

明胶废水中耐钙菌株的筛选鉴定及培养条件优化

白慧慧^{1,2},任海伟^{1,2*},任雨薇¹,唐多利¹,彭轶楠²,王治业²,李志忠¹

(1.兰州理工大学 生命科学与工程学院,甘肃 兰州 730050;

2.甘肃省科学院 生物研究所 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室,甘肃 兰州 730099)

摘要:从明胶加工废水样品中筛选对Ca²⁺具有抗性的微生物菌株,结合形态特征、生理生化试验和分子生物学技术对其进行鉴定,并利用单因素试验及响应面法优化其培养条件,以期高钙污染水体的微生物修复提供菌株资源和应用技术参考。结果表明,当Ca²⁺含量达到50 mg/mL时,从四个样品中筛选出1株抗钙性能较好的菌株,命名为N3-1,经鉴定其为尼阿布芽孢杆菌(*Bacillus niabensis*)。菌株N3-1生长的最佳培养条件为:初始Ca²⁺含量1.40 mg/L、培养温度37 ℃、培养基初始pH值8.3,培养时间21 h。在此优化条件下,菌悬液OD_{600nm}值为0.768。

关键词:明胶废水;耐钙菌株;筛选鉴定;培养条件;响应面优化

中图分类号:Q939.9

文章编号:0254-5071(2021)11-0087-06

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2021.11.016

引文格式:白慧慧,任海伟,任雨薇,等.明胶废水中耐钙菌株的筛选鉴定及培养条件优化[J].中国酿造,2021,40(11):87-92.

Screening, identification and culture condition optimization of calcium resistant strain from gelatin wastewater

BAI Huihui^{1,2}, REN Haiwei^{1,2*}, REN Yuwei¹, TANG Duoli¹, PENG Yinan², WANG Zhiye², LI Zhizhong¹

(1.School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2.Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application of Gansu Province, Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730099, China)

Abstract: Ca²⁺ resistant microbial strains were screened from gelatin processing wastewater samples, and identified by morphological characteristics, physiological and biochemical experiments and molecular biology methods. Its culture conditions were optimized by single factor test and response surface method, in order to provide strain resources and application technology references for the microbial remediation of high calcium polluted water. The results showed that when the Ca²⁺ contents reached 50 mg/ml, a strain with better calcium resistance was selected from the 4 samples, numbered N3-1, and identified as *Bacillus niabensis*. The optimal culture conditions for the growth of strain N3-1 were as follows: initial Ca²⁺ content 1.40 mg/L, culture temperature 37 ℃, medium initial pH 8.3 and time 21 h. Under the optimal conditions, OD_{600nm} value of the bacterial suspension was 0.768.

Key words: gelatin wastewater; Ca²⁺ resistant strain; screening and identification; culture condition; response surface optimization

明胶是一种高分子蛋白质生物材料,因其具有良好的成膜性、侧基的高化学反应活性、生物相容性、胶凝态和溶胶态的可逆转变性以及无毒等优良特性,在感光材料、食品、医药、化妆品、造纸、防腐抗蚀、化工等行业广泛使用^[1]。明胶生产过程中耗水量高达1 500~2 000 t/t明胶^[2],废水产量庞大,若直接排放将会造成严重的水体和土壤环境污染^[3]。另一方面,因明胶生产原料多采用牛骨等动物废弃物,生产过程中又有石灰水中和等步骤,使废水中的Ca²⁺浓度相对较高^[4];较高浓度Ca²⁺对细胞有一定毒性,污泥上的钙沉淀会降低微生物的生物活性,导致污水生物处理的效率下降;而且明胶废水中Ca²⁺会与碳酸根离子结合生成碳酸钙,导致次生废物剩余污泥排放量巨大,占到污水处理量的0.4%^[5]。如何有效避免高浓度Ca²⁺引起的污水处理

困扰,是明胶加工企业面临的难题之一^[6]。若能将明胶废水中的Ca²⁺通过特定的微生物菌株进行富集吸附,则既可降低污水中Ca²⁺浓度,还可以生成高钙微生物进行深度利用。

