



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104388348 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 04

(21) 申请号 201410669244. 9

C12R 1/11(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 21

C12R 1/23(2006. 01)

C12R 1/25(2006. 01)

(71) 申请人 上海寄绿生物环保科技有限公司

C12R 1/46(2006. 01)

地址 200942 上海市宝山区蕴川路 5503 号

C12R 1/465(2006. 01)

A1034 室

C12R 1/01(2006. 01)

(72) 发明人 刘宫介 张显忠 葛文

A61L 101/52(2006. 01)

(74) 专利代理机构 上海硕力知识产权代理事务

所 31251

代理人 王法男

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C12N 1/18(2006. 01)

C12N 1/16(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

A61L 9/01(2006. 01)

C12R 1/865(2006. 01)

C12R 1/78(2006. 01)

C12R 1/10(2006. 01)

C12R 1/125(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

用于污水净化与垃圾除臭的微生态制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种用于污水净化与垃圾除臭的微生态制剂,其为包括如下微生物的液体培养物,酿酒酵母、汉逊酵母、沼泽红假单胞菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、细黄链霉菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌,其中培养用液体培养基包含糖蜜、氯化钠、尿素,且微生态制剂中活菌数达 1×10^{10} cfu/ml 以上。将其投入污水或喷洒于垃圾中转站、垃圾填埋场及养殖场等场所,可对环境起明显改善作用。

1. 一种用于污水净化与垃圾除臭的微生态制剂,其特征在于,所述微生态制剂为包括如下微生物的液体培养物:酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、汉逊酵母 (*Hansenula anomala*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*(Ehrenberg)Cohn]、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、细黄链霉菌 (*Streptomyces microflavus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*),

其中微生物培养用液体培养基包含糖蜜、氯化钠、尿素,且微生态制剂中活菌数达 1×10^{10} cfu/ml 以上。

2. 如权利要求 1 所述的微生态制剂,所述液体培养基包含以重量百分比计的 8 ~ 10% 糖蜜、1.5 ~ 2% 氯化钠及 0.5 ~ 1% 尿素。

3. 如权利要求 1 所述的微生态制剂,所述液体培养基包含以重量百分比计的 8 ~ 10% 糖蜜、1.5 ~ 2% 氯化钠、0.5 ~ 1% 尿素、1 ~ 3% 复合生长因子及余量的水,且 pH 5.8 ~ 6.0,其中复合生长因子包括 20% 磷酸氢二钾、40% 硫酸镁、25% 过滤番茄汁、5% 酵母浸提物、10% 电解多维。

4. 一种制备权利要求 1-3 任一项所述的微生态制剂的方法,包括:

(1) 制备复合菌种:

一级种子培养:将各所述微生物的菌落分别接种于所述液体培养基纯培养 16-24 小时,温度 30-35℃;

二级种子培养:一级培养物接种于所述液体培养基放大混合培养 24-48 小时,温度 30-35℃,得到作为复合菌种的二级培养物;

(2) 初始发酵:将二级培养物接入所述液体培养基放大培养 24-48 小时,温度 15-30℃;然后再添加基于初始发酵开始时 0.8-1.2 倍量的所述液体培养基,在 30-35℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 4.2,对液面进行光照,4-12 小时搅匀一次,培养至出现漂浮物;

(3) 高糖发酵:再加入基于初始发酵开始时 0.8-1.2 倍量的额外添加了 3 ~ 5% 糖蜜的所述液体培养基,在 28 ~ 30℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 3.9,继续提供光照,4-12 小时搅匀一次,培养 4 ~ 8 天,至 pH 不再明显下降;

(4) 静默发酵:停止保温、搅拌、光照,在保持 pH 3.9-4.4 的情况下,继续培养至活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法,其中在一级种子培养过程,所述微生物中的嗜酸乳杆菌与植物乳杆菌静置培养,其余微生物振荡培养。

6. 如权利要求 4 所述的制备方法,其中在二级种子培养过程,所述地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌的一级培养物在混合培养时间过半时接种。

7. 一种制备权利要求 1-3 所述的微生态制剂的方法,包括:

(1) 制备复合菌种:

一级种子培养:将所述液体培养基分装至 200ml 三角烧瓶中,从各所述微生物试管种斜面上挑取菌落,分别接种至各瓶培养基中,并置于恒温振荡器中 32℃ 振荡培养 24 小时,但嗜酸乳杆菌与植物乳杆菌静置培养;

二级种子培养 :取 10L 所述液体培养基,接入酿酒酵母、汉逊酵母、沼泽红假单胞菌、细黄链霉菌的一级培养物,32℃培养,培养期间每 4 小时搅拌均匀一次,培养 24 小时之后再接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌,搅拌均匀后继续静置培养 24 小时得到二级培养物作为复合菌种 ;

(2) 初始发酵 :将二级培养物接入 3 吨所述液体培养基培养 48 小时,温度 15-30℃ ;然后再添加 2.5 吨所述液体培养基,在 32℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 4.2,每 8 小时搅拌 1 分钟,提供光照,培养至出现漂浮物。

(3) 高糖发酵 :再加入 3 吨额外添加了 5% 糖蜜的所述液体培养基,在 28 ~ 30℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 3.9,继续提供光照,每 12 小时搅拌 1 分钟,培养 4 ~ 8 天,至 pH 不再明显下降 ;

(4) 静默发酵 :停止保温、搅拌、光照,在保持 pH 3.9-4.4 的情况下,继续培养至 80% 的漂浮物下沉,培养物颜色呈鲜红色或橙黄色,气味呈酸味或酯味,活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上。

用于污水净化与垃圾除臭的微生物制剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物制剂制备技术领域,具体涉及一种用于污水净化与垃圾除臭的微生物制剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 微生物制剂广泛应用于农业、环保、医疗等领域,目前在农业上用量最大,而在环保领域使用还不多。现有的一些用于水处理的微生物制剂,虽然取得了一些处理效果,但普遍存在激活所需时间长、持续作用时间短、微生物种类单一等问题,从而导致其处理效果欠佳等问题。

发明内容

[0003] 鉴于现有环保领域微生物制剂的不足,本研发团队受“有效微生物群”概念所启发,制备了一种含多种微生物的、能够净化污水及除臭的液体剂型微生物制剂。

[0004] 本发明的第一方面是一种用于污水净化与垃圾除臭的微生物制剂,其为包括如下微生物的液体培养物,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、汉逊酵母 (*Hansenula anomala*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*(Ehrenberg)Cohn]、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、细黄链霉菌 (*Streptomyces microflavus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。其中培养用液体培养基包含糖蜜、氯化钠、尿素,且微生物制剂中活菌数达 1×10^{10} cfu/ml 以上。

[0005] 本发明还提供一种制备上述微生物制剂的方法,包括:

[0006] (1) 制备复合菌种,包括一级种子培养:将各所述微生物的菌落分别接种于所述液体培养基纯培养 16-24 小时,温度 30-35℃;及二级种子培养:一级培养物接种于所述液体培养基放大混合培养 24-48 小时,温度 30-35℃,得到作为复合菌种的二级培养物。

[0007] (2) 初始发酵:将二级培养物接入所述液体培养基放大培养 24-48 小时,温度 15-30℃;然后再添加基于初始发酵开始时 0.8-1.2 倍量的所述液体培养基,在 30-35℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 4.2,对液面进行光照,4-12 小时搅匀一次,培养至出现漂浮物。

[0008] (3) 高糖发酵:再加入基于初始发酵开始时 0.8-1.2 倍量的额外添加了 3~5% 糖蜜的所述液体培养基,在 28~30℃ 下培养,其中保持 pH 不低于 3.9,继续提供光照,4-12 小时搅匀一次,培养 4~8 天,至 pH 不再明显下降;

[0009] (4) 静默发酵:停止保温、搅拌、光照,在保持 pH 3.9-4.4 的情况下,继续培养至活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上。

[0010] 本发明的微生物制剂的优点在于:

[0011] 将其投入污水,如生活污水、食品加工废水、畜牧养殖废水、受污染河道及水产养殖水体等中,可降低污水化学需氧量、总氮、悬浮物等指标,从而使水体变得清澈;将其喷

