

# 1 株高效产絮凝剂菌株的分离及其在冷轧含油废水处理中的应用

雷国元, 丁翠萍, 杨家轩

(武汉科技大学矿产资源高效利用与造块湖北省重点实验室, 武汉 430081)

**摘要:** 从土壤中分离出 1 株高效产絮凝剂菌株 T-3, 经形态学特征分析、生理生化实验及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.). 研究了该菌株的培养条件, 如 pH 值、温度、碳源、氮源对产絮凝剂性能的影响. 结果表明, 该菌株对碳源、氮源有较普遍的适应性; 初始 pH 值为 9, 培养温度为 25℃ 时, 产絮凝剂性能较好. 经过糖、蛋白质的呈色反应、紫外扫描及 Fourier 变换红外光谱分析, 发现该菌株所产生的絮凝剂中含有—OH 和—COO<sup>-</sup>, 絮凝剂为阴离子型絮凝剂, 其主要成分是多糖. 将该絮凝剂用于冷轧含油废水处理, 取得了良好的效果. 当 CaCl<sub>2</sub>、絮凝剂、聚合氯化铝用量分别为 4 g·L<sup>-1</sup>、10% (体积分数) 和 1 g·L<sup>-1</sup>, pH 值为 7 时, 油含量、COD 浓度和浊度分别从 4 819 mg·L<sup>-1</sup>、28 456.8 mg·L<sup>-1</sup>、3 950 降到 10 mg·L<sup>-1</sup>、218.4 mg·L<sup>-1</sup>、1.36, 去除率分别为 99.79%、92.32% 和 99.97%. 絮凝剂与油滴颗粒之间通过范德华力、氢键及 Ca<sup>2+</sup> 的配位桥联而发生相互作用, 其中 Ca<sup>2+</sup> 的配位桥联作用最为重要.

**关键词:** 微生物絮凝剂; 含油废水; 冷轧; 机制; 废水处理

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)09-2716-08

## Isolation of an Excellent Bio-flocculant-producing Strain and Its Application in the Treatment of Cold-rolling Waste Oily Water

LEI Guo-yuan, DING Cui-ping, YANG Jia-xuan

(Hubei Key Laboratory for Efficient Utilization and Agglomeration of Metallurgic Mineral Resources, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

**Abstract:** An excellent strain (designated as T-3) which produces bio-flocculants was isolated from soil samples, and identified as *Klebsiella* sp. species based on the analysis of morphology, physiology and biochemistry and 16S rDNA sequences measurement. The effects of culture conditions such as pH values, temperature, carbon sources and nitrogen sources on bio-flocculants production by T-3 strain were studied. The experiment results show that T-3 strain has better adaptability to carbon sources and nitrogen sources, and higher capacity of bio-flocculants was obtained when the initial pH value of culture and temperature were 9 and 25℃ respectively. Based on the colorimetric reactions of proteins and polysaccharide substance, ultraviolet scanning analysis and Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis, it is found that the bio-flocculants produced by T-3 strain contains —OH and —COO<sup>-</sup> groups and belongs to anionic type flocculant. Moreover, the main component is polysaccharides. The treatment of oily cold-rolling wastewater by the bio-flocculant was investigated and the better result was obtained. When the dosages of CaCl<sub>2</sub>, bio-flocculants and poly aluminium chloride were 4 g·L<sup>-1</sup>, 10% (volume fraction) and 1 g·L<sup>-1</sup> respectively, and the pH value was 7.0, the oil concentration, COD and turbidity were decreased to 10 mg·L<sup>-1</sup>, 218.4 mg·L<sup>-1</sup> and 1.36 from 4 819 mg·L<sup>-1</sup>, 28 456.8 mg·L<sup>-1</sup> and 3 950 with the removal efficiencies of 99.79%, 92.32% and 99.97% respectively. The interaction between flocculant and oily droplets is achieved by the interaction of Van der Waals force, hydrogen bond and the bridged coordination of Ca<sup>2+</sup>, in which the bridged coordination of Ca<sup>2+</sup> is the dominant.

**Key words:** bio-flocculants; oily wastewater; cold-rolling; mechanism; wastewater treatment

冷轧含油废水污染物浓度高, 处理难度很大, 其处理在生产上仍然没有得到解决<sup>[1]</sup>. 含油废水有多种处理方法<sup>[2-7]</sup>, 絮凝法是经济、可行的方法之一, 新型絮凝剂的开发和应用着力于新型无机高分子絮凝剂和复合型絮凝剂<sup>[8-10]</sup>, 但其自身存在以下问题: 不同程度的毒性而造成二次污染; 污泥量大、可降解性差, 增加了污泥处理成本. 这些问题使其在某些特定污水处理领域的应用受到限制.

微生物絮凝剂 (MBF) 是一类由微生物产生的、

有絮凝活性的高分子代谢产物, 可以絮凝、沉淀水中的固体悬浮颗粒和胶体颗粒<sup>[11]</sup>. 与无机或有机高分子絮凝剂相比, 微生物絮凝剂具有高效、无毒、无二次污染、能自然降解等优点. 目前微生物絮凝剂已有许多研究应用<sup>[12-14]</sup>, 但在高浓度含油废水处理方面

收稿日期: 2010-09-29; 修订日期: 2011-01-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (50578051)

作者简介: 雷国元 (1964~), 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物技术、水处理理论与工艺, E-mail: leiguoyuanhit@126.com

却鲜有报道.

为探索经济、高效、绿色的冷轧含油废水处理技术,本研究从土壤中筛选出 1 株高效产絮菌株 T-3,并将其产生的絮凝剂用于冷轧含油废水处理,通过絮凝剂成分、废水中油滴粒径和 Zeta 电位等分析,探讨该絮凝剂的作用机制,以期为其广泛使用提供理论基础.

