

# 利用不同分子量的生物性聚電解質提高 污泥沉降速率之相關研究

毛禹蓁\*、盧文洋\*\*、蘇晨瑄\*\*、黃端文\*\*、施文益\*\*\*、吳建一\*\*\*\*

## 摘 要

一般曝氣池中之活性污泥會因沉降性及壓縮性不佳而導致沉澱池中污泥沉降緩慢或完全不沉降。在此情況下，放流水中含有大量之懸浮物體，常導致放流水不符合排放標準。因此，本研究擬探討各種因子對新型生物聚電解質 polyglutamic acid(簡稱PGA)提高活性污泥沉降速率之影響。實驗結果顯示，pH 7的條件下，當活性污泥SV<sub>30</sub>介於900~950 mL/L，藉由添加*Bacillus subtilis* DYU1所生產的PGA (0.1 g/L)(分子量約1,300 kDa)以及多元氯化鋁(0.05 g/L)，經過5分鐘之後其活性污泥絮凝率約為94%，而經過30分鐘之後，污泥之SV<sub>30</sub>降至90-100 mL/L。實驗結果亦顯示PGA絮凝能力會隨金屬離子的價數增加而增加，其中Al<sup>3+</sup>與Fe<sup>3+</sup>分別添加0.75mM與1mM有最佳的絮凝率，分別達96%以及94%。另外，本研究亦證實生物性聚電解質PGA與污泥之絮凝機制，與活性污泥之界達電位以及PGA之結構中之carboxyl groups官能基有關係。

【關鍵詞】生物絮凝劑、polyglutamic acid、活性污泥、污泥容積指標(SVI)

---

\*大葉大學生物產業科技學系 研究所

\*\*大葉大學生物產業科技學系 大學部

\*\*\*中華醫事科技大學食品營養學系 講師

\*\*\*\*大葉大學生物產業科技學系 副教授

## 一、前 言

一般曝氣池中之活性污泥會因沉降性及壓縮性不佳而導致沉澱池中污泥沉降緩慢或完全不沉降。在此情況下，放流水中含有大量之懸浮物體，常導致放流水不符合排放標準。對於活性污泥膨化之處置對策，基本上可分為緊急、平時及常久性三種。在緊急之處置對策方面，又可分(1)添加化學氧化劑直接抑制污泥中絲狀菌之生長；(2)加入絮凝(助凝)劑於曝氣池與沉澱池間，以改善污泥在沉澱池之沉降性；以及(3)增大污泥迴流(及廢棄)量。而本研究主要開發生物性絮凝劑以取代有機合成高分子助凝劑。天然絮凝劑及生物性絮凝劑大都為生物活性物質及生物可分解性高分子，在環境中易被降解且其分解產物對生態環境不會產生公害問題，因此，不但可以解決污泥膨化現象，亦沒有無機和有機合成絮凝劑對環境污染與安全方面的問題。

目前一般將絮凝劑分為三類：(1)無機絮凝劑：aluminium sulfate 和 polyaluminium chloride (PAC) [Pinotti and Zaritzky, 2001]；(2)有機合成高分子絮凝劑：polyacrylamide 衍生物、polyacrylic acid 和 polyethylene imine [Mpofu., *et al.*, 2004]；(3)天然有機生物高分子聚合物絮凝劑：chitosan、alginate 和 microbial flocculants [Divakaran, R. and Pillai, 2001；Divakaran, R. and Pillai, 2002]。這些絮凝劑已廣泛應用於廢水處理和一些工業的下游製程工業 [Kurane *et al.*, 1986]。在這些絮凝劑之中，因為有機合成聚合絮凝劑的價格便宜且具有高效能，因此為最常使用。然而，使用有機合成聚合絮凝劑會增加環境和健康的問題，其中有一些不易被生物所分解，另外有一些會降解成單體，如丙烯，具神經毒且對人類有很強的致癌性 [Vanhorick and Moens, 1983；Dearfield and Abermathy, 1988]。如此，急迫需要發展一種生物可分解性且無害之絮凝劑，以減少對環境和健康的危害。近年來，許多從不同微生物生產之生物絮凝劑的研究指出，其特性類似蛋白質 [Kurane *et al.*, 1986；Takeda *et al.*, 1992]、多醣 [[Kurane *et al.*, 1986；Kurane and Nohata, 1994；Yokoi *et al.*, 1996]和醣蛋白 (glycoprotein) [Lee *et al.*, 1995]。

由於生物聚合物具有生物可分解性和其降解物對環境與人類無害。於是天然絮凝劑及微生物絮凝劑漸漸受重視，尤其是微生物絮凝劑，大都為生物活性物質及生物可分解性高分子，在環境中易被生物降解且其分解產物對生態環境不會產生公害問題。因此，微生物絮凝劑可以解決無機和有機絮凝劑在使用上對環境污染與安全方面的問題[宮等人，2001]，再加上

微生物絮凝劑不但可以利用微生物技術大量發酵培養生產，且其從發酵培養基中分離純化之技術亦相當簡單。許多研究學者預期利用微生物來生產生物絮凝劑具有相當大的開發前景。因此，本研究擬將利用實驗室先前所篩選之本土性菌株 *Bacillus subtilis* DYU1 所生產生物絮凝劑，並探討應用在提高活性污泥沉降速率的可行性。

## 二、材料與方法

### 1. 生物絮凝劑生產純化

本實驗利用自行篩選之「需 glutamic acid 之 PGA 生產菌株」 *B. subtilis* DYU1 作為生物絮凝劑之生產菌株。接種 2 mL 之甘油保菌至含有 100 mL TSB(Trypticase Soy Broth)培養基之 250 mL 的三角錐形瓶中，於 37°C，150 rpm 下震盪培養 24 小時進行活化。接著，將 30 mL 活化後的菌液接種於含有 300 mL 化合培養基之 500 mL 溝槽三角錐形瓶中，於初始 pH 8.0、37 °C 條件下，在 150 rpm 的培養箱中培養 96 小時，進行 PGA 的生產。透過離心方式去除發酵液中的菌體，取上清液與乙醇混合並收集沉澱物 [Goto and Kunioka, 1992]。收集沉澱物並以蒸餾水復溶，利用透析膜(三光純藥株式會社，日本)進行透析 48 小時，接著將透析後產物凍乾可得純化之生物絮凝劑。

