

好氧颗粒污泥藻酸盐提取物的聚集形态研究

林跃梅, 王琳

(中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 266100)

摘要: 为探寻细菌藻酸盐对好氧污泥颗粒化的作用, 借鉴海藻酸盐的提取方法, 将好氧颗粒污泥中的细菌藻酸盐提取和鉴定后, 对 $10 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内不同浓度的藻酸盐提取物在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ 溶液中的聚集形态进行了原子力显微镜观察. 结果表明, 细菌藻酸盐占好氧颗粒污泥干重的 $35.1\% \pm 1.9\%$. 在 CaCl_2 作用下, 藻酸盐提取物具有从无序聚集成有序状态的超分子自组装特性, 随着浓度的增加, 藻酸盐提取物自发聚集, 由纳米级的胶束微球聚集为微米级的花状, 进而连接成网状成层堆积. 好氧颗粒污泥中细菌藻酸盐通过形成具有三维空间结构的细菌藻酸盐-金属凝胶而对颗粒污泥的形成起骨架作用. 其中, 细菌藻酸盐- Ca^{2+} 凝胶在颗粒污泥的形成和维持其稳定结构中起主要作用.

关键词: 好氧颗粒污泥; 细菌藻酸盐; 超分子自组装; 原子力显微镜

中图分类号: X703.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2008)05-1181-06

Self-aggregation Property of Bacterial Alginates Extracted from Aerobic Granules

LIN Yue-mei, WANG Lin

(Environmental Science and Engineering College, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: To explore bacterial alginates role in aerobic granules' formation, the alginate was extracted from aerobic granules and identified. Its aggregation property in $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ solution was investigated by the atomic force microscopy (AFM). Bacterial alginates amounted to $35.1\% \pm 1.9\%$ of granules' dry mass. With the concentration increased from $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, the extracted alginates tended to form ordered aggregations, with the shape changed from randomly distributed globules, to rod-like and flower-shaped aggregations, and finally to weblike networks due to their supramolecular self-assembly property. The three dimensional alginate-metal gel is the structural polymer of aerobic granules, and the alginates- Ca^{2+} gel formation plays an important role in granules' formation and structure stabilization.

Key words: aerobic granules; bacterial alginates; supramolecular self-assembly; atomic force microscopy (AFM)

细菌胞外多糖被视为微生物细胞间黏附的重要介质, 通过在不同微生物表面的桥联作用产生具有三维空间结构的母体, 从而促进微生物聚集体的形成^[1]. 藻酸盐(alginates)是一类由细菌产生的胞外多聚糖, 它在活性污泥絮体的形成中发挥着重要作用^[2]. 作为与活性污泥絮体相似的好氧微生物聚集体, 好氧颗粒污泥中可能也存在着一定量的细菌藻酸盐, 并且细菌藻酸盐的特性可能对颗粒污泥形成和特性产生重要的影响.

藻酸盐与众不同的特性在于其能在金属离子浓度很低时, 与二价以上的金属离子(Mg^{2+} 和 Hg^{2+} 除外)在温和的条件下形成热力学稳定的凝胶. 其中, Ca^{2+} 是最典型的代表离子^[3]. 而好氧颗粒污泥外观近似凝胶颗粒, 并且在其培养过程中, 一定浓度的 Ca^{2+} 存在于人工废水中. 因此, 有必要通过提取好氧颗粒污泥中的细菌藻酸盐, 并探讨其在 Ca^{2+} 溶液中的聚集形态, 确定细菌藻酸盐凝胶在颗粒污泥形成中的作用.

作为一种新型仪器技术手段, 原子力显微镜

(AFM)自 1986 年首次发明并投入商业应用以来, 以其独特的高分辨成像能力、样品不受导电性限制、可在大气、真空及液体环境条件下进行成像观察等优点, 在生物医学、材料、表面科学以及纳米加工等领域得到了广泛应用^[4~7]. 目前在环境工程领域中, AFM 的应用正逐渐得到重视^[8]. 由于 AFM 可给出样品表面微观形貌和三维结构, 将其引入好氧颗粒污泥的研究必定能得到更多有关颗粒形成机理的信息.

