

王博,王虹,欧阳晓芳,等.紫外诱变选育高原环境絮凝菌及其絮凝条件优化[J].环境科学研究,2018,31(9):1603-1611.

WANG Bo, WANG Hong, OUYANG Xiaofang, et al. Mutation breeding of flocculating microorganism in plateau area by ultraviolet and its application by optimization[J]. Research of Environmental Sciences, 2018, 31(9): 1603-1611.

紫外诱变选育高原环境絮凝菌及其絮凝条件优化

王博^{1,2,3}, 王虹^{4*}, 欧阳晓芳⁴, 魏耀⁴, 马遥⁴

1.中国科学院生态环境研究中心环境生物技术重点实验室,北京 100085

2.中国科学院大学中丹学院,北京 100049

3.中国-丹麦科研教育中心,北京 100190

4.青海大学化工学院,青海 西宁 810016

摘要: 为获得耐低温且絮凝优异的絮凝菌,对一株分离得到的絮凝菌进行紫外诱变和 5 ℃ 低温胁迫培养,并对诱变优势菌进行应用条件优化。结果表明: ①原始菌为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。②紫外诱变和低温胁迫培养得到的目标诱变菌 FM-5 对生活污水絮凝率达 75.35%,具有良好的遗传稳定性。③单因素试验确定最佳絮凝条件,即絮凝菌投加量为 0.90 mL/(50 mL)、pH 为 7.4、助凝剂加量为 1.0 mL/(50 mL)、处理时间为 15 min;筛选出影响诱变菌絮凝能力最显著的 3 个因素为絮凝菌投加量、pH 和助凝剂加量;通过 Box-Behnken 响应面法得到最佳净化的应用条件,即絮凝菌投加量为 0.90 mL/(50 mL)、pH 为 7.38、助凝剂加量为 1.04 mL/(50 mL)。④验证试验确定絮凝率达 97.01%,BOD₅、COD_{Cr}、浊度和色度去除率均达到 97% 以上,出水水质满足 GB 18918—2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级 A 标准。研究显示,紫外诱变联合低温胁迫技术以及单因素与响应面结合优化絮凝条件可以大幅度提高原始菌株的絮凝能力,低温诱变菌 FM-5 能使高寒地区城市生活污水中悬浮固体大幅降低,同时去除水体中多种污染物。

关键词: 紫外诱变; 低温胁迫; 絮凝菌; 生活污水; 优化

中图分类号: X52

文章编号: 1001-6929(2018)09-1603-09

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2018.06.10

Mutation Breeding of Flocculating Microorganism in Plateau Area by Ultraviolet and Its Application by Optimization

WANG Bo^{1,2,3}, WANG Hong^{4*}, OUYANG Xiaofang⁴, WEI Yao⁴, MA Yao⁴

1.Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2.Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3.Sino-Danish Center for Education and Research, Beijing 100190, China

4.College of Chemical Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: In order to obtain a flocculating microorganism with low-temperature resistance and excellent flocculation, UV mutagenesis and cultivation under low temperature (5 ℃) stress were used for flocculating microorganism separation. The results showed that: (1) The original flocculating strain was preliminarily identified as *Bacillus cereus*; (2) The screening gave the targeted mutant FM-5 with 75.35% flocculating rate with genetic stability; (3) Optimum flocculating conditions were determined as optimum dosage 0.90 mL/(50 mL), pH 7.4, coagulant aids 1.0 mL/(50 mL), and processing time 15 mins via univariate experiments (UE); the Box-Behnken response surface method (RSM) was used to acquire the optimum combination of application conditions: dosage 0.90 mL/(50 mL), pH 7.38, coagulant aids 1.04 mL/(50 mL); (4) Verification tests verified that the flocculating rate reached 97.01%, and BOD₅, COD_{Cr}, turbidity and chroma removal rates reached more than 97%, and the effluent quality met the GB 18918-2002 1 A standard of the *Urban Sewage*

收稿日期: 2017-12-29

修订日期: 2018-06-01

作者简介: 王博(1994-)男,安徽池州人, wangbo1320201006@163.com.

* 责任作者,王虹(1978-)女,陕西咸阳人,副教授,硕士,主要从事生物无机化学研究, Whong714@126.com

基金项目: 青海省科技支撑计划项目(No.2014-NS-117); 青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-789)

Supported by Qinghai Province Science and Technology Support Plan Project, China (No.2014-NS-117); Qinghai Province Science and Technology Plan Project, China (No.2017-ZJ-789)

Treatment Plant Pollutant Discharge Standard. In conclusion, the flocculating ability of the original strains could be greatly improved via UV mutagenesis, cultivation under low temperature and a combination of UE and RSM, hence FM-5 could reduce more suspended solids in municipal sewage and achieve removal of various pollutants simultaneously in a plateau area.

Keywords: UV; low-temperature stress; flocculating microorganism; domestic sewage; optimization

絮凝沉降是一种应用广泛、经济简便的处理城镇生活污水、工业废水、给水的水处理手段^[1]. 微生物絮凝剂作为一类高效、安全、无污染、应用范围广泛的新型水处理药剂,已广泛引起国内外学者的重视^[2]. 微生物絮凝剂产生菌是指能分泌产生具有絮凝能力的微生物,简称“絮凝菌”(flocculating microorganism, FM)^[3]. 大量存在于土壤、活性污泥和沉积物中的细菌、放线菌、真菌等微生物都能产生絮凝剂^[4].

青海省地处高原,昼夜温差较大,而微生物絮凝菌絮凝最适温度为25~37℃. 温度太低,絮凝效率明显降低. 此外,随着青海省社会经济的发展 and 人口的增加,生活废水排放量逐渐上升,水资源污染形势严峻,已直接影响到人民群众的身体健康以及经济社会的可持续发展. 因此开展适应于高原环境的微生物菌剂净化高寒地区污染水域的基础研究,是行之有效的且具有深远意义.

