



## 乌勇布拉克盐湖嗜盐古菌絮凝效果筛选及活性检测

刘冰冰<sup>1</sup>, 王双雨<sup>1</sup>, 申亚淇<sup>1</sup>, 赵栩<sup>1</sup>, 程爽<sup>1</sup>, 王来友<sup>1</sup>, 郭书贤<sup>1\*</sup>, 李文均<sup>2\*</sup>

1 南阳理工学院, 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室, 河南 南阳 473004

2 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

刘冰冰, 王双雨, 申亚淇, 赵栩, 程爽, 王来友, 郭书贤, 李文均. 乌勇布拉克盐湖嗜盐古菌絮凝效果筛选及活性检测. 微生物学报, 2022, 62(11): 4095–4107.

Liu Bingbing, Wang Shuangyu, Shen Yaqi, Zhao Xu, Cheng Shuang, Wang Laiyou, Guo Shuxian, Li Wenjun. Flocculation effect and activity of halophilic archaea isolated from Uyong Brac salt lake. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4095–4107.

**摘要:**【目的】从嗜盐古菌中筛选可产生生物絮凝剂的菌株, 对发酵液、上清液、菌悬液、胞外聚合物的絮凝作用进行检测, 筛选能够适应高盐废水处理, 且具有广谱盐度及 pH 作用范围的微生物絮凝剂。【方法】以新疆乌勇布拉克干盐湖沉积物为研究对象, 利用纯培养方法对嗜盐古菌进行分离, 对絮凝菌株进行初筛及 16S rRNA 基因测序, 构建系统进化树, 初步判断菌株分类地位; 复筛检测不同生物材料的絮凝效果; 选择絮凝效果较好的生物材料, 检测其盐度、pH 的絮凝效果稳定性。【结果】采用纯培养方法共分离到 28 株嗜盐古菌, 絮凝初筛共筛选出 16 株嗜盐古菌, 分布于碱线菌属(*Natrinema*)、盐缓长菌属(*Halopiger*)和盐土生菌属(*Haloterrigena*)。菌株发酵液、上清液、菌悬液、胞外聚合物具有不同程度的絮凝效果。菌株 A279-1、A133、RP33、NGA0064、RM-152、A389 的发酵液、上清液的絮凝效果较好, 其中菌株 A389 的发酵液絮凝率为 61.06%, 上清液为 67.92%。所有菌株菌悬液的絮凝率达到 80% 以上。菌株所产胞外聚合物表现出较好的絮凝效果, 菌株 RM-152 所产胞外聚合物的絮凝率最高, 达 89.86%, 其次是 A389 (81.53%)。菌株 A389 所产胞外聚合物的产量最大, 达 12.53 g/L, 具有广泛的盐度和 pH 适应性。【结论】乌勇布

**基金项目:** 国家自然科学基金(31800001); 河南省重点研发与推广专项(科技攻关)项目(212102310232); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2021GGJS153); 河南省高等学校重点科研项目(20A180019); 南阳市科技攻关计划项目(KJGG079)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31800001), by the Key Technologies Research and Development Program of Henan Province (212102310232), by the Henan Province University Youth Researcher Support Project (2021GGJS153), by the Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (20A180019) and by the Key Technologies Research and Development Program of Nanyang City (KJGG079)

\*Corresponding authors. GUO Shuxian, Tel/Fax: +86-20-84111727, E-mail: guoshux@163.com; LI Wenjun, Tel/Fax: +86-37-62076316, liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: 3 April 2022; Revised: 23 July 2022; Published online: 12 August 2022

拉克干盐湖沉积物中蕴含丰富的可产生微生物絮凝剂的嗜盐古菌资源。嗜盐古菌菌株发酵液、上清液、菌悬液及胞外聚合物均具有良好的絮凝作用，尤其是胞外聚合物表现出较好的絮凝效果，具有广谱的盐度和 pH 耐受性。嗜盐古菌所产生物絮凝剂的发现对于后续高盐废水功能材料开发具有重要应用价值。

**关键词：**嗜盐古菌；絮凝作用；高盐废水；群落组成；胞外聚合物

## Flocculation effect and activity of halophilic archaea isolated from Uyong Brac salt lake

LIU Bingbing<sup>1</sup>, WANG Shuangyu<sup>1</sup>, SHEN Yaqi<sup>1</sup>, ZHAO Xu<sup>1</sup>, CHENG Shuang<sup>1</sup>,  
WANG Laiyou<sup>1</sup>, GUO Shuxian<sup>1\*</sup>, LI Wenjun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Henan Key Laboratory of Industrial Microbial Resources and Fermentation Technology, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, Henan, China

<sup>2</sup> School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

**Abstract:** [Objective] The present study screened the halophilic archaeal strains with flocculation effect and evaluated the flocculation effect of the fermentation liquid, fermentation supernatant, cell suspension, and extracellular polymeric substances of the strains, aiming to develop the microbial flocculants that can adapt to a wide range of salinity and pH for high-salt wastewater treatment. [Methods] The pure culture method was designed to isolate halophilic archaea from the sediment samples of Uyong Brac salt lake in Xinjiang. The 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis were performed to evaluate the taxonomic positions of the isolated strains. Furthermore, the flocculation effects of the fermentation liquid, fermentation supernatant, cell suspension, and extracellular polymeric substances of the strains were evaluated. The flocculation stability was evaluated under a wide range of salinity and pH conditions. [Results] A total of 28 strains of halophilic archaea were isolated by pure culture method, among which 16 strains were selected based on the primary screening results. The 16S rRNA sequences and phylogenetic tree suggested that these strains mainly belonged to *Natrinema*, *Halopiger*, and *Haloterrigena*. The fermentation liquid, fermentation supernatant, cell suspension, and extracellular polymeric substances of strains A279-1, A133, RP33, NGA0064, RM-152, and A389 had better flocculation effects than those of other strains. The fermentation liquid and supernatant of strain A389 showcased the flocculation rates reaching 61.06% and 67.92%, respectively. The cell suspensions of all the strains had the flocculation rates over 80%. The extracellular polymeric substances produced by strain RM-152 had the highest flocculation rate of 89.86%, followed by those of strain A389 (81.53%). Strain A389 had the yield of 12.53 g/L of extracellular polymeric substances and it adapted to a wide range of salinity and pH. [Conclusion] There were abundant halophilic archaea in the sediment of Uyong Brac salt lake. The fermentation liquid, fermentation supernatant, cell suspension, and extracellular polymeric substances of halophilic archaea had good flocculation effect. In particular, the extracellular polymeric substances demonstrated good flocculation effect and could withstand a wide range of salinity and pH, being suitable for further industrial recycling and utilization. The isolated strains may serve the

subsequent development of functional materials for industrial high-salt wastewater treatment.