目前MATHIVANAN K等^[7]研究发现,赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus*)作为生物吸附剂对Pb(II)的生物吸附能力和去除效率分别为43.25 mg/g和86.5%;李倩等^[8]从活性污泥中筛选得到耐镉菌株,初步鉴定为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),得到最大铅离子耐受质量浓度为350 mg/L,吸附量为205 mg/g。邹水林^[9]筛选得到一株对铜离子有强耐受能力和吸附性能的菌株*Citrobacter* sp.,该菌株对铜离子的最小抑制浓度可达400 mg/L。周防震等^[10]从富硒土壤中筛选出枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),当Na₂SeO₃溶液质量浓度20 μg/mL,加硒时间5 h,培养温度37 ℃,富硒率为58.3%。

收稿日期:2021-04-28

修回日期:2021-07-20

基金项目:甘肃省科学院青年基金项目(2018QN-09);陇原青年创新创业人才项目(2019-39-GR28);兰州理工大学红柳杰出青年人才支持计划(JQ2020)

作者简介:白慧慧(1996-),女,硕士研究生,研究方向为功能性微生物菌剂。

*通讯作者:任海伟(1983-),男,博士,教授,研究方向为可再生能源与环境工程。

曹礼等^[11]筛选出耐锌菌株HXZ-1,当锌离子质量浓度为50 mg/L、培养时间为10 h时,最大吸附量为29.1%。但是,有关耐钙菌株的分离和鉴定鲜有报道。

本研究从明胶加工废水中筛选出有一定耐钙能力的微生物菌株N3-1,利用形态学观察、生理生化试验及16S rRNA序列分析法等方法对其进行鉴定,对其生长特性进行研究,并通过单因素试验、Box-Behnken 试验设计优化菌株N3-1的培养条件,以期高钙含量的水体污染修复提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 废水样品

明胶加工废水样品:取自甘肃阿敏生物清真明胶有限公司污水处理站。

1.1.2 化学试剂

细菌基因组脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;牛肉膏、蛋白胨(均为生化试剂):北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠、氯化钙(均为分析纯):天津市凯通化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

液体培养基:蛋白胨10 g/L,牛肉膏3 g/L,氯化钠5 g/L,蒸馏水1 L,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

固体培养基:琼脂16 g/L,其余与上述液体培养基相同,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

斜面培养基:琼脂18 g/L,其余同液体培养基,121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

筛选培养基:称取氯化钙8.33 g(Ca²⁺含量为3 g/L)、27.78 g(Ca²⁺含量为10 g/L)、55.56 g(Ca²⁺含量为20 g/L)、83.33 g(Ca²⁺含量为30 g/L)、111.11 g(Ca²⁺含量为40 g/L)、138.89 g(Ca²⁺含量为50 g/L)分别溶于1 L液体的培养基中,121 °C高压蒸汽灭菌20 min,即得对应Ca²⁺浓度的筛选培养基。

筛选培养基Ca²⁺含量的计算公式如下:

$$m_c(\text{CaCl}_2) = c(\text{Ca}^{2+}) \times \frac{M(\text{CaCl}_2) \times V(\text{溶液})}{M(\text{Ca}^{2+})}$$

式中: $m_c(\text{CaCl}_2)$ 为氯化钙的质量,g; $c(\text{Ca}^{2+})$ 为所需的Ca²⁺含量,g/L; $M(\text{CaCl}_2)$ 为氯化钙的摩尔质量,111 g/mol; $M(\text{Ca}^{2+})$ 为Ca²⁺的摩尔质量,40 g/mol; V 为培养基体积,L。

1.2 仪器与设备

HVS-1300-U型超净工作台:苏州安泰空气技术有限公司;DHP-9082型电热恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司;SHZ-8Z型恒温振荡器:国华企业集团有限公司;Genesy 96T型基因扩增热循环仪:杭州郎基科学仪器有限公司;UV2600nmA紫外可见分光光度计:尤尼柯仪器有限公司;24LDJ手提式高压蒸汽灭菌器:江阴滨江医疗设备有限公司;PTC-200型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,

PCR)仪:美国BIO-RAD公司。

1.3 方法

1.3.1 废水样品处理

从明胶污水处理站的初沉池、好氧池、厌氧池和排放口4个采样点分别取废水样品5 g,然后加入事先准备的30 mL含玻璃珠的无菌水中。

菌悬液的制备:在30 °C、120 r/min条件下恒温振荡10 min。准确量取1 mL菌悬液加入到9 mL无菌水中得到10⁻¹菌悬液,采用同样方法依次稀释得到10⁻²~10⁻⁷梯度菌悬液。