微生物絮凝剂因具有无毒无害、无二次污染的特性,使其应用前景明显优于普通絮凝剂. 目前,对于紫外诱变絮凝菌以及高寒地区絮凝菌应用的报道较少,为此,该研究旨在通过紫外诱变技术,筛选出生长较好且在高寒环境中具有较高絮凝能力的耐低温絮凝菌. 通过单因素与响应面试验结合(response surface method, RSM^[5]),优化诱变菌的最佳絮凝条件,以为微生物絮凝剂的研究及工业化应用提供一定的科学依据,从而为城市生活污水的实际应用提供有效的菌株资源和理论依据. 此外,在后续的研究中可运用所得模型与实际高寒地区城市污水处理系统相结合,最大程度地去除污染物,有望提高青海省水资源涵养,实现高寒地区污水的生态良性演化.

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌种筛选分离于西宁市湟水河南岸的污染源中.

菌种活化培养基^[6]: 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, pH 为 7.2~7.4, 在 121℃ 下灭菌 25 min. 牛肉膏蛋白胨固体培养基^[7]: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 琼脂 18 g/L, pH 为 7, 在 121℃ 下灭菌 25 min. 牛肉膏蛋白胨液体培养基不加琼脂.

生活污水取自西宁市第三污水处理厂,其进出水水质见表 1.

表 1 生活污水进、出水水质

Table 1 The inlet and outlet of the domestic sewage quality

项目	进水	出水	去除率/%
BOD ₅	180 ¹⁾	≤20 ¹⁾	≥85
COD _{Cr}	400 ¹⁾	≤60 ¹⁾	≥89
浊度	180 ²⁾	—	—
色度	210 ³⁾	≤30 ³⁾	≥90

注: 1) 以质量浓度计,单位为 mg/L; 2) 单位为 NTU; 3) 单位为度.

1.2 试验方法

1.2.1 絮凝率的测定

分别取试验组和对照组的水样上清液,用分光光度计测定在 550 nm 波长下的吸光值($A_{550\text{nm}}$),絮凝率(flocculation rate)计算公式^[8]:

$$FR = (FR_b - FR_t) / FR_t \times 100\% \quad (1)$$

式中: FR 为絮凝率,%; FR_b 为空白对照组上层清夜 $A_{550\text{nm}}$; FR_t 为试验组上层清夜 $A_{550\text{nm}}$.

1.2.2 絮凝菌的鉴定

形态学观察^[9]: 首先在牛肉膏蛋白胨平板培养基上接种经活化后的絮凝菌,置于 25℃ 培养箱中培养 48~72 h,观察其菌落形态;然后对絮凝菌进行镜检观察,分别进行革兰氏染色和芽孢染色;最后对菌株进行电镜扫描进一步观察其形态.

生理生化试验^[10]: 根据《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)》进行鉴定.

16S rDNA 分子鉴定: 提取菌株 DNA 后,采用细菌通用引物 27 F(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1492 R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增.

PCR 反应条件: 94℃ 预变性 8 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 34 个循环; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,通过 BLAST 检索程序将 16S rDNA 所测序列与 GenBank 中核酸数据进行序列对比,利用软件 MEGA 7.0 构建进化树,构建方式为邻接法(neighbor-joining, NJ).

1.2.3 紫外诱变

测定原始菌株的生长特性曲线^[11]: 接 4 环经活

化后的原始菌于 50 mL 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于 25 ℃、160 r/min 下培养箱中振荡培养,每隔 4 h 用紫外分光光度法测定菌液在 600 nm 下的吸光值($A_{600\text{nm}}$),并记录吸光值随时间的变化。

取培养至对数期的菌液 10 mL 于离心管中,3 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液,再用无菌生理盐水洗涤 2~3 次,将洗涤后的菌液倒入装有玻璃珠的锥形瓶内,摇匀以打散菌体,制得菌悬液。用血球计数板计数法计数,无菌生理盐水调整细胞浓度至 $10^6 \sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$,即为待诱变的菌悬液。

采用功率为 15 W 的紫外灯,照射距离 30 cm,预热 20 min。取制好的菌悬液 5 mL 于直径为 9 cm 的无菌培养皿中,打开皿盖,对菌悬液分别进行 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 s 的诱变处理。于暗室中用 10 倍稀释法将经过紫外诱变的菌悬液同未诱变的菌悬液用无菌生理盐水稀释至适宜浓度,取 0.2 mL 稀释菌液涂平板,设置 4 组平行。为避免微生物光复活,将涂布好的平板用锡箔纸包好,置于 25 ℃ 恒温箱中,培养 2 d 后再进行菌落计数。根据对照和诱变后平板上的菌落数,计算致死率。致死率(lethality rate, LR) 计算公式^[12]:

$$LR = (LR_b - LR_a) / LR_b \times 100\% \quad (2)$$

式中: LR_b 为处理前的菌落数,个; LR_a 为处理后的菌落数,个。

通过初筛和复筛选取目标诱变菌。初筛通过对致死率为 70%~80% 的菌株进行 5 ℃ 的低温胁迫培养,得到耐低温的絮凝菌。将复筛所得的最佳诱变菌进行遗传稳定性试验:连续转接 8 次斜面,同时分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于 5 ℃、160 r/min 的培养箱中振荡培养 2 d,制得菌液,分别测定其对水样的絮凝率。最后比较相同条件下原始菌和诱变菌的生长曲线。

