

分类号         X703.1        

学校代码         10495        

UDC         620        

学    号         0815143005        

# 武汉纺织大学

## 硕士学位论文

### 絮凝剂产生菌及其处理模拟印染废水研究

作者姓名:         李锋        

指导教师:         黄运平 蔡亚君        

学科门类:         工学        

专    业:         环境工程        

研究方向:         水处理微生物        

完成日期:         二零一一年五月

*Wuhan Textile University*  
M. E. Dissertation

**Flocculant-producing Bacteria and Its' Study on  
Simulating Printing and Dyeing Wastewater  
Treatment**

By

LI FENG

Directed by

Professor HUANG YUN PING CAI YA JUN

May 2011

## 独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：                    签字日期：  年    月    日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 **武汉纺织大学** 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 **武汉纺织大学** 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：                    导师签名：  
签字日期：  年    月    日            签字日期：  年    月    日

论文题目：絮凝剂产生菌及其处理模拟印染废水研究

专业：环境工程

硕士生：李锋

指导老师：黄运平 蔡亚君

## 摘要

纺织印染行业是我国重要的支柱型民生产业，同时又是耗水耗能大户，其 COD 排放量在我国 39 个行业中位居第二，废水排放量为第三。纺织印染废水有机污染物含量高、色度深、碱性大、水质变化大，一直是难处理的工业废水之一。而随着国家对于废水排放标准的提高，对于新型高效印染废水处理技术的研究更是成为关系到其行业可持续发展的关键问题。

絮凝沉淀是污水处理中常用的技术，对于印染废水的处理更是必不可少的部分，但传统的化学絮凝剂，因对人类健康和环境带来不利影响的缺点，已不适用于目前的废水提标排放处理。微生物絮凝剂作为一种新型的水处理剂，具有安全无毒、无二次污染、适应范围广等优点，是目前各国大力研究的热点。本论文旨在开发出一种高效微生物絮凝剂，并将其应用于印染废水处理中。

(1) 通过筛选分离得到 9 株具有絮凝活性的细菌，其中絮凝效果最好的菌株 BF-0 对高岭土悬浮液的絮凝率可达到 90 % 以上，结合形态学、生理生化及 16S rDNA 鉴定其为解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)，后续对其进行重点研究。

(2) 对产凝菌 BF-0 的絮凝成分进行了分析，其絮凝成分主要为多糖 (63 %)，还有少量核酸；利用单因素和正交实验对产絮凝剂菌 BF-0 的培养条件进行优化研究，实验室 BF-0 发酵产絮凝剂的最佳工艺确定为：培养基初始 pH=7.0，培养温度为 37 °C，摇床转速 100 r/min，菌株 BF-0 产絮凝剂的最佳碳源为淀粉，最佳氮源为氯化铵，适宜的碳氮比范围为 20~40。正交试验得出最佳培养基的组成：淀粉 15 g/L，氯化铵 1.0 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L，NaCl 0.1 g/L，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L，pH 7.0。在该工艺条件下，菌 BF-0 可获得较高的絮凝剂产量，利用 1 L 发酵培养基可发酵产 BF-0 絮凝剂 5.2 g。

(3) 对 BF-0 菌株发酵以后提取得到的絮凝剂及与硫酸铁复配得到的复合絮凝剂对活性艳红 X-3B 模拟染料废水进行了絮凝脱色研究，结果表明絮凝剂 BF-0 与硫酸铁复配的复合絮凝剂具有较好的脱色效果，絮凝剂 BF-0 能增强硫酸铁对活性艳红 X-3B 的脱色效果。当 1 g/L 的絮凝剂 BF-0 投加比为 0.5 mL/150 mL、硫酸铁(5%)投加比为 0.4 mL/150 mL 时，对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果最好，脱色率最高，达 53.9 %。

本论文研究结果表明微生物絮凝剂 BF-0 在印染废水脱色处理中具有较好的开发和

应用价值。

**关键词：**微生物絮凝剂；絮凝剂产生菌；*Bacillus amyloliquefaciens* BF-0；培养条件；BF-0絮凝剂成分；复合絮凝剂；模拟印染废水

**研究类型：**应用基础

Subject: Flocculant-producing Bacteria and Its' Study on Printing and Dyeing Wastewater Treatment

Specialty: Environment and Engineering

Name: LI FENG

Instructor: HUANG YUN PING CAI YA JUN

## ABSTRACT

Textile printing and dyeing industry is an important pillar of livelihood industries in China, but it is also consuming too much energy and water, the COD emission of 39 industries in our country ranks second, still the volume of wastewater discharged is thirdly. Textile printing and dyeing wastewater with a lot of organic pollutant, color depth, alkaline, changeably water quality, always been a tricky one of industrial wastewater. With the improvement of national wastewater discharge standards, the research of new and high technology on dyeing wastewater treatment becomes key issues to sustainable development of industry.

Coagulation is a common technology in wastewater treatment, especially in the printing and dyeing wastewater treatment, and the traditional chemical flocculants are not apply to current elevating emissions standards due to its adverse impact on the human health and the environment. As a new water treatment agent, microbial flocculants have many advantages, such as non-toxic, no secondary pollution, and widely active spectrum, which become the focus of research in many countries. In this research, we try to develop a new efficient flocculant and apply it into dyeing wastewater treatment.

Firstly, 9 bioflocculant-producing strains were screened, of which strain BF-0 has the best flocculating activity. The best flocculation ratio of strain BF-0 against kaolin suspension was more than 90 %. Strain BF-0 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, and then, the research would focus on it.

Secondly, the main components of flocculants produced by strain BF-0 were analyzed as polysaccharides and nucleic acids. And in this research, the optimum culturing conditions for flocculant-producing of strain BF-0 was identified as initial pH = 7.0, 37 °C, 100 r/min, starch as carbon source, ammonium chloride as nitrogen source, and C/N was in the range of 20 to 40. The optimum component proportion of culture medium(g/L) of BF-0 was identified as starch 15, ammonium chloride 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5, NaCl 0.1, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0.2, pH 7.0 by the orthogonal test. Under these conditions, strain BF-0 yielded 5.2 g flocculants from 1 L the fermentation medium.

Finally, BF-0 flocculant composite with Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> achieved better decolorization ratio against simulated dye wastewater of reactive red X-3B than BF-0 flocculant or Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> separately. When BF-0(1 g/L) was 0.5 mL/150 mL and Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(5 %) was 0.4 mL/150 mL, gained the best decolorization ratio to simulated dye wastewater, which was 53.9 %.

In this study, the data showed that the microbial flocculant BF-0 has a good value of development and application in treatment of printing and dyeing wastewater.

**Key words:** microbial flocculants; flocculants producing strains; *Bacillus amyloliquefaciens*

BF-0; culture conditions; component of BF-0 flocculants; complex flocculants; stimulating

printing and dyeing wastewater

**Thesis:** Application Basic Research

---

---

# 目 录

<b>1 绪论</b> .....	1
1.1 印染废水概况 .....	2
1.1.1 印染废水的来源 .....	2
1.1.2 印染废水的特性和危害 .....	2
1.2 微生物絮凝剂概况 .....	3
1.2.1 微生物絮凝剂的种类和组成 .....	3
1.2.2 微生物絮凝剂的特点 .....	3
1.2.3 产絮凝剂微生物 .....	4
1.2.4 微生物絮凝剂的絮凝机理 .....	5
1.3 微生物絮凝剂在印染废水处理中的应用 .....	6
1.4 微生物絮凝剂在处理印染废水研究中存在的问题 .....	7
1.5 研究的主要内容及意义 .....	7
<b>2 微生物絮凝剂产生菌的筛选分离及鉴定</b> .....	9
2.1 材料和方法 .....	10
2.1.1 材料 .....	10
2.1.2 方法 .....	11
2.2 结果与讨论 .....	13
2.2.1 絮凝剂产生菌的筛选结果 .....	13
2.2.2 絮凝剂产生菌的鉴定结果 .....	13
2.3 本章小结 .....	19
<b>3 菌株 BF-0 培养条件的优化研究</b> .....	20
3.1 材料与方法 .....	20
3.1.1 实验菌种 .....	20
3.1.2 试剂 .....	21
3.1.3 仪器 .....	21
3.1.4 培养基 .....	21
3.1.5 絮凝活性测定方法 .....	21
3.1.6 BF-0 菌体生长与其絮凝活性的关系研究 .....	21
3.1.7 BF-0 产絮凝剂培养条件研究 .....	21
3.2 结果与讨论 .....	22



3.2.1 菌株 BF-0 生长曲线与絮凝活性测定	22
3.2.2 絮凝发酵培养条件研究	23
3.3 本章小结	29
<b>4 絮凝剂 BF-0 成分分析及絮凝机理初探</b>	<b>30</b>
4.1 材料与方法	30
4.1.1 实验菌种	30
4.1.2 培养基	30
4.1.3 絮凝活性测定方法	30
4.1.4 絮凝剂的发酵	30
4.1.5 絮凝活性物质的分布	31
4.1.6 絮凝剂的制备	31
4.1.7 絮凝剂成分分析	31
4.1.8 絮凝剂和高岭土结合键的检测	32
4.2 结果和讨论	32
4.2.1 絮凝活性物质分布	32
4.2.2 絮凝剂分离提纯结果	33
4.2.3 絮凝剂成分分析	33
4.2.4 絮凝剂和高岭土结合键的检测结果	34
4.3 本章小结	35
<b>5 BF-0 絮凝剂与硫酸铁复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验</b>	<b>36</b>
5.1 材料与方法	36
5.1.1 实验材料	36
5.1.2 实验装置	36
5.1.3 絮凝活性测定方法	36
5.2 X-3B 模拟废水处理试验	37
5.2.1 BF-0 絮凝剂单独处理 X-3B 模拟废水试验	37
5.2.2 硫酸铁、硫酸铁与絮凝剂复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验	37
5.3 结果与讨论	37
5.3.1 BF-0 絮凝剂单独处理 X-3B 模拟废水试验结果	37
5.3.2 硫酸铁、硫酸铁与絮凝剂复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验结果	38
5.4 本章小结	39
<b>6 结论与展望</b>	<b>41</b>
6.1 全文总结	41
6.2 工作展望	42

目录

---

---

致 谢 .....	43
参考文献 .....	44
附 录 .....	47

# 1 绪论

随着纺织印染行业的迅速发展,各种复杂的染料中间体,新型印染助剂和整理剂的开发使用,使得印染废水的成分更加复杂化,COD 进一步增加,可生化性不断减低,导致活性污泥在印染废水中生长并驯化困难。新型染料的开发使用,加剧了印染废水脱色难的问题,对印染废水处理技术提出了严峻的挑战,因此急需开发新的印染废水处理工艺解决以上难题。

絮凝沉淀是治理印染废水时经常要用到的方法,通过絮凝沉淀的预处理可以去除很大一部分的有机物质和色度,减轻后续处理工艺的负担。絮凝沉淀中的絮凝剂包括化学絮凝剂和微生物絮凝剂两大类,其中常用的化学絮凝剂主要有无机高分子絮凝剂和有机高分子絮凝剂。无机高分子絮凝剂一般用量较大,且添加到水体中的金属盐类会对人体健康造成不利的影 响,对环境产生二次污染;而有机高分子絮凝剂在环境中的残留物不易被自然降解,同时聚丙烯酰胺的单体有神经毒性和“三致”效应,因此这两类絮凝剂的使用都会对人类健康和生态环境产生不利的影 响。而微生物絮凝剂则是一种安全、可降解并对人体健康和环境无危害的新型水处理絮凝剂。

微生物絮凝剂(Bioflocculant)就是利用生物技术,从微生物或其分泌物中提取、纯化而获得的一种安全、高效、且能自然降解的新型水处理剂<sup>[1]</sup>。与传统的絮凝剂相比,微生物絮凝剂种类繁多;絮凝过程高效无毒;对环境无污染等特点。同时,微生物絮凝剂絮凝后的残渣可以被生物降解,可以消除二次污染。

日本学者首先于上世纪 70 年代在研究酞酸酯生物降解的过程中发现了具有絮凝作用的微生物培养液<sup>[2]</sup>。此后,关于微生物絮凝剂的报道逐步增多。有报道用 *Alcaligenes latus* 生产的微生物絮凝剂和 1.5 mL 1 % 的聚氨基葡萄糖处理某造纸厂废水时,可在废水中看见明显的絮体,脱色率达 94.6 %。Ryuichiro Kurane 等人采用红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) S-1 菌株,发酵生产絮凝剂 NOC-1,并且把它用于畜产废水处理、膨胀污泥的处理、砖场生产废水处理以及废水的脱色处理获得了较好的效果。由此认识到,生物絮凝剂在印染废水处理方面巨大的发展潜力。

鉴于微生物絮凝无毒、无二次污染等优势,以及作为印染废水脱色剂的巨大发展潜力。本实验进行了一系列的研究,旨在开发出一种能应用于印染废水处理工艺中的新型微生物絮凝剂。

## 1.1 印染废水概况

### 1.1.1 印染废水的来源

印染废水是印染厂加工棉、麻、化学纤维及其混纺产品过程中排出的废水。印染包括退浆、煮炼、漂白、丝光、染色、印花、整理等几个工序。每个工序在生产的过程中都有废水产生，分别排出退浆废水、煮炼废水、漂白废水、丝光废水、染色废水、印花废水和皂液废水、整理废水。印染废水通常是指上述各类废水的综合废水。

印染废水的水质随加工纤维的种类及各工序工艺的不同存在较大的差异。印染废水中的主要污染物来源：退浆废水中的浆料、纤维及纤维降解产物；煮炼废水和丝光废水中的碱液、纤维屑和纤维表面的杂质；染色废水中的染料和染色助剂；印花废水中的印花浆料和助剂；整理废水中的整理剂和助剂。

### 1.1.2 印染废水的特性和危害

就印染废水而言，其含有的主要污染物为有机物，并且随加工的纤维种类和加工工艺、及各工序采用的材料的不同而异。一般情况下，印染废水水质 pH 值为 6~10，COD 为 400~1000 mg/L，BOD 为 100~400 mg/L，SS 为 100~200 mg/L，色度为 100~500 倍<sup>[3]</sup>。从废水处理技术角度看，印染废水是一种组成复杂的混合废水，主要有以下特点：水量大、COD 高、而 BOD/COD 比值小、可生化性差、色度高<sup>[4]</sup>。

(1) 水量大：据统计，2003 年纺织行业废水排放总量为  $1.4 \times 10^6$  千吨，约占全国工业废水排放量的 6%。其中印染废水约占纺织印染业废水的 80%。据不完全统计我国日排放印染废水达 3000~4000 千吨<sup>[5]</sup>。

(2) COD 高：据统计，2003 年纺织行业产生废水 COD 总量在工业行业领域排第四位。近年来，随着印染业的发展，纺织行业产生废水 COD 总量稳步上升，目前仅落后造纸行业，占据第二位。随着 PVA 浆料、人造丝碱解物和新型助剂等难生化降解有机物大量使用而进入印染废水，印染废水的 COD 浓度由原有的数百上升为 2000~3000 mg/L，新型的印染工艺的发展也为印染废水 COD 处理增加了难度。如近年来风行的碱减量工艺，由于纤维中大量的对苯二甲酸被溶出，导致 COD 含量大幅增加，其废水中 COD 可达 20000~80000 mg/L；同样原理，海岛丝工艺的废水中 COD 高达 20000~100000 mg/L。

(3) BOD<sub>5</sub>/COD 比值小、可生化性差：新型工艺中大量采用了 PVA 浆料和新型的印染助剂，在印染工作完成后随废水排出，使得印染废水中的 COD 迅速增加，导致 BOD<sub>5</sub>/COD 则由原来的 0.4~0.5 下降到 0.2 左右。对印染废水的生物处理提出了严峻的挑战。需要人为的增加前处理来提高印染废水的 BOD<sub>5</sub>/COD 比值及可生化性，这也无

形的增加了印染废水处理的成本和难度。

(4) 色度高：印染废水中的有机物主要是一些浆料、染料分子、染色助剂和染色整理剂。随废水排出的染料是引起色度高的主要原因，染料分子主要以芳烃和杂环为母体，并带有显色基团和极性基团。这些发色基团都为不饱和原子团，能吸收可见光。印染废水中的污染组分浆料、染料、助剂等本身毒性不大。但是印染废水的色度是对水生生态系统是致命的，染料随废水进入水体，降低水体的透明度，并吸收进入水体的光线，影响水生植物的生长，降低了水体中溶解氧的含量，导致水生动物的生长困难。染料的可生物降解性差，使得进入环境中的染料很难通过水体自净的方式去除。