**Keywords:** halophilic archaea; flocculation; high-salt wastewater; community composition; extracellular polymeric substances

微生物絮凝剂(microbial flocculants, MBF)是由微生物或其分泌物组成,是天然的高分子絮凝剂,微生物絮凝剂的絮凝活性高,对污水中的菌体细胞、细小颗粒或悬浮物具有吸附、凝聚、沉积和分解功能,可广泛应用于工业污水处理、饮用水处理以及工业污水下游工艺中<sup>[1-2]</sup>。微生物絮凝剂具备生物可降解和安全的特点,无毒无害、无二次污染<sup>[3]</sup>。除微生物本身可以作为絮凝剂外,微生物所产生的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS),如胞外多糖、功能蛋白和糖蛋白也具有较好的絮凝效果<sup>[3-6]</sup>。研究表明,能够产生生物絮凝剂的菌株有 *Bacillus* sp. AEMREG7<sup>[7]</sup>、*Serratia ficaria*<sup>[8]</sup>、*Bacillus licheniformis*<sup>[9]</sup>、*Rhodococcus erythropolis*<sup>[10]</sup>、*Chryseobacterium daeguense*<sup>[11]</sup>和 *Bacillus subtilis* IFO3335<sup>[12]</sup>等。

高盐废水主要来自于渔业以及工业污水处理过程中。高盐废水之所以难以处理,主要在于常规污水功能微生物无法抵御高盐渗透压。随着后期污水处理,污水中的盐浓度会达到 5% 甚至 10% 以上,可杀死或抑制更多活性污泥中的功能微生物,加剧后期处理难度。在处理高盐废水时,采用生物的方法相较于物理、化学的方法更加经济,但对于普通非盐生微生物,高盐严重抑制了菌株的生长<sup>[13-14]</sup>。而且高盐度或剧烈的盐度变化一般对常规生物处理工艺构成挑战,盐度对悬浮物的物理化学性质有显著影响,导致其表面电荷、疏水性、可滤性、沉降和絮凝性发生变化<sup>[15]</sup>。相比之下盐生微生物更适合用来处理高盐废水,从盐环境中筛选具有絮凝效果的微生物是解决高盐污水絮凝困扰

的有效途径之一<sup>[16-17]</sup>。目前,耐盐碱微生物 *Bacillus* sp. I-471 和耐盐微生物 *Halomonas* sp. V3a, 均已被应用于高盐废水的处理工艺中,而且菌株产生的 EPS 被证明具有较好的絮凝作用<sup>[18-19]</sup>。在盐生微生物中,能够耐受更高盐浓度的嗜盐古菌对于处理高盐污水中的污染物具有重要的作用<sup>[20]</sup>。嗜盐古菌普遍能够产生 EPS,这些聚合物具有较好的重金属吸附、苯酚清除及絮凝效果,在工业污水,尤其是高盐工业污水的处理中发挥重要作用<sup>[21-23]</sup>。

本研究从高盐微生物中筛选具有良好絮凝效果的生物材料,对其絮凝率进行检测,结合生物产量,筛选絮凝效果好的絮凝剂,进行盐度及 pH 稳定性检测,为工业化应用提供优质的生物絮凝剂材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

新疆乌勇布拉克干盐湖沉积物(42°68'816"N, 89°330'891"E)作为本研究的分离样品。

### 1.2 主要试剂和仪器

本研究使用的化学试剂均为国产 AR 级,购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。数显恒温摇床,苏州威尔实验用品有限公司;高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司;原位冷冻干燥仪, LABCONCO 公司;六联恒温磁力搅拌器,金坛区西城新瑞仪器厂;全波长紫外扫描仪,上海美普达仪器有限公司;红外光谱仪,热电公司;透射电子显微镜,日本电子株式会社。

### 1.3 分离培养基

选择 MG、T3 培养基作为分离培养基<sup>[24-25]</sup>。

发酵培养基 G1: 可溶性淀粉 20 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KNO<sub>3</sub> 1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, NaCl 150 g/L, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

### 1.4 菌株分离

沉积物经自然风干, 采用稀释涂布法, 选择 10<sup>-3</sup> 稀释浓度进行样品分离。平板倒置于 37 °C 培养 4-6 周。选择 G1 固体培养基对分离菌株进行纯化。转接纯化后的菌体细胞于甘油管(30%甘油, 15% NaCl), -80 °C 超低温冰箱进行保藏。

### 1.5 具有絮凝潜力的嗜盐古菌初筛及 16S rRNA 基因序列鉴定

向发酵瓶中添加 15 mL 发酵液体培养基 G1, 用 15% 的 NaCl 溶液配置菌悬液( $OD_{600}=0.8-1.0$ ), 接种 500 μL 于发酵瓶中, 37 °C、120 r/min 培养 14 d。菌株发酵完成后, 挑选发酵液静置 3 d 以上依然浑浊且摇晃之后产生较多细腻泡沫现象的菌株作为具有絮凝潜力的候选菌株。

取少许菌体加入 50 μL pH 7.0 10% 的 Chelex-100 (默克试剂公司) 溶液中。PCR 仪选用程序: 99 °C, 10 min; 16 °C, 10 min。样品 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 PCR 扩增。选用古菌通用引物 20F/1452R<sup>[26]</sup> 进行嗜盐古菌 16S rRNA 基因扩增。扩增体系: 25 μL PCR Mix (2×Premix)[宝日医生物技术(北京)有限公司], 1 μL 20F 引物(0.55 nmol), 1 μL 1452R 引物(0.50 nmol), 1.5 μL DNA (10-20 ng/μL) 模板, 无菌水 21.5 μL。PCR 扩增条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序。根据 16S rRNA 基因序列, 通过 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)<sup>[27]</sup> 数据库进行序列

比对, 对于 16S rRNA 基因相似性小于 98.65%<sup>[28]</sup> 的菌株, 初步判断为潜在新物种。从 NCBI 数据库下载相近序列, 利用 MEGA 7.0<sup>[29]</sup> 构建 NJ (neighbour-joining)<sup>[30]</sup>、MP (maximum-parsimony)<sup>[31]</sup>、ML (maximum-likelihood)<sup>[32]</sup> 系统发生树, 综合分析初步判断菌株的分类地位。

### 1.6 菌株及生物材料絮凝效果检测

因考虑工业应用及后期废水处理工艺改进等环节的便捷性, 本研究采用菌株发酵液(包含菌体、菌体发酵产物等)、上清液(发酵液经 5 000 r/min 离心 5 min 后弃菌体)、菌悬液(发酵液经 5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液留菌体, 加入同弃置上清液相同体积的 15% NaCl 溶液, 混合均匀)、EPS(提取方法如 1.7.1 所示)进行相关絮凝效果检测。菌体产量选用干重法进行计算。絮凝率测定<sup>[33-34]</sup> 方法修改如下。