### 2. 生物絮凝劑的鑑定

#### (1) 傅立葉轉換紅外線光譜儀分析

先將冷凍乾燥後之樣品粉末與烘乾後 KBr 壓成粉末並以 1:99 的比例混合，壓錠成圓盤狀。以傅立葉轉換紅外線光譜儀分析(廠牌: PERKIN ELMER，型號: PARAGON 500)，掃描的範圍是由 400~4000  $\text{cm}^{-1}$  進行分析，將樣品所得結果扣除背景測試的影響，繪製成圖譜，藉由分析圖譜中波峰出現位置，確定生物絮凝劑中的官能基。

#### (2) 氨基酸分析

將純化之產物進行酸水解，取出乾燥後，進行 derivatization reagent 處理 20 min，接著再進行乾燥，將乾燥後之樣品復溶後，使用裝置有 Waters PICO-TAG Amino Acid Analysis System 之 HPLC 進行分析。

#### (3) 核磁共振(NMR)分析

以分子量 14,000 之透析膜透析純化後之  $\gamma$ -PGA 溶液經過冷凍乾燥，取適當乾燥之  $\gamma$ -PGA 樣品，再以  $\text{D}_2\text{O}$  復溶，利用核磁共振儀分

析純化後之  $\gamma$ -PGA 產物，以  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  之標定分析，以得知產物之化學官能基之分佈(此部分委託中興大學貴重儀器中心進行分析)。

### 3. 絮凝活性及絮凝率的測量

在室溫下加入 4.65 mL 的 1 g/L 污泥懸浮液於試管中，隨後添加 0.25 mL polyaluminum chloride(PAC)，使用 Vortex mixer 混合 30 秒並靜置 5 分鐘後吸取上清液並測量其吸光值；接著加入已配製好的生物絮凝劑溶液(*B. subtilis* DYU1 於化學合成培養基或糖蜜基礎培養基所生產)，混合 30 秒並靜置 5 分鐘後吸取上清液測量吸光值( $\text{OD}_{660}$ )，並觀察其絮凝現象。絮凝率利用 Eq.(1)加以計算：

$$\text{Flocculating activity} = \frac{1}{\text{OD}_{660}} - \frac{1}{\text{OD}_{660,\text{blank}}} \quad (1)$$

$$\text{Flocculating rate}(\%) = \frac{\text{OD}_{660,\text{blank}} - \text{OD}_{660}}{\text{OD}_{660,\text{blank}}} \times 100 \quad (2)$$

### 4. 影響絮凝效果之條件因子

本實驗將探討反應時間、pH值、助凝劑(PAC)濃度、絮凝劑濃度對於絮凝效果的影響。在預定條件為不控制pH、PAC(濃度為0.05 g/L)及PGA(濃度為0.2 g/L)下，探討pH值，先利用1N HCl與1N NaOH將污泥溶液( $\text{OD}_{660}=0.8$ )的pH值調整至3.0到10.0，並找出最適pH值條件並接而探討助凝劑(PAC)濃度對於絮凝劑活性的影響。於污泥溶液中添加各種濃度的PAC作為助凝劑，其中PAC濃度為(0.01-0.5 g/L)，依上述方式進行絮凝活性及絮凝率的測量，確定最適助凝劑濃度。綜合上述的最佳絮凝條件，確定最適反應時間、pH及助凝劑濃度後，最後將探討絮凝劑濃度對於絮凝效果的影響，添加不同濃度的生物絮凝劑(0.01-0.5 g/L)溶液至污泥溶液進行絮凝實驗。另外，探討不同價數的金屬離子對絮凝效果的影響。上述絮凝實驗皆使用Eqs. (1 & 2)計算絮凝率與絮凝活性。

## 三、結果與討論

### 1. 生物絮凝劑的鑑定

利用冷凍乾燥法將各種純化方式回收的 $\gamma$ -PGA製成粉末，接著以FT-IR進行分析確定其官能基，分析結果如圖 1所示。觀察各種純化方

式的圖譜可以發現，主要波峰出現的位置大致上相同，而在FT-IR圖譜的波峰分布中，主要波峰分別出現在 $1,400\text{ cm}^{-1}$  [屬於羧基( $\text{COO}^-$ )官能基]、 $1,680\text{ cm}^{-1}$  [屬於帶有雙鍵之 $\text{C}=\text{O}$ 官能基]、 $1,600\text{ cm}^{-1}$  [屬於隨機型多胜肽之醯胺官能基 I]、 $3,410\text{ cm}^{-1}$  [屬於 $\text{NH}_2$ 官能基]，比較Takashi et al. (2000)所做之研究結果後，可以確定分析圖譜中波峰 $1680\text{ cm}^{-1}$ 處應為carboxylic acid dimmer [Takashi et al., 2000]。外，比較Shiro et al. (2003)的研究結果顯示，圖譜中所觀察到的 $3410\text{ cm}^{-1}$ 波峰應為 $\text{NH}_2$  [Shiro et al., 2003]。另外，醯胺官能基(amide group)會有呈現出成對的波段，而稱之為醯胺A官能基(amide A)和醯胺B官能基(amide B)，此兩官能基分別出現在波數 $3,210\text{ cm}^{-1}$  [屬於醯胺A官能基(amide A)]、 $3,080\text{ cm}^{-1}$  [屬於醯胺B官能基(amide B)]，這可能是由於N-H的共振現象所造成的，通常 $\alpha$ -多胜肽( $\alpha$ -polypeptide)中之醯胺I、醯胺II和醯胺III型之醯胺官能基可以分別於 $1,680\sim 1,630$ 、 $1,570\sim 1,510$ 和 $1,300\sim 1,250\text{ cm}^{-1}$ 的區域範圍中發現[Baranska et al., 1987]。為了更加證實利用各種純化方式所回收之產物為PGA，因此，將純化獲得的產物進行NMR以及將PGA水解後進行胺基酸組成分析，實驗結果均顯示產物為PGA( data not shown )。