1.3.2 耐钙菌株的初筛

在超净工作台中,取Ca²⁺含量为3 g/L已灭菌的液体培养基中加入0.05 mL废水样品,放入37 °C、120 r/min摇床中培养24 h,得到发酵液。用接种环将发酵液采用三区划线法接种至Ca²⁺含量为3 g/L的固体培养基中,放置于37 °C恒温培养48 h。经过反复平板划线分离纯化,将筛选出的菌株进行编号,4 °C斜面保存^[12]。

1.3.3 耐钙菌株的复筛

将初筛得到的菌株按2%的接种量依次加入Ca²⁺含量为10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L的液体培养基中,置于37 °C摇床中培养24 h,取100 μL培养液用涂布棒均匀涂布在固体培养基中,置于37 °C恒温培养箱培养48 h,观察菌落形态,挑取高Ca²⁺含量培养基中生长良好的菌落,最终筛选出耐钙能力强的菌株,接种于斜面培养基,4 °C保存^[13]。

1.3.4 耐钙菌株的鉴定

形态学观察:制备10⁻⁶菌悬液均匀涂布于固体培养基上,置于37 °C恒温培养箱培养48 h会形成单菌落,肉眼及显微镜观察菌落的形状、颜色、粘稠度以及边缘等特征^[14]。

生理生化鉴定:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[15]、《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16],通过吲哚试验、柠檬酸盐试验等方法考察菌株的生理生化特征。

分子生物学鉴定:利用试剂盒提取菌体总DNA^[17];并以该DNA为模板,以27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'为引物^[18],进行16S rRNA基因的PCR扩增。PCR扩增体系(50 μL):上下游引物各2 μL,Buffer 5 μL,脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 4 μL, Taq DNA 聚合酶0.5 μL,双蒸水35.5 μL, DNA模板1 μL。PCR扩增条件:94 °C预变性5 min;94 °C变性1 min,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,35个循环;最后94 °C延伸7 min。扩增产物送往上海生工生物工程有限公司测序。将测序的基因序列通过与美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)的GenBank数据库进行基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST) 同源性比对,使用MEGA 7.0生物学软件对近似序列进行比对分析,利用邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树^[19]。

1.3.5 耐钙菌株培养条件的优化

单因素试验:将筛选菌株接种在30 mL液体培养基中活化18 h后,分别以5% (V/V) 的接种量接入已灭菌的装液量为30 mL/250 mL液体培养基中。在37 °C、120 r/min条件下,分别研究培养时间(0、3 h、6 h、9 h、12 h、15 h、18 h、21 h、24 h、27 h、30 h、33 h、36 h、39 h、42 h、45 h),培养温度(20 °C、26 °C、32 °C、37 °C、45 °C),培养基初始pH值(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0),初始Ca²⁺含量(0、0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0 mg/L、2.5 mg/L、3.0 mg/L、4.0 mg/L、5.0 mg/L、6.0 mg/L、7.0 mg/L、8.0 mg/L)对菌悬液吸光度值(OD_{600nm}值)的影响,每个试验进行3次平行。

响应面试验:在上述单因素试验结果的基础上,以培养温度(A),培养基初始pH值(B)和初始Ca²⁺含量(C)为响应因素,以菌悬液吸光度值(OD_{600nm}值)(Y)为响应值,进行基于Box-Behnken试验设计的3因素3水平优化试验,并根据方程(1)对变量进行编码^[20]。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

式中:Y是响应值即菌悬液吸光度值(OD_{600nm}值);β₀是常数;β_i是线性系数;β_{ii}是二次系数;β_{ij}是变量之间相互作用系数,X_i和X_j是表示不同自变量。

通过方差分析(analysis of variance, ANOVA)检验回归系数统计的显著性及模型的充分性,自变量之间的相互作用及其影响利用响应面等值线图进行分析。最后多次试验验证优化设计及统计实验的有效性^[21]。

1.3.6 数据处理

利用Excel 2010 软件整理基础数据,整理后的数据通过SPSS 20.0软件进行ANOVA分析,用Origin 8.0进行数据分析作图,用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计并进行相关数据分析。