(1) 配置 5 g/L 的高岭土悬液(15% NaCl): 称取 5 g 高龄土和 150 g NaCl, 溶解于 1 000 mL 水中, 磁力搅拌器上 25 °C、100 r/min 充分搅拌均匀, 溶液现配现用;

(2) 实验样品准备: 发酵液直接从发酵摇瓶中进行取样 2 mL; 发酵上清液的制备: 发酵液经 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 mL; 菌悬液的制备: 取 2 mL 发酵液于离心管中, 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 添加 2 mL 的 NaCl 溶液, 混和均匀。EPS 溶液稀释浓度为 2 mg/mL;

(3) 烧杯中加入 93 mL 配置的高岭土悬浮液、5 mL CaCl<sub>2</sub> (1%) 溶液, 分别加入 2 mL 发酵液、上清液、菌悬液及 EPS 溶液;

(4) 磁力搅拌器 250 r/min 搅拌 5 min, 静置 20 min; 取烧杯中上层液体 5 mL, 于 550 nm 处测定吸收值;

计算公式:  $E(\%) = (A - B) / B$

其中,  $E$  为絮凝率,  $A$  为空白对照,  $B$  为实验组。

## 1.7 菌株 EPS 的提取及不同盐浓度、不同 pH 条件下絮凝作用检测

### 1.7.1 EPS 提取及产量计算

综合上述结果, 筛选菌悬液及上清液絮凝效果较好的菌株采用 G1 培养基进行发酵, 待发酵 14 d 后采用透析+冷冻抽干的方法进行 EPS 提取。方法如下: 发酵液于 4 °C、7 000 r/min 条件下离心 10 min, 去除菌体; 上清液装于透析袋(截留分子量为 8 kDa, Spectra/Por®6, SPECTRUM, TX)中, 置于蒸馏水体系中室温透析 24 h, 重复 5 次, 去除离子、短肽等杂质。-80 °C 冷冻, -4 °C 冷冻抽干收集液, 称量计算 EPS 发酵含量, 常温保藏备用。结合全波长紫外扫描、红外光谱(FTIR)及透射电镜方法初步检测 EPS 的特性及形态特征。

### 1.7.2 EPS 絮凝率计算

采用 1.4.3 方法进行检测。

### 1.7.3 EPS 稳定性检测

结合絮凝率及产量指标, 挑选最优菌株所产 EPS 设置不同浓度(3、2、1 mg/L)、盐度(0%、3%、5%、8%、10%、13%、15%、18%、20% NaCl)(之所以选择<5%的盐浓度是为了探究 EPS 在低盐环境中的絮凝效果, 为其盐度的广谱适用性提供数据支撑)、pH (pH 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、11.0, 15% NaCl)梯度进行相关絮凝率检测, 判断 EPS 的稳定性。上述实验同等条件下, 选用聚合氯化铝(polyaluminium chloride, PAC)作为对照实验组。

## 2 结果与讨论

### 2.1 嗜盐古菌纯培养分离及絮凝特性初筛

从乌勇布拉克干盐湖沉积物中共分离到 28 株嗜盐古菌。分离到的嗜盐古菌发酵 21 d 后, 筛选到 16 株静置 3 d 后发酵液依然浑浊, 且上下振荡具有细腻泡沫产生的菌株, 初步判断这

些菌株具有一定絮凝特性, 并将其作为后续絮凝效果检测的实验菌株。菌株发酵液静置形态如图 1 所示, 与空白对照及其他静置后澄清的发酵液相比, 16 株菌的发酵液依然浑浊。结合 16S rRNA 基因比对结果, 发现这 16 株菌主要分布于碱线菌属(*Natrinema*)、盐缓长菌属(*Halopiger*)和盐土生菌属(*Haloterrigena*)。菌株 16S rRNA 基因测序对比信息如表 1 所示, GenBank 登录号为: ON394489-ON394504。

### 2.2 絮凝特性初筛菌株 16S rRNA 基因系统发生树分析

16 株具有絮凝特性的初筛菌株的系统发生树如图 2 所示。结合基于 16S rRNA 基因相似性对于新物种的判断依据<sup>[28]</sup>, 菌株 A266-1 和 RP-56 与最相似菌株 *Natrinema soli* LMG 29247<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似性为 98.09%-98.51%, 在 16S rRNA 基因系统发生树中, 菌株 A266-1 和 RP-56 共同聚在一个分支上, 两者的 16S rRNA 基因相似性为 99.21%, 组成 *Natrinema* 属的一个潜在新种分类单元(*Natrinema* sp., OTU1)。菌株 A389 和 A279-1 与最相似菌株 *Natrinema altunense* CGMCC 1.3731<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似性为 97.11%-97.83%, 两者的 16S rRNA 基因相似性为 99.21%, 共同组成 *Natrinema* 属的一个潜在新种分类单元(*Natrinema* sp., OTU2)。菌株 A774 与最相似菌株 *Natrinema salaciae* CECT 8172<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似性为 97.80%, 推断其为 *Natrinema* 属的潜在新种分类单元(*Nnm.* sp., OTU3)。菌株 NGA 0064 与最相似菌株 *Haloterrigena salina* CGMCC 1.6203<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似性为 95.77%, 在系统发生树中的 *Haloterrigena* 属内单独成支, 推断其为 *Haloterrigena* 属的潜在新种分类单元(*Haloterrigena* sp., OTU4)。菌株 RP-33、RM-149、RM-152 与最相似菌株

