

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10): 1298–1304; 4 October 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150035

化学机械法棉秆制浆废液的生物转化条件及转化物的安全性

杨宗政¹, 王明月², 宁立群², 张杰², 曹井国¹

¹天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457

²天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457

摘要: 【目的】系统研究棉秆制浆废液用于培养具有生物防治功能的枯草芽孢杆菌的适宜条件和转化液的安全性。【方法】以初始 pH 值、温度、曝气量和接种量作为单因素, 通过实验优化培养条件, 并以大鼠和大耳兔作为测试动物, 对转化液的安全性进行分析。【结果】结果表明, APMP 棉秆制浆废液培养枯草芽孢杆菌的最适条件为: 初始 pH 7.0, 温度 30 °C, 曝气量 16 L/h, 接种量 0.8 g/L, 反应器内加入填料, 装填率为 30%, 在此培养条件下菌株的活芽孢数为 6.27×10^9 CFU/mL, 废液 COD 转化率达 70.4%。生物转化后, 转化液的成分含量与转化前相比均有不同程度的下降。经 4 种毒性试验检测表明, 未发现转化液的生物致病性。【结论】APMP 棉秆制浆废液可为枯草芽孢杆菌的生长和代谢提供必要的营养, 可用于生物转化, 且转化液为无刺激性、无毒性物质。

关键词: APMP 棉秆制浆废液, 枯草芽孢杆菌, 转化液, 生物毒性

中图分类号: X793 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 10-1298-07

化学机械法 (APMP) 棉秆制浆废液中含有多种有机物和无机物, 很多能为微生物所利用^[1]。采用制浆废液培养有益微生物, 将转化液用于土壤的生物修复和农业种植中, 可减少化学农药的用量, 利于植物的病害防治, 且不会使目标病原菌产生抗药性^[2]。枯草芽孢杆菌是一种重要的工业微生物, 能自身合成消化性酶类, 又能够产生耐热、耐旱、抗紫外线的内生芽孢、活性蛋白、细菌素等抗菌物质, 是理想的生防菌^[3], 也是生物膜系统中发现较早的好氧芽孢杆菌属^[4], 对作物有良好的抗病、抑菌效果, 抑制多种病原真菌和病原细菌, 是一种对人畜无害, 无污染的微生物益生菌^[5-6]。Yang 等^[7-8]利用 APMP 棉秆制浆废液发酵生产枯草芽孢杆菌

(*Bacillus subtilis*) SY1, 并将该转化菌液 (含有废液本身的营养成分以及 *Bacillus subtilis* SY1 的活菌体和代谢产物) 应用于盆栽和田间土壤系统中, 证实了对田间作物种植的安全性, 且能促进作物的生长。

枯草芽孢杆菌的发酵培养是大规模生产芽孢杆菌制剂的前提^[9]。利用 APMP 棉秆制浆废液发酵培养枯草芽孢杆菌, 不仅可以扩大培养菌株数量, 还可以将废液中的成分进行转化和利用。因此, 为优化枯草芽孢杆菌生物转化条件及验证枯草芽孢杆菌生物转化液对生产者和其它生物的安全性, 本实验考察了枯草芽孢杆菌在棉秆制浆废液中的适宜发酵条件以及转化液的毒性试验, 为土壤生物修复及安全性提供理论依据。

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAC11B04)

作者简介: 杨宗政 (1974-), 男, 河北易县人, 博士, 教授, 主要研究方向为污水处理及其水资源化利用。Tel: +86-22-60601278; Fax: +86-22-60600300; E-mail: yzz3520@163.com

收稿日期: 2015-01-19; **修回日期:** 2015-04-10

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *Bacillus subtilis* SY1 为实验室保藏菌

种, 是芽孢杆菌属的一种。

1.1.2 原水水质: 化学机械法 (APMP) 棉秆制浆废液: 取自天津某造纸厂棉秆双螺旋机械浆生产线中预浸、挤浆和磨浆工段产生的中间废水。废液主要成分见表 1 所示。