本研究尝试提取好氧颗粒污泥中的细菌藻酸盐, 并利用 AFM 研究不同浓度的好氧颗粒污泥藻酸盐提取物在 CaCl_2 溶液中聚集形态, 模拟好氧颗粒污泥反应器中, 在金属离子存在的条件下细菌藻酸盐一经产生后的聚集现象, 为解释好氧颗粒污泥的密实结构和形成机理提供必要的信息.

收稿日期: 2007-05-16; 修订日期: 2007-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570339); 教育部科学技术研究重点项目(106105)

作者简介: 林跃梅(1973 ~), 女, 博士, 主要研究方向为污水生物处理, E-mail: to_zhangmin@vip.sina.com

1 材料与方法

1.1 好氧颗粒污泥的培养和细菌藻酸盐的提取

好氧颗粒污泥在高 130 cm, 内径 6 cm, 工作体积 3.6 L 的圆柱形有机玻璃反应器内培养. 人工废水以醋酸钠为碳源, COD 负荷 $6.0\text{ kg}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$, 其它具体成分为: NH_4Cl $192\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NaH_2PO_4 $22\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ $60.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FeCl_3 $4.68\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $12.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 反应器运行周期为 4 h(曝气 225 min, 沉降、出水 and 进水各 5 min), 运行温度为 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. 反应器中部设有排水口, 体积交换比为 50%. 空气由反应器底部结晶砂微孔曝气器进入, 气体流速 $3\sim 3.5\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. 接种污泥为青岛市团岛城市污水处理厂曝气池中的活性污泥.

好氧颗粒污泥反应器中污泥浓度 (MLSS、MLVSS)、污泥沉降指数 (SVI) 的测定参照美国 APHA 标准方法^[9], 污泥粒径采用激光粒度分析仪 (Malvern Mastersizer Series 2600, Malvern Instruments, UK) 测定.

好氧颗粒污泥成熟后, 参照藻类中藻酸盐的提取方法^[10]提取好氧颗粒污泥中的细菌藻酸盐, 采用联合国粮农组织 (FAO) 和国家部颁西药标准中藻酸盐的鉴定方法^[11, 12]进行鉴定, 并测定其纯度.

1.2 好氧颗粒污泥中金属元素含量的测定

成熟好氧颗粒污泥金属元素 K、Ca、Na、Mg、Fe 含量测定如下: 将干好氧颗粒污泥 0.1 g 用浓硝酸-高氯酸消解后, 使用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP) (Perkin-Elmer Optima 3300 DV, 美国) 测定.

藻酸盐的提取和金属元素的测定均同时取 15 个平行样, 测定结果为 15 次测量的平均值.

1.3 原子力显微镜制样

分别移取不同浓度藻酸盐提取物水溶液 10、50、100、250、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 各 10 μL 置于新解理的经

NiCl_2 处理后的云母基片上, 充分铺展, 在室温下静置一段时间. 再各取 5 μL 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液, 浇铸在上述各云母片上, 充分摇动云母基底, 使之尽量铺展, 静置得到透明均一的溶液. 室温下自然风干成膜. 整个实验均在室温、自然大气压下完成. 将处理好的样品置于原子力显微镜 (SPM-9500J3, SHIMADZU, Japan) 下以接触模式观察.

2 结果与分析

2.1 细菌藻酸盐的提取和鉴定

好氧颗粒污泥反应器运行达到稳态后, 反应器中 MLSS 为 $8.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MLVSS 为 $7.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, SVI $27\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1} \pm 3\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 颗粒污泥平均粒径为 $1.7\text{ mm} \pm 0.5\text{ mm}$. 从成熟的好氧颗粒污泥中提取的藻酸盐占污泥干重 (MLSS) 的 $37.8\% \pm 1.5\%$, 经测定, 提取物纯度为 $92.8\% \pm 4.7\%$. 根据文献^[10]计算得到, 好氧颗粒污泥中纯藻酸盐的含量为 $35.1\% \pm 1.9\%$. FAO 和国家部颁鉴定方法中各鉴别反应均显阳性, 可进一步证实, 提取物为藻酸盐.

藻酸盐由细菌和褐藻产生, 由于接种污泥中不含有褐藻, 因此好氧颗粒污泥中的藻酸盐为细菌藻酸盐. 与其他的细菌胞外多糖不同, 细菌藻酸盐由某些细菌在贫营养条件下分泌产生^[2]. 而目前好氧颗粒污泥几乎都在 SBR 反应器中培养, 间歇性的贫营养状态是 SBR 反应器最大的特点. 好氧颗粒污泥中含有大量细菌藻酸盐的事实证明, SBR 反应器特有的贫营养条件与好氧颗粒污泥中细菌胞外多糖的重要组分之间存在着不容忽视的关联性.