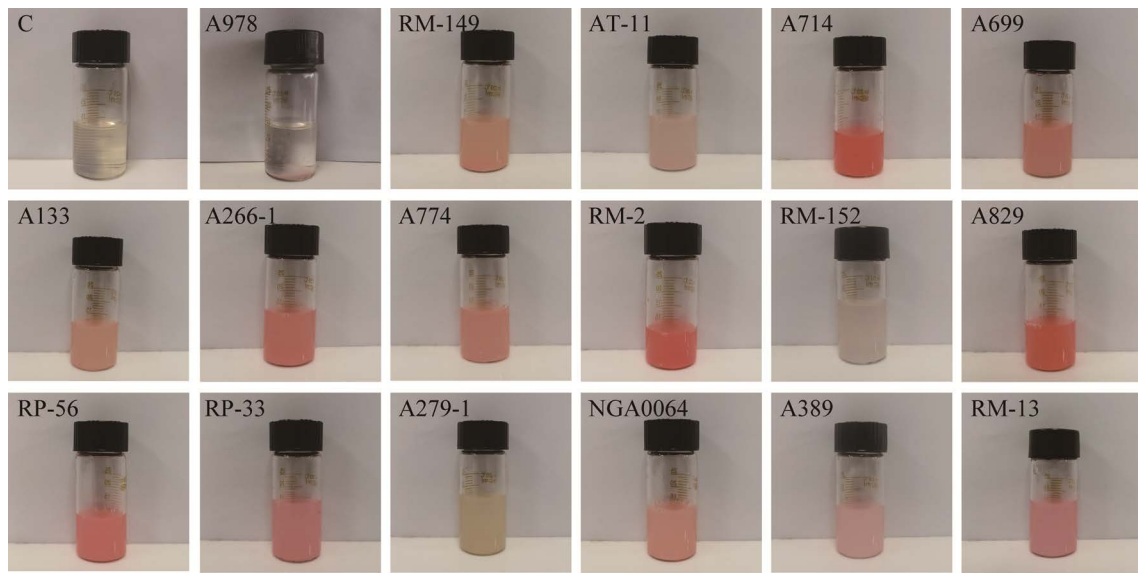


图 1 絮凝效果初筛

Figure 1 Initial screening of potential ability of flocculation. C: the blank control group of fermentation liquid; A978: the negative control group of flocculation properties of fermentation liquid by strain A978; RM-149, AT-11, A714, A699, A133, A266-1, A774, RM-2, RM-152, A829, RP-56, RP-33, A279-1, NGA0064, A389, RM-13: the positive group of flocculation properties of fermentation liquid by strains RM-149, AT-11, A714, A699, A133, A266-1, A774, RM-2, RM-152, A829, RP-56, RP-33, A279-1, NGA0064, A389 and RM-13.

表 1 菌号、最接近模式菌株、16S rRNA 基因相似性及它们的 NCBI 序列号

Table 1 Strains, the closest type strains with the highest 16S rRNA gene sequence similarities and their NCBI accession numbers

Strain No.	GenBank accession number of the isolated strains	Closest homolog	GenBank accession number of the closest strain	Similarity/%
A279-1	ON394502	<i>Natrinema altunense</i> CGMCC 1.3731 <sup>T</sup>	AB663460	97.11
A389	ON394504	<i>Natrinema altunense</i> CGMCC 1.3731 <sup>T</sup>	AB663460	97.83
A774	ON394496	<i>Natrinema salaciae</i> CECT 8172 <sup>T</sup>	AB935413	97.80
A266-1	ON394494	<i>Natrinema soli</i> LMG 29247 <sup>T</sup>	KY381123	98.09
RP56	ON394490	<i>Natrinema soli</i> LMG 29247 <sup>T</sup>	KY381123	98.51
RP-33	ON394501	<i>Haloterrigena salifodinae</i> CGMCC 1.12284 <sup>T</sup>	AB935410	98.02
RM-149	ON394499	<i>Haloterrigena salifodinae</i> CGMCC 1.12284 <sup>T</sup>	AB935410	97.88
RM-152	ON394500	<i>Haloterrigena salifodinae</i> CGMCC 1.12284 <sup>T</sup>	AB935410	97.95
RM-13	ON394492	<i>Haloterrigena salina</i> CGMCC 1.6203 <sup>T</sup>	AB663448	97.91
AT-11	ON394498	<i>Haloterrigena salina</i> CGMCC 1.6203 <sup>T</sup>	AB663448	97.97
NGA0064	ON394503	<i>Haloterrigena salina</i> CGMCC 1.6203 <sup>T</sup>	AB663448	95.77
A829	ON394489	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup>	AB004878	98.86
A714	ON394495	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup>	AB004878	98.66
RM-2	ON394497	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup>	AB004878	99.16
A699	ON394491	<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511 <sup>T</sup>	AB004878	98.94
A133	ON394493	<i>Halopiger xanaduensis</i> CGMCC 1.6379 <sup>T</sup>	AB477974	98.58