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 废水来源与性质

含油废水取自某钢铁公司冷轧废水站,其主要油成分为棕榈油,棕榈油是从棕榈的果肉中提取出来的油脂,其中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸约各占一半.不饱和脂肪酸分子中含有一个或多个双链的脂肪酸,由一条长的碳氢链(一般为 16、18、20 碳)组成;链的一端有一个羧基,链间含有一个或几个双键.饱和脂肪酸则没有双键.由此可知,该含油废水油粒表面带有羧基.

该废水 COD 为 20 000 ~ 30 000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;油的浓度为 1 000 ~ 10 000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;浊度为 1 710 ~ 17 400; pH 值为 4 ~ 6;用 MS2000G 型激光粒度测定仪(英国马尔文仪器公司生产)测定油滴粒径范围为 0.1 ~ 4.5  $\mu\text{m}$ ,中位粒径  $d(0.5)$  为 0.616  $\mu\text{m}$ ;用 Zeta 电位仪(美国 CD 公司生产)测定油滴的 Zeta 电位为 -30 mV 左右.所以,该废水为高浓度、油滴高度稳定分散的含油废水.

### 1.2 菌株的筛选及鉴定

#### 1.2.1 菌株的分离与筛选

用常规的细菌分离纯化方法<sup>[15]</sup>,从土壤、活性污泥及富营养化湖底泥中分离出数株产絮凝剂微生物,通过高岭土絮凝实验评价絮凝效果,发现 1 株从土壤中分离出的菌株具有优良的产絮凝剂能力,记为 T-3.

实验用培养基:葡萄糖 20 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2 g、尿素 0.5 g、酵母膏 0.5 g、NaCl 0.1 g、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g、pH 7.0、蒸馏水 1 000 mL.

培养条件:在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 培养基,灭菌后接入 3% 菌液,在 25 $^\circ\text{C}$ ,130 r/min 的振荡器中培养至预定时间.

#### 1.2.2 菌株的形态观察和生理生化鉴定

对菌株的菌落特征、细胞特征进行观察,并参照文献[15,16]进行相关生理、生化特征鉴定.

#### 1.2.3 菌株 16S rDNA 鉴定及分析

以冷冻保存的菌液为模板,用 16S rRNA 的一对通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CGGTTACCTTGTACGACTTC-3') 进行 PCR 扩增反应.反应液为 50  $\mu\text{L}$ ,含有 10  $\times$  PCR buffer 5  $\mu\text{L}$ ,Pfu 1  $\mu\text{L}$ ,dNTPs(10 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ,27F 2  $\mu\text{L}$ ,1492R 2  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 37  $\mu\text{L}$ .PCR 反应条件为:94 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min,35 个循环(94 $^\circ\text{C}$  变性 30 s,56 $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$  延伸 2 min),最终 72 $^\circ\text{C}$  延伸 10 min.PCR 扩增产物做 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳后所需的 DNA 条带采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,回收纯化后的产物检验后由北京鼎国昌盛生物技术有限公司进行测序.

菌株 16S rDNA 序列分析:利用 Blast 将所测得序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 基因序列进行同源性分析,使用 ClustalW 与从 GenBank 数据库中获得 的 16S rDNA 基因序列进行多序列比较,最后用 Mega4.1 软件中的邻位连接(Neighbour Joining, NJ)法构建 16S rDNA 系统发育树,bootstrap 检验,重复 1 000 次,确定该菌株的分类地位.

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 T-3 产絮凝剂条件实验

分别改变培养基中的碳源、氮源、培养温度、pH 值等条件进行单因素实验,其他培养条件不变,培养至一定时间后,测定培养液对高岭土的絮凝率.

#### 1.3.2 含油废水处理条件实验

pH 值实验:在 50 mL 水样中依次加入  $\text{CaCl}_2$  溶液( $\text{CaCl}_2$  固体量 0.2 g),T-3 菌液 10 mL,调节至不同的 pH 值,混匀后静置 5 min,取上清液测浊度.

絮凝剂(记为 MBF T-3)投加量实验:在 50 mL 水样中依次加入  $\text{CaCl}_2$  溶液( $\text{CaCl}_2$  固体量 0.2 g),改变菌液用量,调节 pH 值至 7.0 左右,混匀后静置 5 min,取上清液测浊度.

助凝剂投加量实验:在 50 mL 水样中加入菌液 10 mL,改变  $\text{CaCl}_2$  用量,调节 pH 值至 7.0 左右,混匀后静置 5 min,取上清液测浊度.

聚合氯化铝协同作用:在 50 mL 水样中加入  $\text{CaCl}_2$  溶液( $\text{CaCl}_2$  固体量 0.2 g),改变菌液及聚合氯化铝用量,调节 pH 值至 7.0 左右,混匀后静置 5 min,取上清液测浊度.

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 絮凝活性测定方法

实验用絮凝率来定量表示微生物絮凝剂的絮凝性.方法如下:取 0.5% (平均粒径约 2.5  $\mu\text{m}$ ) 的高岭土悬浮液 100 mL,加 0.6 mL 菌液,摇匀后静置 5

min, 取上清液, 用紫外-可见分光光度计测定其在 550 nm 处的吸光度值  $D_{550}$ , 以不加培养液的样品作对比, 絮凝率  $E_a$  计算方法为:

$$E_a(\%) = \frac{D_{550}(\text{无絮凝处理}) - D_{550}(\text{絮凝处理})}{D_{550}(\text{无絮凝处理})} \times 100\% \quad (1)$$

含油废水处理中, 用浊度去除率  $E_t$  来表征其絮凝活性. 方法为: 取 50 mL 冷轧含油废水, 加入适量的  $\text{CaCl}_2$  和菌液, 调节 pH 值至 7.0 左右, 混匀后静置 5 min, 取上清液测浊度. 絮凝率  $E_t$  计算方法为:

$$E_t(\%) = \frac{\text{处理前浊度} - \text{处理后浊度}}{\text{处理前浊度}} \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.4.2 絮凝剂 MBF T-3 的提取

将培养至特定时间的培养液置于冷冻离心机中, 恒温 (15℃) 下高速 (11 000 r/min) 离心 10 min 后去除菌体, 提取上清液后, 加入 3 倍体积的预冷乙醇, 然后将其放置在冰箱 (5℃) 中过夜, 之后于 4 000 r/min 的转速下离心 10 min, 得到沉淀物, 最后将沉淀物真空干燥, 得到絮凝剂粗品.