## 2. 不同 pH 值對於絮凝效果之影響

以  $1\text{N HCl}$  與  $1\text{N NaOH}$  將活性污泥溶液的 pH 值調至  $3.0\sim 9.0$ ，添加固定濃度的 PAC( $0.05\text{ g/L}$ )及不同分子量的生物性絮凝劑 [味丹 PGA( $300\text{kDa}$ )、 $900\text{kDa}$ )、*B. subtilis* DYU1 生產純化之 PGA( $1,300\text{kDa}$ ) ]，添加濃度為  $0.2\text{ g/L}$ ，探討 pH 值對於絮凝效果之影響。圖 2 (a)-(c)分別為味丹 PGA( $300\text{kDa}$ )、PGA( $900\text{kDa}$ )及 *B. subtilis* DYU1 生產純化之 PGA( $1,300\text{kDa}$ )對活性污泥絮凝能力的差異，結果顯示由 *B. subtilis* DYU1 生產之 PGA( $1,300\text{kDa}$ )與味丹 PGA( $900\text{kDa}$ )在 pH 7 下有最佳的絮凝效果，其絮凝率分別達  $93.6\%$ 與  $83.6\%$ ，而味丹 PGA( $300\text{kDa}$ )則在 pH 9 下之最佳絮凝率為  $60.3\%$ 。pH 值高於或低於 7 或 9 之範圍的絮凝活性與絮凝率則顯得較低。三種不同分子量的 PGA 在偏酸性 pH 值(3-6)的條件下之絮凝效果皆不佳。結果證實混合作用時 pH 值是影響絮凝活性的關鍵因素[Yokoi et al.,1996]。

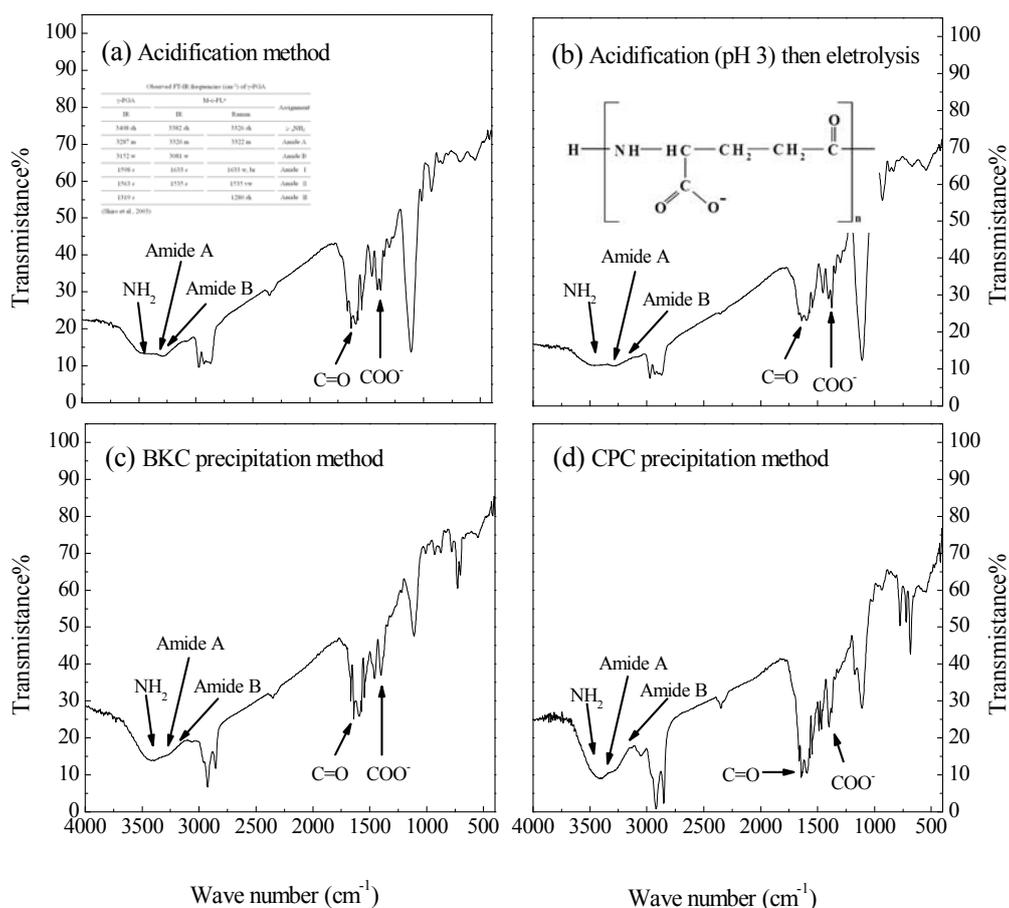
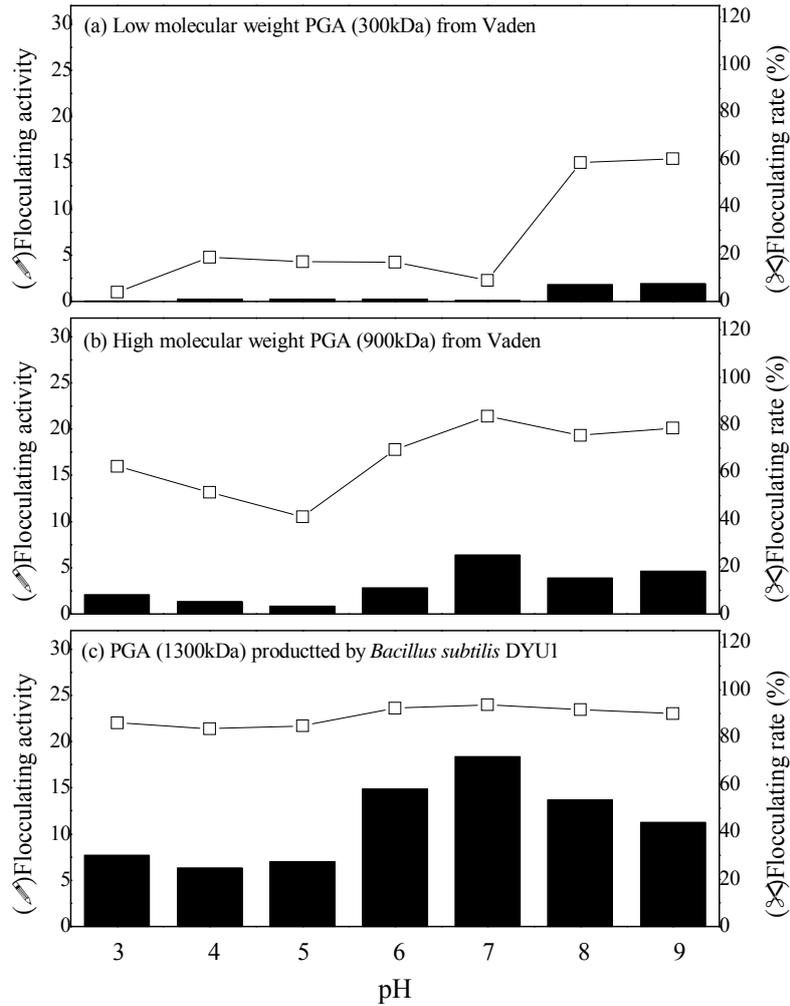