## 1.2 微生物絮凝剂概况

### 1.2.1 微生物絮凝剂的种类和组成

微生物絮凝剂按照来源主要可分为 3 类<sup>[6]</sup>：①微生物细胞作为絮凝剂。此类微生物有的菌体细胞表面附有荚膜层或粘液层，有的菌体表面具有菌毛和纤毛。能够吸附溶液中的有机物和悬浮颗粒。②以微生物细胞壁的提取物作为絮凝剂，如酵母细胞壁的葡聚糖、蛋白质、甘露聚糖和 N-乙酰葡萄糖胺等。③微生物细胞代谢产物作为絮凝剂，微生物细胞的代谢产物有胞外和胞内两种类型。K. Crabtree<sup>[7]</sup>等人对菌胶团细菌 *Zoogloear amigera* 的研究，证实胞内聚合物 PHB 具有絮凝活性；而目前获得的微生物絮凝剂则大部分为微生物细胞和微生物细胞的胞外代谢产物。

从化学组成上来看，目前已知的微生物絮凝剂大多为多糖类，或糖类和蛋白质的复合物。也有少数微生物絮凝剂为蛋白质、脂类、DNA 等其他生物大分子。如微生物絮凝剂 NOC-1 的主要成分为蛋白质<sup>[8,9]</sup>。

### 1.2.2 微生物絮凝剂的特点

与传统的有机合成高分子絮凝和无机絮凝剂相比，微生物絮凝剂具有明显的优势和特点。

(1) 适应范围广：微生物絮凝剂不仅可以用于印染废水、造纸废水等工业废水的处理，也可以应用于污泥浓缩、净水处理、食品发酵等方面。微生物絮凝剂对悬浮物去除效果好；对印染废水、造纸废水等有色废水具有良好的脱色效果；微生物絮凝剂对含油废水中的油和悬浮物吸附效果较好。用 *Alcaligenes latus* 培养物可以很容易将棕榈酸从其乳化液中分离出来，在液面形成清楚可见的油滴，使废水下层清夜 COD 降低 48%。这是用其他无机和有机絮凝剂都很难达到的效果。

(2) 安全无毒：微生物絮凝剂多为微生物菌体和微生物代谢产物。属天然高分子絮凝剂。其化学成分多为糖类、糖蛋白、蛋白质、核酸等。相关的毒理学试验证实微生

物絮凝的安全性，用 *R.erythropolis* 的细胞及培养液注射小鼠，均无致病现象。

(3) 无二次污染：目前使用较多的无机絮凝剂铝盐和铁盐，在进行水处理应用过程中，都会造成二次污染。采用铝盐絮凝剂进行水处理时  $Al^{3+}$  大量进入水体，给水生动物带来了危害，同时水体中  $Al^{3+}$  浓度也和人类的老年痴呆症呈正相关关系。采用铁盐絮凝剂进行水处理时容易残留铁离子，使被处理水带有颜色，影响水质。而常用的有机高分子絮凝剂聚丙烯酰胺，其单体具有神经毒性。微生物絮凝剂多为微生物菌体和微生物代谢产物。属天然高分子絮凝剂。主要成份为多糖、蛋白质、核酸等，它安全无毒，易被微生物降解，且絮凝后的残渣可被生物降解，对环境无害。

### 1.2.3 产絮凝剂微生物

早在 1935 年，Butterfied 就从活性污泥中分离筛选到了能够合成絮凝剂的菌种，但是对于生物絮凝剂的深入研究始于 1976 年 J. Naka-mura 等人的对酱油曲霉研究工作<sup>[10,11,12]</sup>。此后的研究发现能够产生絮凝剂的微生物种类很多，包括细菌、霉菌、放线菌及酵母等，有文献报道的絮凝微生物种类已达 50 种以上<sup>[13,14]</sup>，见表 1.1。

表 1.1 产絮凝剂微生物物种

Tab1.1 Microbial species with flocculation

产絮凝剂微生物	产絮凝剂微生物
细菌	真菌
粪产碱菌属 ( <i>Alcaligenes faecalis</i> )	酱油曲霉 ( <i>Aspergillus sojae</i> )
协腹产碱杆菌 ( <i>Alcaligenes latus</i> )	拟青霉属 ( <i>Paecilomyces</i> sp.)
渴望德莱菌 ( <i>Alcaligenes cupidus</i> )	赫曲霉 ( <i>Aspergillus ochraceus</i> )
土壤杆菌属 ( <i>Agrobacterium</i> sp.)	寄生曲霉 ( <i>Aspergillus parasiticus</i> )
项圈蓝细菌 ( <i>Anabaenopsis circularis</i> )	赤红曲霉 ( <i>Monascus anka</i> )
不动菌属 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	白地霉 ( <i>Georrichum candidum</i> )
芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus</i> sp.)	青霉菌 ( <i>Eupenicillium crustaceus</i> )
嗜虫短杆菌	棕腐真菌 ( <i>Brown rot fungi</i> )
( <i>Brevibacterium insectiphilum</i> )	褐腐真菌 ( <i>Brown rot fungi</i> )
棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium brevicale</i> )	白腐真菌 ( <i>White rot fungi</i> )
暗色孢属 ( <i>Dematium</i> sp.)	汉逊酵母 ( <i>Hansenula anomala</i> )
产黄菌属 ( <i>Flavobacterium</i> sp.)	产乳糖酶酵母 ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> )
光环嗜碱杆菌 ( <i>Haloalkalophilic Bacillus</i> )	栗酒裂殖酵母 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> )
克雷伯氏菌属 ( <i>Klebsiella</i> sp.)	啤酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
栖冷克吕沃菌 ( <i>K. cryocrescens</i> )	单倍体糖化酵母 ( <i>Saccharomyces diataticus</i> )
发酵乳杆菌 ( <i>Lactobacillus fermentum</i> )	粪壳属 ( <i>Sordaria fimicola</i> )
草分枝杆菌属 ( <i>Mycobacterium phlei</i> )	
厄式菌属 ( <i>Oerskwivia</i> sp.)	

表 1.1 (续)

产絮凝剂微生物	产絮凝剂微生物
细菌	放线菌
假单胞菌属 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	酒红链霉菌 ( <i>Streptomyces vinaceus</i> )
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	诺卡菌属 ( <i>Nocardia restrirea</i> )
荧光假单胞菌 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	灰色链霉菌 ( <i>Streptomyces griseus</i> )
产碱假单胞菌	藻类
( <i>Pseudomonas pseudocalcaligenes</i> )	<i>Chlamydomonas Mexicana</i>
粪产假单胞菌 ( <i>Pseudomonas faecalic</i> )	<i>Calothrix desertica</i>
多粘类芽孢杆菌	<i>Phorimidium</i> sp.
( <i>Paenibacillus polymyxa</i> )	<i>Arcuadendron</i> sp.
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	<i>Circinella sydowi</i>
红平红球菌 ( <i>Rhodococcus erythropolis</i> )	颤藻属 ( <i>Oscillatoria</i> sp.)
生枝动胶菌 ( <i>Zoogloea ramigera</i> )	

#### 1.2.4 微生物絮凝剂的絮凝机理

与胶体物质清晰的絮凝机理不同的是，微生物絮凝剂的作用机理至今仍然没有完全明确，对此国内外学者先后提出过很多学说。

##### (1) “桥联机理”

对于游离于发酵液中的胞外絮凝剂的絮凝机理，目前普遍认为：微生物絮凝剂的絮凝过程是吸附架桥、电荷中和及卷扫等物理化学反应共同作用的结果，该学说称为“桥联机理”。

吸附架桥作用：微生物絮凝剂借助氢键、分子作用力和离子键，同时交联多个胶体颗粒，在胶体颗粒间产生连桥，形成一张巨大的网状结构絮凝沉降下来。如朱富坤、刘彬彬<sup>[15]</sup>等研究发现微生物絮凝剂 PF-2 的絮凝机制即为 PF-2 与高岭土颗粒通过  $\text{Ca}^{2+}$  以离子键形式连桥而絮凝沉淀。

电中和作用：溶液中的胶体颗粒与电解质或絮凝剂表面带的相反电荷发生中和，减少静电排斥，促使胶体颗粒间凝聚而沉降。

卷扫与网捕：由联桥电中和作用产生的絮网，在沉降的过程中迅速卷扫、网捕水中胶体颗粒。

R1 艾克斯则将絮凝剂的架桥-絮凝反应过程归结为 3 个阶段：①聚合物在液相中分散；②聚合物于界面处吸附；③-a 界面处吸附的聚合物压缩而产生保护作用或“胶溶作用”；④-b 部分覆有聚合物的颗粒相互碰撞，形成架桥。其中，③-a 和④-b 互相竞争，二者竞争的结果取决于絮凝剂的浓度。当溶液中聚合物浓度高时，会发生胶溶作用，以致无法实现架桥。艾克斯的架桥絮凝反应过程从机理的角度对“絮凝剂的最适浓度”问

题作出了解释。

### (2) “菌体外纤维素纤丝”学说<sup>[16]</sup>

“菌体外纤维素纤丝”学说则主要是针对纤维素类絮凝剂的絮凝机理提出的，由于部分引起絮凝的产生菌体外有纤丝，因而该学说认为是由于胞外纤丝聚合形成絮凝物。

### (3) “类外源絮凝素”假说<sup>[17]</sup>

“类外源絮凝素”假说很好地解释了酵母菌的絮凝机理：絮凝酵母细胞壁上的特定表面蛋白与其它酵母细胞表面的甘露糖残基之间的专一性结合引起絮凝；而非絮凝酵母之间的这种专一性结合很弱，故无絮凝效果。

对非游离态生物絮凝剂的作用机理“类外源絮凝素”假说和“菌体外纤维素纤丝”假说作出了合理解释。

此外，还有 Butterfield 粘质假说、“病毒”假说、Butterfield 粘质假说、离子键、氢键键桥学说、离散细胞和伸展桥键之间的三维基质模型假说等学说<sup>[18]</sup>。从微生物絮凝剂的多样性以及表现出的絮凝范围、广谱性来看，絮凝是多种物理化学作用复杂交互形成的结果。所以为了更好地解释其絮凝机理，需要对特定絮凝剂和胶体颗粒的组成、结构、电荷、构象及各种反应条件对絮凝活性的影响进行更深入的研究。

## 1.3 微生物絮凝剂在印染废水处理中的应用

印染废水由于染料和中间体品种多，类别复杂，包括活性、还原、酸碱性等各种类型的染料都混合在废水中，COD 高、而 BOD/COD 比值小、可生化性差，对环境危害很大，难于处理。而新型 PVA 浆料、人造丝碱解物和新型助剂等的使用，也对传统的印染废水处理技术提出了更加严重的挑战<sup>[19,20]</sup>。随着低碳经济时代的到来以及国家对环境保护的日益重视，印染行业作为我国典型的重污染型行业，废水排放的标准也在逐渐提高。目前国内大部分印染企业为提高 COD 去除率，通常采用在原有传统的絮凝（化学絮凝剂）处理+生化处理工艺的基础上，增加絮凝和生化反应时间，即所谓“生化再生化”、“絮凝再絮凝”，导致污水处理工程占地面积大，流程长，工程费用高，但由于化学絮凝剂大量使用、其中的金属离子会造成二次污染且降低水体的可生化性，最终的处理效果仍难令人满意。

生物絮凝剂由于相对于化学絮凝剂来说所具有的一些显著的优点，目前在生活污水的处理中得到广泛应用，而在印染废水的处理中的应用则大多还处于实验室研究阶段。目前国外利用生物絮凝剂处理印染废水方面的研究相对较少，主要研究也是围绕产絮凝剂菌的筛选分离、絮凝剂成分分析、絮凝剂的絮凝特性研究等方面开展。1986 年，Ryuichiro Kurane 等<sup>[21]</sup>人采用从自然界分离出的红平红球菌（*Rhodococcus erythropolis*）的 S-1 菌株，发酵产絮凝剂 NOC-1，并将它用于畜产废水处理以及废水的脱色处理，获



得了良好的效果。在深入研究 NOC-1 和酱油曲霉的同时,其他学者也在积极的开发新型微生物絮凝剂。此外,韩国的 Kwon G. S.、Kim Young-Jun 等人,以色列的 N.Levy 等<sup>[22]</sup>以及德国的 P.Reinhard 等人也对微生物絮凝剂进行了详细的研究,目前已发现并获得多株具有产絮凝剂活性的微生物。R. Kurane 发现以 1 %的聚氨基葡萄糖为助凝剂时,*Alcaligenes latus B-16* 产生的絮凝剂对化妆品厂排放的蓝色废水具有良好的脱色效果,脱色率可达 94.6 %<sup>[23]</sup>。

目前,国内则主要是围绕微生物絮凝剂处理印染废水的应用方面开展研究,且发现许多微生物絮凝剂对某些印染废水的脱色和 COD<sub>Cr</sub> 的去除都具有较好的效果。张志强,林波<sup>[24,25]</sup>对菌株 BAFRT4 和菌株 CYGS1 的复合菌群利用啤酒废水进行发酵培养,制得的微生物絮凝剂对靛蓝印染废水有良好的脱色及 COD<sub>Cr</sub> 去除效果,当 pH 调节至 8.5 时脱色率最高可达 87.6 %、COD<sub>Cr</sub> 去除率达 79.2 %。李风琴等<sup>[26]</sup>利用微生物絮凝剂 MHXGS2 处理靛蓝印染废水,在最佳工艺条件下脱色率可达 96.5 %。周本军<sup>[27]</sup>利用微生物絮凝剂 MNb-1 处理靛蓝废水,在最佳条件下脱色率可达 88.5 %。柴晓利等<sup>[28]</sup>筛选到两株对染料废水具有明显脱色效果(达 91 %)的絮凝剂产生菌,均属氮单胞菌属。刘晖等<sup>[29]</sup>获得由青霉菌 HHE-P7 产生的微生物絮凝剂,其处理染料废水时絮凝效率可达 85 %以上。黄惠莉等<sup>[30]</sup>筛选出对印染废水具有良好脱色活性的混合菌 A,从中分离出的单菌 N 和 F 对印染废水的脱色率均可达 80 %以上。

#### 1.4 微生物絮凝剂在处理印染废水研究中存在的问题

伴随着对微生物絮凝剂的深入研究,微生物絮凝剂取代或与传统的无机高分子絮凝剂和合成有机高分子絮凝剂联用将成为一种趋势。虽然微生物絮凝剂具有种类多、高效、安全、同时对印染废水最佳的脱色和 COD<sub>Cr</sub> 去除效果大多在 pH 为碱性条件下获得、降低了印染废水由于酸碱度调节带来的处理成本等优势。但关于微生物絮凝剂方面的研究还存在较多的问题:如发酵成本较高;絮凝机理不明;絮凝剂产生菌产凝功能基因研究较少;在印染废水处理方面,特定的 MBF 只对某类印染废水或某几种染料废水的处理效果较好,等。如庄源益等<sup>[31]</sup>研究了 NAT 型生物絮凝剂对几种典型染料模拟废水,酸性湖蓝 A、活性艳蓝 NK-R、直接深棕 M、酸性品蓝 G、直接黑、直接耐晒蓝 B2RL,的处理效果,发现仅对直接黑溶液具有较好的絮凝率,为 60 %,而对其他染料模拟废水的絮凝效果较差。

#### 1.5 研究的主要内容及意义

综上所述,微生物絮凝剂在印染废水处理领域具有巨大的研究价值,因此本研究从以下几个方面进行了探索:(1) 高效、广谱的絮凝剂产生菌的筛选、分离和性质鉴定。(2) 利用高浓度含氮有机废水及廉价原料进行了微生物絮凝剂制备的工艺研究。通过

廉价原料替代培养，获得高效的低成本絮凝剂生产工艺，降低生物絮凝剂的生产成本并实现资源的优化利用。(3) 对所得到的微生物絮凝剂开展印染废水处理的实际应用研究，并研制微生物絮凝剂与其它絮凝剂的复合品，做到优势互补，增强效能，解决用生物絮凝剂进行单一处理 COD、BOD 去除率差的难题。

## 2 微生物絮凝剂产生菌的筛选分离及鉴定

目前已研究发现具有产絮凝剂特性的微生物种类很多，包括细菌、真菌、霉菌、放线菌、藻类等。研究较多的有酱油曲霉、红平红球菌、芽孢杆菌等，而且日本研究获得的红平红球菌，该菌产的絮凝剂 NOC-1 已广泛应用于多种废水处理，并取得了良好的效果。

