

# 微生物絮凝剂产生菌节杆菌 LF-Tou2 的培养和絮凝条件研究

栾兴社<sup>1,2</sup> 王桂宏<sup>2</sup> 于伟正<sup>2</sup> 张长铠<sup>1</sup>

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100;  
2. 山东金佰生物技术公司, 山东 济南 250013)

**摘要:** CaCl<sub>2</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 对于节杆菌 LF-Tou2 絮凝剂的产生非常有效。节杆菌 LF-Tou2 产生絮凝剂的最适温度、最适 pH 值和最适接种量分别为 27℃、7 和每 mL 培养液 10<sup>5</sup> 个细胞。维生素 B<sub>9</sub> 和低浓度的维生素 B<sub>12</sub> 能够刺激微生物絮凝剂的产生。实验还发现, 在絮凝体系中添加 Fe<sup>3+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 能够明显地提高发酵液的絮凝率。对于发酵液展示絮凝剂活性的最合适的 pH 值为 7。在絮凝系统中把定量的助絮凝剂 CaCl<sub>2</sub> 溶液分成 2 次添加能够非常显著地提高絮凝活性。

**关键词:** 培养条件; 絮凝条件; 微生物絮凝剂; 节杆菌 LF-Tou2

中图分类号: X703; Q935

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)06-0043-03

## Culture and flocculating conditions for *Arthrobacter* sp. LF-Tou2 capable to produce microbial flocculant

LUAN Xing-she<sup>1,2</sup>, WANG Gui-hong<sup>2</sup>, YU Wei-zheng<sup>2</sup>, ZHANG Chang-kai<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China;  
2. Shandong Jinbai Biotechnology Company, Jinan 250013, China)

**Abstract:** CaCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub> were very effective for the flocculant formation by *Arthrobacter* sp. LF-Tou2. The optimal cultural temperature, initial pH value and proportion of inoculation was 27℃, 7 and 10<sup>5</sup> cells/mL, respectively. Vitamin B<sub>9</sub> and low concentration of vitamin B<sub>12</sub> could stimulate the production of flocculant. Addition of Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions could obviously increase the flocculating rate. The favorable pH value for the display of flocculant activity was 7. The flocculant activity could be raised significantly by adding the total amounts of CaCl<sub>2</sub> solution into the flocculating system in twice.

**Key words:** culture conditions; flocculating conditions; microbial flocculant; *Arthrobacter* sp. LF-Tou2

近年来水污染问题已引起高度重视, 我国污水排放量已达 416 亿 t/a。絮凝处理是水质净化的主要方法, 常用的化学絮凝剂有以铝系和铁系为代表的无机高分子和以聚丙烯酰胺为代表的有机高分子类。但最近研究表明在饮用含有铝离子水的人群中, 老年性痴呆症的患病比例较高, 人们对铝系混凝剂的安全性提出了质疑; 而有机丙烯酰胺单体则具有强烈的神经毒素作用和致癌作用<sup>[1]</sup>。微生物絮凝剂是由微生物产生的具有絮凝功能的生物大分子物质, 安全、无毒、具有生物可降解性, 使用无二次污染。最近研究者发现了一些能产生微生物絮凝剂的新菌种<sup>[2-6]</sup>, 笔者则首次发现了能产生高效微生物絮凝剂的另一新菌株节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) LF-Tou2, 并对分离到的节杆菌 LF-Tou2 产生絮凝剂的培养条件及絮凝剂的絮凝条件进行了研究。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

节杆菌 LF-Tou2, 由本实验室分离。培养基含有下列成分: 葡萄糖, 25 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; 蒸馏水 1 000 mL, 并调 pH 值为 7.2; 制备固体培养基时加入 15 g 琼脂。

菌种保存于琼脂斜面上。液体摇瓶接种用菌种需提前 18~22 h 用新鲜斜面进行活化。液体培养是在 250 mL 三角瓶中分装 50 mL 液体培养基, 灭菌后每瓶接入 0.2 mL 新鲜的斜面细胞悬液 (4 × 10<sup>7</sup> 个细胞/mL), 在 30℃、170 r/min 条件下摇瓶培养 2 天。