2 结果与分析

2.1 耐钙菌株的筛选

2.1.1 耐钙菌株的初筛

通过从Ca²⁺含量为3 g/L已灭菌的培养基平板中初筛获得3株菌株,依次编号为N3-1、N3-2、N3-3。

2.1.2 耐钙菌株的复筛

初筛得到的3株菌株依次通过Ca²⁺含量为10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L的培养基中复筛,菌株N3-2、N3-3在Ca²⁺含量为20 g/L的培养基中停止生长,菌株N3-1在Ca²⁺含量为40 g/L的培养基中缓慢生长,在Ca²⁺含量为50 g/L的培养基中停止生长,通过复筛获得一株耐钙菌株N3-1。

2.2 耐钙菌株的鉴定

2.2.1 菌株N3-1的形态学观察

由图1可知,菌株N3-1在37 °C固体培养基上培养48 h后形成的表面呈同心环状,边缘锯齿状,灰白色半透明的圆形菌落,菌株N3-1革兰氏染色结果显示为革兰氏阳性菌。

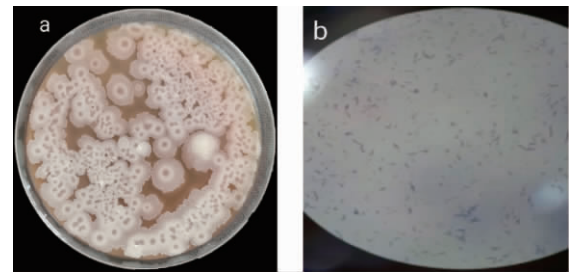


图1 菌株N3-1的菌落(a)及细胞(b)形态
Fig. 1 Colony (a) and cell (b) morphology of strain N3-1

2.2.2 菌株N3-1的生理生化特征

菌株N3-1的生理生化试验、糖发酵试验鉴定结果分别见表1和表2。由表1和表2可知,菌株N3-1可分解明胶、淀粉、葡萄糖、果糖、鼠李糖、蔗糖、阿拉伯糖、棉子糖、甘露醇等,但不能分解木糖。菌株N3-1吲哚试验、甲基红试验、V-P试验结果均为阳性,柠檬酸盐试验结果为阴性。

表1 菌株N3-1的生理生化试验结果
Table 1 Physiological and biochemical tests results of strain N3-1

指标	吲哚试验	柠檬酸盐试验	甲基红试验	V-P试验	明胶水解	淀粉水解
结果	+	-	+	+	+	+

注:“+”表示结果为阳性,“-”表示结果为阴性。下同。

表2 菌株N3-1的糖发酵试验结果
Table 2 Sugar fermentation tests results of strain N3-1

指标	葡萄糖	果糖	木糖	鼠李糖	蔗糖	阿拉伯糖	棉子糖	甘露醇
结果	+	+	-	+	+	+	+	+

2.2.3 菌株N3-1的分子生物学鉴定

将菌株N3-1的16S rDNA产物进行测序,测序结果在NCBI上进行BLAST比对,利用MEGA7.0软件中的NJ法对该菌株及与其序列相似度较高的菌株构建系统发育树,结果见图2。由图2可知,菌株N3-1与NCBI GenBank数据库中的*Bacillus niabensis*(登录号AY998119) 同源性最高^[22],相似度为100%。结合形态学特征、生理生化试验及16S rRNA分子生物学分析,菌株N3-1被鉴定为尼阿布芽孢杆菌(*Bacillus niabensis*)。

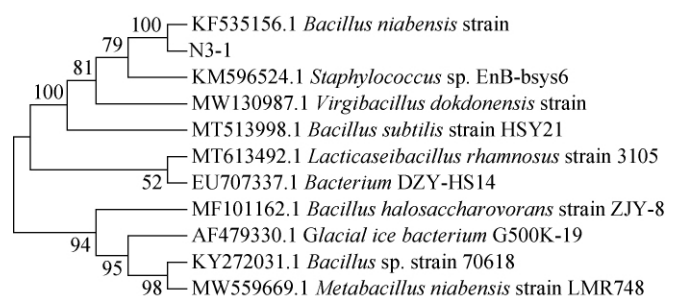


图2 基于16S rDNA序列菌株N3-1的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain N3-1 based on 16S rDNA sequence

2.3 耐钙菌株N3-1的培养条件优化单因素试验

2.3.1 菌株N3-1的生长曲线

微生物生长有一定的规律性,分为迟缓期、对数期、稳定期和衰退期^[23]。由图3可知,菌株N3-1培养0~6 h时菌液澄清,为潜伏期;培养6~21 h菌液开始浑浊,表明菌株的生长速度加快,进入对数期阶段,菌体数出现指数增长;培养21~36 h后菌体浑浊程度相对稳定,未发生明显变化,说明该菌体进入稳定期;培养36 h后吸光度值出现明显的下降趋势,可能由于部分菌体衰亡,说明该菌体进入衰退期。该试验得出菌株N3-1的最佳培养时间为21 h。