2.2 好氧颗粒污泥中的金属元素含量

好氧颗粒污泥中的金属元素含量测定结果见表 1. Ca 的含量远高于其它的金属元素, 表明好氧颗粒污泥积累 Ca 的能力较强.

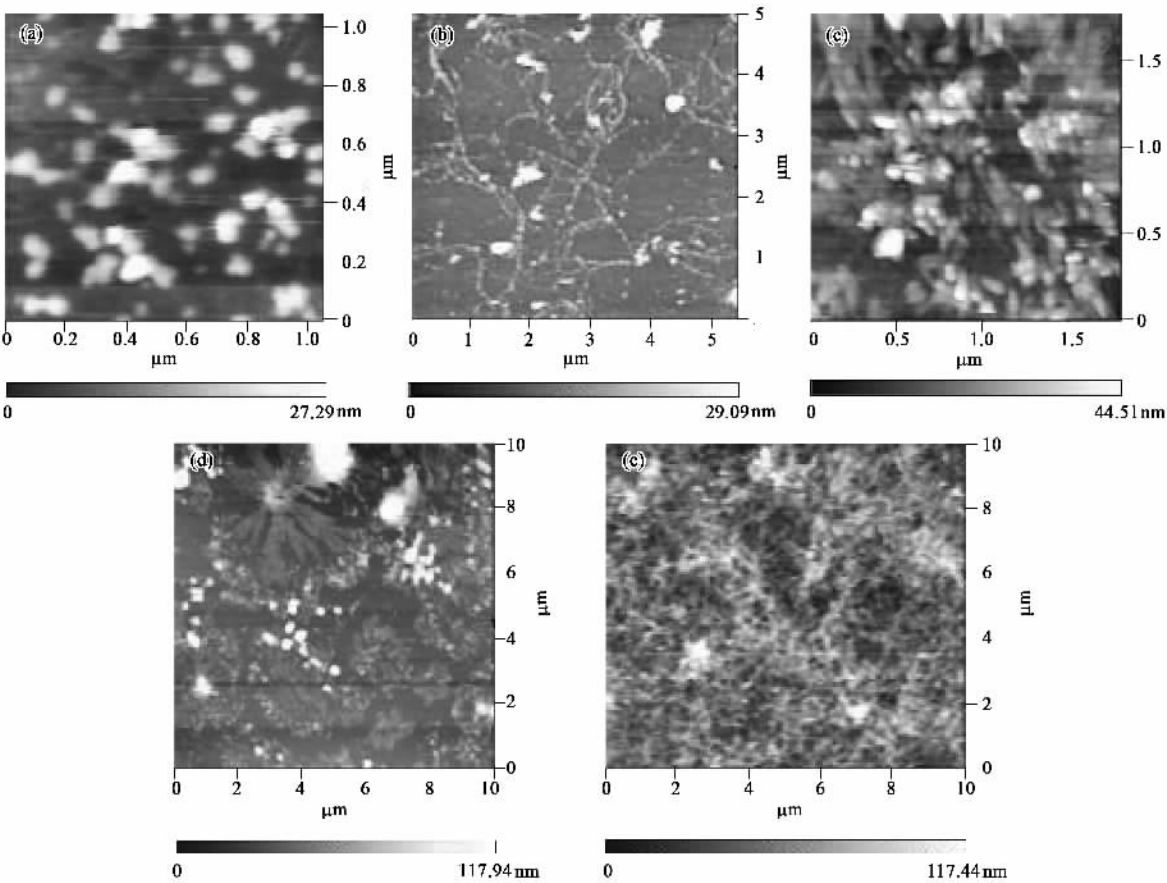
表 1 好氧颗粒污泥中的金属元素含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
Table 1 Metal element contents in aerobic granules/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

指标	K	Ca	Na	Mg	Fe
好氧颗粒污泥	0.187 ± 0.001	57.7 ± 0.5	35.4 ± 0.3	0.713 ± 0.008	0.308 ± 0.002

