

周 礼, 张永奎, 陈 晓, 等. 2006 一种高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养基优化 [J]. 环境科学学报, 26(4): 584– 588
ZHOU L, Zhang Y K, Chen X, *et al.* 2006. The screening of a flocculant-producing strain and optimizing of its culture conditions[J]. Acta Scientiae Circumstantiae 26(4): 584– 588

一种高效微生物絮凝剂产生菌的筛选及培养基优化

周 礼, 张永奎*, 陈 晓, 李万全, 徐绍霞

四川大学化工学院制药与生物工程系, 成都 610065
收稿日期: 2005-06-30 修回日期: 2006-02-20 录用日期: 2006-02-21

摘要: 从某自来水处理厂的活性污泥中筛选得到了一株稳定高效的微生物絮凝剂产生菌 MBF-33, 所产絮凝剂对高岭土悬浮液体系有较好的絮凝作用. 通过培养基优化, 对高岭土的絮凝率从 81.3% 提高到 95%. 实验结果表明: (1) 适宜的单一碳源为 25 g L⁻¹ 葡萄糖; (2) 复合碳源效果优于单一碳源, 适宜的复合碳源为蔗糖 5 g L⁻¹, 葡萄糖 20 g L⁻¹; (3) 无机氮不利于该菌生长, 适宜的氮源为单一有机氮, 为 1.5 g L⁻¹ 蛋白胨; (4) 0.2 g L⁻¹ 的 MgSO₄ 有利于菌生长, 但不利于絮凝剂产生.
关键词: 筛选; 微生物絮凝剂; 培养基优化

文章编号: 0253-2468(2006)04-0584-05 中图分类号: X172 文献标识码: A

The screening of a flocculant-producing strain and optimizing of its culture conditions

ZHOU Li, ZHANG Yongkui*, CHEN Xiao, LI Wanquan, XU Shaoxia

Department of Pharmaceutical and Bioengineering, Sichuan University, Chengdu 610065
Received 30 June 2005 **received in revised form** 20 February 2006 **accepted** 21 February 2006

Abstract A flocculant-producing strain MBF-33 is isolated. It shows high and stable flocculating activity for Gaoling clay suspension. And its flocculating activity was higher than other three kinds of flocculants such as PAC and so on. The flocculating activity could achieve 95% under the best conditions. The culture condition was optimized and the affection of salts was studied. The results shows (1) The best single carbon source is 25 g L⁻¹ glucose; (2) Complex carbon source is better than single carbon source and the best complex carbon source is sucrose 5 g L⁻¹ and glucose 20 g L⁻¹; (3) Inorganic nitrogen could not facilitate growth of the strain, the best nitrogen source is 1.5 g L⁻¹ peptone; (4) MgSO₄ was able to facilitate the growth of the strain at 0.2 g L⁻¹, but restrain the production of flocculant.
Keywords screening; microbial flocculant; culture medium; optimizing

1 前言 (Introduction)

传统无机及人工合成的有机高分子絮凝剂易引起老年痴呆症 (Kurane R *et al.*, 1991) 和具有“三致”效应 (Choi *et al.*, 1998), 其应用越来越受到限制. 微生物絮凝剂是由微生物菌体分泌的生物高分子物质, 是一种新型的天然有机高分子絮凝剂. 因微生物絮凝剂具有产生菌易得、高效、无毒、不会造成二次污染和絮凝范围广泛等优点, 日益受到研究者重视. 近年来, 国外对微生物絮凝剂作了大量的研究, 筛选得到了几十种微生物絮凝剂, 如 *Bacillus* sp. I-450 (C. GaneshKumar *et al.*, 2004)、*Corynebacterium glutamicum* (NingHe *et al.*, 2002)、

Bacillus firmus (H. Salehizadeh *et al.*, 2002) 等. 其中最具有代表性的 MBF 是 Kurane 利用红平红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) 研制成功的微生物絮凝剂 NOC-1 对泥浆水、河水、粉煤灰水、膨胀污泥、纸浆废水等均有极好的絮凝和脱色效果 (Kurane R *et al.*, 1986), 是目前唯一工业化应用的 MBF. 目前微生物絮凝剂研究面临的主要问题是新型微生物絮凝剂产生菌的筛选、培养成本的降低、提高絮凝活性和降低絮凝剂用量.
本文拟从活性污泥中筛选出一株活性高用量少的微生物絮凝剂产生菌 MBF-33, 并对其培养条件进行优化以期提高微生物絮凝剂絮凝率.