#### 1.4.3 生长曲线与絮凝率测定

参考文献 [17] 测定细菌的生长曲线和絮凝率.

#### 1.4.4 热稳定性试验

将絮凝剂加热至不同温度后保温, 以 0.6% 的投加量加入到高岭土悬液中, 磁力搅拌 2 min, 静置 5 min, 取上清液测  $D_{550}$ .

#### 1.4.5 MBF T-3 成分分析

用蒽酮反应、Molish 反应、缩二脲反应、黄色反应、茚三酮反应以及紫外扫描分析初步判断提取后 MBF T-3 的主要成分; 用 Fourier 变换红外光谱仪 (德国 BRUKER 公司, 型号 VERTEX 70) 分析微生物絮凝剂的特征基因.

#### 1.4.6 水质分析方法

分别用重铬酸钾法、重量法测定水中 COD、油浓度 [18]; 用 TDT-1 型浊度仪 (武汉恒岭科技有限公司生产) 测定水的浊度值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的分离筛选

从肥沃土壤、活性污泥及富营养化湖底泥等样品中分离筛选出多种产絮凝剂菌株, 经过复筛和传代培养, 发现 1 株产絮菌 (记为 T-3) 的产絮凝剂性能较好, 稳定性较高, 对高岭土悬浮液的絮凝率稳定在 95% 以上.

### 2.2 T-3 菌株形态及生理生化实验鉴定结果

T-3 菌株的菌落为圆形, 白色, 黏性大, 与培养基结合紧密, 镜检发现该菌株细胞为细杆状, 约为 2 ~ 4  $\mu\text{m}$ , 属于好氧或兼性厌氧菌, 不运动. 常规的细菌鉴定实验结果如表 1 所示.

表 1 T-3 菌株的鉴定

Table 1 Identification of strain T-3

试验名称	结果	试验名称	结果
革兰氏染色	-	吲哚试验	-
过氧化氢酶试验	+	甲基红 (M. R.) 试验	+
明胶液化试验	-	淀粉水解试验	-
硝酸盐还原试验	-	乙酰甲基甲醇 (V. P.) 试验	+

### 2.3 T-3 菌株的 16S rDNA 基因序列

PCR 扩增后得到长约 1 500 bp 的 16S rDNA 片段 (图 1). 扩增片段经测序, 测得其长度为 1 435 bp.

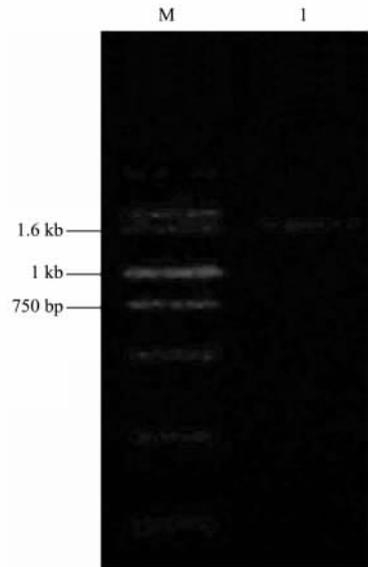


图 1 T-3 菌株的 16S rDNA 片段扩增电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of 16S rDNA gene of strain T-3

### 2.4 系统进化树分析

将 T-3 的 16S rDNA 基因序列提交 GenBank 数据库, 并与数据库中的序列进行 Blast 比对, 结果显示, 该菌株的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 中多株克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) 的 16S rDNA 基因系列的同源性达 99%, 结合菌株的形态和生理生化特征, 鉴定该菌株为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.). 图 2 是该菌株及部分相关菌株基于 16S rDNA 基因的系统进化树.

### 2.5 T-3 菌株的培养特征

T-3 菌株在液体培养基中的生长曲线和各生长阶段的絮凝性能如图 3 所示. 由此可知, 培养液的絮

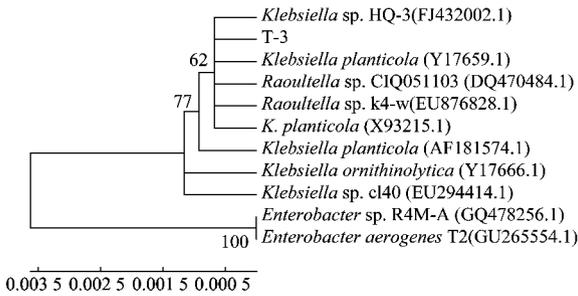


图 2 T-3 菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain T-3

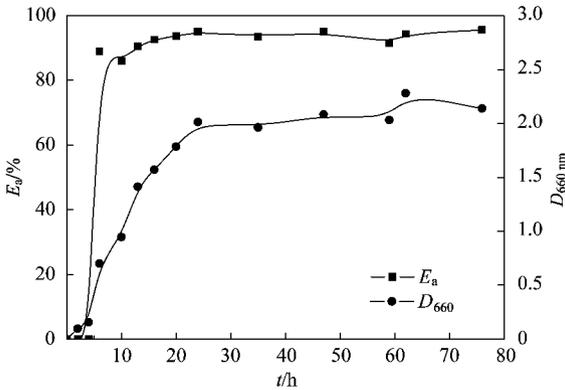


图 3 T3 菌的生长曲线与各阶段的絮凝率

Fig. 3 Growth curve of T3 strain and flocculating rate during the growth stage

凝活性与菌体生长量呈同步增加的关系,细菌处于稳定期时絮凝活性最高. 这表明絮凝的活性物质是在细菌生长过程中分泌产生的,是胞外分泌物.