圖 1 Infrared spectra of PGA produced by *B. subtilis* DYU1 purified with various purification method。

另外，生物絮凝劑之分子量大小從數千至數百萬不等，而分子量大小關係到絮凝作用中架橋機制的效果 [Michaels, 1954]。因此，本實驗使用各種分子量的絮凝劑，希望藉此瞭解絮凝劑分子量及絮凝劑添加濃度與絮凝效果之間的關聯性。由圖 2 亦顯示本實驗以 *B. subtilis* DYU1 生產純化之 PGA(1300kDa) 的絮凝活性與絮凝率較味丹 PGA (300kDa) 與味丹 PGA (900kDa) 高，在相同 PGA 添加量條件下，分子量越大其絮凝效果越佳。由此可得知絮凝劑的分子量與絮凝效果的好壞可能有直接的關連性。高分子量的絮凝劑可以促進絮凝劑與活性污泥的懸浮粒子之間的架橋形成，在絮凝反應過程中形成較大的絮凝物 [Suh *et al.*, 1997; Salehizadeh and Shokaosadati, 2001; Deng *et al.*, 2003]。



**圖 2 The effect of pH on flocculating active and flocculating rate of PGA (0.2 g/L) against activated sludge suspension, containing PAC (0.05 g/L).**

### 3. 不同助凝劑聚氯化鋁(PAC)濃度對於絮凝效果之影響

以味丹 PGA (300kDa)、味丹 PGA (900kDa)與 *B. subtilis* DYU1 生產之 PGA(1,300kDa)(添加濃度為 0.2g/L)作為絮凝劑，在個別最適的 pH 值條件下，添加不同濃度的 PAC 作為助凝劑，探討添加不同濃度 PAC(0.01-0.5g/L)對於活性污泥的絮凝活性及絮凝率之影響。由圖 3 中可得知，PAC 添加濃度為 0.05 g/L 時，味丹 PGA(300kDa)、PGA(900kDa) 及 *B. subtilis* DYU1 生產之 PGA(1300kDa)皆可獲得最佳的絮凝活性及絮凝率，其絮凝活性分別為 1.6、4.9 及 11.6，而絮凝率分別為 56.5%、79.6% 及 90.3%。上述結果可了解，PAC 濃度介於 0.01-0.5g/L 時，有最佳的絮凝活性及絮凝率，然而 PAC 濃度過高或過低皆會使得絮凝活性及絮凝率降低。比較助凝劑濃度對絮凝活性的影響可發現，PAC 添加濃度越高，

絮凝活性亦會隨之增加，但 PAC 添加濃度超過 0.2 g/L 時則會抑制絮凝的效果。活性污泥在 pH 3-9 的範圍其相對應之界達電位值為 9.4 至 -13.9mV，證實 pH 值大於 3 時活性污泥懸浮粒子表面帶有負電荷，而可藉由帶正電荷 PAC 離子鍵結在兩者之間形成架橋，當添加絮凝劑 PGA 時會發生絮凝反應產生絮凝物。絮凝劑的分子量夠大，則會有足夠的自由基與懸浮粒子產生絮凝作用並生成較大的絮凝物。