作者简介: 周 礼 (1982—), 男, 硕士研究生, E-mail: zoll@sohu.com; * 通讯作者 (责任作者)
Biography: ZHOU Li (1982—), male, graduate E-mail: zoll@sohu.com; * **Corresponding author**

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 实验材料

活性污泥:采自成都自来水厂二次沉淀池.

细菌筛选用 LB培养基:牛肉膏 5 g 蛋白胨 10 g NaCl 5 g H₂O 1L, pH 为 7.4

霉菌筛选用查氏培养基:蔗糖 30 g NaNO₃ 3 g K₂HPO₄ 1 g FeSO₄ 0.01 g KCl 0.5 g MgSO₄ 7H₂O 0.5 g H₂O 1L, pH 值自然.

放线菌筛选用高氏一号培养基:可溶性淀粉 20 g KNO₃ 3 g K₂HPO₄ 0.5 g MgSO₄ 7H₂O 0.5 g FeSO₄ 0.01 g NaCl 0.5 g H₂O 1L, pH 为 7.2

2.2 菌种筛选方法

将活性污泥稀释并分别接种于上述 3种液体培养基中富集培养,然后将菌液稀释 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍,在相应培养基的固体琼脂平板上划线,待充分生长后挑取单菌落再次接种于相应的平板培养基纯化,然后分别接种于上述 3种液体培养基中进行浅层发酵.发酵温度 30℃,摇床转速为 $170\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,发酵时间 72h.发酵完成后取发酵液测其絮凝活性,将具有良好絮凝活性的菌株作为复筛菌种,重复上述步骤多次转接纯化后再进行发酵测定絮凝活性.筛菌流程为:活性污泥→富集培养→平板划线→挑单菌落→平板划线纯化→摇瓶培养→初筛→多次纯化及传代培养→复筛→稳定高絮凝活性菌株.

2.3 絮凝活性的评价

在 100 mL 烧杯中配置 $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高岭土悬浊液 50 mL (高岭土配置前过 160 目筛),快速搅拌 1 min 加入 $90\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl₂ 溶液 1 mL,快速搅拌 1 min 然后加入 1 mL 发酵液 (2.2 节中的复筛菌株发酵液) 搅拌 0.5 min 静置 10 min 小心取上清液测 OD₅₅₀, 记为 B. 同上用空白样操作, 不加入发酵液, OD₅₅₀ 值记为 A, 则絮凝率按下式计算: $\eta = (A - B) \times 100\%$.

菌浓度的测定用光电比浊计数法 (沈萍等, 1996).

2.4 培养基优化

采用单因素实验, 分别改变培养基中碳源种类及其浓度、氮源种类及其浓度、无机盐的种类和初始 pH 值, 测量发酵液的絮凝率与菌浓度以找出较适宜的培养基组成. 发酵在 50 mL 摇瓶中完成, 装液量为摇瓶标定容量的 20%, 将已培养 10h 的菌种以

10% 的接种量接入, 然后在 30℃, $170\sim 180\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的摇床上培养 72h 具体实验条件如下.

碳源种类的选择: 分别采用 $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖、淀粉、乳糖、蔗糖、甘油取代 LB 培养基中的碳源蛋白胨, 其余培养条件不变, 实验比较得出较适宜的碳源.

碳源浓度的选择: 得出适宜碳源后改变碳源浓度为 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $55\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $145\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余培养条件不变. 得出较适宜的碳源浓度.

复合碳源的选择: 采用碳源 C1、C2、C3、C4、C5 作为 LB 培养基的碳源, 其余培养条件不变. 以得出复合碳源对菌种生长和发酵的影响. 其中 C1 为蔗糖 $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C2 为蔗糖 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C3 为蔗糖 $12.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $12.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C4 为蔗糖 $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C5 为葡萄糖 $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

氮源种类的选择: 分别采用 $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、酵母浸膏、牛肉浸膏、大豆饼粉、玉米粉、KNO₃、尿素和 (NH₄)₂SO₄ 取代牛肉膏作为 LB 培养基的氮源, 碳源采用已实验得出的较适宜的碳源, 其余培养条件不变. 得出较适宜的氮源.

氮源浓度的选择: 改变氮源浓度为 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余培养条件不变. 实验比较得出较适宜的氮源浓度.