## 2.6 培养条件对菌株 T-3 产絮凝剂性能的影响

不同细菌产絮凝剂的条件不同,为了寻求适宜的培养条件,进行碳源、氮源、培养基初始 pH 值等条件实验,这些因素对絮凝剂絮凝能力的影响分别如表 2 和图 4 所示. 碳源、氮源的实验结果表明,该菌株对碳源、氮源有普遍的适应性,因此,可以选择工业废水如糖蜜废水等作为其营养物质. 培养基初始 pH 值的实验结果表明,该菌株在 pH 值为 9~10 时产絮性能最佳. 在随后的连续监测中发现,初始 pH 值为 9~10 时,培养基的最后 pH 值始终稳定在 6~7 的范围内,表明该菌株在中性偏碱性环境中生长良好. 而 pH 值降低的原因则是该菌株在生长过程中产酸,降低了培养基的 pH 值.

此外,初步考察了温度对该菌株产絮凝剂性能的影响. 在 15、25、35℃ 温度条件下进行实验,其絮凝率分别为 94.36%、94.53%、87.12%,所以,在

表 2 碳源、氮源对 T-3 菌株产絮凝剂的影响

Table 2 Effects of carbon and nitrogen sources on MBF T-3 production

碳源	$E_a/\%$	氮源	$E_a/\%$
葡萄糖	96.20	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	93.67
蔗糖	95.97	牛肉膏	93.55
麦芽糖	96.55	蛋白胨	96.32
D-果糖	96.78	酵母膏	95.52
可溶性淀粉	88.26	尿素	96.09

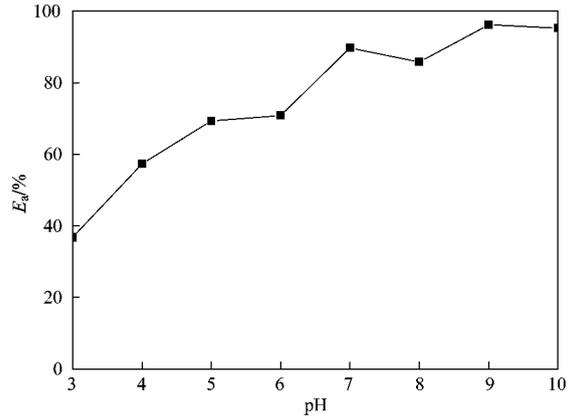


图 4 培养基初始 pH 对 T-3 菌株产絮凝剂的影响

Fig. 4 Effect of the initial pH value of culture on flocculants production by strain T-3

广泛的温度范围内,该菌株均有较好的产絮凝剂能力,25℃ 左右时较好.

## 2.7 MBF T-3 处理含油废水的研究

### 2.7.1 pH 值对 MBF T-3 处理含油废水的影响

pH 值对胶体颗粒的表面电荷和 Zeta 电位、絮凝剂水溶液性质及其絮凝作用都有很大的影响<sup>[19]</sup>. 不同胶体体系,絮凝剂的适宜 pH 值不同. MBF T-3 处理含油废水时,pH 值对处理效果的影响如图 5 所示. 由此可知,pH 值为 5~7 时,絮凝率随 pH 值的增加而增加;当 pH 值为 7~8 时,其絮凝率在 90% 以上,达到最佳处理效果.

### 2.7.2 MBF T-3 投加量对含油废水处理效果的影响

水处理过程中,絮凝剂投加量是影响处理效果的重要因素. 絮凝剂投加量对含油废水处理效果的影响如图 6 所示. 结果表明,随着投加量的增加,其絮凝率逐渐升高并趋于稳定. 当投加量为 16% (体积比)时,废水浊度去除率达到 96.94%;随后,继续增加絮凝剂投加量,絮凝率变化不大.

### 2.7.3 $\text{CaCl}_2$ 对 MBF T-3 处理含油废水效果的影响

金属离子可以加强微生物絮凝剂的桥联作用和中和作用<sup>[20]</sup>. 选择  $\text{CaCl}_2$  为助凝剂, $\text{CaCl}_2$  用量对絮凝效果的影响如图 7 所示. 由此可知,当投加量

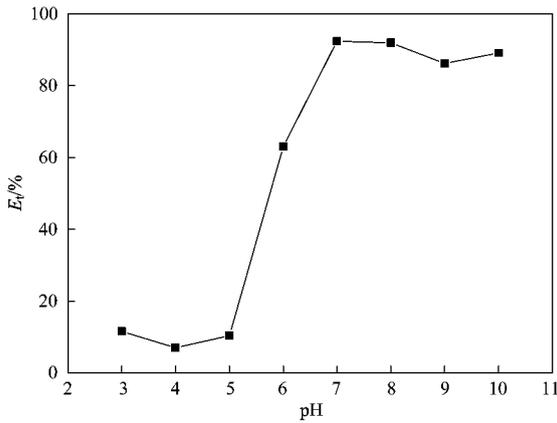


图5 pH 值对微生物絮凝剂含油废水处理效果的影响

Fig. 5 Effect of the pH value on the treatment of oily wastewater by bio-flocculant