表 1. APMP 棉秆制浆废液主要成分表

Table 1. Component analysis of the APMP cotton stalk pulping waste liquor

Parameters	$c(\text{COD}) /$ (mg/L)	$c(\text{BOD}_5) /$ (mg/L)	$c(\text{PO}_4^{3+}) /$ (mg/L)	$c(\text{K}^+) /$ (mg/L)	$c(\text{TN}) /$ (g/L)	$c(\text{organic nitrogen}) /$ (g/L)	$c(\text{total sugar}) /$ (g/L)
Pulping waste liquor	14600	4110	732.40	433.00	19.37	4.41	79.97

1.1.3 培养基: LB 基本固体培养基, 用于平板涂布计数, 测定活芽孢数。

1.1.4 生物转化装置: 小试反应装置如图 1 所示。反应装置为有机玻璃圆柱体, 内径 8.5 cm, 高 44 cm, 体积为 2 L, 装置中装有 1.5 L 经过厌氧处理后的废液。反应器内装有填料, 采用鼓风曝气, 转子流量计调节曝气量。反应器中设有温度控制器, 保持温度在 25–35 °C, 间歇式运行, 采用蠕动泵出水。

13553 mg/L, BOD 为 8350 mg/L, B/C = 0.62。将枯草芽孢杆菌以 0.8 g/L 的接种量接入厌氧处理过的棉秆制浆废液中, pH 7.0, 温度 30 °C, 曝气量 16 L/h, 反应器内加入填料, 装填度为 30%, 生化反应时间为 30 h, 即得棉秆制浆废液转化液 (以下简称转化液)。

1.3 活芽孢数的测定

经水浴加热后稀释, 移取 0.1 mL 至 LB 固体培养基中进行均匀涂布, 恒温培养 48 h 后计算菌落数^[7]。每次实验重复 3 次, 取平均值。

1.4 生物转化前后废液中成分的测定

废液 COD 的测定采用重铬酸钾法^[10]; 废液 BOD₅ 选用仪器 CY-II 差压式直读 BOD₅ 测定仪进行测定^[11]; pH 值采用精密 pH 计进行测定; 总氮采用紫外分光光度法测定; 氨氮采用纳氏试剂分光光度法; 总磷采用钼锑抗分光光度法测定; 总糖、还原糖的测定采用费林试剂热滴定法^[12]。

1.5 APMP 棉秆制浆废液生物转化条件的优化

将菌种以 0.8 g/L 接种量接种于 pH 值为 7.0, 且经厌氧处理后灭菌的废液中, 在温度为 30 °C、曝气量为 16 L/h 的条件下, 进行培养。每 10 h 取样后, 用平板涂布计数转化后废液中的菌数。绘制枯草芽孢杆菌的生长曲线。

实验选择初始 pH 值、温度、曝气量和填料等因素进行单因素实验。由细菌生长机理来看, 选择 pH 水平分别为 6.0、7.0、8.0 和 9.0 作为反应条件; 温度选择 20、25、30 和 35 °C 作为转化条件; 曝气量与反应器中溶解氧含量相关, 选择 8、12、16、20 和 24 L/h 作为反应条件, 相同条件下未加填料和加填料作为反应条件。转化液菌数在 30 h 时进行测定。

1.6 APMP 棉秆废液转化液的安全性检测

按照 HJ/T154-2004 《新化学物质危害评估导则》中急性经口毒性试验、急性经皮毒性试验、急性

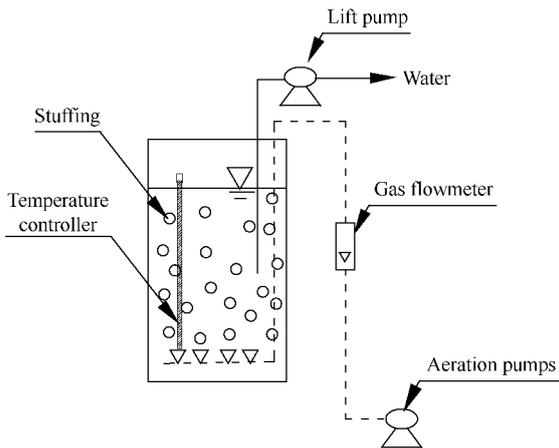


图 1. 小试反应器

Figure 1. The experimental equipment.