复合氮源的选择: 采用蛋白胨 + 不同种类的无机氮组成复合氮源, 其余培养条件不变, 得到复合氮源对菌种生长和发酵的影响. 氮源 N1 为蛋白胨 + NH₄Cl, N2 为蛋白胨 + (NH₄)₂SO₄, N3 为蛋白胨 + 尿素, N4 为蛋白胨 + KNO₃, N5 为空白样, 采用 $2.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨. N1、N2、N3、N4 中蛋白胨浓度均为 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 无机氮浓度均为 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

无机盐的选择: 分别在培养基中加入 $0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄、MgSO₄ 和 CaCl₂, 其余培养条件不变, 得到不同无机盐对菌种生长或产物发酵的影响.

pH 值的选择: 分别改变培养基初始 pH 值为 $4.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $7.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $9.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余培养条件不变, 得到较适宜的初始 pH 值.

2.5 与几种常见絮凝剂絮凝效果的比较

为比较微生物絮凝剂与目前常用絮凝剂的絮凝效果, 把目前常用的絮凝剂 PAC、PFC 和聚合硫酸铝配成一定浓度的溶液, 在高岭土悬浊液中各加入 1 mL, 并调节 pH 为 7~8 测定其对高岭土的絮凝率.

2 6 絮凝剂粗品提取

将发酵液在 10000 r·min⁻¹下离心 5 min, 将上清液取出, 加入 1.2 倍体积的乙醇, 在 10000 r·min⁻¹下离心 5 min, 取出沉淀用 60% 乙醇洗涤 2 次, 冷冻干燥即得 MBF-33 粗品。

3 结果 (Results)

3 1 菌种筛选

从活性污泥中筛选出 83 株菌, 有絮凝活性的有 12 株, 经过多次传代培养和纯化, 得到一株分离自 LB 培养基中并有稳定絮凝活性的菌株 MBF-33。该菌在 LB 培养基中对高岭土悬浊液的絮凝率达到 81.3%, 絮体大, 沉降速度快。该菌株菌苔呈黄色, 表面光滑粘稠, 在 600 倍显微镜下观察为短杆状。

3 2 碳源种类的选择

不同碳源条件下实验结果见表 1。从絮凝活性看, 葡萄糖和蔗糖为碳源时菌种有较高的絮凝活性, 淀粉和乳糖为碳源时絮凝活性较低; 从菌种生长来看, 葡萄糖最容易被利用, 蔗糖、淀粉和乳糖不太容易被利用, 甘油不能被利用。有研究表明, 某些菌株胞外多糖水解酶较少, 故单糖比多糖更容易被利用 (沈萍, 2000)。实验结果表明, 对于 MBF-33, 葡萄糖更容易被利用同时利于絮凝剂产生。与用葡萄糖相比, 用蔗糖时菌浓度低得多, 而絮凝率只是略低。可见蔗糖不太容易被该菌利用, 有利于在发酵液中保持较高的碳源浓度, 故蔗糖可以作为长效碳源。

表 1 碳源种类的选择

Table 1 The choice of carbon sources

碳源种类	絮凝率	菌数 / (10 ⁸ CFU·mL ⁻¹)
葡萄糖	83.3%	4.85
淀粉	72.0%	2.52
乳糖	78.3%	2.89
蔗糖	80.6%	2.30
甘油	0	0

3 3 碳源浓度的选择

不同碳源浓度下实验结果见图 1。从絮凝率来看, 以 25 g·L⁻¹ 的葡萄糖作为碳源时, 菌株对高岭土絮凝率最高, 达到最高 86.8%; 从菌种生长来看, 以 25 g·L⁻¹ 的葡萄糖作为碳源时菌浓度最高, 过高或过低的糖浓度都不利于该菌株生长。这是由于糖浓度过低不能提供足够的能量和物质来源; 而糖浓度过高一方面会引起发酵液中渗透压过高, 使细胞失水, 生长受到抑制, 另一方面糖浓度过高使代谢产