通常微生物絮凝剂产生菌可通过以下几种方法获得：

(1) 自然选育：目前，微生物絮凝剂产生菌广泛的分布于大自然的水和土壤中，土壤、活性污泥和污水都是筛选微生物絮凝剂产生菌的常用样品。目前筛选到的微生物絮凝剂产生菌大多来自土壤、活性污泥。土壤是最适合微生物生长的环境，它含有微生物生长的各种营养物质，并具有保证微生物进行生长繁殖等生命活动的各种条件。它是天然的微生物资源库。而活性污泥本身就是一个由细菌、真菌、放线菌、原生动物等组成微生态群体。

(2) 从已有的菌株中选种：①可以从实验室中已有的菌株中筛选具有产絮凝剂活性的菌种。②直接从菌种保藏中心购买已有文献报道的具有产絮凝剂性能的菌株。③从含有大量微生物的微生物制剂中筛选具有产絮凝剂性能的菌株。

(3) 人工诱变育种：人为的利用诱变剂处理微生物，使其发生突变，并对突变菌株进行筛选来获得稳定的高效的絮凝剂产生菌。

微生物絮凝剂产生菌一般的筛选过程：取样：取少量的土壤或者活性污泥。富集：将取来的土壤或者活性污泥样品稀释后，于富集培养基中进行富集培养，富集培养基需根据我们需要筛选菌株的种类或者直接用产凝培养基进行富集培养。分离纯化：采用涂布平板或平板划线的方法分离出产絮凝剂纯种。复筛：经过 5 次以上的传代培养和反复筛选，确定所获得的絮凝剂产生菌为絮凝活性稳定的纯种。保藏：采用冷冻甘油法、低温斜面法、沙土管法等方法对所获得的高效产絮凝剂菌株进行保藏。

本实验取土壤、污泥及长期放置后已表现出絮凝脱色效果的印染废水，用选择性富集培养的方法从中分离培养出对其具有絮凝脱色活性的微生物。同时对产絮凝剂菌株进行形态学、生理生化特性以及 16S rDNA 序列的相似性比较等方法鉴定菌株的属种，确定其系统发育关系，以便进一步研究。

## 2.1 材料和方法

### 2.1.1 材料

#### (1) 样品来源

用于菌种筛选的样品来源见下表 2.1。

#### (2) 培养基

分离培养基：牛肉膏 3 g，蛋白胨 10 g，NaCl 5 g，蒸馏水 1000 mL，pH 自然。

分离固体培养基：在液体分离培养基中加入 1.5 %~2.0 %的琼脂。

发酵培养基：葡萄糖 20 g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g，尿素 0.5 g，酵母膏 0.5 g，NaCl 0.1 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g，H<sub>2</sub>O 1000 mL，pH 7.0。

#### (3) 16S rDNA 分析实验所用试剂

STE buffer: 10 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5; 10 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA。

TE buffer: 242g Tris-Base, 加入 57.1 ml 的冰乙酸 (17.4 mol/L), 200ml 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 溶解后定量到 1 L。

Tris 碱, HCL, NaCl, EDTA, SDS, 饱和 Tris 酚, 乙醇: 国产分析纯。

蛋白酶 K: 参照《分子克隆实验指南》精编版 (2008) [32] 配制 10 mg/ml 储存液, -20 °C 保存。

RNA 水解酶 (RNaseA): 参照《分子克隆实验指南》精编版 (2008) [32] 配制 10 mg/ml 储存液, -20 °C 保存。

溶菌酶: 宝生物工程 (大连) 有限公司。

DNA 分子量标准: New England Biolabs 或 晶美公司。

PCR 反应所需引物为上海博道生物公司合成, 其余试剂为 Takara 公司产品。

用于 PCR 产物回收试剂盒 (QIAGEN PCR Product Extraction Kit): New England Biolabs。

#### (4) 其他试剂

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 葡萄糖, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 尿素, 以上试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。酵母膏, 牛肉膏, 蛋白胨, 以上生化试剂大多为分析纯, 购自北京双旋微生物培养基制品厂。琼脂, 日本进口分装, 武汉贝特代购。高岭土 (化学纯, 购自国药集团化学试剂有限公司)。

#### (5) 仪器

SPX-3008S-11 生化培养箱 (上海新苗); ZHWY-100B 恒温培养摇床 (上海智斌分析仪器制造有限公司); WFZUV-2100 紫外可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司); 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf); 全自动灭菌锅 HIRAYAMA HVA-110; MY3000-6

六联电动搅拌器（湖北潜江梅宇）；PHS-25 酸度计（上海理达仪器厂）等。

### 2.1.2 方法

#### （1）絮凝剂产生菌的分离纯化和筛选

取少量印染废水于发酵培养基中富集培养（30 °C，150 r/min），富集两次后，将培养液用无菌水稀释成 8 个浓度梯度  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ ，然后分别取 0.2 mL 涂布于相应的分离培养基固体平板上，挑取单菌，转接于发酵培养基中摇床培养（30 °C，150 r/min），第 2 d、4 d 时取培养液进行初筛。

在 200 mL 的烧杯中加入 93 mL 的蒸馏水和 0.4 g 的高岭土，再加入 5 mL  $\text{CaCl}_2$ （w=1 %）搅拌，然后加入 2 mL 发酵菌液，首先于六联搅拌器上快搅（150 r/min）30 s，之后慢搅（50 r/min）1 min，静置 3 min 后观察是否有明显絮体产生。以未接种的发酵液体培养基代替菌液重复以上操作作为空白对照。

将产生明显絮体的菌株作为初筛菌种，将该菌株的发酵液在分离培养基上进行分离培养，挑取单菌落，于分离培养基平板上进行划线，连续三次以上，直到平板中肉眼观察到的各菌落形态一致，镜检观察到的菌体形态一致，得到纯菌种。将实验得到的纯菌种，通过转接于 150 mL 装有 45 mL 发酵培养基的锥形瓶中摇床培养（30 °C，150 r/min），48 h 时取培养液进行复筛，方法同上段所述。在搅拌完成静置 3 min 后，于上清液面下 1cm 处取样，测吸光度  $\text{OD}_{550\text{nm}}$ ，以加空白发酵培养基的样品做对照。

$$E = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \% \quad \text{式 (2.2)}$$

E——为絮凝率

A——为样品经空白发酵培养基处理后上清液  $\text{OD}_{550\text{nm}}$

B——为样品经发酵液处理后上清液  $\text{OD}_{550\text{nm}}$

经不断接种传代和复筛，筛选出具有稳定高效絮凝性能的菌株。

#### （2）絮凝剂产生菌的保藏

斜面低温法保藏：将菌种接种在分离固体斜面培养基上，30 °C 下培养 1 d~3 d，待菌落明显，然后将其置于 4 °C 冰箱中进行保藏。每隔 1 个月另行转接至新鲜的分离固体斜面培养基上，经培养后再进行保藏。

甘油悬液法保藏：将安瓿管先用 2 % 盐酸浸泡过夜，自来水冲洗干净后，用蒸馏水浸泡至 pH 中性，干燥后、贴上标签，标上菌号及时间，加入脱脂棉塞后，121 °C 下高压灭菌 15~20 min；将甘油 100 % 的甘油稀释至 40 %，121 °C 蒸汽灭菌 20 min；将菌种在分离固体培养基中划线，得到的单菌落转接液体发酵培养基中，30 °C 150 r/min 培养 12 h，得菌悬液。将菌悬液与灭菌的 40 % 甘油等体积混合，再分装于 2 mL 的安瓿管中，置于 -70 °C 冰箱中保藏。

### (3) 絮凝剂产生菌的鉴定

①形态学鉴定：观察菌株在特定培养基上的菌落形态，对菌株进行革兰氏染色或者简单染色，通过显微镜对菌体形态进行观察。简单区分菌株是细菌还是真菌，若为细菌其形状是球菌或者杆菌等。

②细菌的生理生化鉴定：对于细菌，首先对菌株进行革兰氏染色，并做接触酶和氧化酶实验，然后利用 VITEK-AMS 仪生理生化鉴定。当 VITEK-AMS 仪鉴定出的菌只含有生理生化反应结果时，可根据接触酶或氧化酶实验，糖（醇、苷）发酵试验、ONPO 试验、VP 试验等试验结果同《杰伯细菌分类手册》中不同种属菌种的生理生化特性进行比对，来确定菌株的种属。

#### ③细菌的 16S rDNA 分析

(i) 细菌 DNA 的提取。采用苯酚/氯仿抽提法：挑取 BF-0 菌株的单菌落，接种于液体 LB 培养基，于 37 °C 恒温摇床上 150 r/min 振荡培养过夜，取 10 mL 菌液，4000 r/min 离心 10 min，收集菌体，加入无菌水 0.5 mL 洗涤，并将菌悬液转到 1.5 mL 离心管中 12000 r/min 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL STE (10 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5; 10 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA) 悬浮细胞，加入蛋白酶 K (10 mg/L) 5 uL, 10 % SDS 50 uL, 55 °C 消化 4 h, 12000 r/min 离心 10 min 取上清。上清液转入新的 5 mL 离心管中，加入等体积的饱和 Tris 酚，震荡 5 min, 4 °C 4000 r/min 离心 5 min, 取离心后的上清，加入等体积的氯仿：异戊醇 (24:1) 震荡 5 min, 4 °C 4000 r/min 离心 5 min, 取上清加入二倍体积 -20 °C 下预冷的无水乙醇。4 °C 12000 r/min 离心 10 min 取沉淀，用 400 uL 70 % 乙醇洗涤离心两次，风干后，即得到模板，加入 50 uL TE 溶解，-20 °C 下备用。

(ii) 细菌 16S rDNA PCR 扩增采用细菌通用引物，

Primer F: 5' -AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' ,

Primer R: 5' -TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' 。

(iii) PCR 反应体系：

10×Buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris · Cl (pH 8.3) 和 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 2.5 μL,

dNTP (2.5 m) 2.5 μL,

primer1 (10 pmol) 1 μL, primer2 (10 pmol) 1 μL,

rTaq 酶 0.2 μL,

模板 DNA 1 μL,

双蒸水 16.8 μL。

(iv) PCR 反应条件：

94 °C 预变性 5 min;

94 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min (30~35 个循环);

72 °C 延伸 10 min。

(v) 用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 检测目的条带。菌种的 16S rDNA 测序由上海英峻公司完成。

(vi) 基于 16S rDNA 序列的系统发育树分析: 测序结果进行双向拼接后, 在 Genbank 中进行 Blast 同源序列检索和比较, 选择与其同源性高的几株细菌模式株, 及同一属中的另外几株菌的 16S rDNA 序列, 利用 Clustx1.8 软件进行序列比对, 然后利用 MEGA5 软件构建系统发育树。

## 2.2 结果与讨论

### 2.2.1 絮凝剂产生菌的筛选结果

经过初筛得到具有絮凝活性的菌株 9 株, 复筛后发现絮凝率较高的菌株有 6 株 (对这 6 株菌一方面采用甘油悬液法保存于 -70 °C 用于其菌株的保藏, 一方面采用斜面保藏法保存以用于平时的实验)。各菌株的来源和絮凝率见下表 2.1。

表 2.1 菌株的来源和絮凝率

Tab2.1 The source and flocculation rate of bacteria

菌株编号	来源	絮凝率
BF-0	印染废水	78.2 %
皂 9.2.1	印染废水	66.5 %
荷 13	龟山荷塘边的土壤	45 %
荷 16.1	龟山荷塘边的土壤	68.4 %
XLGA	武汉纺织大学污水处理厂污泥	60.1 %
BF-1	武汉纺织大学污水处理厂污泥	69 %

而经过传代, 发现菌株 BF-0、BF-1 多次传代以后絮凝率的变化很小, 说明它们的遗传稳定性很好, 故对 BF-0 和 BF-1 进行了重点研究。

### 2.2.2 絮凝剂产生菌的鉴定结果

#### (1) 形态学鉴定

首先, 对菌株 BF-0、BF-1 的菌落形态和菌体形态进行了观察。BF-0 菌落白色干燥, 边缘皱起, 中间拱起, 呈火山爆发状。(见图 2.1), 菌体为杆状, 革兰氏染色阳性 (见图 2.3); BF-1 菌落圆形, 光滑湿润, 边缘齐整, 呈凸透镜状 (见图 2.2), 菌体为杆状, 革兰氏染色阳性 (见图 2.4)。



图 2.1 BF-0 菌落形态

Fig2.1 Colony morphology of BF-0

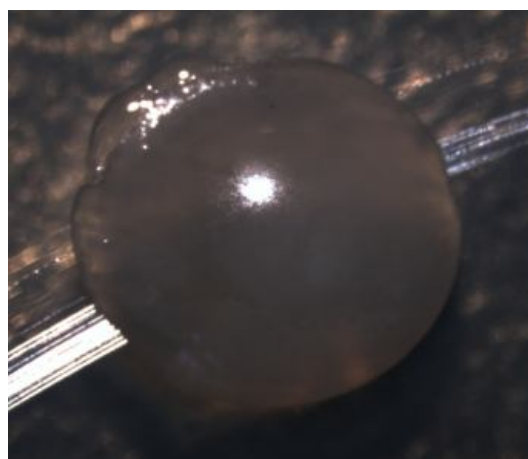


图 2.2 BF-1 菌落形态

Fig2.2 Colony morphology of BF-1



图 2.3 BF-0 菌体形态

Fig2.3 cell form of BF-0



图 2.4 BF-1 菌体形态

Fig2.4 cell form of BF-1

## (2) 生理生化鉴定结果

通过前期的培养观察发现 BF-0、BF-1 均为革兰氏阳性产芽孢杆菌，接触酶均呈阳性，BF-0 不宜高温培养，而 BF-1 在高温条件下生长良好。初步确认 BF-0、BF-1 为芽孢杆菌属，选择 BAC 药敏卡利用 VITEK-AMS 仪鉴定，鉴定结果如下表 2.2。与 VITEK-AMS 仪器自带的菌种库比较发现 BF-0 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 相似性达 99%，故初步鉴定 BF-0 为一株解淀粉芽孢杆菌。BF-1 菌株在 VITEK-AMS 仪器自带的菌种库中并没有找到匹配较好的菌株，根据其生理生化特性查阅《杰伯细菌分类手册》，仅初步确认为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。



表 2.2 菌株的生理生化特性鉴定结果

Tab 2.2 Physiological and biochemical characteristics of strain

检测项目	结果	
	BF-0	BF-1
阴性对照	-	-
蔗糖	+	+
红四氮唑	-	-
塔格糖	-	-
葡萄糖	+	+
肌醇	-	-
半乳糖	-	+
阿拉伯糖	-	-
木糖	-	-
甘露糖	+	+
棉子糖	-	-
水杨素	-	+
苦杏仁苷	-	-
菊粉	+	-
核糖	-	+
麦芽糖	+	-
海藻糖	+	+
脲糖	+	-
山梨醇	+	-
N-乙酰-D 葡萄糖胺	+	+
支链淀粉	+	-
硫氰酸钾	+	-
7%氯化钾	-	-
扁桃酸	+	+
竹桃霉素	-	-
乙酸钠	-	+
阿拉伯糖	-	-
植病链菌素	+	-
萘啶酸	+	-
七叶苷	+	+

注：“+”表示反应呈阳性，“-”表示反应呈阴性。

## (2) 菌株 16S rDNA 分析结果

菌株 BF-0、BF-1 提取 DNA 模板后, 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 发现 BF-0, BF-1 菌株 16S rDNA PCR 产物为大小约 1500 bp 的片段。用 PCR 产物纯化试剂盒对 PCR 产物纯化后测序, 结果分别如图 2.5 和图 2.6。菌株 BF-0 的 16S rDNA 序列, 全长 1461 bp, 菌株 BF-1 的 16S rDNA 序列, 全长 1455 bp, 进行 Blast 分析, 发现 BF-0 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) DSM 7 同源序列相似性达 99 %。BF-1 与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 同源序列相似性达 99 %。

```

TTGTTGCTCCAAGGCGACGCATCATGAAAGTCGAGCGGACAGATGAGAGCTTGCTCC
CTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACAT
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGT
AAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGT
ACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG
GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GCATGTGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGA
CAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGGCAGAACAAAGGCGAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTT
CTCAGTTCGGATCGCAGTTTGCAACTTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC
CACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCTGGTGATAGAGTAACCTCAAGCTACCAGCCTT
ACTAGTGAGTTTGCA