1.1.5 反应器填料: 实验填料采用柱状填料, 直径 25 mm, 比表面积为 155 m²/m³, 孔隙率为 0.87, 堆积个数 53500/m³, 堆积重量 86.5 kg/m³, 填料投加比例为 30%, 在反应器中随水流成流动状态。

1.1.6 试验动物: SPF 级 Wistar 种大鼠和普通级大耳白兔, 为天津市疾病预防控制中心提供的合格动物。38 只 Wistar 种大鼠雌雄各半, 8 只大耳白兔雌雄各半。

1.2 棉秆制浆废液转化液的制备

棉秆制浆废液经厌氧处理后, 废液 COD 为

眼刺激试验、急性皮肤刺激试验的有关要求进行试验^[13]。

2 结果和讨论

2.1 APMP 棉秆制浆废液生物转化条件的优化

2.1.1 枯草芽孢杆菌的生长曲线: 枯草芽孢杆菌和其他细菌一样,其生长曲线可以分为迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期,在 APMP 制浆废液生物转化条件下,枯草芽孢杆菌的生长曲线(图 2)。

从图 2 可以看出,0-10 h 为迟缓期,10-30 h 枯草芽孢杆菌菌数成对数增长,属于细菌生长曲线的对数期,当生物转化时间为 30 h 时,废液中菌浓度最大,达到 5.57×10^9 CFU/mL,表明了该废液适于枯草芽孢杆菌的生长^[14]。而图中并未出现稳定期,其原因可能为取样时间间隔太长,在 30-40 h 期间达到稳定期后没有得到显示。40 h 以后菌数明显下降,主要是由于废液中营养物质被分解利用而不断减少,新生细菌没有足够的营养进行生长繁殖,符合了微生物生长曲线的衰亡期。因此,实验采用培养时间为 30 h,此时枯草芽孢杆菌进入对数生长期,既可保持高的细胞活力,又可获得较大的细胞量。

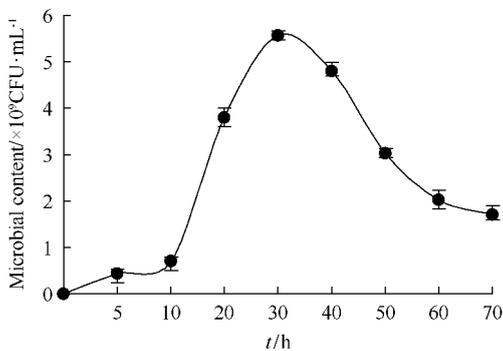


图 2. 枯草芽孢杆菌的生长曲线

Figure 2. The growth curve of the *Bacillus subtilis* SY1.

2.1.2 温度的确定: 温度主要是通过改变酶反应速率来影响菌体的生长,反应器温度过低或过高均会影响菌株的生长^[15]。在初始 pH7.0,温度 30 °C,曝气量 16 L/h,接种量 0.8 g/L,不同温度条件下的废液转化情况见图 3-A。

由图 3-A 表明,当温度为 20 °C 时,菌体生长受到明显抑制,活芽孢数最低,可见低温并不利于菌体在制浆废液中的生长繁殖。温度对菌体生长有较大影

响,30 °C 时发酵液中活芽孢数及 COD 去除率都优于其他温度,活芽孢数量达到 5.57×10^9 CFU/mL, COD 去除率为 59.2%。因此,确定培养枯草芽孢杆菌较适宜的培养基温度为 30 °C。

2.1.3 初始 pH 值的确定: 环境的酸碱度对微生物的生命活动有很大的影响,不同的细菌最适 pH 值不同^[16]。由于生物转化过程中的 pH 难以控制,只能控制转化液的初始 pH^[15]。在温度 30 °C,曝气量 16 L/h,接种量 0.8 g/L,不同 pH 值条件下,实验反应 30 h 后测定活芽孢数和 COD 去除率,实验结果见图 3-B。