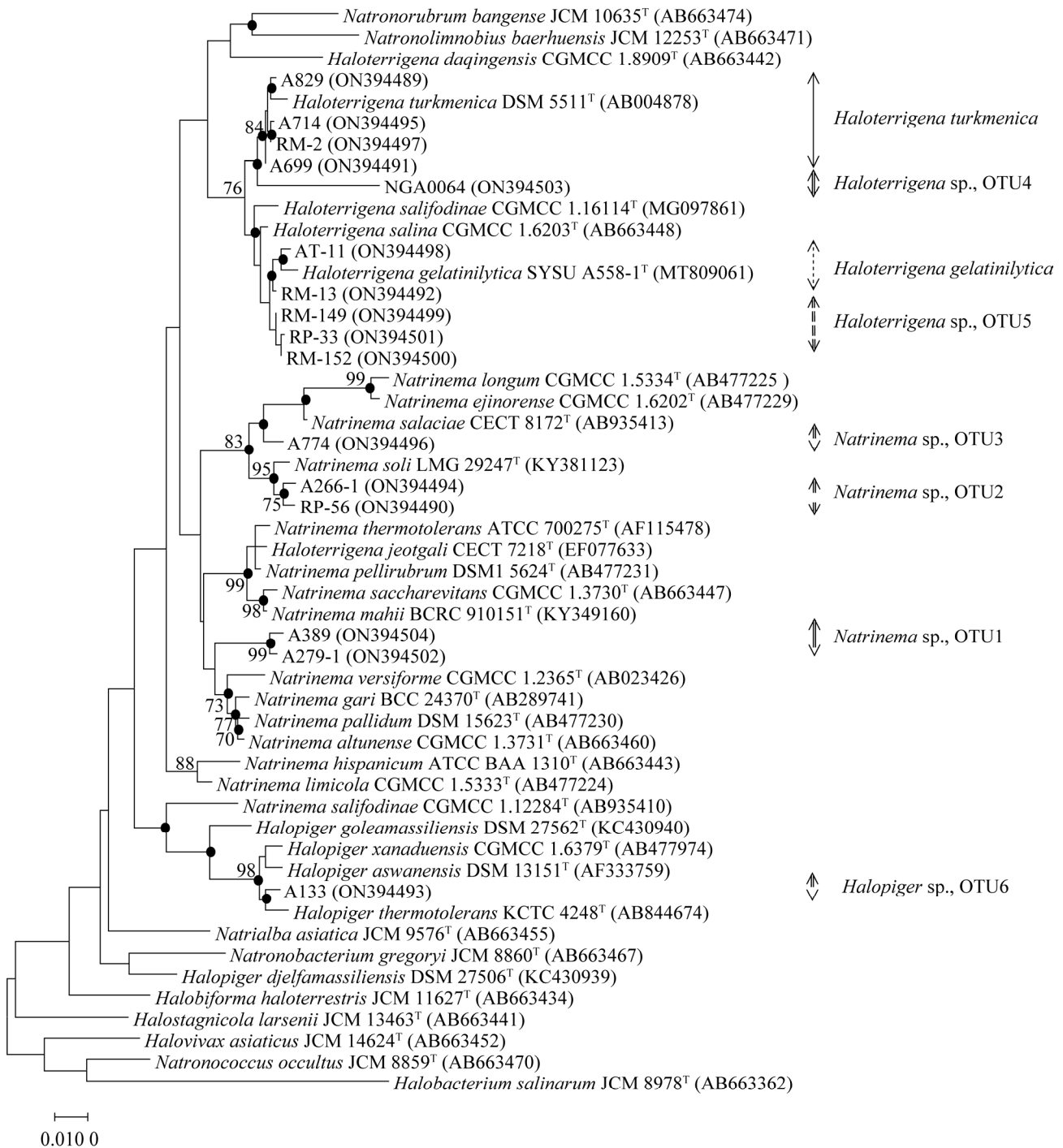


图 2 具有潜在絮凝效果的嗜盐古菌 16S rRNA 基因系统发生 ML 树

Figure 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of halophilic archaea with potential flocculation effect. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support based on a maximum-likelihood analysis of 1 000 resampled datasets, only values >70% were given. Full circles indicate branches that also were recovered in the neighbour-joining, maximum-parsimony and maximum-likelihood trees. Bars: 1 substitution per 1 000 nucleotide positions; OTU: operational taxonomic unit.

*Haloterrigena salifodinae* 的 16S rRNA 基因相似性为 97.88%–98.02%，三者 在系统生发树中聚在一个分支上，推测可能代表 *Haloterrigena* 属的潜在新种分类单元 (*Haloterrigena* sp., OTU5)。菌株 A133 与 *Halopiger xanaduensis* CGMCC 1.6379<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因相似性为 98.58%，推测其为 *Halopiger* 属的潜在新种分类单元 (*Halopiger* sp., OTU6)。菌株 A829、A714、RM-2 和 A699 为 *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> 种内的不同菌株。菌株 AT-11 和 RM-13 为 *Haloterrigena gelatinilytica* SYSU A558-1<sup>T</sup> 种内的不同菌株。

### 2.3 不同生物材料絮凝效果分析

待测嗜盐古菌发酵液、发酵上清液、菌悬液及 EPS 的絮凝率如表 2 所示。由于菌株及分泌特性的不同，导致不同生物样品的絮凝率有一定差异。本研究中絮凝率较好的生物材料多

集中于 *Haloterrigena* 属和 *Natrinema* 属，尤其是 *Natrinema* sp. (OTU1) 和 *Haloterrigena* sp. (OTU5) 2 个潜在新种分类单元。

#### 2.3.1 嗜盐古菌发酵液絮凝效果

16 株待测菌株的发酵液的絮凝率为 17.05%–66.19%，其中菌株 A279-1、A133、A829、RP33、NGA0064、RM-152、A774、A389 发酵液的絮凝率接近 50% 或达到 50% 以上，分别为 57.82%、56.66%、49.87%、61.06%、54.95%、59.81%、58.01%、66.19%。菌株 A389 的发酵液的絮凝率最高 (66.19%)，其次是 A133 菌株发酵液 (61.06%)，两者絮凝率均达 60% 以上。发酵液中包含了菌体细胞及上清液，但是其絮凝率并没有比发酵上清液或者菌悬液高，主要原因在于培养基中的一些成分可能已经形成了絮凝团，因此对于絮凝检测造成影响，使得絮凝剂的絮凝率降低。

表 2 不同菌株及其生物材料絮凝检测结果

Table 2 Flocculation rate test results of different strains and their EPSs

Strain No.	Species	Genus	Flocculation rate of fermentation liquid/%	Flocculation rate of supernatant/%	Flocculation rate of cell supernatant/%		Flocculation rate of EPS/%
					0% NaCl	15% NaCl	
AT-11	<i>Haloterrigena</i>	<i>Haloterrigena</i>	40.92±11.17	45.65±11.51	81.25±3.07	79.58±0.44	NT
RM-13	<i>gelatinilytica</i>		47.34±1.60	55.68±0.23	88.22±0.55	80.34±0.50	74.38±0.97
RM-149	<i>Haloterrigena</i> sp.,		41.39±7.26	53.96±6.67	85.66±1.90	87.64±0.69	NT
RP-33	OTU5		61.06±2.31	67.92±0.54	88.64±0.60	74.32±1.03	31.85±3.74
RM-152			59.81±1.45	62.45±0.69	83.30±0.36	88.27±0.98	89.86±0.70
NGA0064	<i>Haloterrigena</i> sp.,		54.95±0.29	53.91±1.05	85.83±0.17	87.44±0.38	NT
A829	<i>Haloterrigena</i>		49.87±1.39	60.90±0.49	80.81±0.25	72.01±0.32	62.04±0.72
A714	<i>turkmenica</i>		17.05±0.89	12.49±4.59	82.22±0.89	59.35±2.34	NT
RM-2			32.56±1.17	11.45±1.07	81.04±0.61	78.59±1.19	NT
A699			28.75±6.42	27.94±5.14	81.70±1.51	81.45±0.82	NT
A774	<i>Natrinema</i> sp.,	<i>Natrinema</i>	58.01±4.34	48.51±3.12	83.51±0.76	74.76±1.30	NT
A266-1	<i>Natrinema</i> sp.,		32.13±3.41	34.42±1.17	88.15±0.24	83.10±2.44	NT
RP-56	OTU2		30.04±0.98	30.98±2.67	88.47±0.33	86.23±0.15	NT
A389	<i>Natrinema</i> sp.,		66.19±3.15	59.04±1.57	80.26±0.60	89.44±0.29	81.53±0.39
A279-1	OTU1		57.82±3.06	65.70±2.98	72.69±0.52	84.92±1.06	66.58±2.14
A133	<i>Halopiger</i> sp.,	<i>Halopiger</i>	56.66±0.48	60.22±2.35	78.62±0.78	82.50±0.73	47.61±2.59
	OTU6						

NT: not test.