```

图 2.5 BF-0 菌株测序结果

Fig2.5 sequence of 16srDNA of BF-0

```

CGTGCGCAGCTATACATGCAGTTTCGAGCGGACCGACGGGAAGCTTGCTCCCTTAGGTC
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGG
TGGCTTTTAGCTACCACTTGCAGATGGACCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGG
ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAG
AGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GGTTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAC
CCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTTGTCTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAG
TTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GGCAGAAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTC
AGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAC
GAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCCGGTATGG
TGATCACGACTGG

```

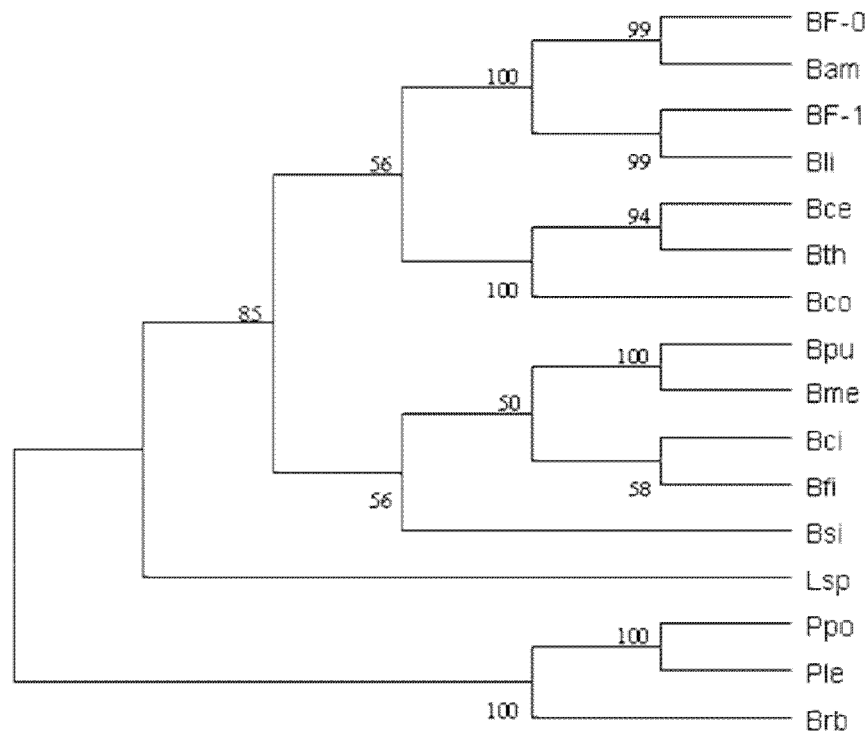
图 2.6 BF-1 菌株测序结果

Fig2.6 sequence of 16srDNA of BF-1

由于细菌 16S rDNA 的高度保守性，细菌的 16S rDNA 被当作一种分子标记。随着 Genebank 中物种基因的完善，利用 16S rDNA 同源性比对已成为细菌鉴定的主要方法之一。对 BF-0、BF-1 与解淀粉芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、胡萝卜芽孢杆菌等（见表 2.3）进行 16S rDNA 同源性比对和进化树分析，结果见图 2.7。

表 2.3 菌株 16S rDNA 序列基因检索表  
Tab2.3 16S rDNA gene sequence searches

登录号	种属	拉丁学名	缩写	碱基数 (bp)
NC014551.1	解淀粉芽孢杆菌	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bam	1408
AJ310098.1	蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	Bce	1504
HQ318731.1	短小芽孢杆菌	<i>Bacillus pumilus</i>	Bpu	1489
AF290545.1	苏云金芽孢杆菌	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bth	1482
HM753634.1	地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bli	1482
HQ202555.1	巨大芽孢杆菌	<i>Bacillus megaterium</i>	Bme	1457
AJ628745.1	胡萝卜芽孢杆菌	<i>Bacillus simplex</i>	Bsi	1503
FJ215785.2	环状芽孢杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	Bci	1519
HQ703891.1	凝结芽孢杆菌	<i>Bacillus coagulans</i>	Bco	1428
FR749832.1	坚硬芽孢杆菌	<i>Bacillus firmus</i>	Bfi	1351
HQ202568.1	短芽孢杆菌	<i>Brevibacillus brevis</i>	Brb	1405
HQ259956.1	球形芽孢杆菌	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Lsp	1459
HQ703924.1	日本甲虫芽孢杆菌	<i>Paenibacillus popilliae</i>	Ppo	1465
AF071861.1	缓病芽孢杆菌	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Ple	1479



注：图中分枝上的数值表示相似性

图 2.7 BF-0、BF-1 与参比菌系统进化关系树状图

Fig2.7 phylogeny tree of BF-0 and BF-1

结果显示 BF-0 与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) DSM 7 的 16S rDNA 相似性为 99 %。在进行 16S rDNA 同源序列相似性比对时, 一般认为相似性大于 95 % 的两株菌可以认为是同一个属, 故鉴定 BF-0 为一株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), BF-1 为一株地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

### 2.3 本章小结

通过一系列的筛选, 获得了 9 株絮凝剂产生菌, 其中从印染废水中筛选到的 BF-0 和从武汉纺织大学污水处理厂污泥中筛选到的 BF-1 的絮凝效果较好, 对高岭土悬液的絮凝率分别达 78.2 % 和 69 %, 且传代培养絮凝剂活性稳定。

菌 BF-0、菌 BF-1, 经形态学观察, 生理生化特性及 16S rDNA 同源序列比对分析鉴定, 菌 BF-0 为解淀粉芽孢杆菌, 命名为 *B. amyloliquefaciens* BF-0, 菌 BF-1 为地衣芽孢杆菌, 将其命名为 *B. licheniformis* BF-1。

据杨胜远<sup>[33]</sup>等报道解淀粉芽孢杆菌具有广泛的抑菌活性, 不仅对藤黄微球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、酿酒酵母、匍枝根霉和白色念珠菌有抑制作用, 而且对霉菌、真菌<sup>[34]</sup>也会产生抑制。目前解淀粉芽孢杆菌作为一种抗菌制剂进行了大量深入的开发和应用研究, 而关于利用解淀粉芽孢杆菌产微生物絮凝剂的研究还较少。解淀粉芽孢杆菌的抗菌性能降低了工业发酵生产中染菌的几率, 为工业生产微生物絮凝剂提供了便利, 也进一步说明解淀粉芽孢杆菌具有较好的开发价值。

在菌株 BF-0 第一次的鉴定过程中发现生理生化鉴定结果与 16S rDNA 相似性比对结果相差比较大, 通过反复多次的实验发现是革兰氏染色出现了失误。由此得出经验: 在利用 VITEK-AMS 仪生理生化鉴定细菌的过程中, 形态观察, 革兰氏染色, 高温培养 (55 °C)、接触酶或氧化酶反应等前期实验对于菌株的正确鉴定至关重要!

在本研究部分, 菌株 BF-0 絮凝效果很好, 且其分类地位已鉴定清楚, 因此后续研究将主要针对 BF-0 展开研究。

### 3 *B. amyloliquefaciens* BF-0 培养条件的优化研究

不同的微生物对营养和培养条件的要求不一样，当我们通过筛选获得高效的菌种之后，为了指导后续的工业应用，非常有必要对该菌种进行摇瓶实验，优化培养基的营养成分（氮源、碳源、生长因子等）和培养环境（培养基的初始 pH 值、培养温度、通气量等），这里我们统称为培养条件。

微生物利用营养物质生长繁殖，并通过代谢为人类提供各种有益代谢产物。通常，营养物质越丰富，就越利于微生物的生长，但是营养物质浓度过高不仅会导致营养物质的浪费，而且使微生物的生长受到抑制，这进一步说明对微生物培养条件进行优化的必要性，同时大量的研究表明，细胞生长的最佳培养条件往往与最佳代谢条件不同，即对于某一特定的菌株，其最佳生长条件并不是其最佳的产絮凝剂条件。

碳源：异养型微生物首选糖类做碳源，而葡萄糖能被大多数絮凝剂产生菌用来产絮凝剂，但是不同的菌，对相同的碳源和氮源利用方式和途径存在差异，产生的絮凝剂结构不同，导致絮凝剂的活性差异。氮源：不同的微生物絮凝剂产生菌对氮源要求是不同的，即有单独利用有机氮源、无机氮源作为产絮凝剂的最适氮源，也有利用复合氮源作为产絮凝剂的最适氮源。碳氮比：碳氮比对于某些微生物产生的絮凝剂成分有决定性的影响。另外，有较多环境因素能影响絮凝剂产生菌生长和絮凝剂合成。其中最主要的环境因素有培养时间、培养基初始 pH 值、培养温度、溶解氧等。

本实验对筛选到的高效微生物絮凝剂产生菌 *B. amyloliquefaciens* BF-0 进行培养和培养条件的优化研究。以菌株 BF-0 的发酵液对高岭土悬浮液的絮凝率来定量地表示 BF-0 发酵液的絮凝能力大小。首先通过单因素实验确定最佳碳源、氮源、最佳碳氮比，然后采用正交实验在对各营养成分的配比进行优化研究。同时考察温度、培养基的初始 pH、通气量等培养条件对微生物絮凝剂产生菌产絮凝剂活性的影响，并根据菌体细胞的生长与产絮凝剂活性的关系来确定最佳的培养工艺。

#### 3.1 材料与amp;方法

##### 3.1.1 实验菌种

实验所用 BF-0 高效产絮凝剂菌为本实验室筛选所得，经鉴定确认为一株解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）。

### 3.1.2 试剂

淀粉,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司, 其他同 2.1.1。

### 3.1.3 仪器

同 2.1.1。

### 3.1.4 培养基

发酵培养基: 同 2.1.1。

### 3.1.5 絮凝活性测定方法

方法同 2.1.2。

### 3.1.6 BF-0 菌体生长与其絮凝活性的关系研究

菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养 (30 °C, 150 r/min) 过夜后, 按 1:100 比例转接入 150 mL 发酵液体培养基中, 37 °C、150 r/min 恒温培养, 分别在培养 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、18 h、24 h、30 h、36 h、48 h、60 h、72 h 时取发酵培养物, 测定其对高岭土悬液的絮凝率, 同时利用紫外分光光度计测定其 600 nm 处的 OD 值 (以未接菌的空白培养基作为对照) 以确定其菌体的生长量 (在一定的浓度范围内, 光密度与菌量呈正相关关系<sup>[35,36]</sup>), 根据不同时间培养物的絮凝率及其  $\text{OD}_{600}$  值制作相应的絮凝曲线和生长曲线。

### 3.1.7 BF-0 产絮凝剂培养条件研究

(1) 采用单因素实验研究不同培养条件及不同培养基成分对菌株培养物絮凝活性的影响

①培养温度的影响: 菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养 (30 °C, 150 r/min) 过夜后, 按 1:100 比例转接入 50 mL 发酵液体培养基中, 150 r/min, 温度分别设为 25 °C、30 °C、37 °C、40 °C, 培养 12 h 后检测培养物的  $\text{OD}_{600}$  及对高岭土的絮凝率。

②起始 pH 的影响: 菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养 (30 °C, 150 r/min) 过夜后, 按 1:100 比例转接入 50 mL 初始 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 的发酵液体培养基中, 150 r/min、37 °C 培养 12 h 后检测培养物的  $\text{OD}_{600}$  及对高岭土的絮凝率。

③通气量的影响: 菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养 (30 °C, 150 r/min) 过夜后, 按 1:100 比例转接入 50 mL 初始 pH 为 7.0 的发酵液体培养基中, 分别设置摇床转速为 0、50、100、150、200 r/min 以给予其不同的通气量, 37 °C 培养 12 h 后检测培

养物的 OD<sub>600</sub> 及对高岭土的絮凝率。

④碳源的影响：菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养（30 °C，150 r/min）过夜后，按 1:100 比例转接入 50 mL 初始 pH 为 7.0 的发酵液体培养基中，该批发酵培养基分别以乳糖、蔗糖、果糖、复合碳（葡萄糖：蔗糖=4:1）、淀粉替代发酵培养基中的葡萄糖作为碳源（碳的质量浓度一定），培养基其他营养成分不变。100 r/min、37 °C 培养 12 h 后检测培养物的 OD<sub>600</sub> 及对高岭土的絮凝率。

⑤氮源的影响：以 BF-0 发酵产絮凝剂的最佳碳源为碳源，在保证氮的质量浓度一定的条件下，分别用氯化铵、硝酸钠、尿素、硫酸铵、酵母膏、蛋白胨替代发酵培养基中的复合氮源（酵母膏+脲+硫酸铵），培养基其余营养成分不变，调整培养基的 pH 为 7.0。菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养（30 °C，150 r/min）过夜后，按 1:100 比例转接入 50 mL 的上述发酵液体培养基中，100 r/min、37 °C 培养 12 h 后检测培养物的 OD<sub>600</sub> 及对高岭土的絮凝率。

⑥碳氮比的影响：经过上述实验确定 BF-0 发酵产絮凝剂的最佳碳源和氮源，在氮源浓度一定的条件下改变碳源的浓度，调节培养基的碳氮比（原子质量浓度比）分别为 15、20、25、30、35、40，培养基其余营养成分不变，pH 为 7.0。菌株 BF-0 于发酵液体培养基中活化培养（30 °C，150 r/min）过夜后，按 1:100 比例转接入 50 mL 的上述发酵液体培养基中，100 r/min、37 °C 培养 12 h 后检测培养物的 OD<sub>600</sub> 及对高岭土的絮凝率。

## （2）优化培养条件及培养基成分的正交实验研究<sup>[37,38]</sup>

利用正交实验考察氮源、碳源、培养基初始 pH 值、通气量和培养温度 5 个因素对菌 BF-0 产絮凝剂的影响，每因素选取 4 个水平值，设计一个 L<sub>16</sub>（4<sup>5</sup>）正交实验，测定在各组实验条件下 BF-0 培养液的絮凝率。以确定菌株 BF-0 产絮凝剂的最佳培养条件，并根据正交实验结果和方差分析结果得出各因素对菌株 BF-0 产絮凝剂影响的显著性大小。

## 3.2 结果与讨论

### 3.2.1 菌株 BF-0 生长曲线与絮凝活性测定

培养条件为 150 r/min、37 °C 时，菌株 BF-0 在发酵液体培养基中培养至 12 h 时达到稳定生长期，此时 OD<sub>600</sub> 最高，为 0.89（见图 3.1）；其菌液在 0~6 h 时对高岭土悬液的絮凝活性迅速增长，培养 6 h 以后培养物的絮凝活性变化较小，当培养至 12 h 其絮凝活性接近最高，达 73%，在培养至 18 h 时培养物的絮凝活性达到最大，对高岭土的絮凝率为 78%（见图 3.1）。

在本部分的研究中，菌株 BF-0 的絮凝活性变化曲线与生长曲线的变化规律基本一致。在早期营养物质充足的条件下，菌株平衡生长、其菌体数量呈对数增加，而此时得



到的培养物的絮凝活性也以相同的趋势增加；随着营养物质的消耗、代谢产物积累和 pH 等环境条件的变化，菌 BF-0 生长由对数期进入稳定期（细菌分裂增加的数量等于细胞死亡数量），菌体生长量的稳定及环境条件的恶化也导致其培养物絮凝活性不再增长甚至逐渐减弱。根据该结果，推测菌株 BF-0 产生的具有絮凝活性的物质不是由微生物细胞自溶而产生的胞内物质，而是其初级代谢产物。