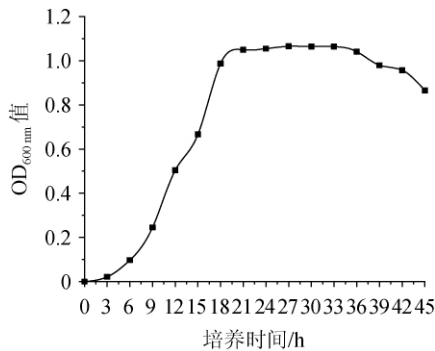


图3 菌株N3-1的生长曲线
Fig. 3 Growth curve of strain N3-1

2.3.2 培养基初始pH值对菌株N3-1生长的影响

pH值是影响微生物生长的重要因素,与微生物的物质代谢、生命活动有着密切的关系^[8]。由图4可知,当培养基初始pH值<6时,菌悬液OD_{600nm}值随着pH值的增加呈现快速增长趋势;当培养基初始pH值为6~8时,OD_{600nm}值缓慢增加;当培养基初始pH达到8时,菌株N3-1的OD_{600nm}值达到最大,为0.825;当培养基初始pH>8之后,OD_{600nm}值随着pH的增加反而下降,过高或过低均不利其生长。因此,菌株N3-1的最适培养基初始pH值为8。

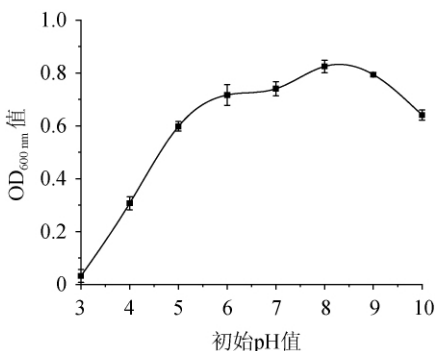


图4 培养基初始pH对菌株N3-1生长的影响
Fig. 4 Effect of initial medium pH on strain N3-1 growth

2.3.3 培养温度对菌株N3-1生长的影响

温度是微生物的重要生存因子,在适宜温度范围内,

酶促反应速率随着温度的升高逐渐加快,微生物的代谢速率和生长速率也相应提高,适宜的培养温度可以使微生物以最快的生长速率繁殖生长^[23-24]。由图5可知,当培养温度在20~37℃时,随着培养温度的升高,OD_{600nm}值明显升高,表明菌株N3-1的生长速率随着培养温度的升高而加快,生长情况较好;当培养温度为37℃时,菌株的OD_{600nm}值达到最大值,为0.489,表明菌株N3-1的培养温度适宜;当培养温度>37℃之后,OD_{600nm}值明显下降,表明菌株N3-1的生长速率随着温度的升高而下降。因此,菌株N3-1的最适培养温度为37℃。

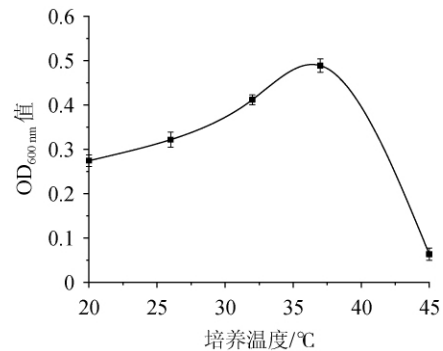


图5 培养温度对菌株N3-1生长的影响
Fig. 5 Effect of culture temperature on growth of strain N3-1

2.3.4 初始Ca²⁺含量对菌株N3-1生长的影响

由图6可知,当菌株N3-1在初始Ca²⁺含量为0.5~1.5 mg/L时,OD_{600nm}值随着钙离子含量的增加而增大,说明初始Ca²⁺含量在适当范围内能促进该菌株的生长。当初始Ca²⁺含量为1.5 mg/L时,OD_{600nm}值达到最大,为0.883。当初始Ca²⁺含量>1.5 mg/L之后,OD_{600nm}值呈波动下降趋势,初始Ca²⁺含量过高会抑制菌株N3-1的生长。因此,菌株N3-1的最适初始Ca²⁺含量为1.5 mg/L。