### 2.3.2 嗜盐古菌发酵上清液絮凝效果

16株待测菌株的上清液絮凝率范围为11.45%–67.92%，其中菌株RM-149、A279-1、A133、A829、RP33、RM-13、NGA0064、RM-152、A389发酵液的絮凝率达到50%以上，分别为53.96%、65.70%、60.22%、60.90%、67.92%、55.68%、53.91%、62.45%、59.04%。菌株RP-33发酵上清液的絮凝率最高(67.92%)，其次是菌株A279-1的发酵上清液(65.70%)。发酵上清液中包含有细胞分泌到胞外的一些成分可能与培养基的成分形成絮凝团，对后续絮凝检测造成影响。所以与后续的EPS的絮凝效果进行比较，发酵上清液的絮凝率较低；也可能是由于相同体积的待测样品，发酵上清液的胞外分泌物浓度太低引起的。

### 2.3.3 嗜盐古菌菌悬液絮凝效果

考虑到嗜盐古菌的高渗适应性，在低渗溶液中菌体会发生自溶现象。在菌体絮凝检测中，分别选用了在0% NaCl和15% NaCl的盐水配制菌悬液，研究其絮凝效果。

#### (1) 0% NaCl溶液下菌株形态

大多数嗜盐古菌在0% NaCl条件下细胞会自溶，但是部分菌属能够耐受一定的低渗环境，表现出菌体不发生自溶的特性。待测菌株悬浮于0% NaCl溶液中，12、24、48 h显微观察，发现待测菌株RP-33、RP-56、RM-13、A266-1会有一定程度的自溶现象，但不明显。其他菌株均表现出低渗(0% NaCl)条件下的稳定性。若胞内内含物溢出，会在一定程度上增加絮凝效果。

#### (2) 0%、15% NaCl的菌悬液絮凝结果

0% NaCl溶液菌悬液的絮凝率除A279-1最小，为72.69%；其次是A133，为78.62%；其他均达到80%以上。其中菌株RP-33、RP-56、RM-13、A266-1菌悬液较高，絮凝率分别为

88.64%、88.47%、88.22%、88.15%。对于0% NaCl条件下有自溶特性的菌株(RP-33、RP-56、RM-13、A266-1)，其15% NaCl溶液菌悬液相较于0% NaCl的菌悬液，絮凝率有一定程度降低；其中菌株RM-13的菌悬液絮凝率达80.34%；其次是RM-2(78.59%)。对于0% NaCl条件下破裂现象不明显的菌株(A699、RM-149、RM-152、A774)，除A699差异不大之外，其他菌株的15% NaCl菌悬液的絮凝效果均优于0% NaCl菌悬液。其中菌株RM-152的絮凝率最高，为88.27%；其次是RM-149(87.64%)。15% NaCl菌悬液絮凝效果明显提升的菌株，可能是菌体表面结合的EPS在低渗条件下帮助细胞免受低渗影响，且在高渗情况下，其功能作用能够更好发挥。综合比较，相较于发酵液及发酵上清液的絮凝率，菌悬液的絮凝效果更好，主要原因在于除菌体细胞具有絮凝吸附作用之外，菌体周边包裹的EPS增强了絮凝效果。在后续研究中，我们将结合微生物絮凝剂产量及作用效果，综合筛选优质的微生物絮凝剂材料。

### 2.3.4 嗜盐古菌EPS絮凝效果

挑选发酵液、发酵上清液絮凝效果较好的菌株A279-1、A133、A829、RP-33、RM-13、RM152、A389进行EPS絮凝效果检测。经全波长紫外扫描检测发现在260–280 nm处有吸收峰，说明EPS中含有蛋白类物质。FTIR分析(图3)初步判断，7株菌的EPS在3 400–3 740  $\text{cm}^{-1}$ 处的宽缓峰以及1 640  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰分别为-OH的伸缩振动峰及弯曲峰。综合全波长紫外扫描结果，初步判断7株菌的EPS是胞外糖蛋白类物质。部分菌株产胞外聚合物透射电镜形态如图4所示，细胞表面及周边分泌有大量的颗粒状或团絮状分泌物。7株菌所产EPS(2 mg/mL)的絮凝率分别为66.58%、47.61%、62.04%、31.85%、74.38%、

89.86%、81.53%，其中 RM152、A389 菌株所产的 EPS 的絮凝效果最佳，分别达到 89.86% 和 81.53%。

### 2.3.5 嗜盐古菌 EPS 絮凝稳定特性

#### (1) EPS 发酵产量

干重法称量 EPS，菌株 A279-1、A133、A829、RP-33、RM-13、RM152、A389 的 EPS 发酵产量分别为 1.92、10.66、3.23、2.18、2.29、2.51、12.28 g/L。同时测定了相对应的菌体的发酵产量，分别为 4.45、6.867、4.55、6.68、4.51、4.01、6.09 g/L。对比菌体发酵产量，以及考虑到代谢产物在后期应用开发中相较于菌体其稳定性及可操作性方面具有优势；同时比较 7 株菌的 EPS 的絮凝率及发酵产量，选用菌株 A389 的 EPS 进行后续的絮凝稳定性检测。

#### (2) EPS 盐度稳定性

由于在高盐废水中，盐度是最关键的限制性因子，且不同类型高盐废水及处理不同工艺阶段会有盐浓度波动的现象，本研究分别检测了 0%–20% NaCl 梯度下菌株 A389 所产 EPS 的絮凝效果。菌株 A389 所产 EPS 在 15% NaCl

溶液中，1、2、3 mg/mL 三个浓度的絮凝率分别为 80.57%、81.53%、79.07%，其中 2 mg/mL 浓度的絮凝效果最好。后续采用 2 mg/mL 浓度的 EPS 进行 0%、3%、5%、8%、10%、13%、15%、18%、20% NaCl 溶液中的絮凝效果检测，其絮凝率分别为 83.95%、83.19%、85.26%、85.27%、85.95%、80.91%、81.79%、81.11%、80.64%，具有极显著差异( $P < 0.001$ )。菌株 A389

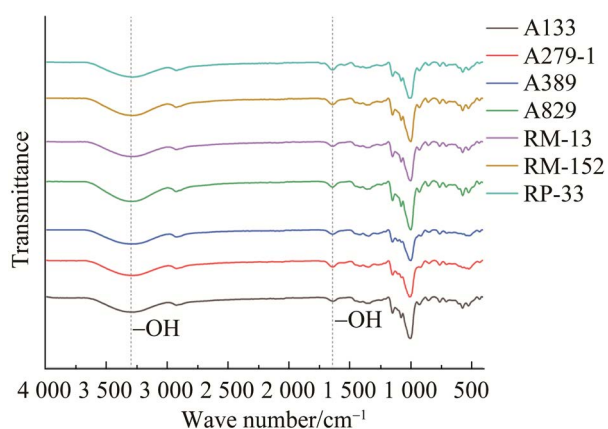


图 3 嗜盐古菌菌株所产 EPS 的 FTIR 图谱  
Figure 3 FTIR spectra of EPS produced by halophilic archaea strains.