在初始 pH 值为 6.0 时,活芽孢数为 3.87×10^9 CFU/mL, COD 去除率低于 30%,而随着 pH 的升高,活芽孢数和 COD 去除率均有明显增加。在 pH 值为 7.0 时,发酵液中活芽孢数达到最多,且此时的 COD 去除率最高。当 pH 值为 8.0 时,菌体生长受到抑制,活芽孢数量及 COD 去除率同时出现下降。因此,确定培养枯草芽孢杆菌较适宜的培养基初始 pH 值为 7.0。

2.1.4 曝气量的确定: 枯草芽孢杆菌属于好氧微生物,曝气不仅可以为微生物提供溶解氧还可以提高氧的传质速率^[17],增加菌体与废水的接触面积^[18]。在初始 pH7.0,温度 30 °C,接种量 0.8 g/L,不同曝气量条件下活芽孢数和 COD 去除率,结果如图 3-C 所示。

利用溶氧仪测量曝气为 8、12、16、20、24 L/h 时,反应器内的溶解氧的量分别为 1.9、2.3、6.5、6.7、6.7 mg/L。由图 3-C 可知,当曝气量为 16 L/h 时,活芽孢数和 COD 去除率均最高,因此,此时反应器中的溶解氧已经达到饱和,为枯草芽孢杆菌的生长繁殖提供了充足的氧气。通过对以上 5 个曝气量的分析,发现在一定的曝气量范围内,曝气量越大,越利于 COD 的降解和枯草芽孢杆菌的生长,但是由于曝气量加大容易使废液发泡,废液蒸发量也会增加,过大的曝气量不利于菌株的生长,甚至会产生毒害作用,且曝气能量消耗增加,综合考虑,选择曝气量为 16 L/h 的条件较为合适。

2.1.5 反应器内填料的添加对生物转化效果的影响: 反应器中添加载体,富集培养生物膜,可增加污水与微生物的接触面积提高生物转化效率,对废水中的 COD、氨氮、磷酸盐等具有一定的去除效果^[19]。