### 1.2 测定

细胞生长是通过测定 660 nm 下的光密度值

收稿日期: 2004-02-02

作者简介: 栾兴社 (1956-), 男, 博士生, 研究员; 张长铠 (1942-), 男, 大学, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为微生物多糖代谢, 通讯联系人, 0531-8378665, ckzhang@life.sdu.edu.cn。

(OD<sub>660</sub>)进行表示。

絮凝活性的测定是在 Kurane<sup>[7]</sup>报道的方法的基础上进行了某些调整:在 100 mL 刻度量筒中,加入 98 mL pH 值 7.5、0.4% 的高岭土悬液,2 mL 5% 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液和 0.3 mL 发酵液,室温条件下把量筒颠倒或往复缓慢混合 30 s,然后保持静止 5 min。用吸管在 50 mL 刻度处吸取 5 mL 上相液进行 550 nm 的光密度测定(OD<sub>550</sub>)。絮凝活性以絮凝率的形式表达,并通过絮凝率 = [(对照 DO - 样品 OD)/对照 OD] 进行计算。

### 1.3 添加 CaCl<sub>2</sub> 的方式对絮凝效果的试验

在进行絮凝率测定时,设计了在容有 98 mL 高岭土悬液的量筒中以 3 种方式加入助絮剂 CaCl<sub>2</sub>,以发现 CaCl<sub>2</sub> 加入絮凝体系的方式和顺序对絮凝效果的影响:①2 mL 5% CaCl<sub>2</sub> 溶液与发酵液一起加入量筒;②1 mL 5% CaCl<sub>2</sub> 溶液与发酵液一起加入、混合后再加入另外 1 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液,再混合;③加入发酵液,混合后再加入 1 mL CaCl<sub>2</sub> 溶液,再混合。以下的步骤按絮凝率的测定方法进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养条件对菌体生长及絮凝剂产生的影响

#### 2.1.1 不同无机盐的影响

微生物絮凝剂的形成与菌株的遗传性能和培养条件密切相关<sup>[8-9]</sup>,温度、无机盐、接种量、维生素和 pH 值都明显地影响着细胞生长、絮凝剂的产生及絮凝活性的展示。

表 1 不同无机盐对细胞生长及絮凝剂活性的影响

无机盐	细胞生长(OD <sub>660</sub> )	絮凝率/%
CaCl <sub>2</sub>	1.10	95.37
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1.07	92.51
CrCl <sub>2</sub>	1.10	79.29
AlCl <sub>3</sub>	1.12	95.36
ZnCl <sub>2</sub>	0.55	72.63
FeCl <sub>3</sub>	1.28	77.21
CoCl <sub>3</sub>	0.80	42.42
对照	0.81	90.48

在试验中用 7 种浓度为 4 mmol/L 的无机盐,分别加入液体培养基中进行絮凝活性产生的培养试验。由表 1 的试验数据可以看出,在试验的无机盐中,CaCl<sub>2</sub> 和 ZnCl<sub>2</sub> 对于培养过程中絮凝活性的产生非常有效。而絮凝活性的形成和细胞生物量则没有完全的平行关系。虽然 FeCl<sub>3</sub> 能够刺激细胞的生

长,但是却降低了絮凝活性的形成。CoCl<sub>2</sub> 的添加严重地抑制了絮凝剂形成。至于 AlCl<sub>3</sub>,它在菌种发酵过程中既降低了细胞生长又影响了絮凝活性的产生。

#### 2.1.2 培养温度的影响

设定不同的培养温度,测定其对应发酵液的絮凝活性,以发现最合适的培养温度条件。节杆菌 LF-Tou2 产生微生物絮凝剂最适温度为 27℃。通过试验又一次发现,在不同实验温度下,絮凝剂的活性与细胞生长之间不存在平行关系,即絮凝活性并不随着细胞生物量增加而增加。细胞生物量在 27℃ 最低,但絮凝活性却最高,温度对细胞生长及絮凝活性的影响数据列于表 2。

表 2 培养温度的影响

温度/℃	细胞生长(OD <sub>660</sub> )	絮凝率/%
24	0.85	88.36
27	0.70	92.98
30	0.73	89.19
33	0.79	88.76
36	0.83	87.00