生的葡糖酸增加, 发酵液 pH 值降低, 不利于菌株生长。对 MBF-33 而言, 25 g·L⁻¹ 的糖浓度为最佳浓度。

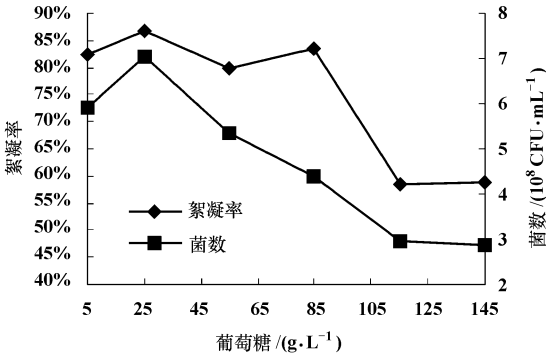


图 1 葡萄糖浓度对絮凝的影响

Fig 1 Effect of glucose concentration on flocculating activity

3 4 复合碳源的选择

由于葡萄糖有利于细胞的生长, 蔗糖可以作为长效碳源, 所以选用这两者搭配为复合碳源。实验结果见图 2。

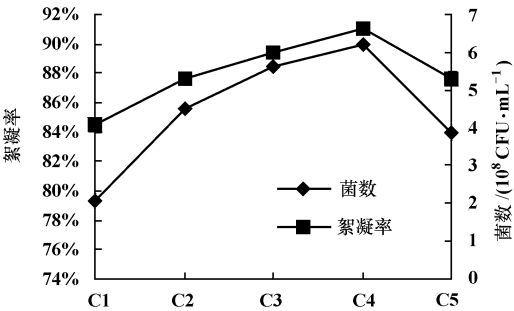


图 2 复合碳源对絮凝的影响

Fig 2 Effect of complex carbon source on flocculating activity

由图 2 可知与单一的葡萄糖和蔗糖相比, 复合碳源能有效的提高絮凝率和菌浓度。随着 $C_{\text{葡萄糖}}/C_{\text{蔗糖}}$ 增加, 菌浓度和絮凝率随之增加, 20 g·L⁻¹ 的葡萄糖和 5 g·L⁻¹ 的蔗糖组成的复合碳源得到最高的絮凝率和菌浓度。而胞外产物的积累通常需要培养基中碳源过量, 单一的速效碳源会很快被消耗, 单一的长效碳源又不能得到理想的初始细胞浓度, 两者都无法得到较高的产物产率。 $C_{\text{葡萄糖}}/C_{\text{蔗糖}} = 1/4$ 时絮凝率与菌浓度较高, 证明在此条件下既能得到较好的细胞浓度, 又能保持培养基中碳源过量, 故能取得较好的效果。

3 5 氮源种类的选择

采用不同种类氮源的实验结果见表 2。由表知在几种无机氮源中菌无法正常生长, 表明该菌可能

还需要某种只有有机氮源才有的生长因子或微量元素. 在几种有机氮源中蛋白胨能得到最高的絮凝率和菌浓度, 为最佳氮源. 若应用于工业生产, 便宜易得的大豆饼粉可以替代蛋白胨作为氮源.

表 2 氮源种类的选择
Table 2 The choice of nitrogen sources

氮源种类	絮凝率	菌浓度 / (10 ⁸ CFU·mL ⁻¹)
蛋白胨	94.3%	5.77
酵母浸膏	76.0%	3.56
牛肉浸膏	84.0%	5.21
大豆饼粉	91.7%	5.70
玉米粉	63.8%	5.77
KNO ₃	0	0
尿素	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0

3.6 氮源浓度的选择

不同氮源浓度下实验结果见图 3. 由图 3 可知, 从絮凝率来看, 以 1.5 g·L⁻¹蛋白胨为氮源时, 所得菌株对高岭土有最好的絮凝率. 这是因为浓度过高导致 C/N 比降低, 不利于产物积累; 浓度过低不能得到理想的菌浓度, 同样不利于絮凝剂产生. 从菌浓度来看, 随着氮源浓度升高, 菌浓度增加, 可见高浓度的氮源有利于菌种生长. 氮源浓度超过 3.5 g·L⁻¹时, 菌浓度增加不多, 表明此时氮源已不是生长的瓶颈. 所以对产物发酵而言 1.5 g·L⁻¹蛋白胨较合适; 对种子培养基, 考虑到成本因素 3.5 g·L⁻¹蛋白胨较合适.

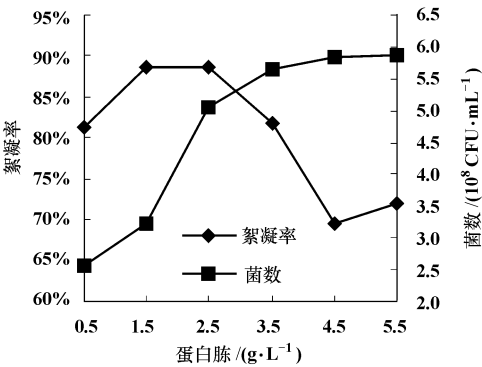


图 3 氮源用量的确定
Fig 3 The choice of nitrogen concentration

3.7 复合氮源的选择

采用不同复合氮源时实验结果见表 3. 由表可知对于该菌种, 采用复合氮源无论是絮凝活性还是菌浓度都远远低于采用蛋白胨作为单一氮源的空白样, 故该菌种并不适合采用复合氮源培养.

