

一株煤泥水微生物絮凝剂产生菌的筛选及鉴定

栾丽杰¹, 郑小菊², 杨永涛²

(1. 济宁职业技术学院 生物与化学工程系, 山东 济宁 272037;

2. 济宁学院 生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155)

摘要: 通过稀释涂布法和常规划线法从煤矿附近的河底污泥中分离出 27 株细菌, 经过初筛和复筛得到 1 株对洗煤废水有较好絮凝效果的絮凝剂产生菌 SM005; 将该菌株用于洗煤废水的絮凝沉降试验, 测定结果表明: 其絮凝率为 81.87%; 对其进行菌落形态和生理生化鉴定, 初步鉴定该菌种为微球菌属, 无致病性, 符合环境保护的要求, 可以作为洗煤废水处理的优良原始菌株。

关键词: 煤泥水; 微生物絮凝剂; 筛选; 鉴定; 微球菌属

中图分类号: TD946.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8397(2018)05-0010-04

煤泥水中含有大量的煤泥、泥沙, 直接排放会对环境有较大的污染, 必须对其进行净化处理。在煤泥水的处理过程中, 为了提高处理效率, 需要使用絮凝剂。目前使用较多的絮凝剂主要有无机电解质凝聚剂和有机高分子絮凝剂两大类。由于这些絮凝剂或价格较贵、或会造成二次污染, 其推广使用受到了严重限制。因此, 亟需开发安全、高效、不污染环境新型絮凝剂。微生物絮凝剂是絮凝微生物在生长过程中代谢产生的一类具有絮凝活性的高分子化合物, 能够聚集、沉淀水中的悬浮颗粒、金属离子、色素及有机物, 具有絮凝效果好、可生物降解的特性, 对环境和人类无毒无害, 不会产生二次污染^[1]。由于这些微生物絮凝剂可克服无机高分子和有机高分子絮凝剂本身固有的缺陷, 很有可能在未来取代或大部分取代传统的无机高分子和合成有机高分子絮凝剂^[2]。目前微生物絮凝剂已经成为絮凝剂研究的热点^[3]。本文主要论述从洗煤废水中筛选出一个絮凝率较高的菌种, 并对其进行鉴定, 为煤泥水高效絮凝处理工程菌提供原始菌株。

1 实验部分

1.1 试验材料

1.1.1 材料

菌种由新村煤矿附近河底污泥分离得到, 煤泥水取自某选煤厂三级沉降池入料。

1.1.2 试验器材

试验所用器材见表 1。

表 1 试验器材名称及制造厂家

器材名称	制造厂家
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-75S II 上海博讯实业有限公司医疗设备厂
分析天平	上海精密科学仪器有限公司
显微镜	北京泰克仪器有限公司
离心机	TD-6 长沙英泰仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-2D 苏州华宏净化技术有限公司
生化培养箱	SPX-250B-Z 上海博讯实业有限公司医疗设备厂
空气恒温摇床	KYC-100C 上海新苗医疗器械制造有限公司
723PC 分光光度计	上海菁华科技仪器有限公司
CJJ78-1 磁力加热搅拌器	山东鄞城现代实验仪器有限公司
恒温鼓风干燥箱	上海朗轩实验设备有限公司
KDM 型调温电热套	龙口市电炉制造厂

收稿日期: 2018-03-26 DOI: 10.16200/j.cnki.11-2627/td.2018.05.003

作者简介: 栾丽杰(1978—), 女, 山东烟台人, 2007年毕业于陕西师范大学食品科学与工程专业, 工学硕士, 济宁职业技术学院讲师。

引用格式: 栾丽杰, 郑小菊, 杨永涛. 一株煤泥水微生物絮凝剂产生菌的筛选及鉴定 [J]. 煤炭加工与综合利用, 2018(5): 10-12, 15.