2.3 不同浓度藻酸盐提取物的分子自组装聚集形态

图 1 为原子力显微镜下不同浓度藻酸盐提取物与 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 作用后的聚集形态. 可以看出, 随着浓度的增加, 藻酸盐提取物在 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 中具有分子间自发聚集的趋势, 聚集形态由球状[图

1(a)]经历珍珠项链状[图 1(b)]向棒状[图 1(c)]、花状[图 1(d)]变化, 最终变为网状成层堆积[图 1(e)]. 聚集体的大小可由 50 nm $\times$ 50 nm 的球状增至超过 10 $\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ 的网状. 聚集体的纵向高度也随着浓度由 6、13、32、50 nm 增至 76 nm. 根据周世海等^[13]的研究, 藻酸盐的分子链高度为 2.5 ~ 3.2 nm,



(a) ~ (e)分别为藻酸盐提取物浓度 10、50、100、250、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

图 1 不同浓度藻酸盐提取物在 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液中的聚集形态

Fig.1 Self aggregation property of the extracted alginates with different concentrations in $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 under AFM

直径约为 $12\sim24\text{ nm}$. 由此而计算, 提取物与 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 作用后形成的聚集体是由多个藻酸盐分子聚集形成的, 是分子间通过非共价键合作用而聚集组织在一起. 这在超分子化学领域中被称为超分子自组装机行为^[14]. 藻酸盐是由数量不一的 1,4 连接的 β -D-甘露糖醛酸残基(M)及其差向异构体 α -L-古洛糖醛酸残基(G)组成的不含分支结构的嵌段共聚物. 其单体以连续的甘露糖醛酸残基组成的区(MM 区)、由古洛糖醛酸残基组成的区(GG 区)和由 2 类残基交替变化区(MG 区)的嵌段形式分布(图 2). 与 MM 区和 MG 区相比, GG 区对 Ca^{2+} 的亲水性最强, 以“蛋格结构”与 Ca^{2+} 形成水不溶物(图 3)^[15]. 因此, 在 CaCl_2 溶液中, 藻酸盐分子可以看作含有 1 个 GG 区疏水链段的双亲性嵌段共聚物. 在浓度很低时(即临界胶束浓度以下), 单个聚合物以单分子链的形式溶解在溶液中. 而在临界胶束浓度以上, 不溶单元数增加, 与水分子间的相互作用增大而导致聚集. 不溶嵌段聚集的同时, 可溶嵌段的存在导致聚

合物胶束化.

胶束化过程中, 在浓度较低时, 形成球形胶束聚集体, 如图 1(a). 胶束内核由疏水链段组成, 亲水链段以溶剂化形式在核周围形成壳层, 以维持胶束的稳定性^[16]. 随着浓度的增加, 球形胶束连接在一起形成珍珠项链状[图 1(b)], 这是藻酸盐聚集体由球向棒转变的起始阶段. 当浓度经 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 变为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 珍珠项链聚集体变为棒状胶束聚集体[图 1(c)]. 而当浓度增至 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 藻酸盐形成大小由 $1\text{ }\mu\text{m}\times1\text{ }\mu\text{m}\sim5\text{ }\mu\text{m}\times5\text{ }\mu\text{m}$ 不等的花状聚集体. 图 1(d)清楚地显示, 花状聚集体的每一个花瓣都是由粒径变大的长棒状胶束聚集形成. 这是由于浓度的增加使藻酸盐胶束碰撞机会增大, 而胶束是软物质, 碰撞后本身会发生较大的形变, 按一定方向析出并逐渐长大成花状. 藻酸盐浓度的继续增加($500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)使胶束在云母片上连成网状, 成层堆积[图 1(e)], 这种网状结构也是由球状体和棒状体为基本单位构成的. 图 1(a)~1(e)的变化过程实际

是一种分子聚集体从无序变为有序,从低级有序变为高级有序的过程,是分子间通过非共价键(如氢键,ππ 相互作用等)作用自发组装成的超分子聚集体^[17].可见,好氧颗粒污泥藻酸盐提取物在 Ca^{2+} 的作用下具有分子自组装的特性.这与其他报道中海藻酸盐的自组装行为相同^[13,17].