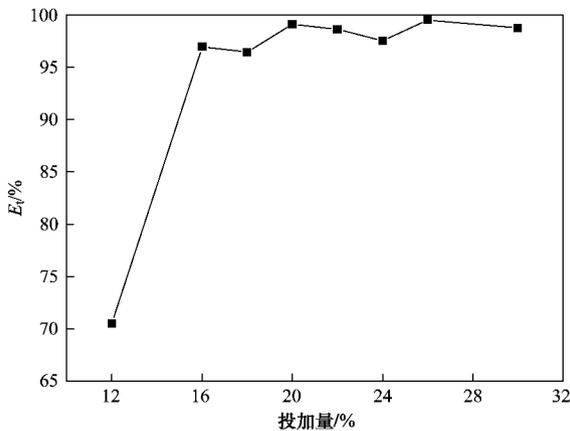


图6 不同 MBF T-3 投加量时对含油废水的处理效果

Fig. 6 Effect of MBF T-3 dosage on the treatment of oily wastewater

$< 3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 随着  $\text{CaCl}_2$  用量的增加, 絮凝效果逐渐变好; 当投加量  $> 3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 其絮凝效果趋于稳定, 接近于 100%, 所以, 本研究选择  $\text{CaCl}_2$  的投加量为  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### 2.7.4 MBF T-3 与聚合氯化铝协同作用

为了降低 MBF T-3 的投加量, 考察了聚合氯化铝与 MBF T-3 协同作用对含油废水处理效果的影响, 结果如图 8 所示. 由此可知, 当絮凝剂用量高于 6%、聚合氯化铝投加量高于  $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 浊度可以降至 20 以下; 当絮凝剂投加量为 10% (体积分数), 聚合氯化铝投加量为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 浊度可以降至 2.0 左右. 因此, 添加少量的聚合氯化铝可以大大地降低微生物絮凝剂的投加量.

#### 2.7.5 含油废水综合处理效果

选择最优条件: 助凝剂  $\text{CaCl}_2$  投加量  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

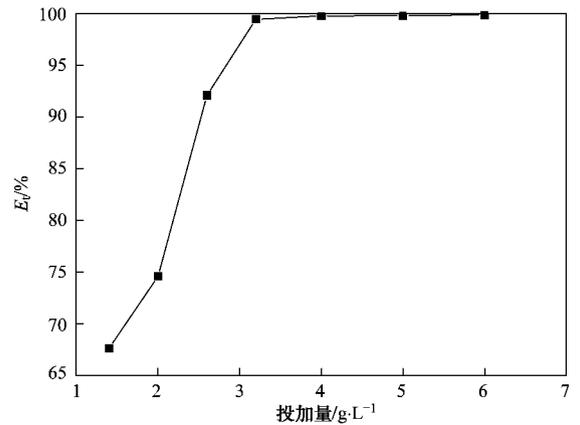
图7  $\text{CaCl}_2$  投加量时对含油废水处理的影响

Fig. 7 Effect of  $\text{CaCl}_2$  dosage on the treatment of oily wastewater

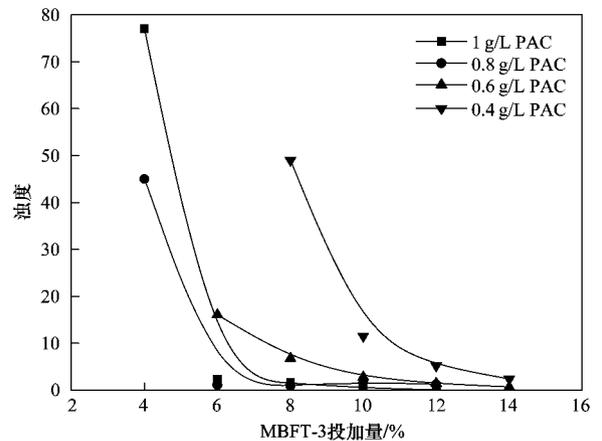


图8 MBF T-3 与聚合氯化铝协同处理含油废水

Fig. 8 Effect of the cooperation of MBF T-3 and PAC on the treatment of oily wastewater

菌液投加量 10%, 聚合氯化铝用量为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值调至 7 左右. 处理含油废水, 结果如表 3. 由表 3 可知, 该絮凝剂对含油废水具有很好的处理效果.

表3 MBF T-3 处理含油废水

Table 3 Result of oily wastewater treatment by MBF T-3

项目	处理前	处理后	去除率/%
油浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	4 819	10	99.79
浊度	3 950	1.36	99.97
COD/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	28 456.8	218.4	92.32

### 3 MBF T-3 的性质

#### 3.1 MBF T-3 的热稳定性

热稳定性实验结果如表 4 所示, 由此可以看出, 随着温度的升高, 絮凝率稍有增加, 这表明该絮凝剂具有很好的耐热性能. 一般认为, 以蛋白质类物质作

为絮凝活性物质的絮凝剂,其热稳定性较差,而热稳定性较好的常为多糖成分<sup>[17]</sup>,由此可初步推断该絮凝剂的主要成分可能是多糖。

### 3.2 糖、蛋白质的呈色反应

将提取后的 MBF T-3 进行糖、蛋白质的呈色反应,结果如表 5。结果表明,絮凝剂 MBF T-3 有明显的

表 5 MBF T-3 的糖、蛋白质的呈色反应

Table 5 Color reaction of carbohydrate and protein on MBF T-3

项目	糖的呈色反应		蛋白质的呈色反应		
	蒽酮反应	Molish 反应	缩二脲反应	黄色反应	茚三酮反应
实验现象	呈蓝绿色	出现紫色环	不显紫色	无黄色反应	无蓝紫色产生