由图 3-D 可以看出,当反应器中有填料存在时,

有助于促进废液的生物转化, 细菌生长到对数时期, COD 的去除率可达 70.4%, 比未加填料提高了 16.2%, 添加填料后转化液中的菌数比未加填料的

转化液增多 12.57%。说明反应器中加入填料可以使细菌在填料上附着, 增加细菌在废液中的停留时间, 有利于枯草芽孢杆菌的生长和 COD 的去除^[14]。

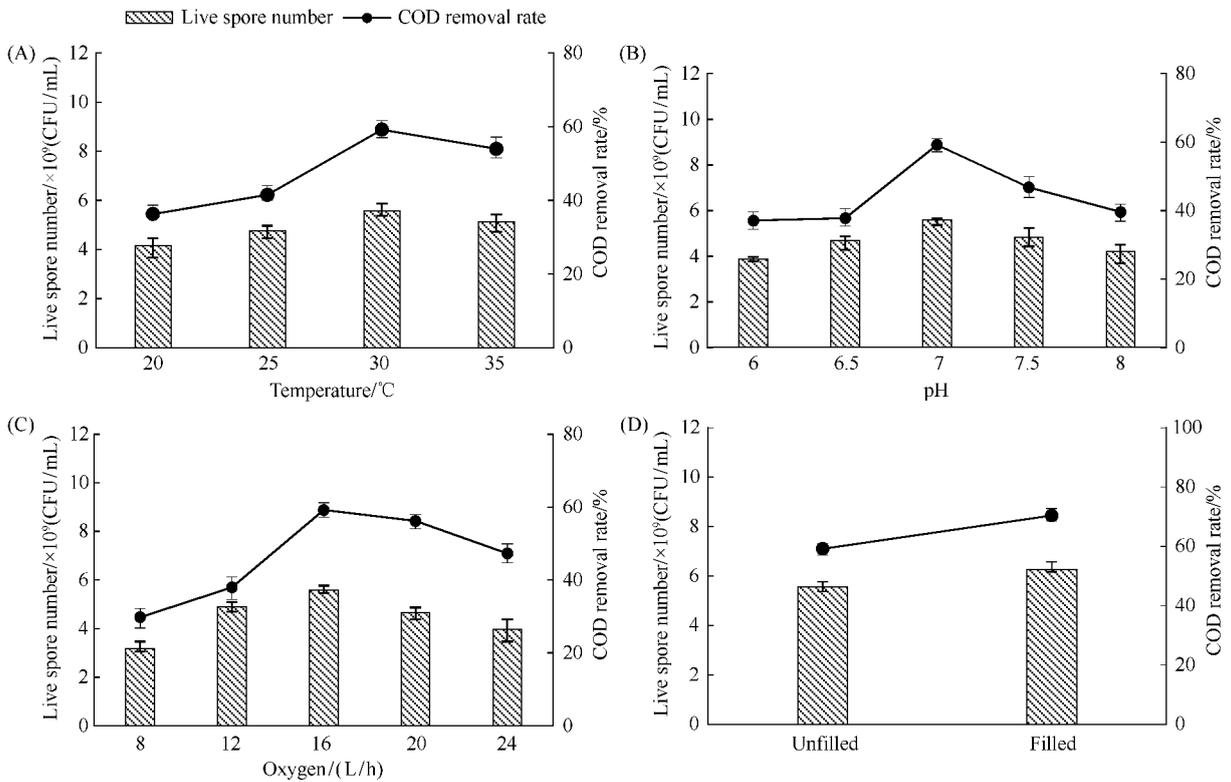


图 3. 不同的温度 (A)、初始 pH 值 (B)、曝气量 (C) 和填料 (D) 对发酵液中活芽孢数和 COD 去除率的影响

Figure 3. Effects of different temperatures (A), initial pH values (B), oxygen (C), stuffing (D) on viable spore number and COD removal rate in the fermentation liquid.

2.1.6 生物转化前后 APMP 棉秆制浆废液成分对比: 在最佳生物转化条件下, 利用棉秆制浆废液转化枯草芽孢杆菌后, 原液和转化液经离心后, 上清液的成分分析结果如表 2 所示, APMP 棉秆制浆废液转化枯草芽孢杆菌后, 转化液的成分与转化前

相比均有不同程度的降低, 说明在生物转化过程中枯草芽孢杆菌消耗了大量的有机物, 其中, 该菌株对总糖中的还原糖利用率较高, 同时废液中含有一定量的磷和氮, 为该菌株的生长和代谢提供了必要的营养^[20]。

表 2. 制浆废液转化前后成分分析对比

Table 2. Component analysis of treated and untreated pulp effluent by the *Bacillus subtilis*

Parameters	$c(\text{COD}) /$ (mg/L)	$c(\text{BOD}_5) /$ (mg/L)	$c(\text{TP}) /$ (mg/L)	$c(\text{TN}) /$ (g/L)	$c(\text{NH}_3\text{-N}) /$ (g/L)	$c(\text{total sugar}) /$ (g/L)	$c(\text{reducing sugar}) /$ (g/L)
Untreated	13553	8350	645.20	15.20	0.92	70.20	58.03
Treated	4015	3550	580.30	12.14	0.74	50.04	30.12
Utilization ratio/%	70.37	57.48	10.01	20.13	19.57	28.00	48.00

2.2 APMP 棉秆制浆废液生物转化液的安全性

枯草芽孢杆菌转化后的 APMP 棉秆制浆废液, 因含有大量具有生物防治功能和促生作用的枯草芽孢杆菌, 因此可以用于修复病害微生物污染土壤, 为研究转化液的安全性, 开展了一系列急性动物实验。

2.2.1 急性经口毒性实验: 按 HJ/T154-2004 《新化学物质危害评估导则》对 28 只, 雌雄各半的 SPF 级 Wistar 种大鼠做急性经口毒性实验, 染毒后至少每日观察 1 次, 连续观察 14 d, 记录观察期内动物中毒症状、死亡状况、体重, 对死亡动物进行尸体解剖。