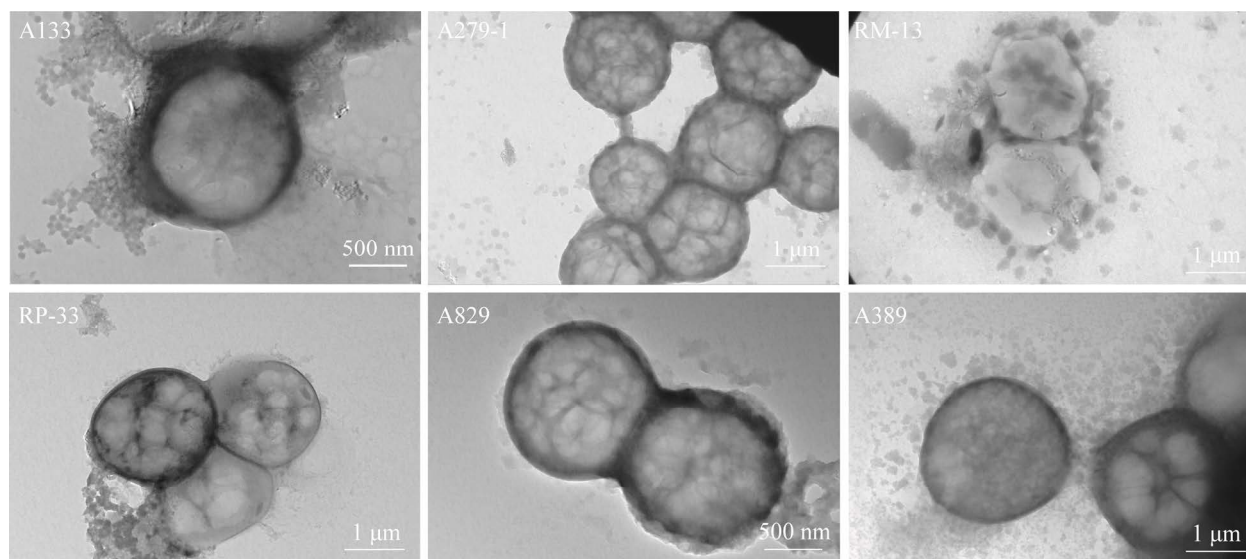


图 4 菌株及所产 EPS 透射电镜形态  
Figure 4 Transmission electron microscopy morphology of strains and their EPS.

所产 EPS 的絮凝作用具有广谱的盐度适应性, 在 0%–20% 的 NaCl 盐度范围内其絮凝率均能达到 80% 以上。PAC 化学絮凝剂在高盐条件下其絮凝效果明显下降, 在 10% NaCl 条件下, PAC 的絮凝率下降到 20.82%, 且在 15% 以上 NaCl 溶液中其絮凝率下降至 11% 以下。

### (3) EPS 的 pH 稳定性

菌株 A389 所产 EPS 在 pH 3.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、11.0 条件下的絮凝率分别为 69.87%、76.82%、75.68%、79.39%、73.80%、68.02%、36.89%, 具有极显著差异 ( $P < 0.001$ )。嗜盐古菌 A389 所产 EPS 在酸性、中性及碱性条件下具有絮凝效果, 能够维持在 68%–80% 的絮凝率, 酸性及中性条件下絮凝效果优于 PAC, 但是在碱性条件下絮凝效果弱于 PAC。对照组 PAC 在中性、碱性条件下具有絮凝效果, 且絮凝率维持在 41%–93% 之间, 碱性条件下其絮凝率明显增加, 但是在酸性条件下, 其絮凝效果下降明显, pH 3.0 时几乎为 0, pH 5.0 时只有 4.56%。

据报道, 嗜盐古菌菌株 *Halogeometricum borinquense* 菌株 A52 所产生的一种新型杂多糖蛋白, 在较广的盐浓度范围内仍然维持较高的絮凝率, 最高达 93%; 能够在 pH 3.0–10.0 条件下维持 80%–90% 的絮凝率<sup>[35]</sup>。结合本研究结果, 我们推断嗜盐古菌部分菌株所产生的 EPS 具有较好的絮凝效果, 且普遍具有广泛的盐度和 pH 适应性。综合分析, 菌株 A389 所产 EPS 的絮凝效果稳定, 与化学絮凝剂 PAC 相比具有广谱的盐度及 pH 的适应性, 更适用于处理高盐工业废水的工艺。对于后期工业应用具有重要的发展前景。高盐废水的盐度范围多集中在 5% NaCl 以上, pH 范围在 3.0–9.0 之间。在工业废水处理的阶段, 盐度可能有较大的变化, 也会伴随 pH 的波动, 对于絮凝剂稳定性的要求极为苛刻。尤其是能够处理 10% 以上的

盐浓度的生物材料的研发, 成为制约高盐工业废水处理的瓶颈。盐生微生物虽然能够耐受较高的盐浓度, 但是对于低渗条件, 菌体的稳定性及成活率会受到影响, 所以寻找稳定且高效絮凝作用的微生物絮凝剂, 是高盐工业废水处理非常好的选择。本研究筛选到菌株 A389 所产生的 EPS 具有较好的絮凝效果, 且具有广谱的盐度及 pH 的适应范围, 为后续高盐工业废水处理提供良好的研究材料。

## 3 结论

本研究从乌勇布拉克盐湖中筛选到能够产生絮凝作用的嗜盐古菌资源。菌株的发酵液、发酵上清液、菌悬液以及 EPS 的絮凝效果的检测结果表明, 嗜盐古菌具有较好的絮凝开发潜力, 尤其在高盐条件下维持较好絮凝效果方面具有优势。菌株不仅在高盐条件下絮凝效果较好, 而且在一定程度上能够耐受一定的低渗环境, 甚至在低渗条件下其絮凝效果有所增加。这对于突破高盐对菌株的限制以及在处理不同浓度的高盐废水应用方面提供了良好的菌种资源。同时结合工业应用后期工艺改进的需要, 选用菌株代谢产物会更有利于材料的回收及改造, 菌株 A389 所产的 EPS 在产量及絮凝效果方面具有优势, 且其对于盐度、pH 具有广谱稳定性。在工业应用上, EPS 常温保存, 既可直接作为生物絮凝剂, 也可包埋化处理从而进行相关固定化工艺处理。结合菌体及菌株产 EPS 的絮凝效果, 后续采用底盘细胞改造将会是更好的开发思路, 可以利用菌体细胞分解代谢污水中的有机物产生 EPS, 再进一步进行絮凝处理。因此, 嗜盐古菌及其 EPS 具有良好的絮凝效果, 在高盐废水的处理过程中具有巨大作用潜力; 本研究为攻克高盐废水处理瓶颈问题提供新的研究思路。