1.2.4 单因素试验设计

初步选取絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量(1% CaCl_2)、处理时间 4 个因素进行单因素试验(见表 2)。絮凝菌投加量单因素试验方法:取 21 支 50 mL 比色管,分别加入 1.4 mL 的 1% CaCl_2 和体积比(相对于 50 mL 的总体积)为 0.8%、1.2%、1.6%、1.8%、2%、2.4%、4% 的絮凝菌菌液,设置 3 组平行试验,取 7 支 50 mL 比色管加入对应量的不接菌的培养基作为对照组,用 pH 为 7 的生活污水定容至 50 mL,上下颠倒 10 次,静止 10 min,放于 550 nm 处测定吸光值,计算诱变菌的絮凝率,其他单因素试验同上。

1.2.5 响应面优化试验设计

表 2 各单因素水平表

Table 2 The univariate factors and levels

水平	絮凝菌投加量/ [mL/(50 mL)]	pH	助凝剂加量/ [mL/(50 mL)]	处理时间/ min
1	0.4	6.6	0.6	5
2	0.6	6.8	0.8	10
3	0.8	7.0	1.0	15
4	0.9	7.2	1.2	20
5	1.0	7.4	1.4	25
6	1.2	7.6	1.6	30
7	2.0	8.0	2.0	60

在单因素试验的基础上,利用 Box-Behnken 对絮凝菌絮凝能力影响显著的絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量设计三因素三水平响应面正交试验(见表 3),处理时间固定为 15 min,温度为低温(5 ℃)。

表 3 试验的因素水平及编码

Table 3 The variables and factor levels

因素	代码	编码水平		
		-1	0	1
絮凝菌投加量/[mL/(50 mL)]	A	0.8	0.9	1.0
pH	B	7.2	7.4	7.6
助凝剂加量/[mL/(50 mL)]	C	0.8	1.0	1.2

1.2.6 验证试验设计

根据响应面正交试验的最佳优化条件,进行 3 次平行试验,测定经诱变菌处理后水样絮凝率以及 BOD_5 ^[13]、 COD_{Cr} ^[14]、浊度^[15]、色度^[16] 去除率 4 个水质指标,结果取平均值,验证预测模型的准确性。

2 结果与讨论

2.1 絮凝菌的鉴定

2.1.1 形态学鉴定

原始絮凝菌的菌落呈圆形、大小中等、淡黄色、中间凸起、不透明、边缘整齐、湿润有光泽、较黏稠、表面光滑。芽孢染色,镜检发现菌体周围呈现出大量的绿色小点,菌株有芽孢。革兰氏染色,呈紫色,为革兰氏阳性菌(G^+)。经扫描电镜观察,菌株细胞呈短杆状,无鞭毛,无荚膜(见图 1)。

2.1.2 生理生化试验结果

通过对菌株进行生理生化试验,进一步鉴定絮凝菌的属性,结果见表 4。

2.1.3 16S rDNA 分子鉴定结果

通过 PCR 试验扩增菌株的 16S rDNA,获得长度为 1 400 bp 的基因片段。通过 BLAST 比对发现,絮凝菌与芽孢杆菌属同源性菌为 99% 左右,选择相似性



图 1 絮凝菌的扫描电镜图(×10 000)

Fig. 1 The SEM of flocculating microorganism (×10 000)

表 4 纯化菌株的生理生化特征^[17]

Table 4 The physiological and biochemical properties^[17]

序号	试验名称	试验结果
1	接触酶	+
2	伏普(V.P)	-
3	明胶液化	+
4	糖发酵	+
5	酪氨酸水解	+
6	甲基红(M.R)	+
7	苯丙氨酸脱氨酶	-
8	硝酸盐还原	+

注: +为阳性反应; -为阴性反应.

较高的菌株构建发育树(见图 2),絮凝菌与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* strain ATCC 14579)在系统发育树中位于同一分支,距离最近.结合菌落形态特征和生理生化特征,可以判断该絮凝菌属于蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*).

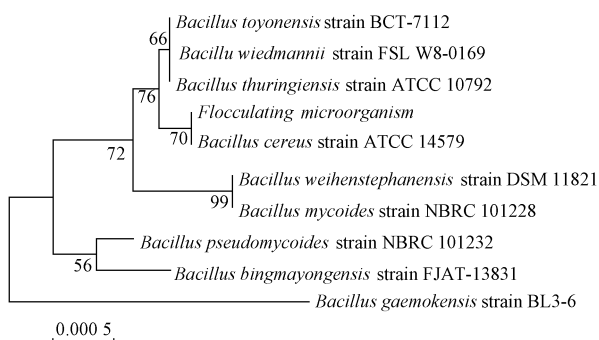


图 2 絮凝菌株基于 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on partial 16S rDNA gene sequences of strain FM

2.2 紫外诱变试验结果

2.2.1 原始菌株的生长特性

在适宜的培养条件下,大部分微生物的繁殖速度

都较快,通过定时取样测定微生物的浓度,以时间为横坐标,以 $A_{600\text{nm}}$ 为纵坐标,绘制原始菌株的生长曲线(见图 3).由图 3 可见,前 4 h 菌液的 $A_{600\text{nm}}$ 几乎持平,表明絮凝菌数量无明显增加,处于停滞期;4~8 h 絮凝菌开始加速生长,增长速率加快,菌量明显增加,处于加速期;8~12 h 菌量呈对数增长,是整个生长阶段最为迅速的时期,即对数期.因此,选择对培养至 10 h 的原始菌株进行紫外诱变.