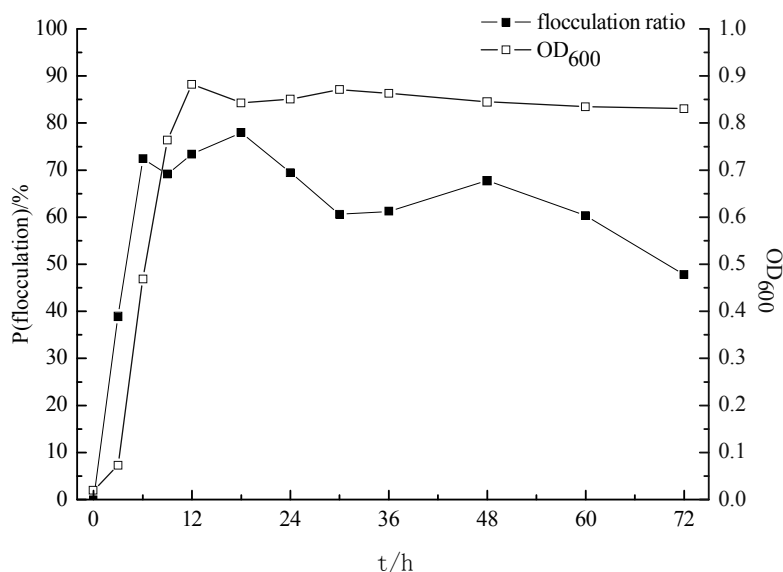


图 3.1 菌株 BF-0 生长及絮凝活性变化曲线

Fig3.1 Curve of growth and flocculating activity of BF-0

### 3.2.2 絮凝发酵培养条件研究

(1) 培养条件及培养基成分对菌株絮凝活性的影响的单因素实验研究

#### ① 培养温度对絮凝活性的影响

对不同培养温度（25 °C、30 °C、37 °C、40 °C）下菌株 BF-0 的絮凝活性和生长状况的研究结果见图 3.2。

由图 3.2 可知，培养温度对菌株 BF-0 的生长和产凝影响较大。在 150 r/min 培养 12 h 时，其在不同温度下培养得到的菌液的 OD<sub>600</sub> 和对高岭土悬液的絮凝率分别为 0.35、0.51、0.91、0.86 和 35 %、52 %、73 %、69 %，絮凝活性与生长（OD<sub>600</sub>）的变化趋势一致。在温度由 25 °C 到 37 °C 逐步提高时，其菌液的 OD<sub>600</sub> 和絮凝活性也随之增高，在温度增至 37 °C 时菌液的 OD<sub>600</sub> 和絮凝活性都达到最高，此后当温度继续升高，BF-0 菌液的 OD<sub>600</sub> 和絮凝活性均开始降低（受实验条件所限，更高温度未继续检测）。因此，初步确定 37 °C 为菌株 BF-0 的最佳生长温度，同时也是最适产凝温度。

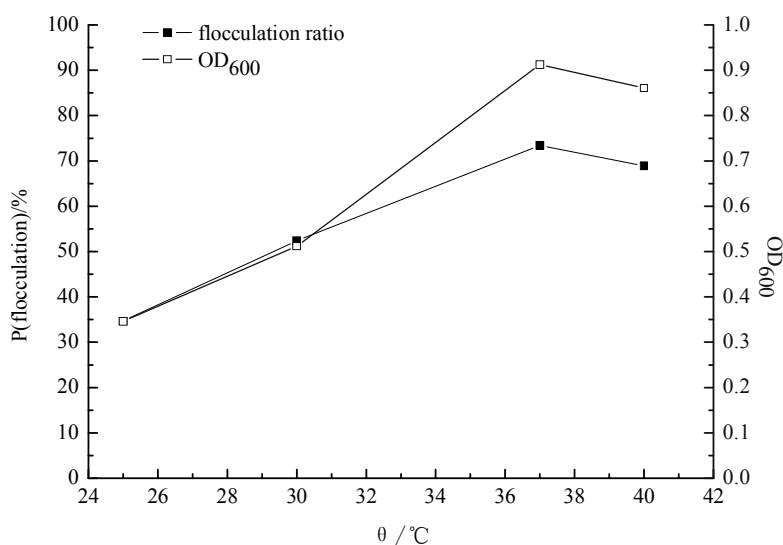


图 3.2 培养温度对菌株 BF-0 絮凝活性的影响

Fig3.2 The effect of incubation temperature on the flocculating activity of strain BF-0

### ② 初始 pH 对絮凝活性的影响

不同培养基初始 pH 下菌株 BF-0 的絮凝活性和生长状况的研究结果见图 3.3。

由图 3.3 可知，培养基初始 pH 对菌株 BF-0 的生长 ( $OD_{600}$ ) 与絮凝活性的影响较大，且对两者的影响规律一致。在初始 pH 为 7.0、37 °C、150 r/min 培养时，BF-0 的生长状况及絮凝活性最好，在培养 12 h 后其菌液  $OD_{600}$  达 0.85，对高岭土悬液的絮凝活性达 76 %。另外，由图 3.3 可知，菌株 BF-0 具有较强的 pH 适应性，在 pH 6.0~9.0、37 °C、150 r/min 培养 12 h 后得到的菌液的  $OD_{600}$  与絮凝活性差别不大，菌液对高岭土悬液的絮凝率均能达到 65 % 以上。

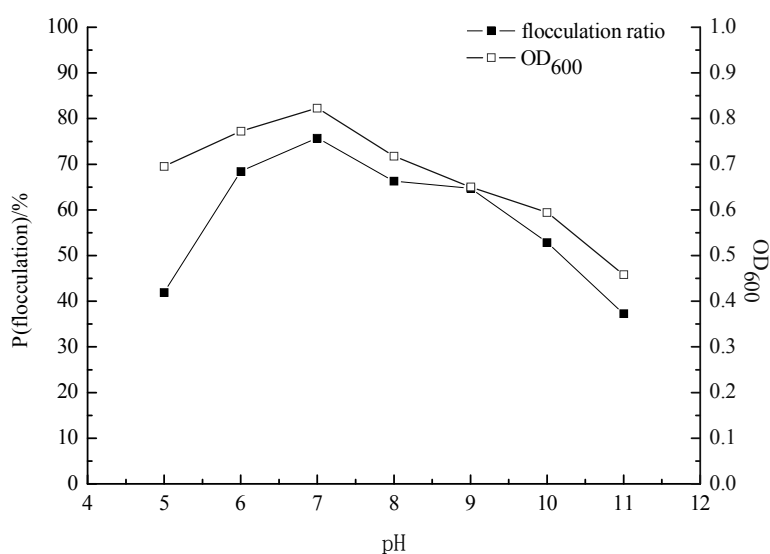


图 3.3 培养基起始 pH 对菌株 BF-0 絮凝活性的影响

Fig3.3 The effect of initial medium pH on flocculating activity of strain BF-0

## ③ 通气量对絮凝活性的影响

在不同摇床转速条件下研究通气量对菌株 BF-0 絮凝活性的影响结果见图 3.4。

由图 3.4 可知，通气量对菌株 BF-0 的生长 ( $OD_{600}$ ) 影响较大，但对其得到的菌液的絮凝活性影响不大。在温度为 37 °C、初始 pH 为 7.0 的培养条件下，当摇床转速由 0 r/min 逐步提高到 100 r/min 时，培养 12 h 后得到的菌液的  $OD_{600}$  和絮凝活性均随之增加，分别为 0.35、0.71、1.04 和 71 %、77 %、80 %，转速为 100 r/min 时菌液的  $OD_{600}$  及其絮凝活性均最高。此后，当转速继续增加，培养 12 h 后得到的菌液  $OD_{600}$  没有太大变化（转速 150、200 r/min 时的  $OD_{600}$  分别为 0.99、1.05），而菌液队高岭土悬浊液的絮凝率却明显降低（转速 150、200r/min 时的絮凝率分别为 74 %、57 %）。分析认为，通气量的增加有利于菌株 BF-0 的生长及其絮凝活性物质的生成，但过大的通气量虽对菌株 BF-0 的菌体生长没有不利影响，却影响其絮凝活性物质的生成。

在本研究中，初步确定在温度为 37 °C、初始 pH 为 7.0 的培养条件下，摇床转速为 100 r/min 时的通气量最适合于菌株 BF-0 的生长及絮凝剂的产生。

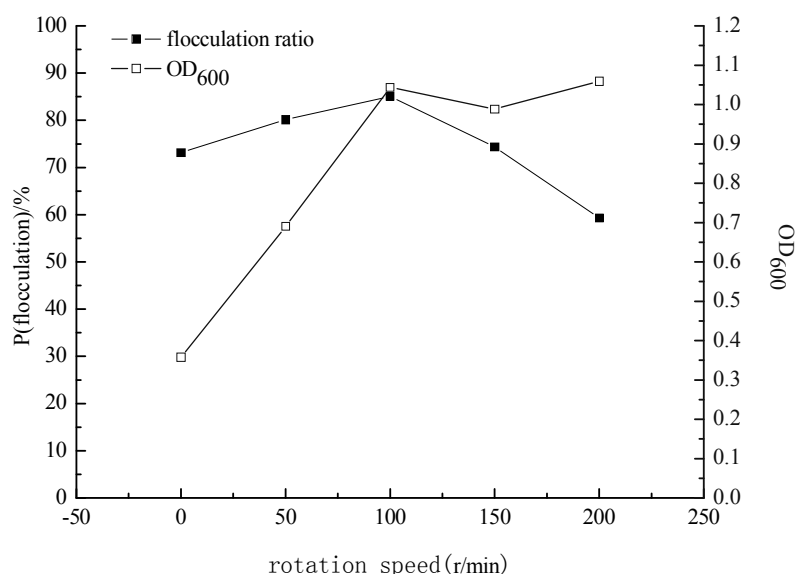


图 3.4 摇床转速对菌株 BF-0 絮凝活性的影响

Fig3.4 The effect of rotation speed on the flocculating activity of strain BF-0

## ④ 碳源对絮凝活性的影响

对复合碳（葡萄糖：蔗糖=4:1）、淀粉、果糖、乳糖、蔗糖等不同碳源对菌株 BF-0 生长及其絮凝活性的影响的研究结果见图 3.5。

由图 3.5 可知，在温度为 37 °C、初始 pH 为 7.0、摇床转速为 100 r/min 的培养条件下，葡萄糖、淀粉、和复合碳作为菌 BF-0 产絮凝剂的碳源时相对乳糖、蔗糖、果糖来说培养得到的菌液具有更好的絮凝活性，对高岭土悬浊液的絮凝率分别为 84 %、90 %、

84 % (乳糖、蔗糖、果糖的分别为 60 %、71 %、69 %)。六种碳源培养 BF-0 的发酵液絮凝率大小从高到低依次为淀粉 > 葡萄糖 > 复合碳源 > 蔗糖 > 果糖 > 乳糖, 从絮凝剂产量和发酵成本两方面考虑, 淀粉作为碳源时培养 BF-0 产絮凝剂活性最高, 价格低廉, 可作为菌 BF-0 产絮凝剂的最佳碳源。

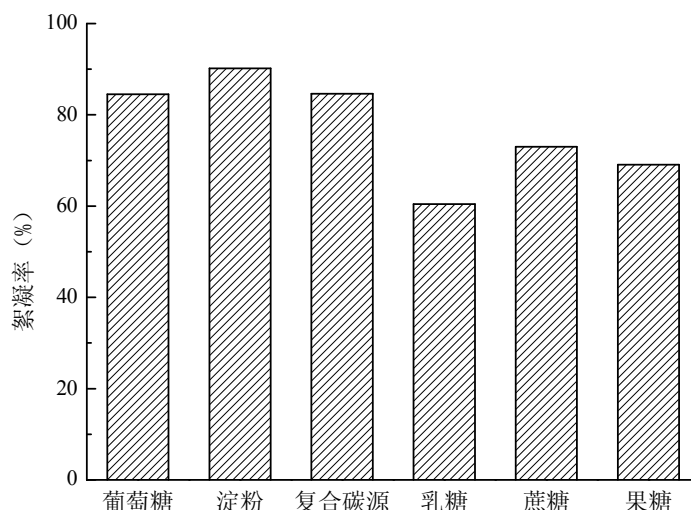


图 3.5 碳源对菌株 BF-0 絮凝活性的影响

Fig3.5 The effect of Carbon source on the flocculating activity of strain BF-0

#### ⑤ 氮源对菌株絮凝活性的影响

氯化铵、硝酸钠、硫酸铵、蛋白胨、酵母膏、尿素替等不同氮源对菌株 BF-0 絮凝活性的影响结果见表 3.1。

由表 3.1 可知, 在温度为 37 °C、初始 pH 为 7.0、摇床转速为 100 r/min 的培养条件下, 以淀粉为碳源时, 复合氮、氯化铵、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、尿素都是菌株 BF-0 产絮凝剂的良好氮源, 培养 12 h 后得到的菌液对高岭土悬浊液的絮凝率都在 87 % 以上。七种受试氮源培养 BF-0 得到菌液的絮凝活性的大小依次为氯化铵 > 硫酸铵 > 蛋白胨 > 复合氮 > 尿素 > 酵母膏 > 硝酸钠。在以硝酸钠作为氮源培养 12 h 后得到的菌液的 OD<sub>600</sub> 仅为 0.241, 其絮凝活性也最低 (40.1 %), 推测是因为菌株 BF-0 几乎不能利用硝酸钠中的氮进行生长。铵盐或含有铵盐的复合氮作为氮源时, 菌株培养 12 h 后得到的菌液的絮凝活性均较高 (如以硫酸铵或复合氮作为氮源时, 菌 BF-0 培养液的絮凝率均达 90 % 以上)。此外, 有机氮源 (蛋白胨、酵母膏) 比无机氮源更有利于 BF-0 的生长, 以酵母膏为氮源时培养 12 h 后得到的菌液的 OD<sub>600</sub> 达 1.305, 但其絮凝活性仅为 87.9 %, 相对铵盐作为氮源时低。根据本研究的结果, 最后初步确定菌株 BF-0 产絮凝剂的最佳氮源为氯化铵。

表 3.1 氮源对菌株 BF-0 絮凝活性和生长的影响

Fig3.1 The effect of nitrogen on the flocculating activity and growing of strain BF-0

氮源种类	硝酸钠	复合氮	氯化铵	蛋白胨	酵母膏	硫酸铵	尿素
絮凝率 (%)	40.1	90.3	92.5	91.2	87.9	91.9	88.4
OD <sub>600</sub>	0.241	1.061	0.941	1.116	1.305	0.98	0.857

## ⑥ 碳氮比对菌株絮凝活性的影响

对不同 C/N (15、20、25、30、35、40) 下菌株 BF-0 的絮凝活性研究结果见图 3.6。

由图 3.6 可知, 在温度为 37 °C、初始 pH 为 7.0、摇床转速为 100 r/min 的培养条件下, 以淀粉为碳源、氯化铵为氮源培养时, C/N=15 时, 菌株 BF-0 培养 12 h 得到的菌液对高岭土悬浊液的絮凝率为 81 %, 而当  $20 \leq C/N \leq 40$  时, 碳氮比的变化对菌株 BF-0 培养得到菌液的絮凝活性基本无影响(菌液对高岭土悬浊液的絮凝率都为 90 %左右)。一般微生物(细菌、放线菌)适宜 C/N 是 25:1 (元素 C/N 的比值), 而本研究得到的结果也显示菌株 BF-0 培养碳氮比保持在 20~40 之间具有比较好的产絮凝物质效果。

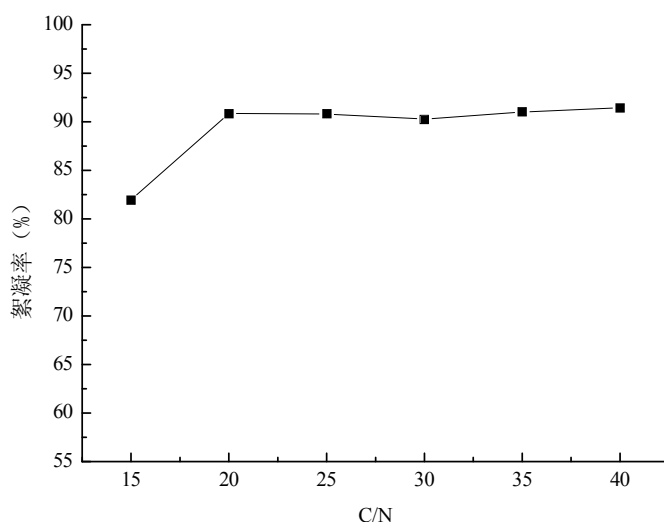


图 3.6 碳氮比对菌株 BF-0 絮凝活性的影响

Fig3.6 The effect of C/N on the flocculating activity of strain BF-0

综上所述, 菌株 BF-0 产絮凝剂的最佳培养条件为 37 °C、100 r/min、初始 pH 7.0、碳源为淀粉、氮源为氯化铵、碳氮比 20~40, 在该培养条件下培养 12 h 得到的菌液即可达到最佳的絮凝效果。

## (2) 优化培养条件及培养基成分的正交实验研究

利用正交实验考察碳源(淀粉)、氮源(氯化铵)、培养基的初始 pH 值、培养温度和通气量 5 个因素(分别用 A、B、C、D、E 表示)对菌 BF-0 产絮凝剂的影响, 每因素设 4 个水平, 设计一个  $L_{16}(4^5)$  正交实验, 正交试验因素及水平见表 3.2, 正交试验设计及结果见表 3.3。对表 3.3 正交实验结果进行方差分析, 结果见表 3.4。