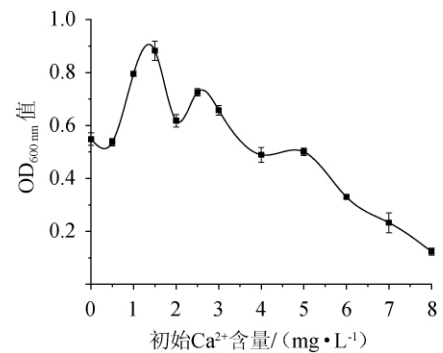


图6 初始Ca²⁺含量对菌株N3-1生长的影响
Fig. 6 Effect of initial Ca²⁺ contents on strain N3-1 growth

2.4 菌株N3-1培养条件优化响应面试验

2.4.1 响应面优化试验及结果

在单因素试验基础上,以菌悬液OD_{600nm}值(Y)为响应

值,以培养温度(A)、培养基初始pH(B)和初始Ca²⁺含量(C)为自变量,进行响应面优化试验,Box-Behnken 试验设计及结果见表3,回归模型方差分析见表4。

表3 Box-Behnken试验设计及结果
Table 3 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号	A 培养温度/℃	B 培养基初始pH值	C 初始Ca ²⁺ 含量/(mg·L ⁻¹)	Y OD _{600nm} 值预测值	OD _{600nm} 值实际值
1	44	9	1.5	0.233	0.250
2	44	8	2.0	0.103	0.084
3	37	8	1.5	0.775	0.770
4	30	8	1.0	0.130	0.140
5	37	8	1.5	0.774	0.770
6	44	8	1.0	0.289	0.280
7	37	8	1.5	0.791	0.770
8	37	9	1.0	0.640	0.630
9	30	9	1.5	0.237	0.230
10	30	7	1.5	0.206	0.190
11	37	8	1.5	0.763	0.770
12	37	8	1.5	0.772	0.770
13	37	9	2.0	0.520	0.520
14	44	7	1.5	0.221	0.230
15	30	8	2.0	0.132	0.150
16	37	7	2.0	0.499	0.510
17	37	7	1.0	0.593	0.590

利用Design-Expert 8.0.6软件对表3数据进行多元回归方程拟合,得到二次多项回归模型方程为: $Y=0.78+0.018A+0.014B-0.050C-4.750E-0.03AB-0.047AC-6.500E-0.03BC-0.48A^2-0.076B^2-0.14C^2$

2.4.2 回归模型方差分析

表4 回归模型的方差分析
Table 4 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.14	9	0.13	375.40	<0.000 1	***
A	2.485E-003	1	2.485E-003	7.34	0.030 3	*
B	1.540E-003	1	1.540E-003	4.55	0.070 4	
C	0.020	1	0.020	58.46	0.000 1	**
AB	9.025E-005	1	9.025E-005	0.27	0.621 6	
AC	8.836E-003	1	8.836E-003	26.09	0.001 4	**
BC	1.690E-004	1	1.690E-004	0.50	0.502 8	
A ²	0.95	1	0.95	2806.50	<0.000 1	***
B ²	0.024	1	0.024	71.10	<0.000 1	***
C ²	0.078	1	0.078	231.22	<0.000 1	***
失拟项	1.961E-003	3	6.536E-004	6.38	0.052 7	
残差	2.371E-003	7	3.387E-004			
纯误差	4.100E-004	4	1.025E-004			
总和	1.15	16				

注:“***”表示对结果影响高度显著(P<0.001),“**”表示对结果影响极显著(P<0.01),“*”表示对结果影响显著(P<0.05)。

由表4可知,模型F值为375.40,P值<0.000 1,表明响应面建立的回归模型达到了高度显著水平,失拟项P值=

0.052 7>0.05,不显著,表明模型与试验数据之间拟合度好。模型决定系数R²=0.997 9,调整决定系数R²_{Adj}=0.995 3,说明该模型的拟合度良好且试验误差较小。变异系数(coefficient of variation, CV)为4.07%,在可接受范围内,说明实验操作可行^[25]。二次项A²、B²、C²对结果影响高度显著(P<0.001),一次项C、交互项AC对结果影响极显著(P<0.01),一次项A对结果影响显著(P<0.05),其他项对结果影响不显著(P>0.05)。各因素对菌株N3-1的OD_{600nm}值影响程度高低顺序依次为初始Ca²⁺含量>培养温度>培养基初始pH值。