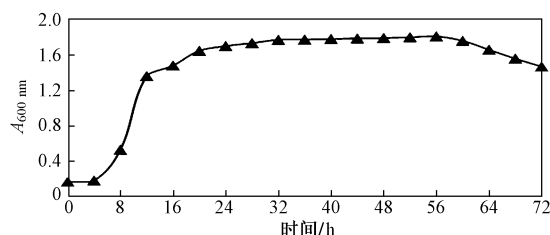


图 3 原始菌株的生长特性曲线

Fig. 3 The growth curve of the original strain

2.2.2 紫外诱变致死曲线

采用平板菌落计数法^[18]测定致死率,得到致死曲线(见图 4).由图 4 可见,随着诱变时间的增长,诱变菌的致死率呈上升趋势,在 30 s 前诱变菌致死率显著增加;30~50 s 间曲线趋于平缓,致死率的变化不明显;50 s 后曲线基本无波动,菌株完全致死^[11].紫外诱变的致死率不能过高或过低,过高的致死率会导致高的负突变率和低的存活率;过低的致死率会使得诱变效果不佳,无法得到理想菌株^[19].该试验为提高正突变率,选择 70%~80%的致死率^[20],即诱变时间为 30 s.

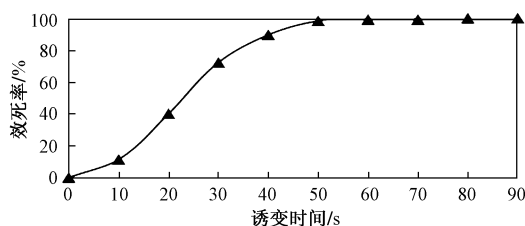


图 4 诱变菌 FM-5 紫外诱变的致死曲线

Fig. 4 The destruction curve of mutagenic strains FM-5 by UV

2.2.3 诱变菌的筛选

采用初筛和复筛对诱变菌筛选.初筛通过 5℃ 低温胁迫培养 4 d 后,选取 8 株菌落大、边缘整齐的单菌落,分别编号为 FM-1、FM-2、FM-3、FM-4、FM-5、FM-6、FM-7、FM-8.复筛通过比较初筛选出的诱变菌和原始菌对水样的絮凝率,选出处理污水的絮凝率最高即为目标诱变菌(见图 5).

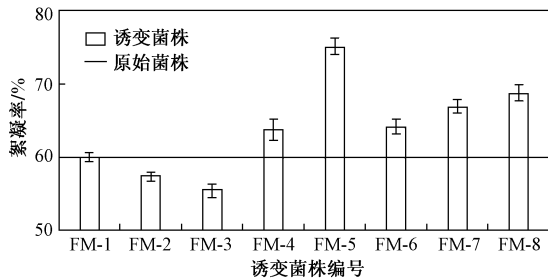


图 5 诱变菌株和原始菌株对水样的絮凝率
Fig. 5 The flocculating rate of mutagenic strains and original strain

由图 5 可见, 筛选的 8 株诱变菌在 5 °C 下对水样

表 5 诱变菌 FM-5 遗传稳定性试验

Table 5 The genetic stability test of mutagenic strain FB-5

诱变菌 FB-5	1 代	2 代	3 代	4 代	5 代	6 代	7 代	8 代	平均值
絮凝率/%	75.43	75.36	76.57	75.72	75.78	76.65	75.87	75.07	75.81

以时间为横坐标, 以 $A_{600\text{nm}}$ 为纵坐标, 绘制原始菌和诱变菌 FM-5 在 5 °C、160 r/min 振荡培养条件下的生长曲线(见图 6)。由图 6 可见, 原始菌和诱变菌 FM-5 的数量在前 4 h 都未明显增加, 处于停滞期; 4 h 后二者的生长曲线开始出现差异; 随着时间的延长, FM-5 的生长曲线上升幅度明显优于原始菌。这进一步表明诱变菌 FM-5 的优越性以及诱变效果显著。

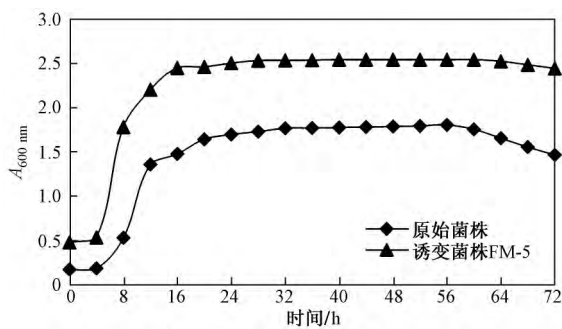


图 6 原始菌株和诱变菌株 FM-5 的生长曲线
Fig. 6 The growth curves of original strain and FM-5

2.3 单因素试验

该试验将诱变菌 FM-5 对生活污水体系应用的絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量、处理时间均设定为 7 个梯度(见表 2), 每个梯度设置 3 组平行试验, 试验温度设定为 5 °C。以单因素变量为横坐标, 以絮凝率为纵坐标, 得到单因素变量对诱变菌 FM-5 絮凝能力的影响曲线(见图 7)。

图 7 表明, 絮凝菌投加量影响诱变菌的絮凝剂产量, 最适投加量能使菌株达到最适絮凝剂产量, 并直接关系到絮凝效果, 对于提高菌株絮凝污染物的能力

的絮凝率参差不齐, 诱变菌 FM-4、FM-5、FM-6、FM-7、FM-8 的絮凝率均高于原始菌, 为正突变菌(柱状图位于横线以上); 而诱变菌 FM-1、FM-2、FM-3 的絮凝率均低于原始菌, 为负突变菌(柱状图位于横线以下)。其中诱变菌 FM-5 的絮凝率最高, 为 75.35%, 故目标诱变菌为絮凝能力最强的 FM-5。

2.2.4 诱变菌的遗传稳定性试验

对诱变菌 FM-5 进行连续 8 代培养, 絮凝率平均值为 75.81%, 极差为 1.59%, 标准偏差为 0.56。诱变菌 FM-5 的絮凝率在误差允许的范围内波动, 具有遗传稳定性(见表 5)。