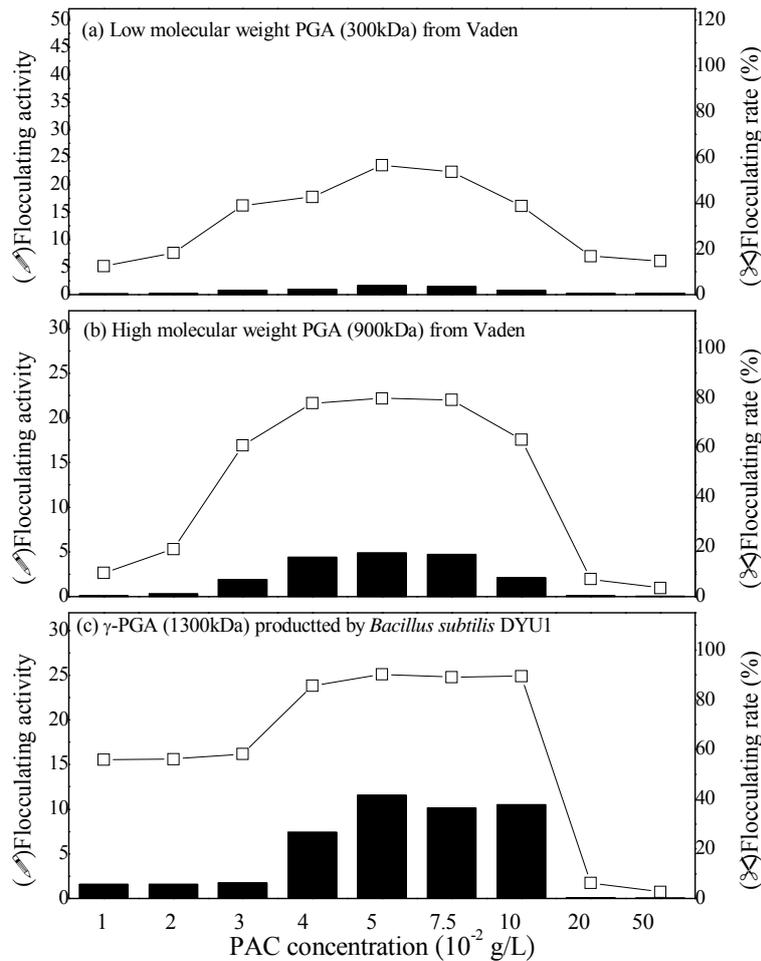


圖 3 The effect of PAC concentration on flocculating activity and flocculating rate of PGA (0.2 g/L) against activated sludge suspension.

#### 4. 不同絮凝劑濃度對於絮凝效果之影響

由圖 4 可明顯看出添加不同濃度的味丹 PGA(900kDa) 及 PGA(300kDa) 其絮凝活性及絮凝率變化差別不明顯。而添加 *B. subtilis* DYU1 生產之 PGA(1300kDa)，在添加濃度為 0.1 g/L 有最佳的絮凝活性(為 19.5)與絮凝率(為 94%)，濃度越高絮凝活性及絮凝率會隨之降低。由上述可得知高分子

量的PGA，因靜電荷相斥，在PGA分子鏈中的carboxyl groups 會使聚合鏈延伸，伸長的可以提供多有效位置以供活性污泥之懸浮粒子附著 [Deng *et al.*, 2003]。

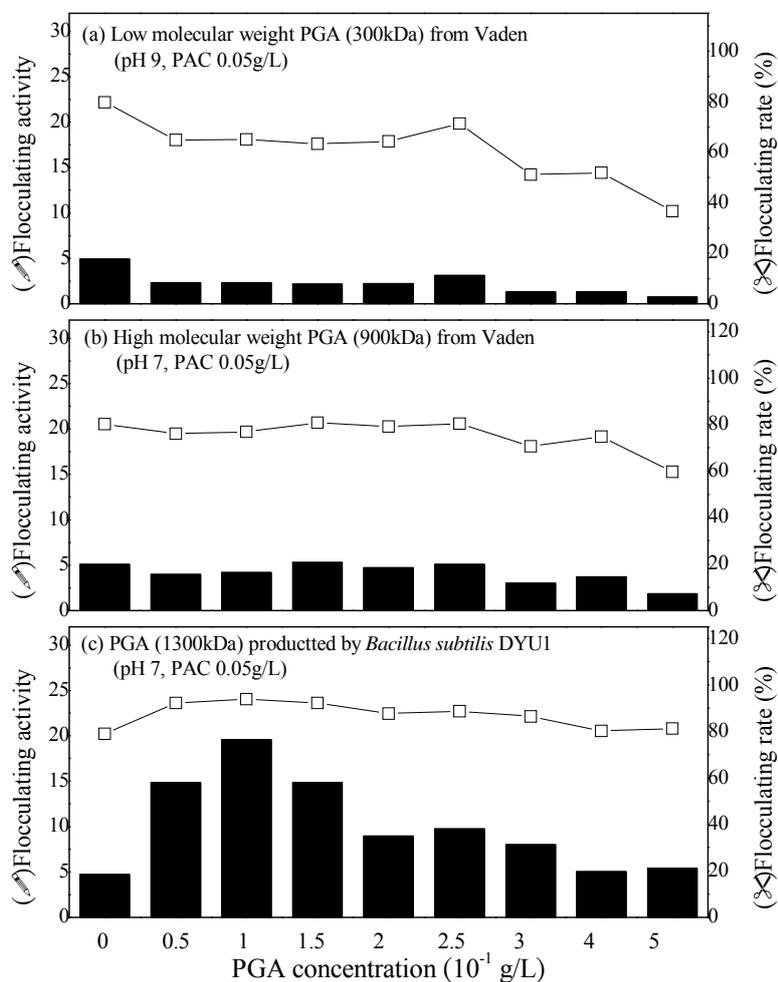
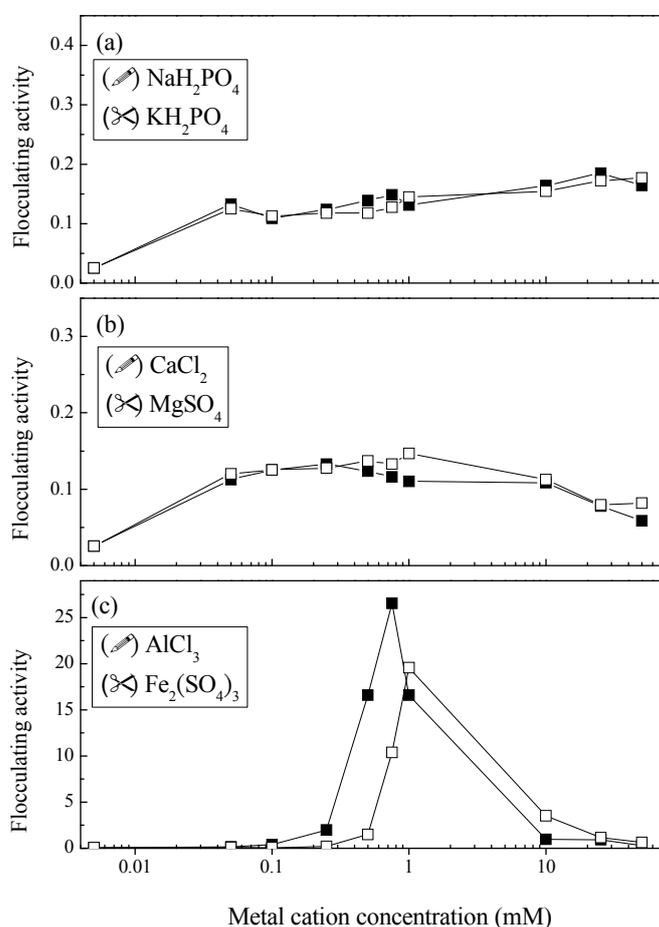