洒于垃圾中转站、垃圾填埋场及养殖场等场所,可对空气中的氨、硫化氢等恶臭物质起到吸附、酶解等作用。从而起到对环境的改善作用。

具体实施方式

[0012] 本发明的微生态制剂由复合菌种经发酵得到。

[0013] 本发明中复合菌种制备及其发酵所需的液体培养基的组成为:

[0014] 糖蜜 8 ~ 10%; 食盐 1.5 ~ 2%;

[0015] 尿素 0.5 ~ 1%; 复合生长因子 1 ~ 3%;

[0016] 及余量的水。

[0017] 各组分以重量百分比计。调配好后用氢氧化钠或碳酸氢钠调 pH 至 5.8 ~ 6.0, 巴氏消毒。

[0018] 上述糖蜜、食盐、尿素为市购产品。

[0019] 复合生长因子为自配, 由 20% 磷酸氢二钾、40% 硫酸镁、25% 过滤番茄汁、5% 酵母浸提物、10% 电解多维。其中, 磷酸氢二钾、硫酸镁、酵母浸提物、电解多维为市购产品, 过滤番茄汁为自制。

[0020] 复合菌种按如下方法制备。

[0021] 复合菌种的微生物组分包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、汉逊酵母 (*Hansenula anomala*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn]、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、细黄链霉菌 (*Streptomyces microflavus*)、嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。各微生物组分为市购试管种。

[0022] 复合菌种的制备方法分为一级与二级两步。

[0023] 上述“一级”为各组分的纯培养。挑取各微生物的菌落, 分别接种至 100 ~ 200mL 液体培养基中, 置于恒温振荡器中 30 ~ 35°C、100 ~ 200r/min 培养 16 ~ 24h; 但嗜酸乳杆菌与植物乳杆菌不振荡, 静置培养。各微生物接种量基本相同。

[0024] 上述“二级”为混合培养, 具体方法为: 准备 5 ~ 10L 液体培养基, 接种一级培养后的酿酒酵母、汉逊酵母、沼泽红假单胞菌、细黄链霉菌培养物, 30 ~ 32°C 间歇搅拌 (60 ~ 120r/min 机械搅拌, 每 3 ~ 5h 一次, 每次 1 ~ 2min) 培养 12 ~ 24h; 之后接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌, 继续培养 16 ~ 24h。培养完毕后, 发臭的视为染杂菌, 应舍弃; 气味为酸味的为正常。

[0025] 发酵培养过程分为初始发酵、高糖发酵、静默发酵三个阶段, 其条件如下所述:

[0026] 初始发酵

[0027] 将已制备好的复合菌种泵入含上述液体培养基的种子罐, 不设条件地自然培养 (自然温度 15 ~ 30°C) 24 ~ 48h, 然后泵入装有约四分之一体积液体培养基的发酵罐, 使发酵罐中培养物体积为罐总体积的约二分之一。在发酵罐中以 30 ~ 32°C, pH 下限 4.2, 每 8 ~ 12h 搅拌 1min, 提供光照 (例如以高压气体放电灯, 如金属卤化物灯、氙气灯等, 在发酵罐上部照射于液面, 作用为促进沼泽红假单胞菌生长并成为优势菌, 通常照度不低于 1000LUX;), 培养至出现漂浮物 (类菌苔物)。通常此阶段发酵时间为 1 ~ 3 天。

[0028] 高糖发酵

[0029] 向发酵罐中泵入再添加了 2 ~ 5% 糖蜜的所述液体培养基至大致四分之三体积, 搅拌均匀。以 28 ~ 30℃, pH 下限 3.9, 每 8 ~ 12h 搅拌 1min, 继续提供光照, 培养至 pH 不再明显下降。通常此阶段发酵时间为 4 ~ 8 天。

[0030] 静默发酵

[0031] 不再加热、搅拌、光照, 在 pH 下限 3.9, pH 上限 4.4 的情况下, 继续培养, 当 pH 值低于下限, 则加入氢氧化钠或碳酸氢钠调整; 当 pH 值高于上限, 则加入硫酸或冰乙酸调整。至漂浮物大部分 (80% 以上) 下沉, 且颜色呈鲜红色或橙黄色, 气味呈酸味或酯味, 活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上即可放罐。通常此阶段发酵时间为 5 ~ 10 天。

