生絮凝剂或具有絮凝效果的微生物的统称,包括细菌、放线菌和真菌等,广泛分布于自然界的土壤、水体、活性污泥及水底沉积物中,人们可以通过筛菌的方式获得具有絮凝活性的菌种。而进行污水处理时,污水中大量的有机物可以为絮凝菌的生长和代谢提供所需的营养物质,促进絮凝菌的快速增殖,从而增强絮凝菌的絮凝效果^[6]。

微生物固定化技术是一种新兴高效的污水生物处理方法,它将具有特定功能的微生物固定在不同类型的载体表面或内部,使微生物具有较高的生物活性,并且在适宜的环境条件下促进它们快速、大规模地繁殖^[7]。将絮凝菌进行固定化处理,不仅可有效改善污水处理的效果,还可以显著缩短处理时间,更好地实现保护环境的目的。此外,固定化载体的存在还能够帮助微生物抵御不良环境产生的威胁,缩短固液分离的进程。目前,微生物固定化技术常用的方法有三种:吸附法、交联法和包埋法^[8]。其中,本研究所使用的包埋法具有安全、环保、可靠、耐久等优点,是当今应用最为广泛的微生物固定化技术。

微生物固定化技术所用载体的选择决定了该技术是否具有较强的应用性。本研究从活性炭、石英砂、琼脂、海藻酸钠和硅胶等常用的固定化载体中,选择无毒无害且具有较好生物相容性的海藻酸钠作为絮凝菌的固定化试剂,对从植物根系土壤中筛选的高效产絮凝剂的菌种进行海藻酸钠的固定化处理,研究在不同固定化条件下微生物絮凝剂的絮凝效果,以明确海藻酸钠固定化的最优条件。

1 药剂、设备与方法

1.1 实验药剂

本实验所用药剂见表 1。

表 1 实验所用药剂

序号	名称	型号	生产厂家
1	氯化钠	分析纯 AR	天津市光复科技发展有限公司
2	无水氯化钙	分析纯 AR	天津市永大化学试剂有限公司
3	海藻酸钠	分析纯 AR	天津市登峰化学试剂厂
4	高岭土	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司
5	磷酸二氢钾	分析纯 AR	天津市致远化学试剂有限公司
6	无水硫酸镁	分析纯 AR	天津市光复科技发展有限公司
7	酵母浸膏	分析纯 AR	天津市福晨化学试剂厂
8	葡萄糖	分析纯 AR	天津市光复科技发展有限公司
9	磷酸氢二钾	分析纯 AR	天津市光复科技发展有限公司
10	蛋白胨	分析纯 AR	天津市光复精细化工研究所
11	牛肉膏	分析纯 AR	北京奥博星生物技术有限责任公司
12	尿素	分析纯 AR	天津市光复科技发展有限公司
13	琼脂	分析纯 AR	国药集团化学试剂有限公司

1.2 仪器设备

ZDP-250 型振荡培养箱,上海精宏实验设备有限公司;CX21 型双目生物显微镜,上海顶派机械设备有限公司;722E 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;3H16RI 型台式高速冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;2013-B22/8 型压力蒸汽灭菌筒,上海东亚压力容器制造有限公司;SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司。

1.3 培养基的配置

基础培养基:牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 18.0 g,水 1 000 mL,溶液 pH 值 7.1~7.5。

发酵培养基:葡萄糖 20.0 g,磷酸氢二钾 5.0 g,磷酸二氢钾 3.0 g,氯化钠 0.3 g,尿素 0.3 g,酵母浸膏 0.6 g,无水硫酸镁 0.5 g,水 1 000 mL,溶液 pH 值 7.5~8.5。

培养基灭菌条件:采用高压蒸汽灭菌,维持压力 0.1 MPa,灭菌时间 15~20 min。

1.4 絮凝菌的筛选

选取唐山学院东院图书馆前、北院三号实验楼前为土壤采样点,分别采集两处采样点的乔木植物根系地面下 15~20 cm 处的土壤样品,去除表面的杂物,装入已灭菌的烧杯中,用锡箔纸封口后,记录采样日期,带回实验室。土壤样品尽量现用现取。称取 10 g 土壤混合样品置于无菌的 250 mL 锥形瓶中,加入适量无菌水和玻璃珠,在漩涡振荡器上充分振荡均匀^[9]。取灭菌后的试管对土壤样品进行梯度稀释。