## 参考文献

- [1] Menkhaus TJ, Anderson J, Lane S, Waddell E. Polyelectrolyte flocculation of grain stillage for improved clarification and water recovery within bioethanol production facilities. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2280–2286.
- [2] Qiu ZM, Jiang WT, He ZJ. Post-treatment of banknote printing wastewater using polysilicate ferro-aluminum sulfate (PSFA). *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 166(2/3): 740–745.
- [3] Kurniawan SB, Abdullah SRS, Imron MF, Said NSM, Ismail N, Hasan HA, Othman AR, Purwanti IF. Challenges and opportunities of biocoagulant/bioflocculant application for drinking water and wastewater treatment and its potential for sludge recovery. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(24): 9312.
- [4] Tian XM, Shen ZQ, Han ZF, Zhou YX. The effect of extracellular polymeric substances on exogenous highly toxic compounds in biological wastewater treatment: an overview. *Bioresource Technology Reports*, 2019, 5: 28–42.
- [5] Sam S, Kucukasik F, Yenigun O, Nicolaus B, Oner ET, Yukselen MA. Flocculating performances of exopolysaccharides produced by a halophilic bacterial strain cultivated on agro-industrial waste. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1788–1794.
- [6] Al-Wasify RS, Al-Sayed AA, Saleh SM, Aboelwafa AM. Bacterial exopolysaccharides as new natural coagulants for surface water treatment. *International Journal PharmTech Research*, 2015, 8(9): 198–207.
- [7] Okaiyeto K, Nwodo UU, Mabinya LV, Okoli AS, Okoh AI. Characterization of a bioflocculant (MBF-UFH) produced by *Bacillus* sp. AEMREG7. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 12986–13003.
- [8] Gong WX, Wang SG, Sun XF, Liu XW, Yue QY, Gao BY. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4668–4674.
- [9] Li Z, Zhong S, Lei HY, Chen RW, Yu Q, Li HL. Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14): 3650–3656.
- [10] Chang WN, Liu CW, Liu HS. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochemistry*, 2009, 44(9): 955–962.
- [11] Liu WJ, Wang K, Li BZ, Yuan HL, Yang JS. Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. *Bioresource Technology*, 2010, 101(3): 1044–1048.
- [12] Yokoi H, Arima T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. Flocculation properties of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, 82(1): 84–87.
- [13] Ching YC, Redzwan G. Biological treatment of fish processing saline wastewater for reuse as liquid fertilizer. *Sustainability*, 2017, 9(7): 1062.
- [14] Li J, Yu L, Yu DS, Wang D, Zhang PY, Ji ZG. Performance and granulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating saline sulfate wastewater. *Biodegradation*, 2014, 25(1): 127–136.
- [15] Reid E, Liu XR, Judd SJ. Effect of high salinity on activated sludge characteristics and membrane permeability in an immersed membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 2006, 283(1–2): 164–171.
- [16] Maheshwari DK, Saraf M. *Halophiles*. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [17] Akapo CSO. Production and characterisation of bioflocculant produced by bacterial isolates from Richards Bay Harbour, Kwazulu Natal. University of Zululand Doctoral Dissertation, 2019.
- [18] Kumar CG, Joo HS, Kavali R, Choi JW, Chang CS. Characterization of an extracellular biopolymer flocculant from a haloalkalophilic *Bacillus* isolate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(8): 837–843.
- [19] He J, Zhen QW, Qiu N, Liu ZD, Wang BJ, Shao ZZ, Yu ZN. Medium optimization for the production of a novel bioflocculant from *Halomonas* sp. V3a' using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 2009, 100(23): 5922–5927.
- [20] Li J, Gao YY, Dong HY, Sheng GP. *Haloarchaea*, excellent candidates for removing pollutants from hypersaline wastewater. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(2): 226–239.
- [21] Wei LL, Li Y, Noguera DR, Zhao NB, Song Y, Ding J, Zhao QL, Cui FY. Adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  by extracellular polymeric substances (EPS) in different sludges: effect of EPS fractional polarity on binding mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 321: 473–483.

- [22] Liu BB, Govindan R, Muthuchamy M, Cheng S, Li XB, Ye LJ, Wang LY, Guo SX, Li WJ, Alharbi NS, M Khaled J, Kadaikunnan S. Halophilic Archaea and their extracellular polymeric compounds in the treatment of high salt wastewater containing phenol. *Chemosphere*, 2022, 294: 133732.
- [23] Shi YH, Huang JH, Zeng GM, Gu YL, Chen YN, Hu Y, Tang B, Zhou JX, Yang Y, Shi LX. Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: an overview. *Chemosphere*, 2017, 180: 396–411.
- [24] Liu BB, Rao MPN, Yin XQ, Li X, Salam N, Zhang Y, Alkhalifah DHM, Hozzein WN, Li WJ. Description of *Halegenticoccus soli* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a soil sample of Ebi Lake. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 2019, 23(5): 521–528.
- [25] Tang SK, Tian XP, Zhi XY, Cai M, Wu JY, Yang LL, Xu LH, Li WJ. *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(9): 2075–2080.
- [26] Yang XY, Yin XM, Hou J, Zhu L, Cui HL. *Halosimplex halophilum* sp. nov. and *Halosimplex salinum* sp. nov., isolated from saline soil and a salt mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2021, 71(4): 004775.
- [27] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613–1617.
- [28] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351.
- [29] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [30] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [31] Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, 1971, 20(4): 406–416.
- [32] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17(6): 368–376.
- [33] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, Kiyohara M, Hirano M, Taniguchi Y. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1994, 58(2): 428–429.
- [34] 王坤. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝性的研究. 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2015.
- [35] Chouchane H, Najjari A, Neifar M, Cherif H, Askri R, Naili F, Ouzari HI, Cherif A. Unravelling the characteristics of a heteropolysaccharide-protein from an Haloarchaeal strain with flocculation effectiveness in heavy metals and dyes removal. *Environmental Technology*, 2020, 41(17): 2180–2195.

刘冰冰, 博士, 南阳理工学院生物与化学工程学院副教授, 硕士生导师。研究方向: 极端环境微生物。在嗜盐古菌资源及生态功能、高盐废水功能微生物及材料开发、白酒酿造微生物资源及产物、植物内生菌资源及应用等方面取得系列研究成果。先后主持了国家自然科学基金青年基金、广东省自然科学基金、河南省科技攻关计划项目、博士后基金特别资助项目、博士后基金面上一等资助项目等研究课题。发表 SCI 及 EI 论文 15 篇。荣获“河南省五一劳动奖章”“河南省技术能手”“河南省文明教师”等荣誉称号。