表 3 复合氮源的选择
Table 3 The choice of complex nitrogen sources

氮源	絮凝率	菌浓度 / (10 ⁸ CFU·mL ⁻¹)
N1	58.4%	1.92
N2	58.1%	2.42
N3	38.1%	2.46
N4	51.6%	2.10
N5	92.5%	6.80

3.8 无机盐的选择

在培养基中加入不同种类无机盐时实验结果见表 4. 与不加入无机盐作生长因子的空白样相比, 这 5 种无机盐都对絮凝剂的产生有少量抑制作用; NaCl、KNO₃ 和 CaCl₂ 对菌生长无明显影响, (NH₄)₂SO₄和 MgSO₄对菌的生长有较好的促进作用. 可能是由于这 2 种无机盐能提供 SO₄²⁻, 而 SO₄²⁻为菌细胞内合成含硫氨基酸或某种维生素所必需 (沈萍, 2000), 故有利于该菌生长. 综合上述实验结果, 种子培养基中宜加入 0.2 g·L⁻¹的 MgSO₄.

表 4 无机盐种类的选择
Table 4 The choice of salts

无机盐	絮凝率	菌浓度 / (10 ⁸ CFU·mL ⁻¹)
NaCl	82.0%	5.54
KNO ₃	84.0%	5.22
(NH ₄) ₂ SO ₄	80.0%	9.79
MgSO ₄	81.0%	10.6
CaCl ₂	82.5%	5.43
空白	95.3%	5.91

3.9 pH 值的选择

不同初始 pH 条件下实验结果见图 4. 由图 4 知生长最适 pH 值在 7.5 左右, pH 值太高或太低均不利于该菌生长. 这是由于一方面 pH 值过低或过高都会引起微生物表面电荷的改变, 从而不利于细胞对营养物质的吸收; 另一方面 pH 值的改变会让有机化合物离子化, 不利于有机化合物渗入细胞 (郑怀礼, 2004). 对于絮凝剂的产生, 最适 pH 值为 5.5. 此时絮凝率高达 95%. 这是由于该菌产物略呈酸性, 初始 pH 值为 5.5 时在发酵 72 h 后 pH 值为 5.2. 二者 pH 值相近, 故利于产物产生; 而 pH 过高或过低则会对产物生成有不同程度的抑制. 在此基础上可以推测, 若在对数生长期末期之前控制 pH 为 7.5 将利于菌株的生长, 在平稳期即产物的产生时期将 pH 值控制在 5.5 将利于产物的产生, 可以达到更大的絮凝剂产率.

由图 5 知在 72 h 发酵后发酵液的 pH 值与初始

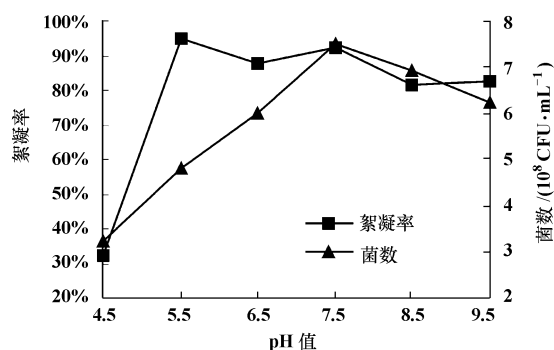


图 4 pH 值对絮凝率的影响

Fig 4 The affection of pH on flocculation

pH 值相比都有不同程度的降低, 初始 pH 值越高降低越多. 这是由于一方面代谢过程中葡萄糖酸的增加导致 pH 值下降, 另一方面该菌代谢产物为酸性多糖 (絮凝剂粗品溶于与发酵液等量的水 $\text{pH} \approx 5.3$), 故 pH 值有不同程度的下降.