1.1.3 试验试剂

分离培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g, NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL。

制作絮凝剂的筛选发酵培养液:葡萄糖 20 g, K_2HPO_4 5 g, KH_2PO_4 2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g, 尿素 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, NaCl 0.1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL。

菌种鉴定试剂:结晶紫染液,路哥式碘液,95%乙醇,番红染液,美蓝,伊红,甲基红染液,吡啶试剂,过氧化氢溶液,淀粉。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的筛选

取河底污泥及河水混匀,用无菌水无菌操作稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 4种稀释度,分别涂布于分离培养基平板上,做3个平行样。37℃的生化培养箱培养48 h后,挑取单菌落,经多次划线分离纯化获得纯菌株,转接入斜面保存。

1.2.2 微生物絮凝剂的制备

将纯化后的多株菌株分别接种到装有50 mL 筛选发酵培养液的250 mL锥形瓶中,37℃、160 r/min条件下振荡培养72 h,分别取2 mL 发酵液加入到洗煤废水中,并加入5 mL 浓度1%的 $CaCl_2$ 溶液作为助凝剂,先快速搅拌1 min,再慢速搅拌5 min。选取生长速度较快、絮凝沉降速度较快的菌株进行复筛^[4]。

将初筛获得的菌株接种到装有50 mL 筛选发酵培养液的250 mL锥形瓶中,在37℃、160 r/min的振荡条件下培养72 h,测定发酵液的絮凝活性,进一步筛选出絮凝活性较高的菌株。

1.2.3 絮凝活性的测定方法

絮凝效果用絮凝率来表征^[5]。在100 mL量筒中加入80 mL混合均匀的洗煤废水,5 mL 浓度1%的 $CaCl_2$ 溶液,1 mL待测样品;用洗煤废水定容至100 mL,调节pH至7.0,倒入250 mL烧杯中,放在磁力搅拌器上快速搅拌1 min,慢速搅拌5 min,静置30 min,用吸管吸取一定深度的上清液,用723型分光光度计在550 nm处测定吸光度,同时以不加含絮凝剂的样品上清液作对照实验。絮凝率计算公式如下:

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

式中, A 为对照样品上清液在550 nm处的

吸光度; B 为样品上清液在550 nm处的吸光度。

1.2.4 菌种的鉴定方法

(1)细菌群体形态观察。细菌群体形态是指细菌菌落形态。挑取少许较纯菌落接种到固体平板培养基上,在37℃下培养18~24 h至菌落生长良好,取出后观察菌落形态、大小、隆起程度、边缘结构、表面形态、颜色、光泽度、粘稠度、透明度等^[6]。同样条件下,在试管肉汤培养基中进行液体培养18~24 h后,观察试管中的菌体生长状况,如发育程度、混浊度以及沉淀等。

(2)个体形态观察。挑取长势良好的单一菌落进行革兰氏染色,观察细菌细胞的形状和细菌细胞间的排列方式,鉴别细菌的种类。

(3)生理生化特征鉴定。对获得的菌株进行接触酶试验、葡萄糖利用、无氮培养、甲基红试验、吡啶试验、淀粉水解试验^[7,8]。参照伯杰氏菌种鉴定手册,初步确定菌株的属种^[9]。

2 结果与分析

2.1 菌种分离结果

经过稀释涂布平板法和平板划线分离法共分离出27株单菌落,将菌株编号为SM001-SM027。单菌落及划线法得到的菌落如图1和图2所示。

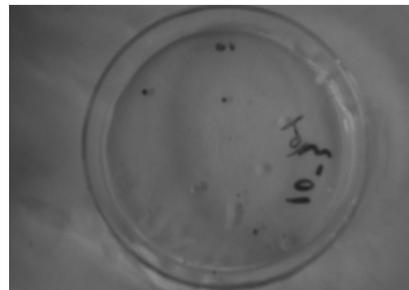


图1 稀释涂布平板法得到的单菌落

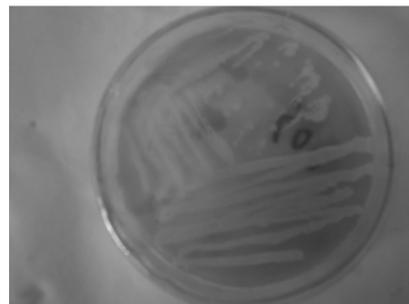
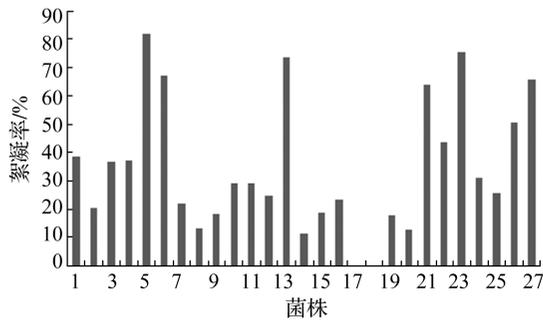