#### 2.1.3 维生素 B<sub>9</sub> 和 B<sub>12</sub> 的影响

该试验的目的是观察维生素 B<sub>9</sub> 和 B<sub>12</sub> 对细胞生长和絮凝剂形成的关系。如表 3 所示,维生素 B<sub>9</sub> 能够促进细胞生长并显著地提高絮凝剂的形成。当加入维生素 B<sub>9</sub> 40 mg/L 时,絮凝活性提高 5.4%。

表 3 维生素 B<sub>9</sub> 和 B<sub>12</sub> 对细胞生长与絮凝活性形成的影响

质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞生长(OD <sub>660</sub> )	絮凝率/%
维生素 B <sub>9</sub>	20	0.82
	30	0.83
	40	0.93
	50	1.10
	94.85	94.85
维生素 B <sub>12</sub>	6	1.20
	9	1.19
	12	1.18
	15	1.17
对照	0.78	90.26

维生素 B<sub>12</sub> 能够大大地刺激细胞生物量的积累,在低于 6 mg/L 时能够促进絮凝剂的形成,但当培养液中加入较高浓度的维生素 B<sub>12</sub> 则对絮凝剂的形成出现抑制现象。维生素 B<sub>9</sub> 在节杆菌 LF-Tou2 絮凝剂形成中起着比较重要的作用,其最适质量浓度为 40 mg/L。

#### 2.1.4 起始培养 pH 值的影响

表 4 中的数据指出,细胞生长和絮凝剂的产生

受起始 pH 值的影响。中性 pH 值能够非常明显地促进絮凝剂的形成。一方面在酸性起始 pH 值,细胞生长和絮凝活性都低于中性 pH 值。另一方面,碱性起始 pH 值刺激细胞生长,却降低絮凝活性。正如表中数据所表明的一样,发酵液的最初培养 pH 值与起始 pH 值有平行关系,也就是说最终 pH 值随着起始 pH 值的降低而降低,但在酸性起始 pH 值下最终 pH 值降低的程度要比在碱性起始 pH 值下小得多。

表 4 起始培养 pH 值的影响

起始培养 pH 值	5	6	7	8	9
最终 pH 值	3.48	3.67	3.72	4.09	5.05
细胞生长 (OD <sub>660</sub> )	0.22	0.74	0.85	1.20	1.20
絮凝率/%	28.41	89.32	97.66	76.59	72.73

### 2.1.5 接种量的影响

液体培养接种量也曾被极大关注过<sup>[10-11]</sup>。表 5 可看出,接种量对絮凝活性的生成影响很大,但对细胞生物量的影响却很轻微。当每毫升培养液的接种量为  $1 \times 10^5$  个细胞时,形成的絮凝剂达到最大。可是如果继续增加接种量,絮凝活性反而降低。

表 5 不同接种量的影响

细胞个数/mL	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
生长 (OD <sub>660</sub> )	0.94	0.92	0.92	0.97
絮凝率/%	91.70	97.85	93.60	88.27

## 2.2 絮凝条件对发酵液絮凝活性展示的影响

### 2.2.1 阳离子对絮凝活性的展示影响

表 6 阳离子对絮凝活性展示的影响

浓度/ mmol·L <sup>-1</sup>	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	6.0	8.0	10.0
KCl	90.72		91.75			91.34	90.72		22.8
NaCl	91.75		92.18			93.81	92.16		
CaCl <sub>2</sub>			91.13			92.37	92.78	97.94	97.31
CuCl <sub>2</sub>	93.81	92.16	91.34			86.86	85.57		
BaCl <sub>2</sub>			88.66			89.69	90.10	90.51	91.75
MnCl <sub>2</sub>		93.81	93.86			98.35	98.35		
FeCl <sub>3</sub>	93.20	95.46	98.35	92.16	66.60				
AlCl <sub>3</sub>	96.29	89.28	55.67	0.11					

从表 6 可以看出,在絮凝系统中添加不同的阳离子能够影响絮凝活性。絮凝效果由于添加 Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>3+</sup> 而提高。从较高絮凝效果和低离子添加浓度的角度考虑,Fe<sup>3+</sup> 是产生絮凝效果最有利的阳离子。对絮凝活性具有促进作用的顺序依次为:

Fe<sup>3+</sup> > Mn<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup>。K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Ba<sup>2+</sup> 都对絮凝活性的展示有抑制作用。至于 Al<sup>3+</sup> 在低浓度下能够轻微提高絮凝活性,但随着添加量的增加絮凝活性反而降低。

### 2.2.2 pH 值环境对絮凝活性展示的影响

这一试验的目的是为了观察在絮凝系统中 pH 值环境对絮凝活性的直接影响。从表 7 可以看出,碱性 pH 值环境有利于絮凝活性的展示。虽然实验所用的发酵液完全一样,但 pH 值环境不同所展示的絮凝活性亦不同,随着环境 pH 值由 5 升到 10 絮凝活性逐渐增加。

表 7 pH 值环境对絮凝活性展示的影响

pH 值	5	6	7	8	9	10
絮凝率/%	88.6	90.1	91.26	92.16	92.75	93.8

### 2.2.3 助絮凝剂 CaCl<sub>2</sub> 的不同的添加方式对絮凝活性展示的影响

表 8 CaCl<sub>2</sub> 的不同添加方式对絮凝活性展示的影响

pH 值	方式 1	方式 2		方式 3
		1 mL	1 mL	
5	89.69	88.66	95.67	92.57
6	92.58	91.13	96.90	93.20
7	92.78	91.72	98.35	96.26

Ca<sup>2+</sup> 能够提高絮凝效果已被许多研究者<sup>[12-14]</sup> 及上述实验所证实。实验发现在固定量 CaCl<sub>2</sub> 溶液的条件下,不同的添加方式会影响并产生不同的絮凝效果。这种由于 CaCl<sub>2</sub> 的不同添加方式和顺序对絮凝效果的影响也和环境 pH 值相关联,即中性 pH 值絮凝活性最高,酸性 pH 值不利于絮凝活性的展示或发挥。由表 8 可以看出,按 1.3 中方式 1 添加的最后絮凝活性提高 6% (pH 值为 7 的条件下),尽管 CaCl<sub>2</sub> 总加量一样。把方式 3 与方式 2 作比较,可以发现另一絮凝现象,这就是由方式 3 添加 CaCl<sub>2</sub> 产生的絮凝活性要比方式 2 法中的第 1 次加入产生的高 5.7% (pH 值为 7 条件下),也就是说 CaCl<sub>2</sub> 的不同添加顺序也使絮凝剂产生不同的絮凝效果。

## 3 结语

发现了能产生高效微生物絮凝剂的新菌株节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) LF-Tou2, 并对其产生絮凝剂的培养条件及絮凝剂的絮凝条件进行了研究, 研究显示温度、无机盐、接种量、维生素、pH 值以及助絮凝剂

(下转第 50 页)

点腐蚀提供了极其有利的温度条件。随着点蚀孔的不断扩大,在应力作用下撕裂形成裂纹,此时,烟气不断携带催化剂粉尘从裂口喷出,膨胀节壁温提高,裂纹扩展速度加快,膨胀节很快失效。

### 3.3 介质环境

检测结果发现,膨胀节内表面特别是裂纹处富集大量的 S 元素,高温下反应生成  $H_2S$ ,膨胀节在  $H_2S$  和 O 的腐蚀下生成  $FeS$ ,进而产生  $SO_2$ 、 $SO_3$  及连多硫酸( $H_2S_xO_6$ )。

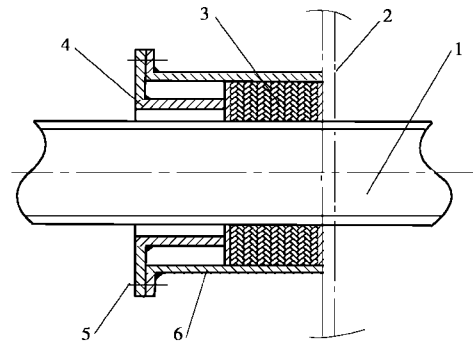
连多硫酸一般在露点温度以下或者设备停工期间产生,开停车时应力波动剧烈,故连多硫酸引起的应力腐蚀开裂(SCC)一般发生在开停工期间。国内外一些学者对此进行了失效分析<sup>[3-5]</sup>,并研究了不锈钢在连多硫酸溶液中的电化学行为<sup>[6]</sup>,认为连多硫酸容易引起敏化的奥氏体不锈钢(主要是 304 和 316)应力腐蚀开裂,连多硫酸对 Cr-Ni 奥氏体不锈钢的腐蚀与不锈钢的敏化有很大关系,一般情况下,不锈钢中 Cr 质量分数达到 11.7%,就能减缓腐蚀,如果 Cr 质量分数增加,热处理后获得单一的金相组织,基本会阻止电化学腐蚀。由于膨胀节在操作时有造成晶间贫铬的温度条件,因此,此敏化了的膨胀节在连多硫酸作用下产生了应力腐蚀开裂。