本研究采用传统的细菌筛选方法——平板划线法^[10]获得纯菌株,以了解目标微生物的种水平和基本性状,并使用纯菌株进行后续实验研究。将已制备好的基础培养基置于超净工作台中,以由低浓度向高浓度吸取的顺序,用移液枪吸取 2.0 mL 的土壤悬浊液加入到灭菌后的基础培养基上,并用涂布棒将加入的土壤悬浊液均匀地涂布在基础培养基表面。每个浓度的土壤悬浊液各做两组平行样品,以确保后续筛选的顺利进行。涂布完成后进行编号,之后将

温度控制在 30 ℃,恒温培养 48 h。观察涂布后的基础培养基上的菌落分布,然后用灭菌后的接种环取少量菌体以划线的方式接种在基础培养基上,继续培养 48 h。将划线反复操作 3~4 次,可获得不同形态、较为黏稠、呈圆点状的单一细菌菌落。挑取上述不同形态的细菌菌落分别置于发酵培养基中进行发酵培养。

1.5 絮凝菌活性的测定

取烧杯,加入 0.4 g 高岭土、80.0 mL 蒸馏水、4.0 mL 1%浓度的 CaCl_2 溶液和 4.0 mL 细菌发酵液,混匀后加水定容至 100.0 mL,用玻璃棒慢速搅拌 5 min,静置 10~15 min。以不添加任何菌液的样品作为对照。吸取添加菌液的样品和未添加菌液的样品的上清液,用紫外可见分光光度计在 550 nm 处测定吸光度,利用吸光度来计算絮凝率,以絮凝率对絮凝效果进行表征^[7],具体见公式(1)。

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

式中, A 为不加菌液的样品静置 10~15 min 后的吸光度; B 为加入菌液的样品静置 10~15 min 后的吸光度。

1.6 絮凝菌的海藻酸钠固定化

取培养 48 h 的细菌发酵液进行离心处理,去除上清液后加入生理盐水与离心后的絮凝菌湿菌体充分混合,再次放入离心机中离心,上述步骤重复 3 次。收集离心好的絮凝菌湿菌体,将之与海藻酸钠溶液按照不同的体积比进行混合,借助移液器把混合物滴在 CaCl_2 溶液中,形成球状沉淀物^[11],用锡箔纸封口并置于超净工作台中固化交联 24 h。在上述固定化操作过程中,移液器枪头距离 CaCl_2 溶液液面的高度宜保持在 20 cm 处,以便于混合物滴落形成固定化小球。

交联 24 h 后弃去 CaCl_2 溶液,用生理盐水和蒸馏水各冲洗固定化小球两次,以去除其表面的 CaCl_2 溶液。用药匙取等量小球分别加入到发酵培养基内,并标号,置于振荡培养箱中培养 48 h,培养温度设置为 30 ℃,转速设置为 110 r/min。

为了确定最优的海藻酸钠固定化条件, 本研究将海藻酸钠溶液浓度、絮凝菌湿菌体和海藻酸钠的体积比以及 CaCl_2 溶液浓度作为优化因素, 分别设定为因素 A, 因素 B 和因素 C, 进行三因素三水平正交实验。各因素数据见表 2, 正交实验方案见表 3。

表 2 海藻酸钠固定化优化因素表

水平	因素 A	因素 B	因素 C
水平 1	2%	1 : 1	2%
水平 2	3%	1 : 2	3%
水平 3	4%	2 : 1	4%

表 3 正交实验方案表

标号	因素 A	因素 B	因素 C
1	2%	1 : 1	2%
2	2%	1 : 2	4%
3	2%	2 : 1	3%
4	3%	1 : 1	4%
5	3%	1 : 2	3%
6	3%	2 : 1	2%
7	4%	1 : 1	3%
8	4%	1 : 2	2%
9	4%	2 : 1	4%