表 3.2 菌株 BF-0 正交试验因素及水平表

Table3.2 Factors and levels of orthogonal design of BF-0

水平	因素				
	A (g/L)	B (g/L)	C (°C)	D	E (r/min)
1	15	1.0	25	6	0
2	20	1.2	30	7	50
3	25	1.4	37	8	100
4	30	1.6	40	9	150

表 3.3 L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) 正交试验设计及结果

Table3.3 Orthogonal design and its result

试验号	因素					絮凝率 (%)
	A	B	C	D	E	
1	1	1	1	1	1	61.29
2	1	2	2	2	2	63.29
3	1	3	3	3	3	88.58
4	1	4	4	4	4	63.33
5	2	1	2	3	4	57.18
6	2	2	1	4	3	50.39
7	2	3	4	1	2	61.36
8	2	4	3	2	1	86.89
9	3	1	3	4	2	68.22
10	3	2	4	3	1	35.89
11	3	3	1	2	4	66.37
12	3	4	2	1	3	69.62
13	4	1	4	2	3	91.68
14	4	2	3	1	4	74.9
15	4	3	2	4	1	17.29
16	4	4	1	3	2	53.08

表 3.4 菌株 BF-0 正交实验结果方差分析表

Table3.4 The ANOVA of orthogonal design

因素	A	B	C	D	E
K1	69.123	69.593	57.782	66.793	50.340
K2	63.955	56.117	51.845	77.058	61.487
K3	60.025	58.400	79.648	58.682	75.067
K4	59.237	68.230	63.065	49.807	65.445
R	9.886	13.476	27.803	27.251	24.727
SS	245.501	557.255	1715.084	1618.601	1256.548
df	3	3	3	3	3
MS	81.834	185.752	571.695	539.534	418.849
F	0.228	0.517	1.590	1.501	1.165
显著性					

注：SS、df、Ms 分别表示平方和、自由度、均方。

由表 3.4 可知，淀粉 (A)、氯化铵 (B)、初始 pH 值 (C)、培养温度 (D) 和通气量 (E) 这 5 个因素对菌株 BF-0 的絮凝活性影响不均显著，这说明菌株 BF-0 有较广的生长适应范围。由 R 值 (极差) 的大小可知，各因素对菌株 BF-0 培养产絮凝剂的影响从大到小一次为：初始 pH 值 > 温度 > 通气量 > 氯化铵 > 淀粉。从 K 值可判断出，各因素的最佳产凝水平为：淀粉 15 g/L，氯化铵 1.0 g/L，培养基的初始 pH 7.0、培养温度 37 °C 和通气量 100 r/min。该培养条件下淀粉为 15 g/L，氯化铵为 1.0 g/L，其 C/N 为 25.32 (在 20~40 之间)，符合最佳产凝碳氮比的要求。在各培养条件最佳水平下，BF-0 培养 12 获得的培养液对高岭土悬液的絮凝率高达 92 % 以上。

### 3.3 本章小结

本研究首先对 *B. amyloliquefaciens* BF-0 生长及其产絮凝活性的关系进行了研究，其生长曲线及絮凝活性曲线的测定结果显示，菌株 BF-0 的絮凝活性与菌株生物量呈正相关，当菌株生长进入稳定期 (培养 12 h 左右)，此时的絮凝活性最高。而其他絮凝剂产生菌的最佳产凝培养时间都在 48 h 以上，如李学翔等<sup>[39]</sup>研究发现德克斯氏菌 X-3 培养 72 h 絮凝活性最佳，费文砚等<sup>[40]</sup>筛选获得的菌株 C5，其理想的产凝发酵时间为 48 h，屹立等<sup>[41]</sup>分离筛选出的克雷伯氏菌 YS2，在培养 84 h 絮凝活性最好。因此，利用 *B. amyloliquefaciens* BF-0 发酵产絮凝剂，可大大的缩短生产周期，提高产量。

其次，考察了培养基初始 pH、温度、通气量等培养条件对菌株 BF-0 发酵产絮凝剂活性的影响。最终得出了菌株 BF-0 产絮凝剂的最适培养条件为：培养基初始 pH=7.0，培养温度为 37 °C，摇床转速 100 r/min，最佳碳源为淀粉，最佳氮源为氯化铵，适宜的碳氮比为 20~40。并通过正交试验得出最佳培养基的组成：淀粉 15 g/L，氯化铵 1.0 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L，NaCl 0.1 g/L，MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L，pH 7.0。

目前关于解淀粉芽孢杆菌生产絮凝剂的最佳培养条件的研究大多只停留在实验室阶段，产凝培养基更多的是利用葡萄糖、蔗糖、淀粉等来做碳源，硫酸铵、尿素、酵母粉等做氮源进行培养条件的优化研究，获得的发酵工艺因为培养基成本太高无法进行工业化生产。利用何种廉价原料进行替代培养产絮凝剂以及利用廉价原料获得的絮凝剂产量高低是开发高效廉价产絮凝剂发酵工艺的关键问题。后续将以淀粉废水，糖蜜废水，猪场废水等废弃资源作为廉价原料进行解淀粉芽孢杆菌发酵产絮凝剂的研究，以求在实现资源化的同时获得较好的絮凝剂生产工艺。

## 4 絮凝剂 BF-0 成分分析及絮凝机理初探

广义的微生物絮凝剂：是指具有絮凝活性的微生物或者微生物分泌物。具有高效、无毒、无二次污染和絮凝范围广泛等特点。可以在食品，水处理等多个领域推广应用<sup>[42]</sup>。

目前已知的微生物絮凝剂大多为多糖和糖蛋白。也有少数微生物絮凝剂为蛋白质、脂类、DNA 等其他生物大分子。已报道微生物絮凝剂的絮凝机理有：“桥联机理”、“菌体外纤维素纤丝”学说<sup>[16]</sup>、“类外源絮凝聚素”假说<sup>[17]</sup>，此外，还有离子键、氢键键桥学说、Butterfield 粘质假说、Butterfield 粘质假说、离散细胞和伸展桥键之间的三维基质模型假说、“病毒”假说等学说<sup>[18]</sup>。从微生物絮凝剂的多样性和表现出的絮凝范围的广泛性来看，絮凝是多种物化作用复杂交互形成的结果。所以为了更好地解释 BF-0 的絮凝机理，需要对絮凝剂 BF-0 的组成及各种反应条件对絮凝活性的影响进行更深入的研究。

本实验对 *B. amyloliquefaciens* BF-0 产生的絮凝活性物制的成分进行了分析，并在絮凝成分和物质结构确定的基础上进一步对絮凝机理进行简单探讨。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 实验菌种

同 3.1.1。

#### 4.1.2 培养基

优化发酵培养基：淀粉 15 g，氯化铵 1.0 g， $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g，NaCl 0.1 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g， $\text{H}_2\text{O}$  1000 mL，pH 7.0。

#### 4.1.3 絮凝活性测定方法

方法同 2.1.2。

#### 4.1.4 絮凝剂的发酵

于冰箱 4 °C 保存的平板中挑取 BF-0 单菌落，转入装有 40 mL 优化发酵培养基的 150 mL 的锥形瓶，于 37 °C 恒温摇床上 100 r/min 振荡培养 12 h，获得种子培养液。取一个 150 mL 的锥形瓶，装入 40 mL 优化发酵培养基后灭菌，然后按 1 % 的量接入种子培养液，在 37 °C 恒温摇床上 100 r/min 振荡培养 12 h。



#### 4.1.5 絮凝活性物质的分布

取 150 mL 的锥形瓶，装入 40 mL 初始 pH=7.0 的优化发酵培养基后灭菌，按 1% 的量接入 BF-0 活化培养后的菌液，于 37 °C 恒温摇床上 100 r/min 振荡培养。将菌种发酵液 4000 r/min 离心 8 min，上清液备用；沉淀用 pH 7.0 的与离心时发酵液相同体积的未接种发酵培养基洗涤后再离心，重复 4 次后得到的菌体用相同体积的未接种优化发酵培养基配成菌悬液。分别测定上述两溶液及未离心的菌种发酵液对高岭土悬液的絮凝率<sup>[40]</sup>。

#### 4.1.6 絮凝剂的制备

将得到的发酵液于 8000 r/min 条件下离心分离 10 min，去菌体，发酵液用旋转蒸发器浓缩至 1/2 体积，加入 4 倍体积的预冷无水乙醇混合均匀，可以看到有白色絮状物产生，于 4 °C 冰箱中静置 24 h 后，4000 r/min 离心 10 min 取得沉淀，收集沉淀溶于少量蒸馏水后进行冷冻干燥（干燥机的型号：生产公司），即得到 BF-0 絮凝剂粗制品<sup>[15,43]</sup>。

#### 4.1.7 絮凝剂成分分析

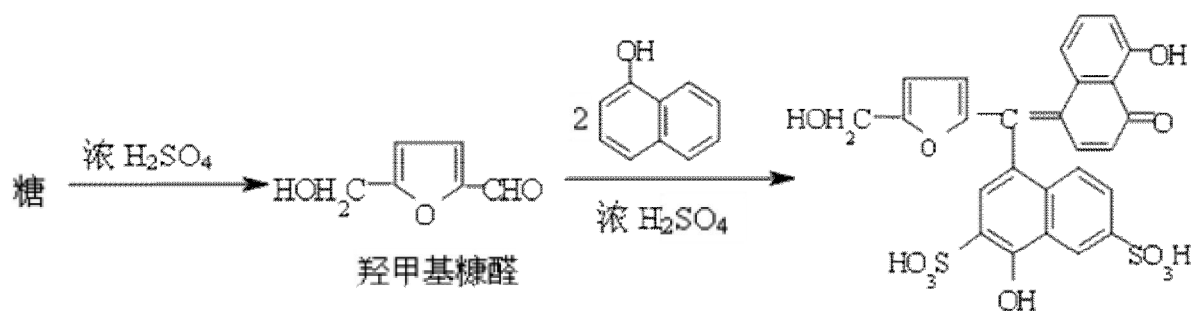
(1) 糖、蛋白质和核酸的定性分析

(i) 制样：絮凝剂粗制品配制成 2 g/L 的水溶液。

(ii) 糖类的定性分析

Molish 反应：

糖在浓硫酸或浓盐酸的作用下脱水形成糠醛及其衍生物与  $\alpha$ -萘酚作用形成紫红色复合物，在糖液和浓硫酸的液面间形成紫环，因此又称紫环反应。Molisch 反应可以鉴定单糖的存在，其反应方程式如下：



取试管加入 BF-0 絮凝剂水溶液 1 mL，然后加两滴 Molish 试剂，摇匀。倾斜试管，沿管壁小心加入约 1 mL 浓硫酸，小心竖直后观察颜色变化（以蒸馏水做空白对照实验）。

蒽酮反应：

糖经浓酸作用后生成的糠醛及其衍生物与蒽酮（10-酮-9, 10-二氢蒽）作用生成蓝

绿色复合物。

①称取粗多糖 0.01 g，容量瓶定容至 100 mL。沸水回流 2 h，冷却后重新定容至 100 mL。

②取样品 1 mL 于试管中，再加入 3 mL 的蒽酮试剂(溶解 2 g 蒽酮于 1 L 浓硫酸中)，室温放置 20 min，以蒸馏水做空白对照实验，观察结果。

### (iii) 蛋白质的定性分析

茚三酮反应：

在加热条件下，氨基酸或肽与茚三酮反应生成紫色（与脯氨酸或羟脯氨酸反应生成亮黄色）化合物的反应。取 2 mL 样品，加入 4 滴 0.1 % 茚三酮显色液煮沸后观察颜色变化。

(iv) 核酸的定性分析：紫外分光光度法：将配置好的絮凝剂水溶液用 WFZUV-2100 紫外可见分光光度计进行全波长扫描，观察 260 nm 波长处是否有吸收峰。

### (2) 苯酚—硫酸法测定多糖含量<sup>[44]</sup>

①样品的预处理：称取粗多糖 0.1 g，容量瓶定容至 100 mL。沸水回流 2 h，冷却后重新定容至 100 mL。

②标准曲线的制作：准确称取标准葡萄糖 25 mg 于 250 ml 容量瓶中，加去离子水至刻度。分别吸取 0.4、0.6、1.0、1.2、1.4、1.6 mL，各以去离子水补至 2.0 ml，然后加入 6 % 苯酚 1.0 ml，迅速垂直于液面滴加浓硫酸 5.00 mL，摇匀冷却，室温放置 20 min 以后于 490 nm 测光密度，以 2.0 ml 去离子水按同样显色操作为空白，得标准曲线。

③样品的测定：将 BF-0 絮凝剂粗制品配制成 0.1 g/L 的溶液，取待测样品溶液 2 mL，同标准曲线制作方法进行。

## 4.1.8 絮凝剂和高岭土结合键的检测

按文献<sup>[15]</sup>检测 BF-0 与高岭土颗粒之间的结合键。将高岭土水样调节 pH=7，然后用六连搅拌器进行混凝实验，分别用 2 mol/L EDTA、6 mol/L HCl 和 5 mol/L 尿素处理絮凝后的高岭土絮体，轻轻搅拌，静置一段时间后观察现象，再次加入少量的 CaCl<sub>2</sub> (1 %) 和 NaOH (6 mol/L) 溶液，观察现象。

## 4.2 结果和讨论

### 4.2.1 絮凝活性物质分布

BF-0 菌液、菌悬液、上清液的絮凝活性测定结果如图 4.1。

由图 4.1 可知，菌液离心后分别测定其上清和菌体对高岭土的絮凝率，测得菌液的

絮凝率为 84 % 时，其上清和菌体的絮凝率分别为 78 %、11 %。由此说明，絮凝活性物质为 BF-0 菌株在生长过程中产生的胞外分泌物，主要存在于发酵液上清中，而菌体上只含量很少絮凝活性物质。

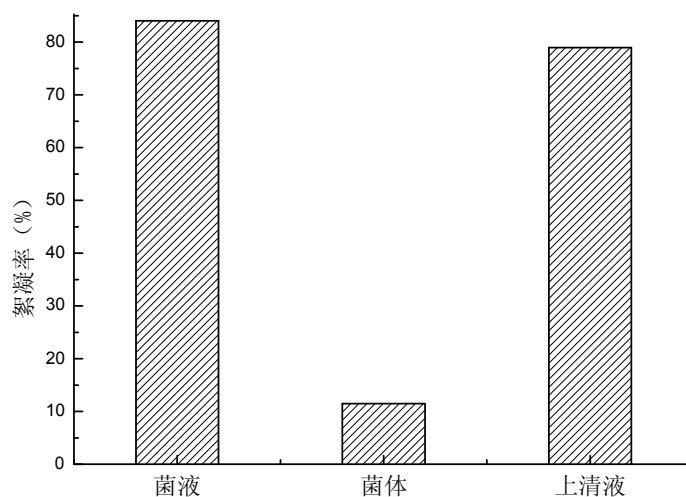


图 4.1 絮凝活性物质分布

Fig4.1 The distribution of active flocculations

#### 4.2.2 絮凝剂分离提纯结果

经冷冻干燥后得到白色淡黄的 BF-0 絮凝剂粗制品，产量为 5.2 g/L。将上述粗制品配制成 5 g/L 的溶液，测定其絮凝活性，发现溶液的絮凝效果良好，絮凝的过程中产生明显的粒径大的絮体。

#### 4.2.3 絮凝剂成分分析

##### (1) 糖和蛋白质的定性分析

通过糖和蛋白质的呈色反应，对 BF-0 粗提物进行定性分析，现象和结果如表 4.1

表 4.1 糖和蛋白质的呈色反应现象和结果

试验项目	现象	结果
Molish 反应	出现紫环，呈阳性反应	BF-0 絮凝剂含有糖
蒽酮反应	蓝绿色	BF-0 絮凝剂含有糖
茚三酮反应	无蓝色	BF-0 絮凝剂不含蛋白质

##### (2) 紫外光谱扫描图

BF-0 的紫外扫描结果(见图 4.2)为一条平滑的曲线，在 204 nm 处有一很强的吸收峰，

说明 BF-0 中含有吡喃环，主要成分是糖类物质；在 280 nm 处没有特征吸收峰，进一步证实 BF-0 不含蛋白质，260 nm 处存在较强的吸收峰，说明 BF-0 含有较多的核酸。