以及合理利用菌株有重要作用, 故最佳絮凝菌投加量为 0.9 mL/(50 mL), 絮凝率为 80.42%; pH 小于 7.4 时絮凝率随 pH 的增大而增大, pH 大于 7.4 后外界环境中的 H^+ 浓度低于微生物酶一定的适应范围, 使微生物的原生质膜的电荷发生变化, 影响微生物的生长及其酶的活性, 絮凝率随 pH 的增大反而降低^[21], 故最适 pH 为 7.4, 絮凝率为 85.01%; 菌株在助凝剂(1% $CaCl_2$) 加量为 1.0 mL/(50 mL) 时对絮凝效果最好, 而助凝剂加量低于或超过该量时絮凝率均会下降, 表明一定的 Ca^{2+} 能起到助凝作用, 但超过一定量时, Ca^{2+} 会占据絮凝剂分子的活性位置, 使絮凝剂和悬浮物质隔开, 从而影响絮凝率^[22], 故最适助凝剂加量为 1.0 mL/(50 mL), 絮凝率为 87.29%; 处理时间在 5~15 min 时絮凝率逐渐升高, 至 30 min 后有一定程度下降, 但基本保持平稳, 合适的静沉时间不仅有助于絮凝菌发挥最佳絮凝效果^[23], 同时也会节约时间和经济成本, 故处理时间为 15 min 时絮凝效果最优, 絮凝率为 88.31%。

2.4 响应面优化试验

2.4.1 统计分析和回归数学模型的建立

在单因素试验的基础上, 筛选出对诱变菌 FB-5 絮凝能力影响最为显著的 3 个因素: 絮凝菌投加量(A)、pH(B)和助凝剂加量(C)。利用 BBD(Box-Behnken Design)^[24] 设计三因素三水平共 17 个试验点的试验方案, 考察在处理时间为 15 min、温度为 5 °C 下, 上述 3 个因素对絮凝菌絮凝效果的影响。运用 Design Expert 8.0 (DX) 对 BBD 响应面试验结果进行深入分析^[25](见表 6)。

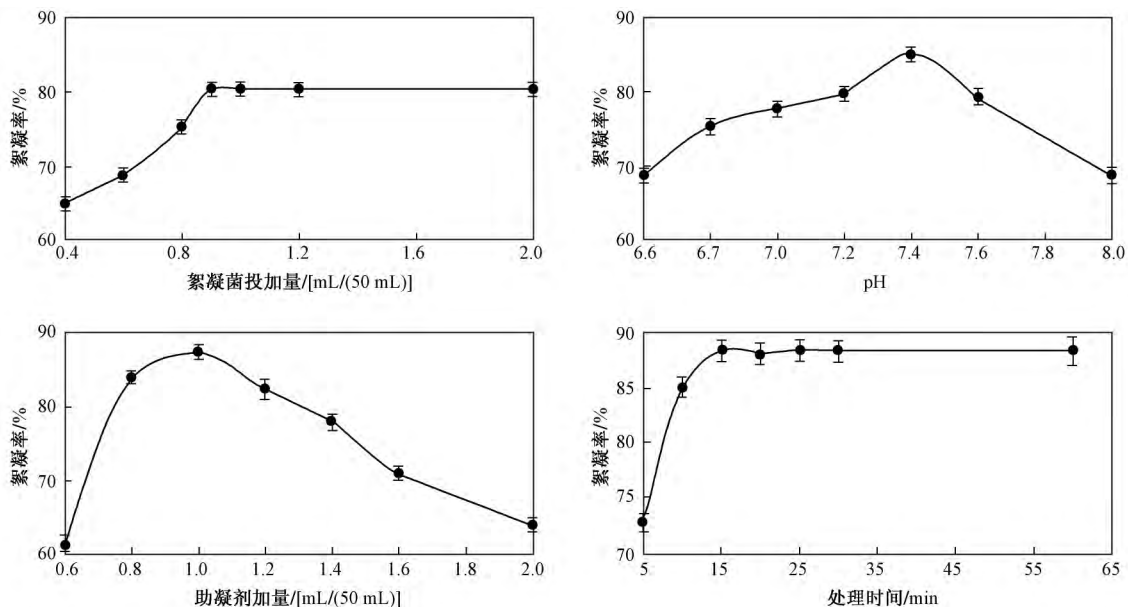


图 7 絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量、处理时间对诱变菌 FM-5 絮凝能力的影响

Fig. 7 The effects of dosage , pH , coagulant aids , time on flocculating rate of mutagenic strain FM-5

表 6 Box-Behnken 响应面设计回归分析

Table 6 The regression analysis of Box-Behnken response surface design

试验编号	因素			絮凝率/%
	絮凝菌投加量(A) / [mL/(50 ml)]	pH(B)	助凝剂加量(C) / [mL/(50 ml)]	
1	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	92.07
2	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	91.95
3	1 (1.0)	-1 (7.2)	0 (1.0)	84.45
4	-1 (0.8)	1 (7.6)	0 (1.0)	81.86
5	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	92.64
6	0 (0.9)	1 (7.6)	-1 (0.8)	85.08
7	0 (0.9)	1 (7.6)	1 (1.2)	88.35
8	1 (1.0)	0 (7.4)	0 (1.0)	83.23
9	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	86.58
10	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	92.67
11	0 (0.9)	0 (7.4)	1 (1.2)	92.33
12	1 (1.0)	-1 (7.2)	0 (1.0)	84.56
13	-1 (0.8)	0 (7.4)	1 (1.2)	83.87
14	-1 (0.8)	0 (7.4)	-1 (0.8)	86.01
15	1 (1.0)	0 (7.4)	-1 (0.8)	85.78
16	-1 (0.8)	-1 (7.2)	-1 (0.8)	81.54
17	0 (0.9)	0 (7.4)	0 (1.0)	86.41