3 讨论

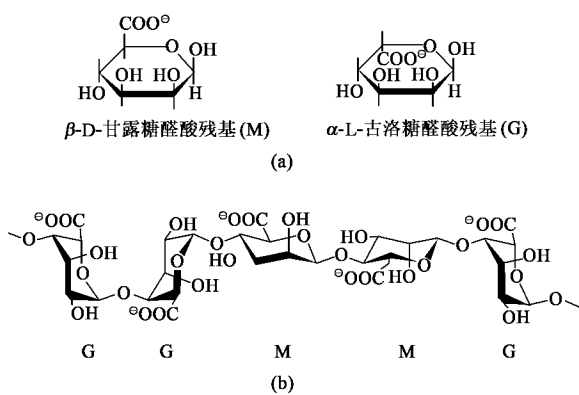
3.1 热力学解释

超分子自组装过程多受热力学驱动,整个自组装过程是使体系自由能趋于最低值^[17].当嵌段共聚物浓度增加时,由于形成核的不溶性嵌段的浓度也增加,熵对整个组装过程的贡献增大,整个过程变为熵驱动为主^[18].虽然藻酸盐分子聚集时由于形成更有序的结构使一部分熵减小,然而,在 CaCl_2 水溶液中不溶嵌段 GG-Ca 会发生疏水水合作用,这时水分子有序地排列在其周围.当藻酸盐浓度增大时,更多的 GG-Ca 嵌段聚集,使周围水分子的有序结构被打破,体系的总熵增加,驱动着藻酸盐分子在 CaCl_2 溶液中随着浓度的增加自组装成粒径更大的聚集体.根据热力学定律,对于熵驱动的过程,当熵增加时,自由能降低,因此藻酸盐提取物在 CaCl_2 溶液中的超分子自组装过程可以自发进行,在热力学上是稳定的.

藻酸盐还是一种聚电解质,如图 2 所示,每一个糖醛酸残基中都含有带电基团 $-\text{COO}^-$.在 CaCl_2 溶液中,GG 嵌段由于“蛋格结构”形成不溶物变为内核,MM、GM 嵌段形成外壳.电荷的吸引使 Ca^{2+} 镶嵌在柔性 MM、GM 嵌段中的一 COO^- 周围,整体电荷的中和降低了一 COO^- 分子链之间的排斥力,形成了球状和棒状聚集体.这些聚集体的形成既减少了聚电解质带电基团之间的静电斥力,又保持了聚合物分子链间的短程作用力,如分子间的氢键、偶极作用和分子的取向力等^[19-22].进而随着浓度的增加,这些短程作用力促使球状和棒状聚集体进一步组装成粒径更大的花状和三维网状聚集体,最终形成凝胶析出.

3.2 藻酸盐凝胶对好氧颗粒污泥形成的作用

藻酸盐最突出的特性是能在金属离子浓度较低时,与二价以上的金属离子(Mg^{2+} 和 Hg^{2+} 除外)在温和的条件下形成凝胶.藻酸盐分子含有 MM、GG 和 GM 链段,各链段与金属的结合能力主要取决于分子的立体化学结构以及金属离子的半径和所带的电荷.GG 嵌段相邻糖单元的羧基和糖苷键氧以及羟基氧在主链的同侧,形成具有蛋盒形状的空穴(图



(a) β -D-甘露糖醛酸残基(M)和 α -L-古洛糖醛酸残基(G); (b)藻酸盐 GM, GG, MM 嵌段

图 2 藻酸盐单体及嵌段结构

Fig.2 Monomers and blocks of alginates

2b),非常适合金属离子,尤其是二价金属离子的嵌入.因此 GG 链段成为藻酸盐分子结合金属离子的主要链段,并且对二价金属的选择性较强.其中, Ca^{2+} 是最典型的代表离子^[3].它的离子半径为 $0.95\text{\AA}$,以 sp^3 轨道杂化与 GG 链段 4 个氧原子形成配位^[15],易于嵌入 GG 链段的空穴,以蛋格结构结合(图 3).