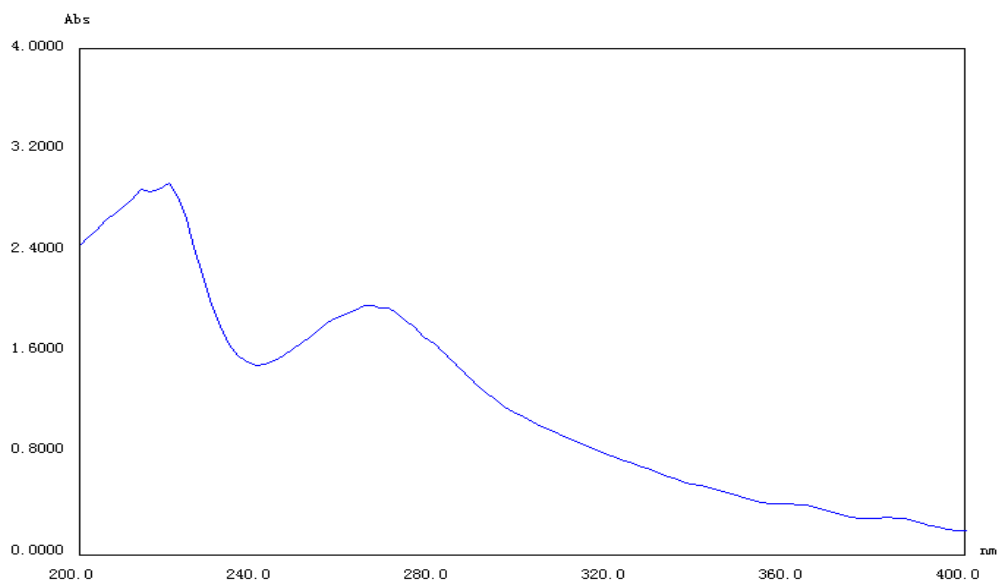


图 4.2 BF-0 的紫外扫描光谱图

Fig4.2 UV scanning spectra of BF-0

### (3) 多糖含量的测定

按实验方法制作葡萄糖标准曲线，得到葡萄糖标准曲线的回归方程  $y=12.88x+0.001$  ( $r=0.9997$ )。糖的质量浓度在 20~80 mg/L 范围呈线性。测得 BF-0 中多糖含量占 63%。

### 4.2.4 絮凝剂和高岭土结合键的检测结果

分别用 0.2 mol/L EDTA、6 mol/L HCl 和 5 mol/L 尿素处理相同 pH 条件下絮凝后的高岭土絮体，现象和结果分析如下表 4.2。从表 4.2 可知，在 BF-0 絮凝剂与高岭土颗粒之间的结合中同时存在离子键和氢键的作用。说明 BF-0 中的絮凝活性物质是典型两性高分子，在不同的水体环境中发挥的絮凝作用的活性基团不同，如马放<sup>[45]</sup>等研究证明在酸性条件下，氨基或是酰氨基优先质子化形成  $\text{NH}_4^+$ ，主要是通过氢键使 BF-0 絮凝剂与高岭土颗粒之间结合；碱性条件下，BF-0 活性物质中的羟基和羧基发生电离，形成大量的  $-\text{COO}^-$  和  $-\text{OH}^-$ ，主要是通过离子键使 BF-0 絮凝剂与高岭土颗粒之间结合。

表 4.2 絮凝剂和高岭土结合键的检测结果  
Tab4.2 Test results of flocculant and kaolin Bond form

试验项目	现象	结果分析
EDTA	出现明显的解絮现象, 浑浊, 加入 $\text{CaCl}_2$ 又重新形成絮体, 静置几分钟后溶液澄清。	EDTA 的螯合作用破坏了 $\text{Ca}^{2+}$ 在絮凝剂与高岭土之间的连桥, 使得絮体解絮; 在重新加入 $\text{Ca}^{2+}$ 后连桥重新形成, 解絮的絮体又重新聚集沉淀。
HCl	出现明显的解絮现象, 浑浊, 加入 NaOH 后重新形成絮体, 静置几分钟后溶液澄清。	大量 $\text{H}^+$ 的加入能与带负电的高岭土胶体结合, 导致絮凝剂与高岭土之间的离子键被破坏, 发生解絮; $\text{OH}^-$ 的加入使胶体重新带上了负电荷, 微生物絮凝剂与高岭土胶体之间重新形成絮体。
尿素	少量絮体发生解体, 微浑。	尿素与高岭土形成氢键, 破坏了高岭土与絮凝剂之间的氢键结合部分, 而它们之间以离子键结合完好无损, 因此才导致絮体部分解体。

### 4.3 本章小结

通过本研究得出: BF-0 絮凝剂为解淀粉芽孢杆菌 BF-0 分泌的胞外代谢物, 主要分布于发酵液中。利用 1 L 发酵培养基可发酵产 BF-0 絮凝剂 5.2 g, 其中主要的成分是多糖 (63 %) 和核酸, 不含蛋白质。鉴于絮凝剂 BF-0 主要成分为多糖和核酸的特性, 其热稳定性相对含蛋白质的絮凝剂好, 也决定了絮凝剂 BF-0 具有更广的应用范围。下一步将考察 BF-0 的热稳定性, 以及处理高温印染废水的可行性。

BF-0 的絮凝机制: BF-0 通过  $\text{Ca}^{2+}$  的架桥作用在离子键和氢键的共同作用下吸附高岭土颗粒发生絮凝沉降。

由于各种因素限制本研究只对絮凝剂 BF-0 的絮凝剂成分和絮凝机理进行了初步分析。为了深入的了解 BF-0 絮凝剂作用的机理, 还需要利用红外, 质谱, 扫描电镜对 BF-0 絮凝剂组成、结构、构象进一步研究分析。

## 5 BF-0 絮凝剂与硫酸铁复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验

印染废水是目前我国工业废水的主要组成部分，具有高 COD、难生物降解、高色度等特点。尤其是色度造成的环境污染，更是困扰环保工作者的首要问题，而染料才是产生各种色度污染的罪魁祸首。染料按性能分为：直接染料(direct dyes)、酸性染料(acid dyes)、分散染料(disperse dyes)、活性染料(reaction dyes)、还原染料(vat dyes)等。这些染料中以活性染料的使用最为广泛，活性染料的水溶性很好，色度很难去除。故本实验选择化学性质相对稳定的活性艳红 X-3B 来模拟染料废水，进行絮凝剂的脱色性能研究。

从以往多数的絮凝试验经验可知，应用单一的生物絮凝剂处理含活性染料较多的废水时可能效果并不理想。硫酸铁在工业污水中处理中应用较多、价格相对较低，但是过多的使用硫酸铁无机絮凝剂也会给环境造成二次污染。故本实验将考察絮凝剂的添加量、絮凝剂的复配比例等因素对印染废水的处理效果的影响，找到两种絮凝剂的最佳复配比例，优化处理条件，以求在减少硫酸铁的加药量的情况下，并获得较好的的脱色效果。

### 5.1 材料与amp;方法

#### 5.1.1 实验材料

试验水样：100 mg/L 的活性艳红 X-3B 的水溶液；絮凝剂 BF-0：为菌株 BF-0 发酵液按第 4 章方法提取的粗制品，将其配置成 1 g/L 的水溶液使用；硫酸铁，分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司，配成 5 % 的水溶液使用。

#### 5.1.2 实验装置

MY3000-6 六联电动搅拌器（湖北潜江梅宇）。

#### 5.1.3 絮凝活性测定方法

在 200 mL 的烧杯中加入 100 mg/L 的活性艳红 X-3B 的水溶液 150 mL 后，加入 5 mL  $\text{CaCl}_2$  (w=1 %) 搅拌，然后加入 1 g/L 的 BF-0 絮凝剂水溶液，放置于六联搅拌器上快搅 (150 r/min) 30 s，转入慢搅 (50 r/min) 1 min，然后静置 3 min。于上清液面下 1cm 处取样测吸光度  $\text{OD}_{538}$ ，以加蒸馏水的样品做对照。

$$E = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \% \quad \text{式 (5.1)}$$

E——为脱色率

A——为对照上清液  $OD_{538 \text{ nm}}$

B——为样品处理后上清液  $OD_{538 \text{ nm}}$

## 5.2 X-3B 模拟废水处理试验

### 5.2.1 BF-0 絮凝剂单独处理 X-3B 模拟废水试验

分别取 150 mL 活性艳红 X-3B 的水溶液放入 6 个 200 mL 的烧杯中,加入 5 mL  $\text{CaCl}_2$  ( $w=1\%$ )搅拌,然后分别加入 1 g/L 的 BF-0 絮凝剂水溶液 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL,放置于六联搅拌器上快搅 (150 r/min) 30 s,转入慢搅 (50 r/min) 1 min,然后静置 3 min。于上清液面下 1cm 处取样测吸光度  $OD_{538}$ ,以加蒸馏水的样品做对照,算取脱色率。

### 5.2.2 硫酸铁、硫酸铁与絮凝剂复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验

①分别取 150 mL 活性艳红 X-3B 的水溶液放入 6 个 200 mL 的烧杯中,分别加入 5%的硫酸铁 0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL,放置于六联搅拌器上快搅 (150 r/min) 30 s,转入慢搅 (50 r/min) 1 min,然后静置 3 min。于上清液面下 1cm 处取样测吸光度  $OD_{538}$ ,以加蒸馏水的样品做对照,算取脱色率 (同式 5.1)。

②分别取 150 mL 活性艳红 X-3B 的水溶液放入 6 个 200 mL 的烧杯中,分别加入 0.5 mL 的絮凝剂 BF-0,然后分别加入 5%的硫酸铁 0 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL,放置于六联搅拌器上快搅 (150 r/min) 30 s,转入慢搅 (50 r/min) 1 min,然后静置 3 min。于上清液面下 1cm 处取样测吸光度  $OD_{538}$ ,以加蒸馏水的样品做对照,算取脱色率 (同式 5.1)。

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 BF-0 絮凝剂单独处理 X-3B 模拟废水试验结果

不同浓度 BF-0 絮凝剂处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验结果,见图 5.1

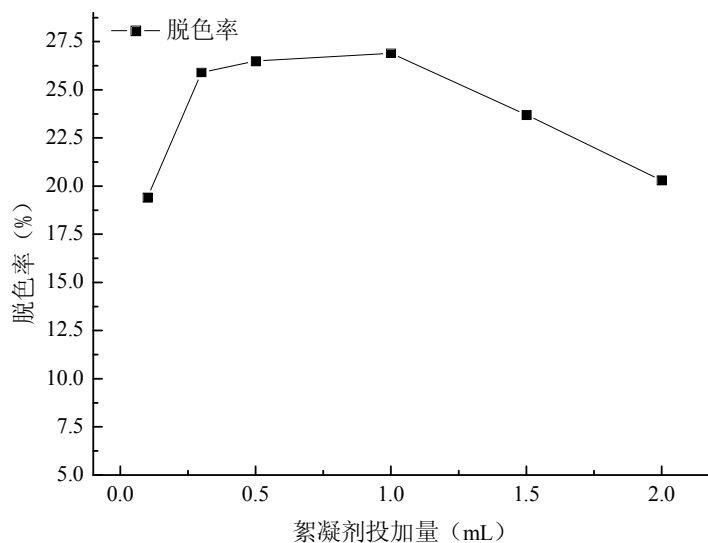


图 5.1 絮凝剂投加量对脱色效果的影响

Fig5.1 Flocculant dosage effect on the decolorization

由图 5.1 可知，絮凝剂对活性艳红 X-3B 模拟废水具有一定的脱色效果。在絮凝剂投加量为 1.0 mL 时，脱色效果最好，脱色率达 28.9 %。当絮凝剂投加量在 0.3 mL~1.0 mL 之间变化时，絮凝剂对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果变化不大。当絮凝剂投加量大于 1.0 mL，絮凝剂对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果反而下降，说明投加的絮凝剂的量与絮凝效果不是正相关的关系。这可能是由于过多的絮凝剂之间的电荷排斥作用导致不能形成很好的沉淀，使得活性艳红 X-3B 中的悬浮物增多，增加了吸光度。

### 5.3.2 硫酸铁、硫酸铁与絮凝剂复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验结果

不同浓度硫酸铁、不同浓度硫酸铁与絮凝剂复配处理活性艳红 X-3B 模拟废水试验结果，见图 5.2。



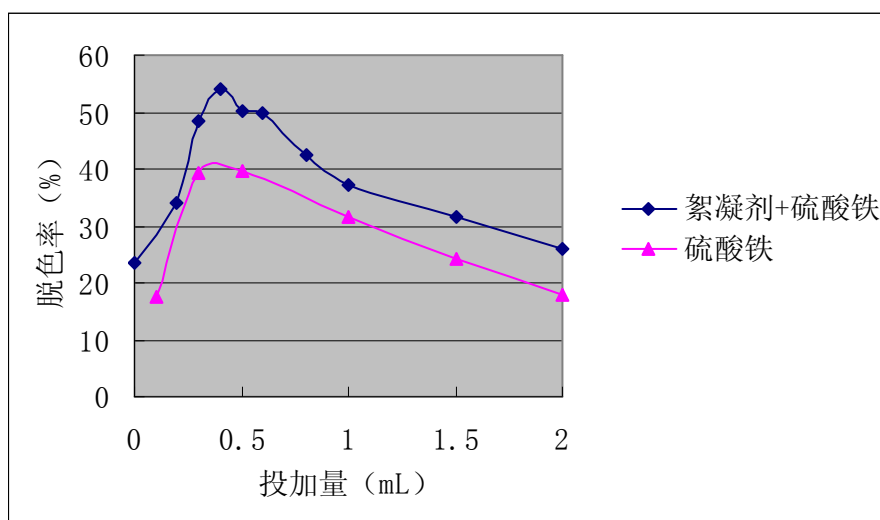


图 5.2 硫酸铁、絮凝剂 BF-0 复合硫酸铁模拟印染废水对比试验

Fig 5.2  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  and BF-0 Joint with  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  in Treatment of dyeing wastewater compared

由图 5.2 可知，①硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟废水具有一定的脱色效果。在硫酸铁投加量为 0.5 mL 时，脱色效果最好，脱色率达 40%。当絮凝剂投加量在 0.3 mL~0.5 mL 之间变化时，硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果变化不大。当硫酸铁投加量大于 0.5 mL 时，硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果反而下降。可能是过多的  $\text{Fe}^{3+}$  使得溶液中的正电荷过剩，形成了新的相互排斥的电荷平衡，导致小絮体很难沉淀。②硫酸铁和絮凝剂 BF-0 复配对活性艳红 X-3B 模拟废水脱色效果较好。在硫酸铁投加量为 0.4 mL 和絮凝剂投加量为 0.5 mL 时，对活性艳红 X-3B 脱色效果最好，脱色率达 53.9%。③絮凝剂 BF-0 与硫酸铁的复配，能有效的提高硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟染料废水的脱色效果。单独投加 0.5 mL 的絮凝剂 BF-0 时，对活性艳红 X-3B 模拟染料废水的脱色率为 25%；单独投加 0.5 mL 的硫酸铁时，对活性艳红 X-3B 模拟染料废水的脱色率为 39.8%；当同时投加 0.5 mL 的絮凝剂 BF-0 和 0.5 mL 的硫酸铁时，对活性艳红 X-3B 模拟染料废水的脱色率达 50.2%。说明在一定的浓度范围内，絮凝剂 BF-0 的加入能增强硫酸铁对活性艳红 X-3B 的脱色效果。

#### 5.4 本章小结

通过实验得出：絮凝剂 BF-0 和硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟染料废水都具有一定的脱色效果，当利用絮凝剂 BF-0 和硫酸铁联合处理活性艳红 X-3B 模拟染料废水时，较分别使用絮凝剂 BF-0 和硫酸铁单独处理模拟染料废水效果好。说明在一定的浓度范围内，絮凝剂 BF-0 的加入能增强硫酸铁对活性艳红 X-3B 的脱色效果。当絮凝剂 BF-0 投加比为 0.5 mL/150 mL、硫酸铁投加比为 0.4 mL/150 mL 时，对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果最好，脱色率最高，达 53.9%。

从以上实验可知生物絮凝剂与硫酸铁复合能增强能效，改善印染废水的脱色效果。为了获得更加高效的复合脱色絮凝剂，后续将开展生物絮凝剂 BF-0 同 PAC，PFC 等无机絮凝的联用处理印染废水脱色效果研究。