注: 括号外数值表示编码值; 括号内数值表示编码水平, 即试验因素。

通过拟合得到絮凝率的三元二次回归方程:

$$R = 92.33 + 0.59 \times A - 0.79 \times B + 0.84 \times C +$$

$$0.20 \times A \times B - 1.42 \times A \times C - 0.11 \times B \times C - 5.56 \times A^2 - 3.42 \times B^2 - 2.30 \times C^2 \quad (3)$$

单因素效应分析, 令上述回归方程中的 3 个未知数中的 2 个归于零水平, 从而得到以其中一个因素为主要变量的偏回归模型^[26]:

$$R_A = -5.56 \times A^2 + 0.59 \times A + 92.33 \quad (4)$$

$$R_B = -3.42 \times B^2 - 0.79 \times B + 92.33 \quad (5)$$

$$R_C = -2.30 \times C^2 + 0.84 \times C + 92.33 \quad (6)$$

式中, R 为响应值 (response), R_A 、 R_B 、 R_C 分别为 A (絮凝菌投加量)、 B (pH)、 C (助凝剂加量) 对应的絮凝率响应值。

上述 3 个方程的二次项系数均为负值, 说明其表征的抛物线都开口向下, 因此 3 个因素取值均存在极大值点, 即最佳值, 过大或过小均会使响应值絮凝率降低^[27]。

对方程模型进行方差分析, 结果见表 7、8。由表 7 可知, 模型大于 F 值的概率 $P < 0.0001$, 表明模型极其显著, 可信度较高; 模型失拟率不显著, 因此可以用该模型对不同条件下的絮凝率进行分析和预测。由表 8 可知, 模型的相关系数 (R^2) 为 0.9979, 表明模型可以解释 99.79% 的试验所得絮凝率。校正系数 (R_{Adj}^2) 为 0.9951, 与预测相关系数 (R_{Pred}^2) 0.9911 十分接近, 表明仅有 0.49% 的絮凝率总变异不能用该模型解释。变异系数 (CV) 为 0.31 (<10, 较低), 表明该模型能很好地反映真实的试验值, 试验可靠性较高。

表 7 方差分析统计结果

Table 7 The variance analysis of experiment results

项目	平方和 (SS)	自由度 (DF)	均方 (MS)	F	P	显著性
模型	243.25	9	27.03	364.88	<0.000 1	极显著
A	2.81	1	2.81	37.92	0.000 5	
B	5.01	1	5.01	67.62	<0.000 1	极显著
C	5.59	1	5.59	75.53	<0.000 1	极显著
A×B	0.16	1	0.16	2.11	0.190 0	
A×C	8.09	1	8.09	109.27	<0.000 1	极显著
B×C	0.05	1	0.05	0.65	0.445 5	
A ²	129.98	1	129.98	1 754.71	<0.000 1	极显著
B ²	49.35	1	49.35	666.23	<0.000 1	极显著
C ²	22.34	1	22.34	301.62	<0.000 1	极显著
残差误差	0.52	7	0.074			
失拟率	0.10	3	0.032	0.30	0.825 9	不显著
纯误差	0.42	4	0.11			
合计	243.77	16				

注: 合计中数值为模型和残差误差之和。

表 8 回归模型方差分析

Table 8 The variance analysis of regression model

项目	数值	项目	数值
标准误差 (Std. Dev.)	0.27	相关系数 (R^2)	0.997 9
等比中数 (Mean)	87.02	校正系数 (R_{Adj}^2)	0.995 1
变异系数 (CV)	0.31	预测校正系数 (R_{Pred}^2)	0.991 1
残差 (PRESS)	4.71	精密度 (Precision)	51.312 0

2.4.2 因素间交互作用的分析

为了进一步研究相关变量间的交互作用和确定最优点,通过 DX 软件做 A(絮凝菌投加量)、B(pH)和 C(助凝剂加量)3 个主要影响因素对絮凝水平交互影响的响应面(见图 8)。若二因素交互作用不显著,底部等高线为圆形;若显著则为椭圆形^[29],响应面图中曲面的弯曲程度说明单因素的显著程度。由

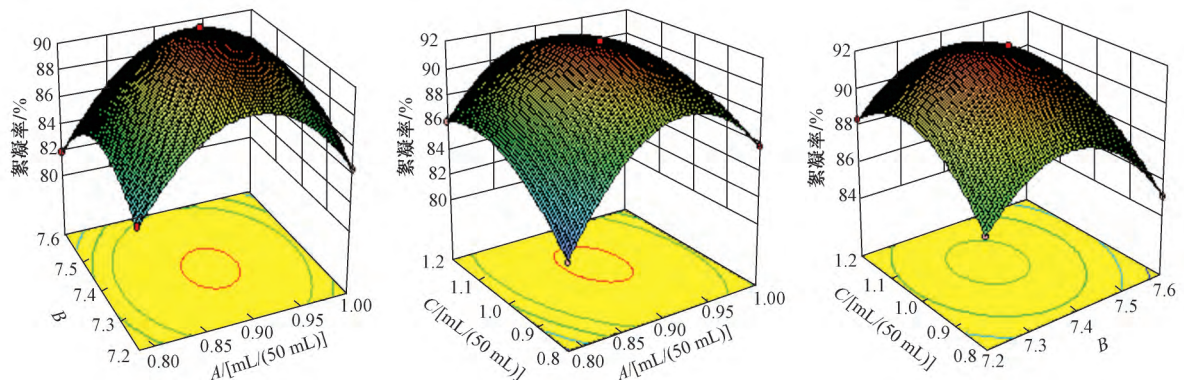
图 8 可见, A×B、B×C 交互作用不显著(趋近于圆形), A×C 交互作用显著(椭圆形)。因素 B、C 对絮凝菌的影响最为显著,曲线较为陡峭;因素 A 次之,拟合面有真实的最大值。显示 pH 对微生物絮凝剂功能基团的电负性和生活污水的表面电荷均有着较大的影响^[30]。