圖4 The effect of PAC concentration on flocculating activity and flocculating rate against activated sludge suspension.

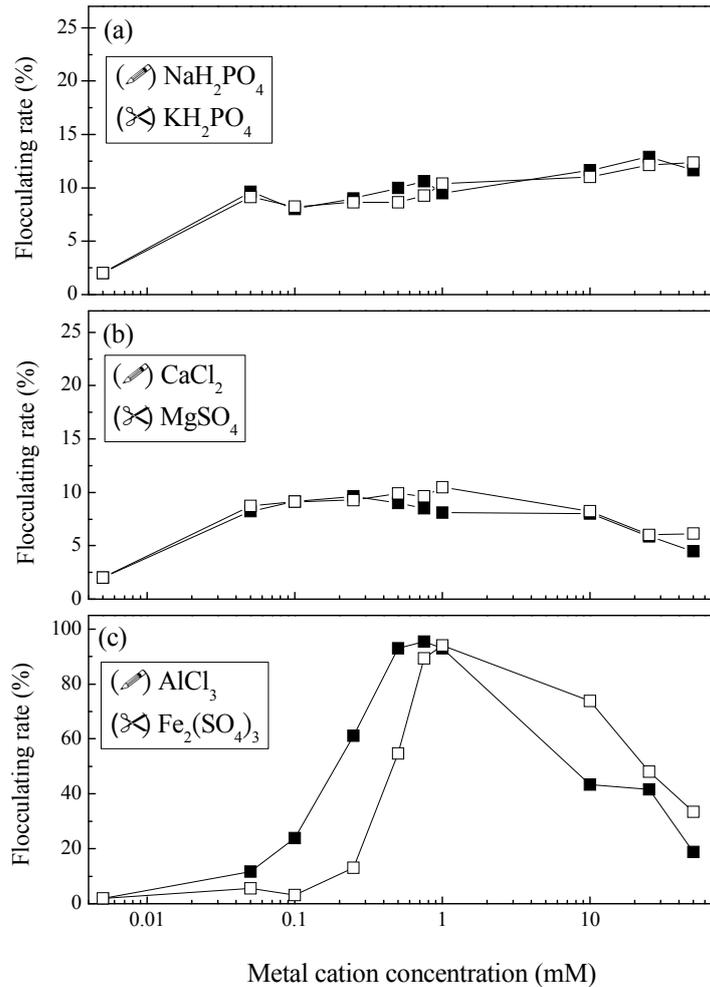
#### 5. 不同價數的金屬離子對於絮凝效果之影響

有學者證實，陽離子會中和並穩定絮凝劑官能基團上殘餘的電荷而在顆粒間形成架橋，故添加重金屬離子可促進絮凝能力 [Levy *et al.*, 1992]。添加的陽離子是否具高度的促進絮凝作用，取決於離子價數及濃度 [Watanabe *et al.*, 1999]。圖 5與6 顯示在不同濃度的陽離子中，添加三價離子有較佳的絮凝活性及絮凝率。提高 *B. subtilis* DYU1 生產之 PGA(1,300kDa) 的絮凝活性一價 ( $\text{Na}^+$  或  $\text{K}^+$ ) 及二價 ( $\text{Ca}^{2+}$  或  $\text{Mg}^{2+}$ ) 陽離子理想的添加濃度  $> 50\text{Mm}$ ；而三價離子 ( $\text{Al}^{3+}$  或  $\text{Fe}^{3+}$ ) 添加濃度分別為 0.75 與 1mM

有最佳的效果(絮凝活性及絮凝率分別為26.5與19.6以及95.5%與94%)，但添加過多或過少皆會降低絮凝活性。當三價離子添加超過50mM則會完全抑制絮凝作用，而一價與二價陽離子在50mM仍可促進絮凝作用的發生，亦即一價與二價陽離子需要較高劑量來達到絮凝效果，而添加三價陽離子只需要低劑量便可達到絮凝的效果。目前，已有許多研究報告指出，生物絮凝劑可藉由添加各種不同的重金屬離子產生協同作用，以達提高其絮凝能力，例如：由*Rhodococcus erythropolis* [Takea *et al.*, 1991]和*Alcaligenes cupidus* [Toeda and Kurane, 1991]所生產的生物絮凝劑，可藉由添加Ca<sup>2+</sup>和Al<sup>3+</sup>提高絮凝率。