表 3 为急性经口毒性实验对大鼠体重的影响。

以 10.5 g/kg·(BW) 受试物经口染毒后, 动物未见明显中毒症状, 观察期间内无死亡。表 3 可见, 动物体重呈增长趋势, 尸检中各主要器官未见明显异常。病理检查结果发现, 染毒组及对照组动物病理检查均未见明显异常。

表 3. 经口染毒对大鼠体重影响(g, 均值 ± 标准差)

Table 3. The influence of the animal effect by the transformation liquid (g, average ± error)

Groups	Sex	Initial weight	7 th d	14 th d
Test groups	male	194.8 ± 4.5	236.7 ± 10.2	257.3 ± 13.0
	female	186.0 ± 3.6	215.4 ± 7.9	233.5 ± 8.6
Control groups	male	194.7 ± 5.8	231.8 ± 10.7	258.2 ± 12.2
	female	185.5 ± 3.2	214.4 ± 11.8	233.8 ± 13.4

于染毒后第 1、7、14、21 天收集动物粪便, 同时采集血液, 剖解动物的心, 肝, 肺, 肾, 脑, 睾丸 (卵巢), 提取组织样品 DNA 后进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳实验。

由电泳结果可以得出, 样品已成功扩出, 通过与 DL2000 Marker 对比, 其片段大小为 100 bp 左右, PCR 扩增效果良好。而在粪便的 PCR 扩增产物中除 DNA 扩增片段外, 多了一条与菌液扩增物一致的条带, 且该条带比较明显, 说明经口染毒后大鼠体内含有受试物, 经粪便排放出现在粪便中, 在心、肝、脾等其它器官中并未显示有受试物扩增条带的出现。经口染毒第 7、14、21 天后粪便中受试物扩增条带消失, 表明粪便中受试物被清除至检验水平之下, 大鼠体内基本无菌液的残留, 且心、肝、脾、肾、脑、睾丸 (卵巢) 及血液等器官中也未出现明显条带, 说明染毒后大鼠未受到菌液毒性的影响。

实验结果表明, 染毒组及对照组动物病例检查均未见明显异常, 以 10.5 g/kg·(BW) 受试物经口染毒后, 动物未见明显中毒症状, 观察期内无死亡。动物体重呈增长趋势, 尸检中各主要脏器未见明显异常, $LD_{50} \geq 10.5$ g/kg·(BW)。

2.2.2 急性经皮毒性实验、急性眼刺激实验和急性皮肤刺激实验: 经 HJ/T154-2004《新化学物质危害评估导则》对普通级大耳白兔做急性经皮毒性、急性眼刺激和急性皮肤刺激实验, 观察记录受试动物的中毒症状、死亡数、眼睑刺激反应和皮肤刺激反应。结果表明, 涂抹受试物后皮肤没有出现明显感染状况, 观察期内无实验动物死亡。经皮 $LD_{50} \geq$

2500 mg/kg 体重; 眼刺激实验结果为 1-2 级; 生物转化液皮肤刺激试验分值 < 0.5。

综上所述, 经急性经口毒性、急性经皮毒性、急性眼刺激和急性皮肤刺激四种实验, 根据《新化学物质危害评估导则》HJ/T154-2004 分级标准表明, 该生物转化液为无刺激性、无毒性物质。

3 结论

棉秆制浆废液中含有木质素、纤维素、蛋白质等多种营养成分, 经处理后有利于微生物的生长, 对枯草芽孢杆菌在 APMP 棉秆制浆废液厌氧处理后废液中的适宜发酵条件及转化液的安全性进行了考察。结果表明, 厌氧处理后棉秆 APMP 制浆废液培养枯草芽孢杆菌的最适条件为: 初始 pH7.0, 温度 30 °C, 曝气量 16 L/h, 接种量 0.8 g/L, 反应器内加入填料; 在此培养条件下菌株的活芽孢数为 6.27×10^9 CFU/mL, 废液 COD 转化率达 70.4%。生物转化结束后, 转化液的成分含量与转化前相比均有不同程度的下降, 说明棉秆 APMP 制浆废液可为枯草芽孢杆菌的生长和代谢提供必要的营养。经过四种毒性试验结果表明, 该生物转化液未发现生物致病性, 因此, 可以被应用于农田土壤修复和蔬菜种植中的蔬菜促生, 而不会给自然环境和人类带来副作用。