2.4.3 响应面分析最佳应用条件的确定

从上述结果分析响应面试验得到最优组合絮凝菌投加量为 0.90 mL/(50 mL), pH 为 7.38, 助凝剂加量为 1.04 mL/(50 mL), 处理时间为 15 min, 温度为 5 °C, 此时絮凝率预测最大值为 92.46%。

2.5 验证试验

按照响应面试验结果,采用生活污水体系,取絮凝菌投加量为 0.90 mL/(50 mL), pH 为 7.38, 助凝剂加量为 1.04 mL/(50 mL) 的最佳优化条件进行 3 次



注: A 表示絮凝菌投加量; B 表示 pH; C 表示助凝剂加量。

图 8 絮凝菌投加量和 pH、絮凝菌投加量和助凝剂加量、pH 和助凝剂加量影响絮凝率的响应面

Fig. 8 Response surface plots of interactions on dosage and pH, dosage and coagulant aids, pH and coagulant aids

平行的验证试验,得到絮凝率平均值为 97.01%,表明该模型能很好地预测实际絮凝情况.同时测定水样的各项水质指标(见图9),BOD₅、COD_{Cr}、浊度、色度平均去除率分别为 97.68%、98.45%、97.89%、98.01%,出水水质均达到 GB 18918—2002《城镇污水处理厂污染物排放标准》一级 A 标准^[30],表明微生物絮凝菌净化生活污水的效果良好,能很好地应用于实际降解情况.

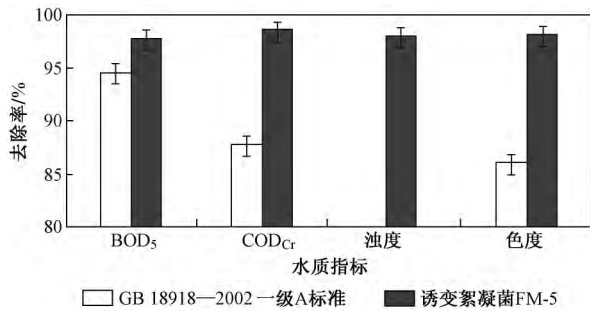


图9 水样水质指标的变化

Fig. 9 The changes of wastewater quality indexes

3 结论

a) 通过对原始絮凝菌鉴定,判断其为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

b) 紫外诱变提高了原始菌的絮凝效果,选择对培养至 10 h 的菌株进行 30 s 的紫外诱变和 5 ℃ 的低温胁迫培养,筛选得到的诱变菌 FM-5 对生活污水的絮凝率达到 75.35%,具有稳定的遗传性。

c) 诱变菌 FM-5 絮凝条件优化:通过单因素试验,确定最佳絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量、处理时间分别为 0.9 mL/(50 mL)、7.4、1.0 mL/(50 mL)、15 min;利用 Box-Behnken 设计絮凝菌投加量、pH、助凝剂加量三因素三水平的响应面实验得到最终净化的最佳条件,即絮凝菌投加量为 0.90 mL/(50 mL)、pH 为 7.38、助凝剂加量为 1.04 mL/(50 mL),诱变菌对水样絮凝的预测最大值为 92.46%,该降解模型显著,模型适应性好。

d) 在优化条件下,进行絮凝率与四大水质指标的验证试验.絮凝率平均值为 97.01%,与最大响应值的预测值基本一致,BOD₅、COD_{Cr}、浊度以及色度去除率均达到 97% 以上,出水水质满足 GB 18918—2002 一级 A 标准。

参考文献(References):

[1] 吴敬荣,王广军,李志斐,等.一株絮凝剂产生菌的分离鉴定及其絮凝条件优化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2017(1):175-184.
WU Jingrong, WANG Guangjun, LI Zhifei, et al. Isolation and

identification of a flocculant-producing bacterium strain and optimization of its culturing conditions [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition) 2017(1): 175-184.

- [2] GIRI S S, HARSHINY M, SEN S S, et al. Production and characterization of a thermostable bioflocculant from *Bacillus subtilis* F9, isolated from wastewater sludge [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety 2015, 121: 45-50.
- [3] NWODO U U, GREEN E, MABINYA L V, et al. Bioflocculant production by a consortium of *Streptomyces* and *Cellulomonas* species and media optimization via surface response model [J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces 2014, 116(2): 257-264.
- [4] OH H M, LEE S J, PARK M H, et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49 [J]. Biotechnology Letters 2001 23: 1229-1234.
- [5] NOSUHI M, NEZAMZADEH-EJHIEH A. High catalytic activity of Fe(II)-clinoptilolite nanoparticles for indirect voltammetric determination of dichromate: experimental design by response surface methodology (RSM) [J]. Electrochimica Acta 2017, 223: 47-62.
- [6] BERBEGAL C, BENAVENT-GIL Y, PARDO I, et al. A novel culture medium for *Oenococcus oeni*, malolactic starter production [J]. LWT-Food Science and Technology 2015 64(1): 25-31.
- [7] GUO Suolian, ZHAO Xinqing, WAN Chun, et al. Characterization of flocculating agent from the self-flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS-6-1 for efficient biomass harvest [J]. Bioresource Technology 2013, 145: 285-289.
- [8] CZEMERSKA M, SZCZES A, HOŁYSZ L, et al. Characterisation of exopolymer R-202 isolated from *Rhodococcus rhodochrous* and its flocculating properties [J]. European Polymer Journal 2017, 88: 21-33.
- [9] WAGNER M, AMANN R, KÄMPFER P, et al. Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge [J]. Systematic & Applied Microbiology 1994, 17(3): 405-417.
- [10] 刘国生. 微生物学试验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 141-149.
- [11] 王虹, 王婧, 华珍, 等. 高寒地区氨氮降解菌诱变筛选及降解能力的研究 [J]. 环境工程 2016, 34(9): 13-16.
WANG Hong, WANG Jing, HUA Zhen, et al. Study on mutation screening and degradation ability of ammonia-nitrogen degrading bacteria in alpine region [J]. Environment Engineering, 2016, 34(9): 13-16.
- [12] COGONI C, VALENZUELA L, GONZÁLEZHALPHEN D, et al. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide [J]. Journal of Bacteriology 1995, 177(3): 792.
- [13] HOSSAIN M I, PAPANINI A, CORD-RUWISCH R. Rapid adaptation of activated sludge bacteria into a glycogen accumulating biofilm enabling anaerobic BOD uptake [J]. Bioresource Technology 2017, 228: 1-8.
- [14] KIYUNA L S, FUESS L T, ZAIAT M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane

- production from the biodigestion of sugarcane vinasse [J]. *Bioresource Technology* 2017 232: 103-112.
- [15] ABOUBARAKA A E , ABOELFETOH E F , EBEID E M. Coagulation effectiveness of graphene oxide for the removal of turbidity from raw surface water [J]. *Chemosphere* 2017 ,181: 738-746.
- [16] ZHAO Kunjiao ZHAO Guohua ,LI Peiqiang *et al.* A novel method for photodegradation of high-chroma dye wastewater via electrochemical peroxidation [J]. *Chemosphere* 2010 ,80(4) : 410-415.
- [17] 布坎南 R E ,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社 ,1984: 833-835.
- [18] 陈学情 ,蒋家璇 ,任志鸿 ,等. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用 [J]. *微生物学报* 2017 57(4) : 539-549.
CHEN Xueqing ,JIANG Jiakuan ,REN Zhihong *et al.* Antibacterial activity of silver nanoparticles against multiple drug resistant strains [J]. *Acta Microbiologica Sinica* 2017 57(4) : 539-549.
- [19] MA Caixia ,JIANG Dongliang ,WEI Xiyang. Mutation breeding of *Emericella foeniculicola* TR21 for improved production of tanshinone IIA [J]. *Process Biochemistry* 2011 46(10) : 2059-2063.
- [20] MASMOUDI F ,BEN K S ,KAMOUN A *et al.* Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea* [J]. *Microbiological Research* 2017 ,197: 29-38.
- [21] ZHANG Yi ,HE Meilin ,ZOU Shanmei *et al.* Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by ethylmethane sulfonate-induced mutation [J]. *Bioresource Technology* 2016 207: 268-275.
- [22] 杨莹 ,马放 ,李芬 ,等. 生物絮凝剂的絮凝形态及影响因素 [J]. *东北林业大学学报* 2009 37(12) : 91-94.
YANG Ying ,MA Fang ,LI Fen *et al.* Flocculation morphology of bioflocculant and its influence factors [J]. *Journal of Northeast Forestry University* 2009 37(12) : 91-94.
- [23] GUO Haipeng , HONG Chuntao , ZHANG Cheng , *et al.* Bioflocculants' production from a cellulase-free xylanase-producing *Pseudomonas boreopolis* G22 by degrading biomass and its application in cost-effective harvest of microalgae [J]. *Bioresource Technology* 2018 255: 171-179.
- [24] KRUPA A N D , ABIGAIL M E A , SANTHOSH C , *et al.* Optimization of process parameters for the microbial synthesis of silver nanoparticles using 3-level Box-Behnken Design [J]. *Ecological Engineering* 2016 87(2) : 168-174.
- [25] ANSARI M H , PARSARAJA B , ARJOMANDI J. Application of conducting polyaniline , *o*-anisidine , *o*-phenetidine and *o*-chloroaniline in removal of nitrate from water via electrically switching ion exchange: modeling and optimization using a response surface methodology [J]. *Separation & Purification Technology* , 2017 ,179: 104-117.
- [26] 吕长鑫 ,李萌萌 ,徐晓明 ,等. 响应面分析法优化纤维素酶提取紫苏多糖工艺 [J]. *食品科学* 2013 34(2) : 6-10.
LV Changxin ,LI Mengmeng ,XU Xiaoming *et al.* Optimization of enzymatic extraction conditions for crude polysaccharides from perilla leaves by response surface methodology [J]. *Food Science* , 2013 34(2) : 6-10.
- [27] SABOUR M R , AMIRI A. Comparative study of ANN and RSM for simultaneous optimization of multiple targets in Fenton treatment of landfill leachate [J]. *Waste Management* 2017 65: 54-62.
- [28] KUMAR A , PATIL P P. FEA simulation and RSM based parametric optimisation of vibrating transmission gearbox housing [J]. *Perspectives in Science* 2016 8: 388-391.
- [29] DHIMAN N , SHUKLA S P , KISKU G C. Statistical optimization of process parameters for removal of dyes from wastewater on chitosan cenospheres nanocomposite using response surface methodology [J]. *Journal of Cleaner Production* 2017 ,149: 597-606.
- [30] 郭俊元 ,陈诚 ,刘文杰. 微生物絮凝剂及与壳聚糖复配处理亚甲基蓝废水 [J]. *中国环境科学* 2017 37(9) : 3346-3352.
GUO Junyuan ,CHEN Cheng ,LIU Wenjie. A bioflocculant and its performances in treatment of methylene blue wastewater by composited with chitosan [J]. *China Environmental Science* 2017 , 37(9) : 3346-3352.
- [31] 国家环境保护总局 ,国家质量监督检验检疫总局. GB 18918—2002 城镇污水处理厂污染物排放标准 [S]. 北京: 中国标准出版社 2002.

(责任编辑: 张蕊)