2 结果与分析

2.1 絮凝菌的絮凝效果

经初筛和复筛, 从土壤样品中一共筛选出 51 株菌落形态不同的絮凝菌菌种, 配置高岭土悬浊液作为模拟废水进行絮凝菌对模拟废水絮凝效果的测定。经过目测观察发现, 能使高岭土悬浊液絮凝成大颗粒^[12] 的有 6 株菌种, 测得其中絮凝效果最好的菌种的絮凝率为 39.35%, 由此将此菌种作为海藻酸钠固定化研究的絮凝菌培养菌种, 并对此菌种进行斜面低温保藏。

2.2 絮凝菌的初步鉴定结果

显微镜观察发现, 筛得的絮凝菌在进行革兰氏染色后呈现紫色, 如图 1 所示, 表明该絮凝菌为革兰氏阳性菌, 细胞形态规则, 为短杆状, 生长状态良好, 未产生芽孢, 不具有鞭毛等特殊结构。该絮凝菌在基础培养基上的菌落形态为圆形凸点状(如图 2 所示), 呈乳白色, 挑起时较为黏稠。

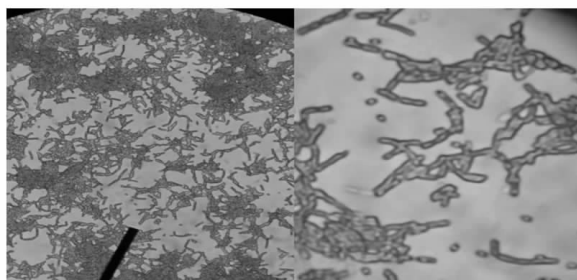


图 1 光学显微镜下的絮凝菌革兰氏染色图



图 2 絮凝菌的菌落形态

2.3 海藻酸钠固定化参数优化实验结果与分析

在进行絮凝菌的海藻酸钠固定化过程中, 发现海藻酸钠溶液浓度、絮凝菌湿菌体和海藻酸钠的体积比、 CaCl_2 溶液浓度均会对固定化微生物的絮凝效果产生影响。其中, 在海藻酸钠溶液浓度低于 2% 时, 与絮凝菌湿菌体混合而成的固定化小球比较软、机械强度差, 将其置于振荡培养箱 48 h 后, 多数固定化小球出现破裂, 而海藻酸钠溶液浓度高于 4% 时, 溶液较黏稠, 不宜滴落, 在滴入 CaCl_2 溶液中时不易成球, 呈拖尾状; 海藻酸钠体积占比高于 2/3 时, 絮凝菌分泌的絮凝剂含量少, 影响絮凝率, 而絮凝菌湿菌体体积占比高于 2/3 时, 固定化小球的营养供应不足, 导致絮凝菌活性下降; CaCl_2 溶液浓度越大, 固定化小球形成得越快, 但此溶液浓度也不宜过高, 过高反而会影响微生物的活性。

通过调整海藻酸钠溶液浓度、絮凝菌湿菌体和海藻酸钠的体积比、 CaCl_2 溶液浓度, 最后获得了机械强度较高、不易破裂、包含适量絮凝菌的海藻酸钠固定化小球, 如图 3 所示。发酵培养后测定其絮凝率, 获得正交实验结果, 具体数据见表 4。