参考文献

- [1] Qiu J, Pang JZ, Liu Z, Yang ZZ. Effects of bioconversion broth of cotton stalk pulping waste liquor on seed germination and seedling growth of eggplant. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38 (6): 2858-2860. (in Chinese)
邱瑾, 庞金钊, 刘忠, 杨宗政. 棉秆制浆废液生物转化液对茄子种子萌发和幼苗生长的影响. *安徽农业科学*, 2010, 38 (6): 2858-2860.
- [2] Yu GH, Cheng P, Wang YL, Chen YF, Chen YH, Li YJ. Control effect of *Bacillus subtilis* strain TR21 on panama disease of banana Brazil (*Musa spp.*) in fields. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 26 (4): 497-500. (in Chinese)
喻国辉, 程萍, 王燕鹂, 陈远凤, 陈燕红, 黎永坚. 枯草芽孢杆菌 TR21 田间防治巴西蕉枯萎病的效果. *中国生物防治*, 2010, 26 (4): 497-500.
- [3] Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial

- bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101 (1): 1-8.
- [4] Liang RG, Zhu YQ. The treatment of waste water from pulping and papermaking by microbiological technology. *Shanghai Paper Making*, 2006, 37 (4): 60-64. (in Chinese)
梁荣国, 朱勇强. 好氧微生物与厌氧微生物处理制浆造纸废水. 上海造纸, 2006, 37 (4): 60-64.
- [5] Li ZF, Lin CQ, Zhang H, Li Y, Lin XJ, Chen JC. Analysis of antimicrobial activity and extracellular metabolites of *Bacillus subtilis* strain CS16. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, 34 (6): 1155-1160. (in Chinese)
李占飞, 林陈强, 张慧, 李昱, 林新坚, 陈济琛. 枯草芽孢杆菌 CS16 抑菌活性与胞外产物成分分析. 热带作物学报, 2013, 34 (6): 1155-1160.
- [6] Seydlová G, Fišer R, Cabala R, Kozlík P, Svobodová J, Pátek M. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2013, 1828 (11): 2370-2378.
- [7] Yang ZZ, Liu X, Liu Z, Pang JZ, Qiu J, Yang WW. Effect of *Bacillus subtilis* SY1 on antifungal activity and plant growth. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2009, 2 (4): 55-61.
- [8] Liu X, Pang JZ, Yang ZZ. The effect of *Bacillus subtilis* SY1 and *Pseudomonas fluorescens* W1 in the ecological remediation of the soil. *Journal of Sustainable Development*, 2009, 2 (2): 90-94.
- [9] Hao LH, Sun PX, Jiang ZB, Chen KS, Niu DQ. Liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis*. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2006, 24 (4): 380-385.
郝林华, 孙丕喜, 姜振波, 陈靠山, 牛德庆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 液体发酵条件. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2006, 24 (4): 380-385.
- [10] 魏复盛. 水和废水监测分析方法. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 210-213.
- [11] 但德忠. 环境监测. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 34-44.
- [12] 天津轻工业学院. 工业发酵分析. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 8-12.
- [13] 国家环境保护总局. 新化学物质危害评估导则. 北京: 中国环境科学出版社, 2004: 3-7.
- [14] 陈剑虹. 环境工程微生物学. 第2版. 武汉: 武汉理工大学出版社, 2009: 56-58.
- [15] Liu HL, Li YY, Ju RC, Zhao HT, Yang Q. Isolation, identification and fermentation optimization of antagonistic *Bacillus subtilis* KC-5. *China Biotechnology*, 2014, 34 (3): 96-102. (in Chinese)
柳慧丽, 李园园, 鞠瑞成, 赵宏涛, 杨清. 拮抗枯草芽孢杆菌 KC-5 的分离鉴定及其发酵优化. 中国生物工程杂志, 2014, 34 (3): 96-102.
- [16] Yao CP, Wang HY, Yang F, Lin L, Wang L. Optimization of liquid culture conditions for *Bacillus subtilis* and analysis of its metabolites. *Liquor-Making Science & Technology*, 2010, (8): 43-45. (in Chinese)
姚翠萍, 王和玉, 杨帆, 林琳, 王莉. 枯草芽孢杆菌液态培养条件优化及其代谢产物分析. 酿酒科技, 2010, (8): 43-45.
- [17] Sun YP, Zhou XL. Study on enhancing the efficiency of bioreactor by enriched oxygen aeration. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2 (8): 1069-1073. (in Chinese)
孙余凭, 周小玲. 膜法富氧曝气提高生物反应器效能的研究. 环境工程学报, 2008, 2 (8): 1069-1073.
- [18] Weng LF, Zhao ML, Xia W, Sun YQ, Shen L. Application of elastic filler and suspended ball-filler in biological pretreatment project. *Water & Wastewater Engineering*, 2011, 37 (7): 22-24. (in Chinese)
翁利丰, 赵明雷, 夏玮, 孙月奇, 沈亮. 弹性填料和悬浮球填料在生物预处理工程中的应用. 给水排水, 2011, 37 (7): 22-24.
- [19] Fraser DS, O'Halloran K, van den Heuvel MR. Toxicity of pulp and paper solid organic waste constituents to soil organisms. *Chemosphere*, 2009, 74 (5): 660-668.
- [20] Yang WY, Pang JZ, Yang ZZ, Liu X. Effects of poplar APMP wastewater and its fermented liquor on seed germination and seedling growth of Chinese cabbages. *China Pulp & Paper*, 2009, 28 (2): 40-43. (in Chinese)
杨文艳, 庞金钊, 杨宗政, 刘欣. 杨木 APMP 废液及转化液对白菜种子萌发和幼苗生长的影响. 中国造纸, 2009, 28 (2): 40-43.