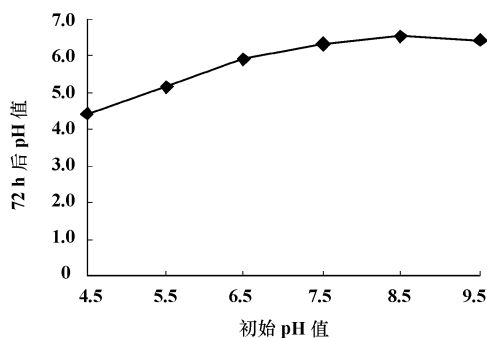


图 5 72h 发酵后 pH 值

Fig 5 The pH value after 72 hours' fermentation

3.10 与几种常见絮凝剂絮凝效果的比较

实验结果如图 6 所示. 在絮凝剂浓度小于 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 微生物絮凝剂的絮凝率明显高于其它絮凝剂; 当浓度超过 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 微生物絮凝剂的絮凝效果急剧下降; 当浓度超过 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时聚合硫酸铝絮凝能力显著提高, 聚合氯化铝也有一定提高; 而聚

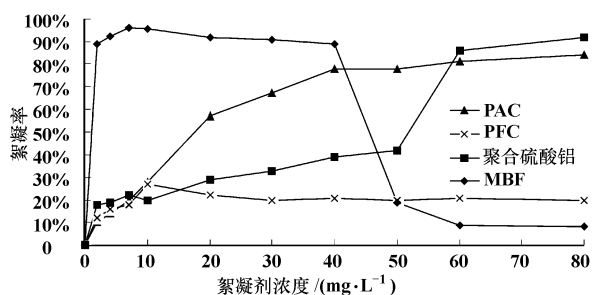


图 6 不同絮凝剂絮凝效果比较

Fig 6 Comparison of various kinds of flocculant

丙烯酰胺的絮凝率始终较低. 可见微生物絮凝剂絮凝率更高, 而且达到较高絮凝率时用量较少, 同时不会造成污染, 比其它絮凝剂有较大优势.

4 结论 (Conclusions)

1) 从活性污泥种筛选出一株高效絮凝剂产生菌株, 在最佳发酵培养基中絮凝率达 95%. 2) 实验得到较适宜的种子培养基为蔗糖 5 g 葡萄糖 20 g 蛋白胨 3.5 g K_2HPO_4 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 0.2 \text{ g H}_2\text{O}$ 1 L, pH 7.5 适宜的发 酵培养基为蔗糖 5 g 葡萄糖 20 g 蛋白胨 1.5 g K_2HPO_4 2 g H_2O 1 L, pH 5.5 3) 与目前常见絮凝剂相比, 微生物絮凝剂具有用量少、絮凝率高的特点.

通讯作者简介: 张永奎, (1966—), 男, 四川大学化学工程学院教授 (博士). 主要研究方向为微生物胞外聚合物、生物冶金与生物脱硫. Email: zhangyongkuina@163.com, Tel: 028-85408255

References

- C. GaneshKumar, Han-SeungJoo, Jang-WonChoi, *et al.* 2004. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. F-450 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 673—681
- Choi C W, Yoo S A, Oh I H, *et al.* 1998. Characterization of an extracellular flocculating substance produced by a planktonic cyanobacterium *Anabaena* sp [J]. *Biotech Lett* 20(7): 643—646
- H Salehizadeh, S A Shojaosadati 2002. Isolation and characterization of a bioflocculant produced by *Bacillus firmus* [J]. *Biotechnology Letters* 24: 35—40
- Kurane R, Nohata Y. 1991. Microbial flocculation of waste water liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes faustus* [J]. *Agric Biol Chem*, 55(4): 1127—1129
- Kurane R, Toeda K, Takeda K, *et al.* 1986. Culture Conditions for Production of Microbial Flocculant by *Rhodococcus erythropolis* [J]. *Agric Biol Chem*, 50(9): 2309—2313
- Ma F, Li S G. 2002. The present situation and development of microbial flocculant [J]. *Industrial Water and Waste Water* 33(1): 7—9 (in Chinese)
- Shen P. 2000. Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press 77 (in Chinese)
- Shen P, Fan X R, Li G W. 1996. Experiment Guide of Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Press 95—97 (in Chinese)
- Ning H, Yin L, Jian C, *et al.* 2002. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Biochemical Engineering Journal* 11: 137—148
- Zheng H L. 2004. Microbial Flocculant and Flocculation Technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press 147—148 (in Chinese)

中文参考文献

- 马放, 李淑更. 2002. 微生物絮凝剂的研究现状及发展趋势 [J]. *工业用水与废水*, 33(1): 7—9
- 沈萍. 2000. 微生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 77
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 1996. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 95—97
- 郑怀礼. 2004. 生物絮凝剂与絮凝技术 [M]. 北京: 化学工业出版社环境科学与工程出版中心, 147—148