在好氧颗粒污泥培养过程中,SBR 反应器的间歇贫营养条件促进了细菌藻酸盐的分泌^[23].人工废水中的金属离子为 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 和 Fe^{3+} ,其中 Ca^{2+} 的离子半径及所带的电荷导致其与藻酸盐 GG 链段的结合能力最强^[15].在 Ca^{2+} 等金属离子的诱导作用下,产生的细菌藻酸盐发生分子自组装,随浓度的增加具有形成大的网状聚集体的趋势,并可通过与细菌细胞膜作用而附着在细菌表面^[19].已发生聚集的藻酸盐还可通过相互之间的短程作用力(如氢键)进一步组装,形成粒径更大的聚集体,成为细菌细胞黏附的重要介质.由此可见,在颗粒污泥中含量为 $35.1\% \pm 1.9\%$ 的细菌藻酸盐通过形成具有三维空间结构的细菌藻酸盐-金属凝胶而对颗粒污泥的形成起重要的骨架作用.细菌藻酸盐与 Ca^{2+} 的结合使 Ca^{2+} 在好氧颗粒污泥中大量积累,含量可达到大于颗粒干重的 5%.Qin 等^[24]和 Jiang 等^[25]的研究也发现好氧颗粒污泥对 Ca^{2+} 的积累能力较强,并且后者的试验表明, Ca^{2+} 浓度的提高可促进好氧颗粒污泥的形成.这些结果有力地证明,细菌藻酸盐- Ca^{2+} 凝胶在好氧颗粒污泥的形成和维持其稳定结构中起重要作用.Chen 等^[26]对好氧颗粒污泥细菌胞外多糖进行了荧光原位染色研究,在同样采用醋酸钠为底物培养的好氧颗粒污泥中发现大量 α -连接和 β -

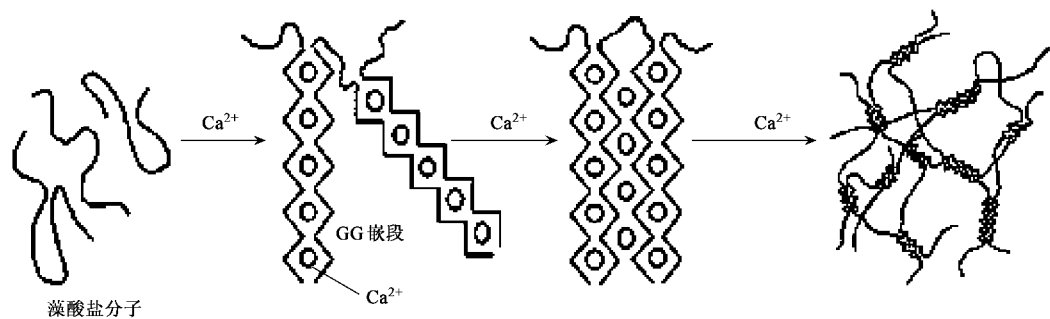


图3 藻酸盐与Ca²⁺为典型代表的金属离子作用形成的蛋格结构[蛋格中心为Ca²⁺,能形成蛋格结构的是聚古洛糖醛酸嵌段(GG)]

Fig.3 “Egg-box”formed by alginates-Ca²⁺ (GG block combining with Ca²⁺)

连接的多糖结构.由于藻酸盐中同时存在α-连接的古洛糖醛酸残基及β-连接的甘露糖醛酸残基,Chen等^[26]的研究也为颗粒污泥中的藻酸盐骨架结构提供了佐证.

由此可见,使用AFM对好氧颗粒污泥细菌藻酸盐提取物聚集特性进行研究,不仅简化了扫描电镜和透射电镜研究中复杂费时的制样过程,减少了由仪器边界条件等不确定因素造成的假象;而且通过模拟反应器中藻酸盐在Ca²⁺诱导下的分子自组装行为,揭示了细菌藻酸盐-Ca²⁺凝胶的三维桥联作用,为颗粒形成机理的探讨提供了重要的信息.

4 结论

(1) 好氧颗粒污泥中细菌藻酸盐含量为35.1%±1.9%.大量细菌藻酸盐的发现表明,好氧颗粒污泥SBR反应器特有的贫营养条件与好氧颗粒污泥中细菌胞外多糖的重要组分之间存在着关联性.

(2) 不同浓度的好氧颗粒污泥细菌藻酸盐提取物与50 mg•L⁻¹ CaCl₂溶液作用后,随着浓度的增加自发聚集,由纳米级的胶束微球聚集为微米级的花状,继而形成网状成层堆积.

(3) 聚集体是通过分子间非共价键合作用而聚集组织在一起,是超分子自组装行为.这种由低级有序变为高级有序的过程,在热力学上是稳定的.