### 3.3 MBF T-3 的紫外扫描分析

将提取后的 MBF T-3 溶于蒸馏水中,进行紫外扫描。扫描结果如图 9 所示。曲线为一平滑曲线,没有特征吸收峰,蛋白质、核酸的吸收峰分别在 280 nm 和 260 nm 处,说明絮凝剂中不含有蛋白质和核酸。因此,进一步推断出该絮凝剂的有效成分可能为多糖。

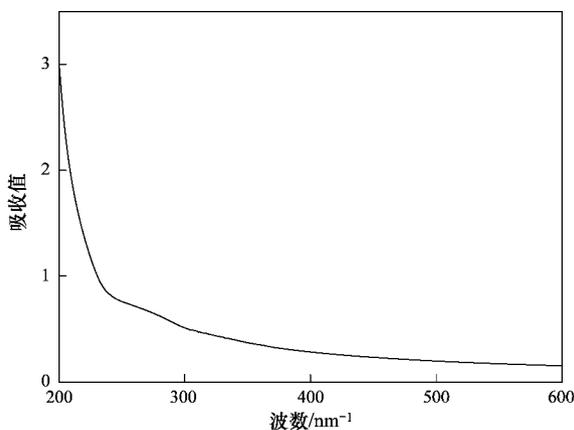


图 9 MBF T-3 的紫外光谱图

Fig. 9 Ultraviolet spectrum of MBF T-3

### 3.4 MBF T-3 的 Fourier 变换红外光谱分析

将提取后的絮凝剂进行 Fourier 变换红外光谱分析,结果如图 10 所示。图 10 是较为典型的多糖红外光谱图。①3 600 ~ 3 400  $\text{cm}^{-1}$ :最大吸收峰在 3 439  $\text{cm}^{-1}$  附近,峰强而宽,为糖环中的—OH 和 N—H 振动所致,说明多糖结构中存在大量氢键<sup>[21]</sup>。②3 000 ~ 2 900  $\text{cm}^{-1}$ :最大吸收峰在 2 929  $\text{cm}^{-1}$  附近,峰强中等,是由 C—H 伸缩振动引起<sup>[22]</sup>。③1 720 ~ 1 600  $\text{cm}^{-1}$ :最大吸收峰在 1 640  $\text{cm}^{-1}$  附近,峰较强,是由—COO<sup>-</sup> 的反对称伸缩振动引起<sup>[23]</sup>。④1 462  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰表明有—CH<sub>2</sub>—存在,1 392  $\text{cm}^{-1}$  处的吸

糖呈色反应,而没有蛋白质/氨基酸的特征反应,因此可定性的判断出该絮凝剂的有效成分可能是多糖。

表 4 MBF T-3 的热稳定性

Table 4 Heat stability of MBF T-3

温度/°C	25	35	45	55	65	80
$E_a/\%$	92.91	94.64	95.59	95.79	96.93	96.93

收峰是由 C—H 的弯曲振动引起,这 2 处的吸收峰都有可能是一 CH<sub>3</sub><sup>[21]</sup>。⑤1 307  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是由—COO<sup>-</sup> 的对称伸缩振动和 P=O 伸缩振动引起的,这表明糖分子中含有磷酸基团<sup>[11]</sup>。⑥1 101  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是由 C—O 键振动引起的<sup>[24]</sup>。⑦859  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是糖环反对称伸缩振动引起的。⑧542  $\text{cm}^{-1}$  处有一个较强的吸收峰,可能是糖环呼吸振动和羧基基偶合作用产生的<sup>[11]</sup>。

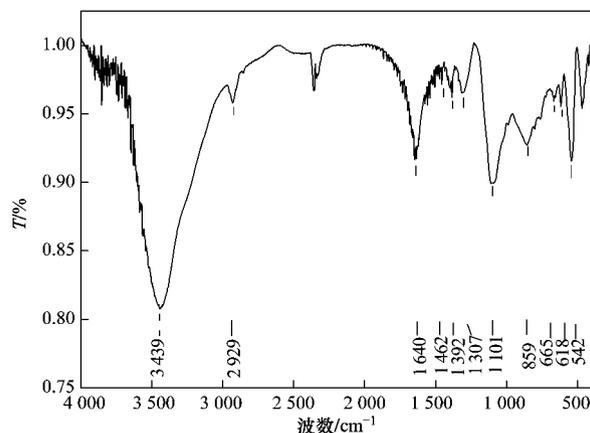


图 10 MBF T-3 的 Fourier 变换红外光谱

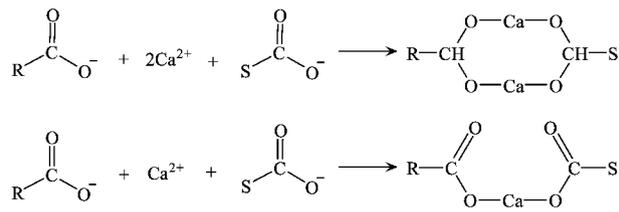
Fig. 10 Fourier transaction infrared spectra of MBF T-3

综上所述,MBF T-3 是含有氨基和磷酸基团的多糖类物质。此外,糖分子中含有大量的羟基和羧基,增强了絮凝剂分子的水溶性,初步判断 MBF T-3 为阴离子絮凝剂。

## 4 MBF T-3 的絮凝机制

微生物絮凝理论主要有桥联学说、电性中和学说、基团反应学说、Butter-field 黏质假说、Friedman 菌体外纤维素行为学说和病毒学说等。一般认为,微生物高分子絮凝剂通过桥联作用和电性中和作用使颗粒凝聚<sup>[11]</sup>。

MBF T-3 在处理含油废水的过程中,首先通过范德华力和氢键作用使絮凝剂分子部分链段吸附在颗粒表面,其余部分则伸展在溶液中,在较大范围内捕集邻近颗粒,形成大而易破碎的絮体<sup>[25]</sup>. 并且,带负电荷的阴离子絮凝剂由于相邻官能团间的离子静电斥力,在溶液中往往比非离子型絮凝剂分子有更大的伸长长度,因而表现出更强的架桥絮凝能力. 再者,由于絮凝剂和废水中油粒表面都含有一COO<sup>-</sup>,可以通过配位结合桥作用,使絮凝剂和颗粒联接起来,再通过微生物絮凝剂的长链作用形成网状的空间絮体<sup>[17]</sup>. 在助凝剂 CaCl<sub>2</sub> 存在时,微生物絮凝剂分子与油滴之间的相互作用如图 11 所示.