2.4.3 各因素交互作用对菌株N3-1生长影响的响应面分析

响应曲面图可以直观地反映出两因素交互作用对响应值的影响^[26]。通过保持其中两个因素不变而改变另一个因素,以了解两个独立变量之间的交互作用对OD_{600nm}值影响,利用Design-Expert 8.0.6软件绘制各因素交互作用响应面及等高线见图7。

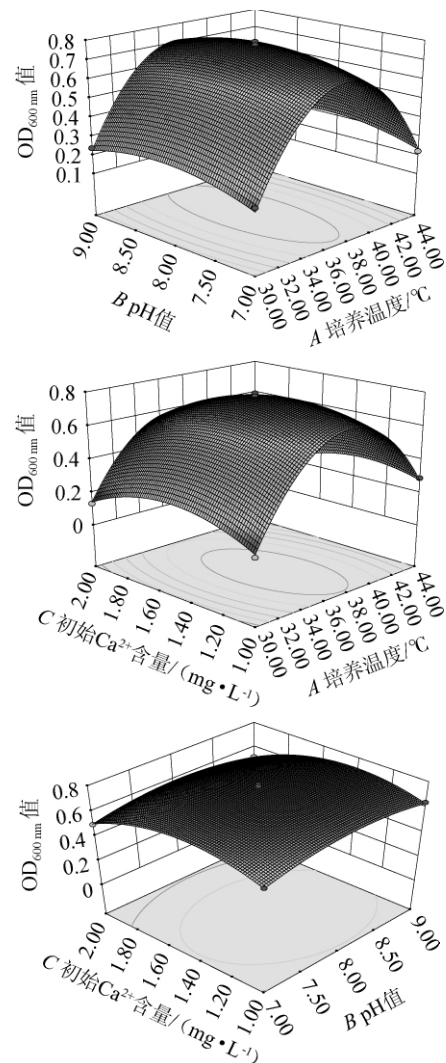


图7 各因素交互作用对菌株N3-1的OD_{600nm}值影响的响应面及等高线
Fig. 7 Response surface plots and contour lines of effects of interaction between each factor on OD_{600nm} value of strain N3-1

由图7可知,温度与pH值的交互作用下,温度一定时,随着pH值的增加,OD_{600nm}值无显著变化,当pH值一定时,随着温度增大,OD_{600nm}值先升高后降低,表明温度影响比pH明显;温度与初始Ca²⁺含量的交互影响下,温度一定时,OD_{600nm}值随Ca²⁺含量的增加轻微地先增加后减少,当初始Ca²⁺含量一定时,随温度增大,OD_{600nm}值先增后减的变化趋势,表明初始Ca²⁺含量比温度影响明显;pH值与初始Ca²⁺含量的交互影响下,控制其他条件不变,初始Ca²⁺含量增加,OD_{600nm}值先逐渐升高后降低,控制除pH值外的条件不变,pH值增加,OD_{600nm}值无显著变化,由各因素对纯度影响效果的显著性可以得出,初始Ca²⁺含量比pH值影响明显。

2.4.4 验证试验

理论上菌株N3-1最佳培养条件为培养温度37.2℃,初始Ca²⁺含量1.41 mg/L,初始pH值8.31,在此条件下预测的OD_{600nm}值为0.775。为了便于实际操作,将培养条件修正为培养温度37℃,初始Ca²⁺含量1.40 mg/L,初始pH值8.3。在此优化培养条件下进行3次平行验证试验,OD_{600nm}值实际值为0.768。实测值与理论值的误差为0.90%,差异不显著,表明该模型可以较好的预测菌株的生长条件。

3 结论

本研究从明胶废水中筛选出一株对Ca²⁺有较强抗性的细菌,经过形态特征的观察、生理生化鉴定及分子生物学鉴定为尼阿布芽孢杆菌(*Bacillus niabensis*)。通过单因素及响应面优化确定该菌株的最适培养条件为初始Ca²⁺含量1.40 mg/L,培养温度37℃,初始pH值为8.3。在此优化培养条件下,OD_{600nm}值为0.768。本研究中筛选得到的*Bacillus niabensis*可以在高Ca²⁺浓度的水体环境中生长。今后将继续对该菌钙离子的吸附机理进一步研究,可以为微生物修复水体污染提供新的菌种资源。