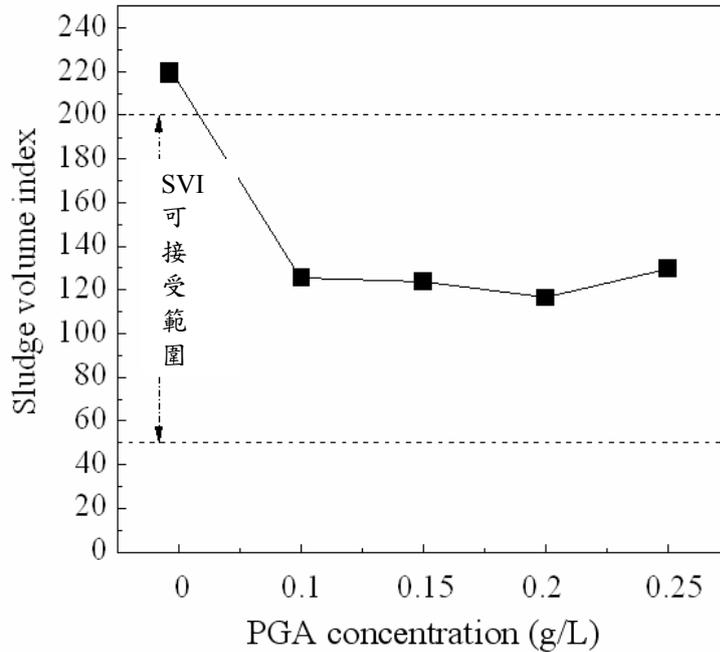


**圖5** Effects of cation concentrations on flocculating activity of PGA (0.1 g/L) using activated sludge suspension at pH 7.0: (a) monovalent cations; (b) bivalent cations; (c) trivalent cations.



**圖6 Effects of cation concentrations on flocculating rate of PGA (0.1 g/L) using activated sludge suspension at pH 7.0: (a) monovalent cations; (b) bivalent cations; (c) trivalent cations.**

6. 添加不同濃度的 PGA 對污泥容積指標 (sludge volume index, SVI) 之影響  
 一般，活性污泥 SVI < 100 時，表示污泥沉降性能好；當 100 < SVI < 200 時，表示污泥沉降性能一般；而當 SVI > 200 時，示污泥沉降性能不好。圖 7 為添加不同濃度 PGA 對活性污泥 SVI 之影響。結果顯示隨添加 PGA 濃度增加 (0-0.2 g/L) 而 SVI 隨著降低 (150-120)，當 PGA 濃度 > 0.2 g/L 時，SVI 值會略為上升，但 SVI 值都仍在一般活性污泥合理的沉降性能範圍內。



**圖 7 The effect of PGA concentration on sludge volume index of PAC (0.1 g/L) against activated sludge suspension(6.702 g/L).**

#### 7. PGA 提高活性污泥沉降速率之機制

一般，生物絮凝劑是以架橋作用以及電荷中和的方式來凝聚顆粒或是細菌細胞[Salehizadeh and Shokaosadati, 2001]。帶有負電荷的懸浮污泥與陽離子的PAC形成架橋，在顆粒與絮凝鏈之間再與陰離子的生物絮凝劑發生絮凝作用。根據上述的結果，推測絮凝機制如圖 8所示。當陽離子PAC存在時，減少活性污泥面積的負電荷，最後會由負電荷變成正電荷。因此，帶有負電的carboxyl group ( $\text{COO}^-$ )的生物絮凝劑PGA可以與帶有正電荷的懸浮活性污泥顆粒發生反應。

陽離子所扮演的角色為在懸浮粒子的表面上減少顆粒及生物絮凝劑的負電荷，增加生物絮凝劑的能力[Levy *et al.*,1992]。絮凝作用藉由添加陽離子而降低了電荷密度，導致懸浮粒子間[Nakamura *et al.*,1976]的架橋。符合Schulze Hardy's定律，也暗示電荷密度會改變絮凝作用的結果，同時也指出陽離子導致界達電位呈現中性[Klute and Neis, 1976]。