## 4 改造方案

通过检测与分析可知,膨胀节的失效是在露点腐蚀条件下,由于硫化物引起的应力腐蚀开裂。

针对大连石化分公司膨胀节的实际情况,在既不破坏烟气管线,确保烟气管线的变形不受约束,又能防止烟气外漏的前提下,采用图 3 所示的改造

方案。



1—烟气管线;2—炉墙;3—填料;4—填料压盖;  
5—螺栓螺母紧固件;6—填料箱

图 3 改造方案结构图

该方案的总体思路是:首先将套在烟气管线外侧与炉墙相连接的膨胀节去除,然后将填料箱同心套在烟气管线上并按图示与炉墙焊接,填料箱填上适量的耐高温填料,用压盖通过螺栓螺帽将填料压紧,在提供足够的密封力防止炉内烟气泄露的同时,能够使烟气管线在冷热变形时窜动,减小温差应力。

试验证明,该方案由于省去了膨胀节,能够长期工作,减小了膨胀节因寿命短造成的停车损失,同时省去了膨胀节的成本,值得推广应用。

### 参考文献

- [1] 张明乐,郭奇,陈庆.[J].化工设备设计,1999,36(3):30-31.
- [2] 刘桂金,宋洁冰.[J].光电对抗与无源干扰,2002,(4):46-48.
- [3] Ahmad S, Menta M L.[J].Corrosion,1982,38(6):346.
- [4] Heller J, Prescott G R.[J].Corrosion,1965,4(9):14-18.
- [5] 小若正伦.金属的腐蚀破坏与防腐蚀技术[M].袁宝林译.北京:化学工业出版社,1988.428-442.
- [6] Ahmad S, Menta M L.[J].Corrosion,1983,39(8):333
- [7] Kurane R, Toeda K, Takeda K, et al.[J].Agric Biol Chem,1986,50(9):2309-2313.
- [8] Takeda M, Koizumi J, Matsuoka H, et al.[J].Journal of Fermentation and Bioengineering,1992,74(6):408-409.
- [9] Wang Z, Wang K X, Xie Y M.[J].Biotechnology Techniques,1994,8(11):831-836.
- [10] Hayashi S, Matsuzaki K, Takasaki Y, et al.[J].World J Microbial, Biotechnol,1992,8:155-159.
- [11] Chen W C, Lui C H.[J].Enzyme Microb Technol,1996,18:153-160.
- [12] Toeda K, Kurane R.[J].Agric Bio Chem,1991,55(11):2793-2799.
- [13] Takeda M, Kurane R, Koizumi J I, et al.[J].Agric Biol Chem,1991,55(10):2663-2664.
- [14] Kurane R, Matsuyama H.[J].Biosci Biotech Biochem,1994,58(9):1589-1594. ■

(上接第 45 页)

的不同添加方式及顺序,都明显地影响着细胞生长、絮凝剂的产生及絮凝活性的展示。

### 参考文献

- [1] Kurane R.[J].Agric Bio Chem,1986,50(9):2301-2307.
- [2] Shimofuruya H.[J].Memoirs of Suzuka National College of Technology,1998,31:155-158.
- [3] Derumlim W, Prasertsam P.[J].Micrbial Biotechnol,1999:52,698-703.
- [4] Fujita M, Ike M.[J].J of Biosci and Bioengin,2000,89:40-46.
- [5] He Y, Li Y.[J].Biochemical Engineering J,2002,(11):137-148.
- [6] Salehizadeh H, Shojaosadati S A.[J].Biotechnology Letters,2002,24:35-40.