R-COO<sup>-</sup> 为 MBF T-3, S-COO<sup>-</sup> 为油粒

图 11 絮凝过程的反应模式

Fig. 11 Reaction model of flocculation

因此, Ca<sup>2+</sup> 的配位桥联作用既可以促进絮凝剂分子的连接,增加絮凝剂分子量,加快絮团形成,强化絮团的网捕效应;也可以促进絮凝剂分子与油滴之间的结合. 在范德华力、氢键、Ca<sup>2+</sup> 的配位桥联这 3 种作用机制中,以 Ca<sup>2+</sup> 的配位桥联最为重要. 这一机制可以解释许多实验现象,如 pH 值、CaCl<sub>2</sub> 添加量对处理效果的影响.

#### 4.1 pH 值对絮凝效果影响的机制分析

pH 值影响颗粒表面电荷密度和微生物絮凝剂的解离状况,从而影响它们之间的相互作用. 随着 pH 值的升高,促进 -COOH 电离生成 -COO<sup>-</sup>, 提高了絮凝剂分子链上的电荷密度,使其分子上的活性链节在水中得到充分的伸展,能更好地发挥其架桥作用. 同时, -COO<sup>-</sup> 的增加可以与颗粒表面形成更多的氢键,促进絮凝<sup>[11]</sup>.

由 2.7.1 节中的分析可知,该絮凝剂在酸性环境下处理效果较差, pH 值在 5~7 之间,絮凝率快速上升. pH 值增加时,油滴的 Zeta 电位绝对值增加,油滴之间的排斥力增加;由于微生物絮凝剂是阴离子型, pH 值增加也会增加其负电性. 所以,絮凝率随 pH 值增加而增加,说明絮凝作用不是通过电中和及压缩双电层来实现的. pH 值较低时,絮凝剂分子上

的羧基解离程度较低,负电荷密度较小,分子上的链节在水中伸展度较低,因而不能有效地实现吸附作用和桥联作用. 在 pH 值高于 7 的碱性环境中,虽然 MBF T-3 分子和废水中油粒表面都带负电荷,但由于 pH 值的增加, MBF T-3 分子上羧基解离程度增加,促进了其分子上的活性链节在水中的伸展;此外, pH 值的增加也增加了油滴表面上的 -COO<sup>-</sup> 密度. 所以, pH 值增加有利于絮凝剂分子与油滴之间的 Ca<sup>2+</sup> 配位桥联作用,使油滴絮凝率增加.

#### 4.2 CaCl<sub>2</sub> 对絮凝效果影响的机制分析

实验中发现,单独加入微生物絮凝剂和助凝剂 CaCl<sub>2</sub> 时,絮凝效果都不明显;而两者同时加入时其絮凝效果显著增强,絮凝率一直稳定在 95% 以上. CaCl<sub>2</sub> 加入前后废水中油滴的 Zeta 电位-pH 值的关系如图 12 所示,结果表明,相同 pH 值的条件下,加入 4 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 后,油滴的 Zeta 电位绝对值增加;随着 pH 值增加,油滴的 Zeta 电位绝对值逐渐降低. pH 值较低时,油滴表面的负电荷密度较小, CaCl<sub>2</sub> 加入后,较多的 Cl<sup>-</sup> 吸附到油滴表面,从而增加了负电荷密度,使油滴的 Zeta 电位绝对值大幅度升高. 随着 pH 值的增加,油粒表面上的 -COOH 容易电离形成 -COO<sup>-</sup>, 使水中的 Ca<sup>2+</sup> 因配位作用而吸附到油滴表面,从而增加了油滴表面的正电荷密度,使油滴的 Zeta 电位绝对值降低. 所以, CaCl<sub>2</sub> 加入前后,油滴的 Zeta 电位-pH 值关系曲线的对比,说明了 pH 值增加时 Ca<sup>2+</sup> 与油滴之间确实发生了配位结合作用,但这种作用仍然不能改变悬浮液的稳定性. 微生物絮凝剂单独加入时,絮凝剂分子与油滴之间的氢键作用也不足以使大量的油滴脱稳沉降. 当微生物絮凝剂和助凝剂 CaCl<sub>2</sub> 同时加入时, Ca<sup>2+</sup> 在絮凝剂分子与油滴之间的配位桥联作用发挥作用,使油滴

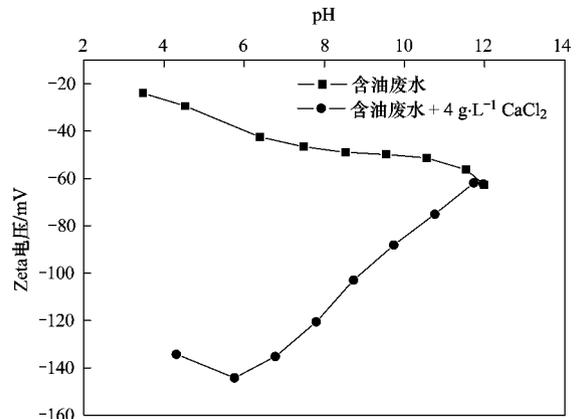


图 12 CaCl<sub>2</sub> 加入前后对废水中油滴 Zeta 电位的影响

Fig. 12 Effect of CaCl<sub>2</sub> on the Zeta potential of oily droplets

脱稳去除。所以, 比较而言,  $\text{Ca}^{2+}$  在絮凝剂分子与油滴之间的配位桥联作用是最主要的絮凝除油机制, 这就解释了絮凝率对适宜 pH 值、 $\text{CaCl}_2$  添加量、微生物絮凝剂添加量等因素的高度依赖性。