(4) 好氧颗粒污泥中细菌藻酸盐通过形成具有三维空间结构的细菌藻酸盐-金属凝胶而对颗粒污泥的形成起骨架作用.其中,细菌藻酸盐-Ca²⁺凝胶在颗粒污泥的形成和维持其稳定结构中起主要作用.

参考文献:

[1] Wingender J, Neu T R, Flemming H C. Microbial Extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function [M]. Berlin: Springer, 1999. 120.

[2] Bruus J H, Nielsen P H, Keiding K. On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering [J]. Water Res, 1992, 26: 1597-1604.

[3] Grant G T, Morris E R, Rees D A, et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the Egg-box Model [J]. Febs Letters, 1973, 32: 195-198.

[4] 何昆,张德添,张学敏,等.原子力显微镜在生物医学中的应用[J].军事医学科学院院刊,2002,26(2): 139-143.

[5] 罗艳红,姜勇,雷玉国,等.原子力显微镜研究高聚物结晶的最新进展[J].科学通报,2002,47(15): 1121-1125.

[6] 谢敬伟,暴宁钟,陆小华.扫描探针显微技术在TiO₂表面研究中的应用[J].化学通报,2002,7: 445-451.

[7] 张宇军,李鹏,胡元中,等.碳纳米管的操纵和剪切[J].科学通报,2002,47(14): 1066-1070.

[8] 葛小鹏,潘建华,刘瑞霞,等.重金属生物吸附研究中蜡状芽孢杆菌菌体微观形貌的原子力显微镜观察与表征[J].环境科学学报,2004,24(5): 753-760.

[9] American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. Washington D C: American Public Health Association, 1998.

[10] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1999.

[11] FAO. Compendium of food additive specifications. Addendum 5 (FAO Food and Nutrition Paper-52 add.5) [C]. Rome: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 49th session, 1997.

[12] WS-01(X-01)-93(1),海藻酸钙海绵部颁标准[S].

[13] 周世海,蔡继业,陈勇.钙离子对海藻酸钠自组装行为影响的AFM研究[J].药物生物技术,2004,11(2): 81-85.

[14] Zhang L, Eisenberg A. Multiple morphologies and characteristics of crew-cut micelle-like aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) diblock copolymers in solution [J]. Science, 1995, 268(5218): 1728.

[15] Davis T A, Volesky B, Mucci A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae [J]. Water Research, 2003, 37: 4311-4330.

[16] Halperin A, Tirrell M, Lodge T P. Tethered chains in polymer microstructures [J]. Adv Polym Sci, 1992, 100: 31-71.

[17] 江明,艾森伯格A,刘国军,等.大分子自组装[M].北京:科学出版社,2006.

- [18] Shen H, Zhang L, Eisenberg A. Thermodynamics of crew-cut micelle formation of polystyrene-b-poly (acrylic acid) diblock copolymers in DMF/H₂O mixtures [J]. J Phys Chem B, 1997, **101** (24): 4697-4685.
- [19] Cowman M K, Spagnoli C, Kudasheva D, *et al.* Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy [J]. Biophysical Journal, 2005, **88**: 590-602.
- [20] Cobierre M K, Cameron N S, Lennox R B. Polymer-stabilized gold nanoparticles with high grafting densities [J]. Langmuir, 2004, **20** (7): 2867-2873.
- [21] Glass R, Moeller M, Spatz J P. Block copolymer micelle nanolithography [J]. Nanotechnology, 2003, **14** (10): 1153.
- [22] Yoo S I, Sohn B H, Zin W C, *et al.* Self-assembled arrays of zinc oxide nanoparticles from monolayer films of diblock copolymer micelles [J]. Chem Comm, 2004, **24**: 2850-2851.
- [23] 旺达姆 E J, 贝特斯 S De, 斯泰因比歇尔 A. 多糖 I ——原核生物多糖 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004. 181-210.
- [24] Qin L, Tay J H, Liu Y. Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors [J]. Process Biochem 2004, **39**: 579-584.
- [25] Jiang H L, Tay J H, Liu Y, *et al.* Ca²⁺ augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors [J]. Biotechnol Lett, 2003, **25**: 95-99.
- [26] Chen M Y, Lee D J, Tay J H. Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **73**: 1463-1469.