参考文献:

[1] 汪晓鹏. 胶原和明胶的改性研究及应用[J]. 西部皮革, 2021, 43(1): 21-22.
[2] 郭丽芹. 制革白湿皮废料制备明胶及混合废水处理[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
[3] 徐润, 梁庆华. 明胶的生产及应用技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1988: 45-51.
[4] 于大勇, 黄越洋, 魏文武. 二甲酚橙显色体系测定明胶中的钙含量[J]. 现代科学仪器, 2009(3): 99-101.
[5] KRUTHIKA N L, KARTHIKA S, RAJU G B, et al. Efficacy of electrocoagulation and electrooxidation for the purification of wastewater generated from gelatin production plant[J]. *J Environ Eng*, 2013, 1(3): 183-188.
[6] WANG G, YU N N, GUO Y. A novel process to recycle the highly concentrated calcium and chloride ions in the gelatin acidification wastewater[J]. *J Clean*

Prod, 2018, 188: 62-68.
[7] MATHIVANAN K, RAJARAM R, ANNADURAI G. Biosorption potential of *Lysinibacillus fusiformis* KMNTT-10 biomass in removing lead (II) from aqueous solutions[J]. *Sep Sci Technol*, 2018, 53(13): 1991-2003.
[8] 李倩, 张平, 廖柏寒, 等. 一株耐 Cd 菌株的分离、鉴定及基本特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 11-24.
[9] 邹水林. 重金属铜耐受菌的筛选及吸附铜的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
[10] 周防震, 谢园园, 赵婷, 等. 富硒微生物的筛选、富硒条件优化及鉴定[J]. 中国酿造, 2013, 32(8): 103-106.
[11] 曹礼, 李晓慧, 张芹辉, 等. 一株耐锌菌株的分离鉴定及其生长特性研究[J]. 生物学杂志, 2017, 34(6): 60-64.
[12] 唐多利. 明胶废水中耐钙微生物的筛选、鉴定及其钙吸附研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2020.
[13] 张新国, 马国弟, 刘子预, 等. 有机钙转化微生物的筛选、鉴定及其富钙研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 251-259.
[14] 徐少慧, 蒋代华, 史鼎鼎, 等. 重金属复合污染土壤中耐铅镉微生物的筛选及鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(3): 532-538.
[15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 134-167.
[16] 布坎南 R E, 吉布斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 254-259.
[17] MILLER S A, DYKES D D, POLESKY H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3): 1215.
[18] 刘翠华, 李娟, 齐兵兵, 等. 嗜盐单胞菌的分离及其胞外黏性代谢物的分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(3): 120-125.
[19] SEDLAKOVA-KADUKOVA J, KOPCAKOVA A, GRESAKOVA L, et al. Bioaccumulation and biosorption of zinc by a novel *Streptomyces* K11 strain isolated from highly alkaline aluminium brown mud disposal site[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 167: 204-211.
[20] MATHEW B B, KRISHNAMURTHY N B. Screening and identification of bacteria isolated from industrial area groundwater to study lead sorption: Kinetics and statistical optimization of biosorption parameters[J]. *Groundwater Sust Dev*, 2018, 7: 313-327.
[21] 沈佳莉. 不同原料制备微晶纤维素的工艺优化及其结构研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019.
[22] 赵晓妍, 曹越, 董芮萌, 等. 一株野生大豆内生细菌 YDX14 菌株的分离、鉴定及促生效应研究[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 224-231.
[23] 徐婷婷. 一株耐重金属镉、铅、锰菌株的筛选及其复合型吸附菌剂的制备[D]. 桂林: 广西师范大学, 2018.
[24] MUÑOZ A J, ESPÍNOLA F, RUIZ E. Removal of Pb (II) in a packed-bed column by a *Klebsiella* sp. 3S1 biofilm supported on porous ceramic Raschig rings[J]. *J Ind Eng Chem*, 2016, 40: 118-127.
[25] 王川, 冯灵玉, 曹瑜, 等. 一株杀扑磷高效降解菌的分离、鉴定及降解条件的响应面法优化[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(2): 224-229.
[26] 焦雯妹, 关嘉琦, 史佳鹭, 等. 响应面法优化乳酸乳球菌 KLD54.0325 产叶酸的培养基成分及发酵条件[J]. 食品科学, 2020, 41(6): 123-130.