## 5 结论

(1) 从土壤中分离出 1 株高效产絮凝剂菌株 T-3, 经鉴定, 该菌株为克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.), T-3 对碳源、氮源有普遍的适应性, 最佳产絮凝剂温度在  $25^\circ\text{C}$  左右, pH 值为 7。

(2) MBF T-3 具有良好的热稳定性; 经过糖、蛋白质的呈色反应、紫外扫描及 Fourier 变换红外光谱分析, 确认该絮凝剂为多糖物质, 其分子中含有大量  $-\text{OH}$  和  $-\text{COO}^-$ , 为阴离子型絮凝剂。

(3) MBF T-3 处理冷轧含油废水获得较好的效果, pH 值、助凝剂  $\text{CaCl}_2$  投加量、絮凝剂投加量等是影响处理效果的重要因素, 添加少量的聚合氯化铝有助于微生物絮凝剂用量的降低。当助凝剂  $\text{CaCl}_2$  投加量  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 菌液投加量 10% (体积分数), 聚合氯化铝用量为  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 值为 7 时, 含油量、COD 浓度和浊度分别从  $4819 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $28456.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3950$  降到  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $218.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.36$ , 去除率分别为 99.79%、92.32% 和 99.97%。

(4) MBF T-3 与油滴之间的相互作用涉及到范德华力作用、氢键作用、 $\text{Ca}^{2+}$  的配位桥联作用, 其中  $\text{Ca}^{2+}$  的配位桥联作用起着极为重要的作用, 这一作用机制可以解释众多影响因素对除油效率的影响。

致谢: 此研究得到清华大学核能与新能源技术研究院王建龙教授的支持与指导, 特此致谢!

### 参考文献:

- [1] Zhang Y H, Gan F X, Li M, *et al.* New integrated processes for treating cold-rolling mill emulsion wastewater [J]. *Journal of Iron and Steel Research, International*, 2010, **17**(6):32-35.
- [2] Song Y C, Kim I S, Koh S C. Demulsification of oily wastewater through a synergistic effect of ozone and salt [J]. *Water Science and Technology*, 1998, **38** (4-5):247-253.
- [3] Deng S B, Yu G, Jiang Z P, *et al.* Destabilization of oil droplets in produced water from ASP flooding [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005, **252** (2-3): 113-119.
- [4] Zouboulis A I, Avranas A. Treatment of oil-in-water emulsions by coagulation and dissolved-air flotation [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000, **172** (1-3): 153-161.
- [5] Chen G H. Electrochemical technologies in wastewater treatment [J]. *Separation and Purification Technology*, 2004, **38**(1): 11-41.
- [6] Hua F L, Tsang Y F, Wang Y J, *et al.* Performance study of ceramic microfiltration membrane for oily wastewater treatment [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2007, **128**(2-3):169-175.
- [7] Yu S L, Lu Y, Chai B X, *et al.* Treatment of oily wastewater by organic-inorganic composite tubular ultrafiltration (UF) membranes [J]. *Desalination*, 2006, **196**(1-3):76-83.
- [8] Zhao X F, Liu L X, Wang Y C. Influences of partially hydrolyzed polyacrylamide (HPAM) residue on the flocculation behavior of oily wastewater produced from polymer flooding [J]. *Separation and Purification Technology*, 2008, **62**(1):199-204.
- [9] Zeng Y B, Yang C Z, Zhang J D, *et al.* Feasibility investigation of oily wastewater treatment by combination of zinc and PAM in coagulation/flocculation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, **147**(3):991-996.
- [10] Ahmad A L, Sumathi S, Hameed B H. Coagulation of residue oil and suspended solid in palm oil mill effluent by chitosan, alum and PAC [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2006, **118**(1-2): 99-105.
- [11] 胡勇有, 高宝玉. 微生物絮凝剂 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [12] Zhang Z Q, Xia S Q, Zhang J. Enhanced dewatering of waste sludge with microbial flocculant TJ-F1 as a novel conditioner [J]. *Water Research*, 2010, **44**(10):3087-3092.
- [13] Salehizadeh H, Shojaosadati S A. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus* [J]. *Water Research*, 2003, **37** (17):4231-4235.
- [14] Lian B, Chen Y, Zhao J, *et al.* Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99** (11):4825-4831.
- [15] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [16] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 编. 伯杰氏细菌鉴定手册 [M]. (第 8 版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [17] 胡筱敏, 董怡华, 李亮. 微生物絮凝剂 BS-5 的筛选及其特性 [J]. *东北大学学报 (自然科学版)*, 2005, **26**(7):681-694.
- [18] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [19] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [20] 胡筱敏. 化学助凝剂 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 1999.
- [21] 张华. 现代有机波谱分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [22] Kumar C G, Joo H S, Choi J W, *et al.* Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **34**(7):673-681.
- [23] Zheng Y, Ye Z L, Fang X L, *et al.* Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19 [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(16):7686-7691.
- [24] 韦革宏, 李素俭, 徐万里, 等. 根瘤菌菌体及胞外多糖红外光谱特征 [J]. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(3):310-314.
- [25] 邓述波, 余刚, 蒋展鹏, 等. 微生物絮凝剂 MBFA 9 的絮凝机理研究 [J]. *水处理技术*, 2001, **27**(1):22-25.