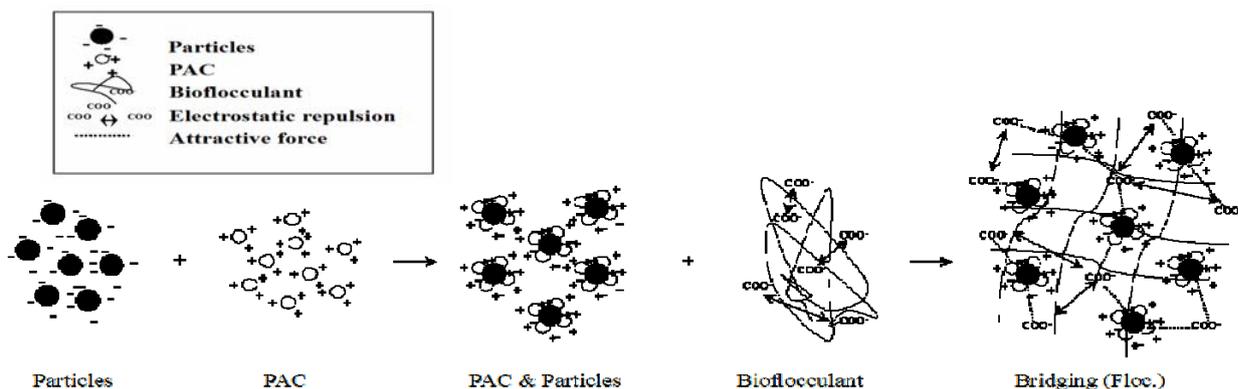


圖 8 PGA 提高活性污泥沉降速率之機制。

#### 四、結 論

本實驗利用 *B. subtilis* DYU1 株菌生產之生物絮凝劑(PGA)，以提高活性污泥沉降速率為目標。探討不同 pH 值、不同濃度之生物絮凝劑、不同濃度之助凝劑(PAC)以及不同價數之金屬離子等條件，觀察以上對於絮凝效果的影響。另外，也探討添加同一濃度之助凝劑的條件下，不同濃度絮凝劑對污泥容積指標(sludge volume index, SVI)的影響。根據實驗結果顯示，分子量大的絮凝劑在 pH 值為 7(PGA 0.2 g/L 與 PAC 0.05 g/L)絮凝效果最佳，絮凝率約 93%，而分子量小則變化不大。而固定在 pH 值條件下，助凝劑的添加量會隨著分子量變大而減少。而三者絮凝率會隨著 PAC 的濃度增加而增加，但 PAC 濃度若超過 0.5 g/L 時，則會抑制絮凝效果。探討不同濃度絮凝劑對污泥溶液絮凝率之影響，可明顯的看出，絮凝率會隨絮凝劑濃度增加而增加，最佳濃度為 0.05~0.15 g/L，其絮凝率為 92~94%。在探討金屬離子對絮凝劑之影響，絮凝率會隨金屬離子價數越高而效果越好。綜合以上敘述，絮凝的最佳效果仍是有一定的範圍，並非濃度越高其效果越好。生物絮凝劑具有生物可降解性和無毒性，藉由此特性，可讓環境不易發生二次污染，同時也較不危害人體。因此可以取代常見的合成絮凝劑，並廣泛的應用在廢水處理以及提高廢水中污泥的沉降速率以及放流水的清澈度。

#### 五、參考文獻

1. Baranska, H., Labudzinska, A., and Terpinski, J. 1987. Laser Raman Spectroscopy-Analytical Applications, Ellis Horwood, Chichester, UK.

2. Dearfield, K. L., Abernathy, C. O., Ottley, M. S., Brantner J. H., and Hayes, P. F. 1988. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity. *Mutant Res* 195: 45-77.
3. Deng, S. B., Bai, R. B., Hu, X. M., and Luo, Q. 2003. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Agricultural and Biological Chemistry* 60:588-593.
4. Divakaran, R. and Pillai, V. N. S. 2001. Flocculation of kaolinite suspensions in water by chitosan. *Water Research* 35: 3904–3908.
5. Divakaran, R. and Pillai, V. N. S. 2002. Flocculation river silt using chitosan. *Water Research* 36: 2414–2418 .
6. Klute, R, Neis, U. 1976. Stability of colloidal kaolinite suspensions in the presence of soluble organic compounds. In: Ker M, editor. *Proceedings of the international conference, colloid interface science*, 50th ed 4: 113.
7. Kurane, R. and Nohata, Y. 1994. A new water-absorbing polysaccharide from *Alcaligenes latus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58: 235-238.
8. Kurane, R., Takeda, K. and Suzuki, T. 1986. Screening for and characteristics of microbial flocculant. *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 2301-2307.
9. Lee, S. H., Lee, S. O., Jang, K. L. and Lee, T. H. 1995. Microbial flocculant from *Arcuadendron* sp. TS-49. *Biotechnology Letters* 17: 95-100.
10. Levy N., Magdasi S., Bar-Or Y. 1992. Physico-chemical aspects in flocculation of bentonite suspensions by a cyanobacterial. *Water Research* 26:249–54.
11. Michaels, A.S. 1954. Aggregation of suspensions by polyelectrolytes. *Industrial & Engineering Chemistry* 46: 1485-1490.
12. Mporu, P., Addai-Mensah, J., and Ralston, J. 2004. Temperature influence of nonionic polyethylene oxide and anionic polyacrylamide on flocculation and dewatering behavior of kaolinite dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science* 271: 145–156.
13. Nakamura, J., Migashiro, S., and Hirose, Y. 1976. Screening isolation and some properties of microbial cell flocculant. *Agricultural and Biological Chemistry* 40: 377-383.
14. Pinotti, A. and Zaritzky, N. 2001. Effect of aluminum sulfate and cationic polyelectrolytes on the destabilization of emulsified wastes. *Waste Management* 21: 535–542.
15. Salehizadeh H., and Shokaosadati S. A. 2001. Extracellular biopolymeric flocculants Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances* 19: 371–85.

16. Shiro, M., Kunimoto, K. K., Sasaki, C., Kuwae, A., and Hanai, K. 2003 Characterization of microbial poly ( $\epsilon$ -L-lysine) by FT-IR, Raman and solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopies. *Journal of molecular structure* 655: 149-155.
17. Suh, H. H., Kwon, G. S., Lee, C. H., Kim, H. S., Oh, H. M. and Yoon, B.D. 1997. Characterization of bioflocculant produced by *Bacillus* sp. DP-152. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 108-112.
18. Takashi, A., Hayashi, S., Higashi, N., Niwa, M., and Kurihara, K. 2000. Charge regulation in polyelectrolyte brushes studied by FTIR spectroscopy. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 169: 351-356.
19. Takeda, M., Kurane, R., Koizumi, J. and Nakamura, I. 1991. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 2663-2664.
20. Toeda, M. and Kurane, R. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidas* KT201. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 2793–2799.
21. Vanhoric, M. and Mones, W. 1983. Carcinogen of acrylamide. *Carcinogenesis* 4: 1459-1463.
22. Watanabe, M., Suzuki, Y., Sasaki, K., Nakashimada, Y., Nishio, N. 1999. Flocculating property of extracellular polymeric substance derived from a marine photosynthetic bacterium, *Rhodovulum* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87:625–9.
23. Wu, J.,Y. and Ye, H., F. 2007. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. *Process Biochemistry*. 42: 1114–1123.
24. Yokoi, H., Yoshida, T., Mori, S., Hirose, J., Hayashi, S. and Takasaki, Y. 1996. Biopolymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp. *Biotechnology Letters* 19: 569-573.