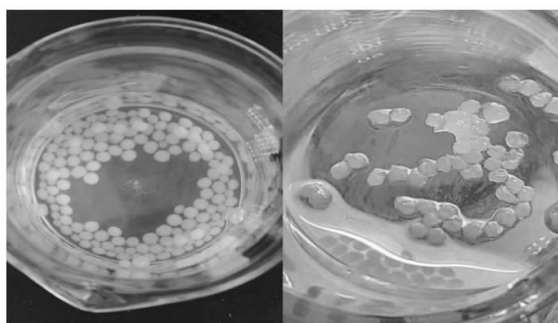


图 3 絮凝菌与海藻酸钠溶液混合后在 CaCl_2 溶液中形成的固定化小球

表 4 正交实验结果表

标号	因素 A	因素 B	因素 C	絮凝率/%
1	2%	1:1	2%	59.44
2	2%	1:2	4%	64.35
3	2%	2:1	3%	60.03
4	3%	1:1	4%	75.78
5	3%	1:2	3%	59.35
6	3%	2:1	2%	57.74
7	4%	1:1	3%	68.92
8	4%	1:2	2%	55.29
9	4%	2:1	4%	65.11
K_1	61.27%	68.05%	57.47%	
K_2	64.29%	59.66%	62.77%	
K_3	63.11%	60.96%	68.41%	
R	3.02	8.39	10.94	

根据正交实验结果进行数据分析,可知:对高效产絮凝剂菌种进行海藻酸钠固定化时,影响固定化絮凝菌絮凝率的三因素中, CaCl_2 溶液浓度的影响最大,絮凝菌湿菌体与海藻酸钠的体积比次之,海藻酸钠溶液浓度的影响最小。由测得的絮凝率可知,能够提升絮凝效果的最优海藻酸钠固定化条件为:海藻酸钠溶液浓度为 3%,絮凝菌湿菌体与浓度为 3% 的海藻酸钠体积比为 1:1, CaCl_2 溶液浓度为 4%。在上述优化条件下,固定化絮凝菌的絮凝率达到 75.78%,絮凝效果比未固定化时显著提高。

3 讨论和结论

通过对植物根系土壤进行预处理、初筛和复筛,筛得一株高效产絮凝剂的菌种,它对高岭土悬浊液的絮凝率为 39.35%。经初步鉴定,该絮凝菌为革兰氏阳性菌,细胞形状呈短杆状,发酵培养产絮凝剂过程中细胞生长状态良好,

无芽孢产生,不具有鞭毛等特殊结构。该絮凝菌菌落呈圆形凸点状,乳白色,挑起时较为黏稠。

对筛得的絮凝菌进行扩大培养,以海藻酸钠为固定化载体进行微生物的固定化处理,并选取三个海藻酸钠固定化的影响因素进行正交实验,最后确定了能够提升该絮凝菌絮凝效果的海藻酸钠固定化最优条件:在海藻酸钠溶液浓度为 3%,絮凝菌湿菌体与浓度为 3% 的海藻酸钠体积比为 1:1, CaCl_2 溶液浓度为 4% 时,固定化絮凝菌的絮凝率达到最高,为 75.78%。

本研究选取海藻酸钠作为固定化载体,探究了筛得的单一絮凝菌的固定化最优条件。在此基础上,可尝试对混合絮凝菌进行不同固定化载体的筛选,以拓展微生物絮凝剂的种类及应用范围。另外,可将固定化絮凝菌用于食品加工废水、煤炭工业废水、重金属废水、印染废水等不同工业废水的处理,以进一步明确固定化絮凝菌在工业废水处理中的应用情况。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王嵩林. 水处理过程中图像识别方法的应用与实现[D]. 北京:北京化工大学,2017.
- [3] 皮姗姗,李昂,魏薇,等. 微生物絮凝剂在水污染控制中的应用研究进展[J]. 中国给水排水,2017,33(16):27-31.
- [4] 张进武. 水处理絮凝剂研究现状与前景[J]. 山西化工,2022,42(6):28-29.
- [5] 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]. 环境保护学,2022,48(1):74-80.
- [6] 滕晓芸,胡春义,石瑶瑶. 包埋法固定化微生物技术的载体选择[J]. 工业微生物,2023,53(2):73-75.
- [7] 詹小菁. 微生物絮凝菌的固定化及混合菌种培养[D]. 上海:东华大学,2008.
- [8] 陈显玲,张鹏,农秀丽,等. 响应面法优化海藻酸钠固定菊糖蔗糖酶的研究[J]. 饲料研究,2022,45(8):73-77. (下转第 104 页)