图2 平板划线法得到的单菌落

2.2 单菌株的絮凝率

单菌株的絮凝率如图3所示。



注：17和18两株的絮凝率值为负值

图3 单菌株的絮凝率

由图3可知，除SM017和SM018这两株菌种外(这两株的絮凝率值为负值)，其它菌株都有不同程度的絮凝，其中絮凝率在70%以上的有2株，最终选定絮凝率为81.87%的SM005菌株作为高产菌株进行试验。

2.3 菌种鉴定结果

2.3.1 菌落的形态特征

SM005菌株的外部形态特征为：金色，表面凸状，浑浊，有粘性，不透明，菌落小。

2.3.2 生理生化特征

菌株的生理生化特征见表2。

表2 菌种鉴定结果

实验项目	鉴定结果
革兰氏染色	G+
肉汤培养	浑浊
接触酶	+
葡萄糖利用	-
无氮培养	+
甲基红试验	-
吲哚试验	-

根据菌株的生理及生化特征，并参照伯杰氏菌种鉴定手册，初步鉴定其为微球菌属(*Micrococcus*)。

3 讨论

通过试验，本研究获得的菌株絮凝率为81.87%，比吴学风^[10]研究的酵母菌对煤泥水的絮凝率97.97%要低，但比王艳梅等^[11]对洗煤废水微生物絮凝剂产生菌的筛选研究得出的菌种絮

凝率高7.47个百分点。以该菌株为起始菌株，进行诱变筛选和絮凝条件优化，可获得絮凝率较高的工程菌，从而为获得洗煤废水高效处理菌株提供条件。

经初步鉴定，SM005菌株属于微球菌属，之前未曾有微球菌属用于洗煤废水研究的文献报道。微球菌属无致病性，符合环境保护的要求。该菌株筛选自煤泥水，对煤泥水适应性高，存活能力强，在工业中应用前景广泛。

SM017和SM018的试验结果显示了这两种菌对煤泥水没有絮凝效果，不仅如此，加入后反而阻碍了煤泥水的沉降。吴学风^[10]在大肠杆菌对煤泥水絮凝作用的研究中也出现了此种现象。由此可以看出，在以后微生物絮凝剂处理废水的工作中，不仅可以加入对絮凝有作用的菌种，还可以控制条件杀死或抑制废水中一些微生物的生长，从而提高絮凝效率。

在对煤泥水处理的研究中，罗志敏等^[12]选用的是模拟洗煤废水，吴学风^[10]选用的是现场应用的煤泥水。本研究选用的煤泥水是某选煤厂三级沉降池入料，筛选出的菌种能更好的适应该煤泥水的絮凝沉淀，其在实际工业生产中有更为广泛的应用前景。

4 结论

(1)最终筛选出SM005作为微生物絮凝剂高效产生菌进行试验，它对洗煤废水的絮凝率为81.87%。

(2)通过对筛选的SM005菌落形态观察及生理及生化特征实验，鉴定该菌株为微球菌属(*Micrococcus*)。

参考文献

- [1] 杨玉静, 赵祥瑞, 张家祥, 田延军, 刘建军. 微生物絮凝剂产生菌的筛选 [J]. 酿酒, 2010(3): 42-44.
- [2] 吴静荣, 王广军, 李志斐, 等. 一株絮凝剂产生菌的分离鉴定及其絮凝条件优化 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(1): 175-184.
- [3] 韩艳霞, 胡斌杰, 姬红. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化 [J]. 化工环保, 2010(3): 206-209.

(下转第15页)