Biotransformation and safety of cotton stalk alkaline peroxide mechanical pulping waste liquor

Zongzheng Yang^{1*}, Mingyue Wang², Liquan Ning², Jie Zhang², Jingguo Cao¹

¹College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

²College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] We studied the conditions of culturing *Bacillus subtilis* SY1 to treat cotton stalk alkaline peroxide mechanical pulping waste water, and evaluated afterwards the safety of its release to plants and animals. [Methods] The culture conditions were optimized through single factor tests, including temperature, initial pH, oxygen, and inoculation size. We used rats and big ear rabbits to test the safety of treated waste water. [Results] The optimal condition was as follows: initial pH 7.0, hydraulic retention time 30 h, temperature 30 °C, filling rate of aeration 16 L/h, the dosage of *Bacillus subtilis* SY1 0.8 g a liter water, and the stuffing volume accounting for 30% of the effective volume of the reactor. Under these culture conditions, the live spore number of *Bacillus subtilis* SY1 reached 6.27×10^9 CFU/mL. The removal rate of COD reached 70.4%. Results of the acute dermal toxicity test, dermal irritation test, eye irritation test and skin sensitization test after treated by the fermentation showed no clinical signs or changes conditions, and no deaths during the test period of 21 days. Animal body weight had a tendency to increase and had no abnormalities in the major organs, the Lethal Dose 50 (Abbreviated LD_{50}) values was equal or greater than 10.5 g/(kg body weight) in acute dermal toxicity experiments. LD_{50} values were equal or greater than 2500 mg/(kg body weight) in dermal irritation experiments. No rabbits exhibited chemosis eye at any time during the test period. The results of skin sensitization test showed no erythema or edema. The skin sensitization value was less than 0.5. [Conclusion] Pulping waste water of APMP cotton stalk fermented by *Bacillus subtilis* SY1 had reduced COD and no obvious toxicity to animals.

Keywords: APMP cotton stalk pulping waste water, *Bacillus subtilis*, biotransformation, biotoxicity

(本文责编:李磊)

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (2011BAC11B04)

* Corresponding author. Tel: +86-22-60601278; Fax: +86-22-60600300; E-mail: yzz3520@163.com

Received: 19 January 2015/Revised: 10 April 2015