户账号平移复制的形式进行推广。同时,加强文献史料、经典著作、孤本译本等珍稀资源的数字化转码,在保护中加强利用。此外,还应加强与相关兄弟院校、科研机关等机构的联盟数据库建设,丰富资源储备,提升使用效率,促进数字资源内容的供需匹配,实现共建共享、共通共融。

参考文献:

- [1] 习近平. 高举中国特色社会主义伟大旗帜为全面建设社会主义现代化国家而团结奋斗[N]. 人民日报, 2022-10-26(1).
- [2] 罗自文, 熊庾彤, 马娅萌. 智能媒体的概念、特征、发展阶段与未来走向: 一种媒介分析的视角[J]. 新闻与传播研究, 2021, 28(S1): 59-75.
- [3] 马克思, 恩格斯. 马克思恩格斯全集: 第3卷[M]. 北京: 人民出版社, 2002: 308.
- [4] 中共中央国务院印发《关于新时代加强和改进思想政治工作的意见》[N]. 人民日报, 2021-07-13(1).
- [5] 张烁. 坚持中国特色社会主义教育发展道路 培养德智体美劳全面发展的社会主义建设者和接班人[N]. 人民日报, 2018-09-11(1).
- [6] 张阳. 智媒时代高校思想政治教育: 现实审视与创新路向[J]. 思想理论教育, 2022, (5): 94-99.
- [7] 推动媒体融合向纵深发展 巩固全党全国人民共同思想基础[N]. 人民日报, 2019-01-26(1).
- [8] 吴复来. 思政课要讲深讲透讲活“六个坚持”[N]. 人民日报, 2022-12-07(12).
- [9] 李君亮, 栾忠恒. 符号化与生活化: 思想政治教育的表达之争[J]. 理论月刊, 2019(2): 32-38.
- [10] 李章军. 认真学习马克思主义经典著作 不断推进中国特色社会主义事业[N]. 人民日报, 2011-05-14(1).
- [11] 于祥成, 陈梦妮. 大数据时代高校精准思政的特征、现状及路径[J]. 大连理工大学学报(社会科学版), 2022, 43(5): 8-16.
- [12] 李厚锐. 智能媒体赋能高校思想政治教育创新探究[J]. 思想理论教育, 2022, 519(7): 96-101.
- [13] 张宝君. “精准供给”视域下高校思想政治理论课教学现实反思与策略[J]. 思想理论教育导刊, 2017(8): 99-102.
- [14] 教育部思想政治工作司 2023 年工作要点[EB/OL]. (2023-03-10). http://www.moe.gov.cn/s78/A12/gongzuo/yaodian/202302/t20230221_1046541.html.
- [15] 廖卢琴, 谢爱林. 圈层与连接: 思政教育网络话语传播困境与出路: 基于矩阵传播的视角[J]. 教育学术月刊, 2021, 348(7): 48-54.
- [16] 方提, 尹韵公. 习近平的“四全媒体”论探析[J]. 马克思主义研究, 2019(10): 116-121.
- [17] 徐曼, 黄祎霖. 网络思想政治教育主客体互动的展开、张力及优化[J]. 思想教育研究, 2022, 341(11): 57-63.
- [18] 邹国振. 大数据时代高校思想政治教育信息资源的开发利用[J]. 思想政治教育研究, 2019, 35(3): 139-143.

(责任编辑: 李亚平)

(上接第 52 页)

- [9] 林映津, 陈倩, 曾小妹, 等. 高效絮凝菌的分离鉴定及其絮凝条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(24): 6-10.
- [10] 荣楠, 李备, 唐昊冶, 等. 微生物菌种筛选技术方法研究进展[J]. 土壤, 2021, 53(2): 236-242.
- [11] 李胜. 海藻酸钠固定化白腐真菌对镉和诺

氟沙星复合污染废水的处理试验研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2021.

- [12] 张薇, 马沁沁, 袁向华, 等. 一株高效絮凝剂产生菌的分离鉴定与絮凝特性研究[J]. 安全与环境学报, 2015, 15(6): 286-290.

(责任编辑: 冯兆娜)