而在本研究中，BF-0 产生的絮凝剂对活性艳红 X-3B 的处理效率显著低于上一章得到的对高岭土悬浊液的絮凝效果，分析原因认为一方面可能是因为絮凝过程中缺少颗粒物作为絮核，高岭土悬浊液具有的颗粒物可以作为其卷扫核心，而活性艳红 X-3B 水溶液则缺乏。因此，后续研究可以利用高岭土、膨润土及活性粘土作为 BF-0 处理模拟印染废水的助凝剂。在实际的印染废水处理时，废水本身含有的物质复杂，不乏纤维等可以作为絮凝核心的物质，因此，利用生物絮凝剂处理实际废水的效果应好于模拟印染废水，且不需要添加其他物质等作絮凝核心。

## 6 结论与展望

### 6.1 全文总结

本文通过筛选获得了效果较好的产絮凝剂菌种，并对该菌株进行生理生化、分子生物学鉴定，同时对该菌株的培养条件进行了优化研究；絮凝剂组成成分分析，最后对获得的生物絮凝剂进行了模拟印染废水混凝试验。经过上述一系列的研究得出以下结论：

(1) 获得了两株絮凝活性良好的高效絮凝剂产生菌。两株菌经过形态学分析、生理生化特性分析以及 16S rDNA 序列同源性比对等方法鉴定，一株为 *B. amyloliquefaciens* BF-0，另一株为 *Bacillus licheniformis*. BF-1。为了进一步提高微生物絮凝产生菌的絮凝活性和产凝能力，可使用人工诱变育种技术，对两株菌进行诱变，筛选出产絮凝剂活性更强的菌株。

(2) 通过 *B. amyloliquefaciens* BF-0 发酵产絮凝剂培养条件研究，得出 BF-0 菌株的絮凝活性与菌株生长呈正相关，并在稳定期后达到稳定，最大细胞生长量与最高絮凝活性的时间均在 12 h 左右。相比其他的微生物絮凝剂产生菌获得最佳产凝活性的 48 h 和 72 h，其发酵时间明显缩短，这点在工业应用中的价值是不可估量的。

*B. amyloliquefaciens* BF-0 产絮凝剂的最适培养条件：培养基初始 pH=7.0，培养温度为 37 °C，摇床转速 100 r/min，菌株 BF-0 产絮凝剂的最佳碳源为淀粉，最佳氮源为氯化铵，适宜的碳氮比范围为 20~40。正交试验得出最佳培养基的组成：淀粉 15 g/L，氯化铵 1.0 g/L，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L，NaCl 0.1 g/L，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L，pH 7.0。

该实验结论是通过摇瓶培养得出的实验结果，摇瓶培养过程中很难对变化的 pH 以及营养组分进行调控，为了方便后续的大规模工业应用，还需要用发酵罐连续控制 pH、营养，对菌株 BF-0 产絮凝剂进行发酵实验研究。

(3) BF-0 絮凝剂为 *B. amyloliquefaciens* BF-0 分泌的胞外代谢物，主要分布于发酵液中。利用 1 L 发酵培养基可发酵产 BF-0 絮凝剂 5.2 g，其中主要的成分是多糖（63%）和少量核酸，不含蛋白质。BF-0 的絮凝机制：BF-0 通过 Ca<sup>2+</sup>的架桥作用在离子键和氢键的共同作用下吸附高岭土颗粒发生絮凝沉降。

(4) BF-0 絮凝剂和硫酸铁对活性艳红 X-3B 模拟染料废水都具有一定的脱色效果，当利用絮凝剂 BF-0 和硫酸铁联合处理活性艳红 X-3B 模拟染料废水时，较分别使用絮凝剂 BF-0 和硫酸铁单独处理模拟染料废水效果好。说明在一定的浓度范围内，絮凝剂 BF-0

的加入能增强硫酸铁对活性艳红 X-3B 的脱色效果。当 1 g/L 的絮凝剂 BF-0 投加比为 0.5 mL/150 mL、硫酸铁 (5%) 投加比为 0.4 mL/150 mL 时, 对活性艳红 X-3B 模拟废水的脱色效果最好, 脱色率最高, 达 53.9%。

可进一步考察温度、pH、转速、CaCl<sub>2</sub> 投加量等因素对 BF-0 与硫酸铁复合絮凝剂处理活性艳红 X-3B 模拟染料废水脱色效果的影响, 以及 BF-0 与其他无机絮凝剂复合对模拟印染废水脱色处理研究。

## 6.2 工作展望

随着微生物絮凝剂的深入研究开发, 更因微生物絮凝剂具有: 种类多, 高效, 安全等特性, 以及其对印染废水最佳的脱色和 COD<sub>Cr</sub> 去除效果大多在 pH 为碱性条件下获得的, 降低了印染废水由于酸碱度调节带来的处理成本等优势。使得微生物絮凝剂取代传统的无机高分子絮凝剂成为了一种趋势。但目前的研究还存在很多的问题: 真正的高效产凝菌少, 发酵成本较高; 絮凝机理模糊; 对于絮凝剂产生菌产絮基因的研究较少; 在印染废水处理方面, 处理功能单一, 特定的 MBF 只对某类印染废水或某几种染料废水的处理效果较好。因此今后对微生物絮凝剂的研究应主要着重几个以下方面:

(1) 通过筛选或者利用各种生物工程手段选育出更加高效、广谱的絮凝剂产生菌。

(2) 利用高浓度含糖、含氮有机废水及廉价原料进行微生物絮凝剂制备的工艺研究。利用廉价原料发酵淀粉废水<sup>[46]</sup>、味精废水<sup>[47]</sup>、啤酒废水、糖蜜废水等作为发酵产絮凝剂。刘立凡<sup>[48]</sup>等将糖蜜废水在不添加其他营养物质的条件下稀释 50 倍用来培养絮凝剂产生菌 HHE-P7, 获得的菌液具有较好的絮凝活性, 当培养液的投加量为 0.5 mL, 溶液 pH 为 9.0, CaCl<sub>2</sub> 投加量为 1.0 mL 时, 对高岭土悬液的絮凝率达 90% 以上。

(3) 研制微生物絮凝剂和其它絮凝剂的复合品, 做到优势互补, 增强效能。近年来研究人员发现在处理废水等复杂、稳定的分散体系时, 复合絮凝剂表现出优于单一絮凝剂的效果, 毕韶丹等利用与生物絮凝剂结构相近的有机高分子絮凝剂壳聚糖与无机絮凝剂 PAC<sup>[49]</sup>和 PFC<sup>[50]</sup>复合处理活性染料模拟废水, 脱色效果比单一处理明显改善。

(4) 加强对絮凝机理、动力学、絮凝剂的理化性质等的研究。通过对特定絮凝剂的成分进行分析, 以及絮凝剂特性研究, 掌握特定絮凝剂的絮凝机理; 在印染废水应用过程中, 针对不同成分的染料废水, 选择相对应的微生物絮凝剂。

## 致 谢

岁月如梭，三年的研究生生活转瞬即逝，不知不觉中迎来了毕业的尾声。校园的美丽风景，亲密的朋友，热情的篮球伙伴，敬爱的而又可爱的老师。这一切的美好都会成为我心中永恒的回忆。在此毕业之即，我百感交集，但我更想说的和做的就是感恩。

首先，我要感谢我的导师黄运平教授和指导老师蔡亚君老师，黄老师诲人不倦的高尚师德，朴实严谨的工作态度，平易近人的作风，待人处事的周全。对我影响深远。不仅使我树立了远大的学术目标、掌握了分析解决问题的方法，更加让我懂得待人接物的道理。本文从课题的开题到完成，每一步都得到了指导老师蔡亚君老师的悉心指导，她科学严谨的治学态度，让我清楚了一个科研工作者应具备的基本素质。在此，谨向他们表示崇高的敬意和诚挚的谢意。

本课题的顺利完成，要感谢环科所水项目课题组的夏东升教授、李海燕高工、杨小俊老师、杨俊老师、阮新潮老师等在小组研讨会上对本课题的研究方法，研究思路，可行性进行分析指导和帮助。还要感谢工程中心的苎麻课题组的陈洪高教授和其他老师以及师弟桂震和环境与城建学院的老师在学习生活上提供的支持和帮助。

最后，感谢我的父母，他们含辛茹苦无私奉献，为我的顺利毕业提供了保障。感谢武汉纺织大学，她为我们提供了良好生活环境和实验室条件。感谢和我一起走过三年的同学和朋友，师弟师妹们。祝：大家前程似锦！

李锋

2011年5月

## 参考文献

- [1] 陈元彩, 肖 锦. 环境科学进展. 1999, 7(3):84-89
- [2] Kurane R et al, Agric Biol Chem. 1979, 43 (5): 907-917
- [3] 马春燕. 印染废水深度处理及回用技术研[D]: [博士学位论文]. 上海: 东华大学, 2007
- [4] 马春燕, 谭书琼, 奚旦立. 印染废水处理原则及方法[J]. 印染, 2010, 16:30-32
- [5] 谭 艺, 林亲铁. 印染废水深度处理与回用技术研究进展[J]. 广东化工, 2009, 36(198): 132
- [6] 吴 键, 戴 桂. 微生物细胞的絮凝与微生物絮凝剂[J]. 环境污染与防治, 1994, (6):27-29
- [7] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(5): 371-385
- [8] Takeda M, Kurane R, Koizumi J, et al. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Agric. Biol. Chem., 1991, 55: 2663-2664
- [9] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, et al. Purification and characterization of liquid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*[J]. Biosci.Biotechnol. Biochem., 1994, 58: 1977-1982
- [10] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y, et al. Modes of flocculation of yeast cell flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ-7002[J]. Agric. Biol. Chem. , 1976a, 40: 1565-1571
- [11] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y, et al. Conditions of production of microbial cell flocculant produced by *Aspergillus sojae* AJ-7002[J]. Agric. Biol. Chem. , 1976b, 40: 1341-1347
- [12] Nakamura J, Miyashiro S, Hirose Y, et al. Purification and chemical analysis of microbial cell flocculants produced by *Aspergillus sojae* AJ-7002 [J]. 1976c, 40: 619-624
- [13] 江 锋, 黄晓武, 胡勇有. 胞外生物高聚物絮凝剂的研究进展(上)[J]. 给水排水, 2002, 28(8):83-89
- [14] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19:371-385
- [15] 朱富坤, 刘彬彬, 闫永胜, 等. 微生物絮凝剂 PF-2 的成分分析及絮凝机制研究[J], 环境污染与防治, 2008, 30(2):38-40
- [16] Wang Z, Wang K X. Studies on bioflocculant producing microorganism[J]. Acta

- Microbiologica Sinica, 1995, 35(2): 121-129
- [17] Miki B L, Poon N H, James A P, Seligy V L. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Bacteriol, 1982, 150(2): 878-889
- [18] 马 放, 张金凤, 远立江, 等. 复合型生物絮凝剂成分分析及其絮凝机理的研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(11):1491-1496
- [19] 孙 政. 印染废水水质特征及生物处理技术综述[J]. 煤矿现代化, 2007, (1):62-63
- [20] 王振东, 张志祥. 印染废水的污染与控制[J]. 环境科学与技术, 2001, 24(1):19-23
- [21] Kurane R, Hatamochi K, Kakuno T, et al. Production of a Bioflocculant by *Rhodococcus Erythropolis* S-1 Grown on Alcohols[J]. Biosci. Biotech. Biochem., 1994, 58(2): 426-429
- [22] Levy N Y, Magdassi V S. Flocculation of Betonies Particles by a Cyan bacterial Bioflocculant[J]. Colloids and Surfaces, 1990, 48: 337-349
- [23] Kurane R, Nohata Y. Microbial Flocculants of Waste Liquids and Oil Emulsion by a Bi-oflocculant from *Alcaligenes Latus*[J]. Agric.Biol.Chem, 1991, 55(4): 1127-1129
- [24] 张志强, 林 波. 利用啤酒废水所产微生物絮凝剂处理靛蓝印染废水的研究[J]. 环境污染与防治, 2006, 28(2):149-151
- [25] 张志强, 林 波. 高活性微生物絮凝剂处理靛蓝印染废水的动力学研究[J]. 工业用水废水, 2007, 27(4):44-47
- [26] 李风琴等. 微生物絮凝剂 MHXGS2 处理靛蓝印染废水脱色的研究[J]. 江西化工, 2004, (4):121-124
- [27] 周本军, 林 波. 微生物絮凝剂 MNb-1 处理靛蓝废水研究[J]. 合肥工业大学学报, 2008, 31(4):515-517
- [28] 柴晓利, 陈 洁. 微生物絮凝剂产生菌的筛选[J]. 污染防治技术, 2000, 13(2):68-70
- [29] 刘 晖, 周康群, 胡勇有, 等. 青霉菌 HHE-P7 利用酱油废水产生微生物絮凝剂的研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(3):40-44
- [30] 黄惠莉, 林文銮. 印染废水脱色菌的选育基脱色研究[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 1997, 18(3):293-296
- [31] 庄源益, 戴树桂, 李 彤, 等. 生物絮凝剂对水中染料絮凝效果探讨[J]. 水处理技术, 1997, 23(6):349-352
- [32] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著, 黄培堂等译. 《分子克隆实验指南》精编版[M], 北京: 化学工业出版社, 2008, 603
- [33] 杨胜远, 韦 锦, 李 云, 等. 一株产抗菌活性物质解淀粉芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(21):208

- [34] 王英国, 王军华, 权春善, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12):41-45
- [35] 韩 燕, 关志强. 纳豆中微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝活性研究[J]. 武汉生物工程学院学报, 2008, 4(4):190-193
- [36] Ichiro Watanabe, Yoshiaki Satoh. Screening Isolation and Taxonomical Properties of Microorganisms Having Acrylonitrile-hydrating Activity[J]. Agric. Biol. Chem., 1987, 51(12):3193-3199
- [37] 钟文文. 微生物絮凝剂产生菌的筛选及其培养条件优化的研究[J]. 环境工程学报, 2007, 1(8):141
- [38] 杜荣骞. 生物统计学(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004:242-248
- [39] 李学翔, 汪玉娟, 薛正莲, 等. 两株微生物絮凝剂产生菌筛选与复合培养研究[J]. 生物技术, 2007, 17(1):31
- [40] 费文砚, 吴 涓. 微生物絮凝剂产生菌的选育及絮凝特性研究[J]. 生物技术, 2007, 17(3):62
- [41] 屹 立, 赵 吉, 刘 君, 等. 高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及其絮凝特性分析[J]. 中国给排水, 2007, 23(21):46
- [42] HE N, LI Y, CHEN J, et al. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2002, 11: 137-148
- [43] SCHMIDT I, BOCK E, JETTEN M S M. Ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* with  $\text{NO}_2$  as oxidant is not inhibited by acetylene[J]. Microbiology, 2001, 147
- [44] 孟 利, 张兰威. 苯酚-硫酸法测定西藏灵芝胞外粗多糖及影响因素[J]. 理化检验-化学分册, 2008, 44(3):290-291
- [45] 朱艳彬, 马 放, 李大鹏. 一株球形芽孢杆菌产絮凝活性物质及其絮凝特征[J]. 给水排水, 2009, 35:279-280
- [46] 蔡琳晖, 聂麦茜, 贾建慧. 以预发酵淀粉废水为碳源生产微生物絮凝剂[J]. 应用化工, 2007, 36(5):457-458
- [47] 尹 华, 余丽萍. 固氮菌 J-25 利用味精废水产生絮凝剂的研究[J]. 环境化学, 2003, 22(6):582-587
- [48] 刘立凡, 阮彩群. 糖蜜废液培养微生物絮凝剂及絮凝特性研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(8):152-154
- [49] 毕韶丹, 沈春旭. 复合絮凝剂对染料废水的脱色作用[J]. 工业水处理, 2009, 29(7):57-59
- [50] 毕韶丹. 羧甲基壳聚糖及复合絮凝剂对染料废水的脱色研究[J]. 环境保护科学, 2009, 35(8):64-67



## 附 录

### 攻读硕士学位期间发表的论文及获奖:

- [1] 李锋（第一作者）. 微生物絮凝剂及其在印染废水处理中的应用[J]. 广州化工, 2010, 38（9）：12-14
- [2] 李锋（第一作者）. *Sphingomonas* sp. X20 的絮凝特性及培养条件研究[J]. 生物技术, 2010, 20（6）：78-81
- [3] 李锋（第一完成人）. 微生物絮凝剂处理高温印染废水的研究. 武汉纺织大学创新课题, 武汉纺织大学研究生处, 2011. 3