[0032] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0033] 其中, 各实施例所用微生物菌株及来源如下:

[0034]

微生物名称	来源	商品名/保藏号
酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	安琪酵母股份有限公司	安琪高活性干酵母
汉逊酵母 (<i>Hansenula anomala</i>)	中国普通微生物菌种保藏管理中心	2.810
沼泽红假单胞菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)	山西中盛化工药业有限公司	超浓缩光合细菌冻干粉
地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	东北制药集团沈阳第一制药有限公司	整肠生
枯草芽孢杆菌 [<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn]	鹤壁市百惠生物科技有限公司	枯草芽孢杆菌
巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	鹤壁市百惠生物科技有限公司	巨大芽孢杆菌
细黄链霉菌 (<i>Streptomyces microflavus</i>)	石家庄伟天科学仪器设备有限公司	细黄链霉菌 5406
嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	常州益菌加生物科	益菌加嗜酸乳杆菌

[0035]

	技有限公司	
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	常州益菌加生物科 技有限公司	益菌加植物乳杆菌
嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	中国普通微生物菌 种保藏管理中心	1.2471

[0036] 实施例 1

[0037] 1.1 制备液体培养基

[0038] 按质量比取糖蜜 8%、食盐 2%、尿素 1%、复合生长因子 2%，加入除氯自来水配置 5 吨培养基。其中 2 吨入 3 吨种子罐，2.5 吨入 10 吨发酵罐，其余 0.5 吨备用。

[0039] 1.2 制备复合菌种

[0040] 将备用的液体培养基分装至若干个 200mL 三角烧瓶中，每瓶 100mL，以 121℃，15min 予以高压蒸汽灭菌。后在超净工作台中，用接种环从各组分的试管种斜面上挑取一些菌落，接种至各瓶培养基中，并置于恒温振荡器中 32℃，150r/min 培养 24h，但嗜酸乳杆菌与植物乳杆菌静置培养。

[0041] 取 10L 备用的液体培养基，接种酿酒酵母、汉逊酵母、沼泽红假单胞菌、细黄链霉菌，32℃ 培养 24h，培养期间用叶轮式搅拌电机每 4h 搅拌一分钟，搅拌速率 60r/min。之后接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌并搅拌充分后，继续静置培养 24h。

[0042] 1.3 初始发酵

[0043] 将已制备好的复合菌种泵入种子罐，不设条件地自然培养 48h 后泵入发酵罐。在发酵罐中以 32℃，pH 下限 4.2，每 8h 搅拌 1min，提供光照（使用金属卤化物灯，从上方向液面投射，强度 1000LUX），培养 2 天至出现漂浮物。

[0044] 1.4 高糖发酵

[0045] 向发酵罐中泵入新制备的上述液体培养基与 5% 的糖蜜（基于新加培养基的体积）至约四分之三体积，搅拌均匀。以 28℃，pH 下限 3.9，每 12h 搅拌 1min，继续提供光照，继续培养 4 天至 pH 不再明显下降。

[0046] 1.5 静默发酵

[0047] 不再加热、搅拌、光照，在控制 pH 下限 3.9，pH 上限 4.4 的条件下，继续培养至 80% 的漂浮物下沉，发酵体系颜色呈鲜红色或橙黄色，气味呈酸味或酯味，此时搅匀发酵液并取样进行菌落计数，若活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上即可放罐。

[0048] 最终得到约 8 吨此微生态制剂。

[0049] 实施例 2

[0050] 2.1 制备液体培养基

[0051] 按质量比取糖蜜 8%、食盐 2%、尿素 1%、复合生长因子 2%，加入除氯自来水配置 10 吨培养基。其中 4 吨入种子罐，5 吨入 20 吨发酵罐，其余 1 吨备用。

[0052] 2.2 制备复合菌种

[0053] 将备用的液体培养基分装至若干个 200mL 三角烧瓶中, 每瓶 100mL, 以 121℃, 15min 予以高压蒸汽灭菌。后在超净工作台中, 用接种环从各组分的试管种斜面上挑取一些菌落, 接种至各瓶培养基中, 并置于恒温振荡器中 32℃, 150r/min 培养 24h, 嗜酸乳杆菌与植物乳杆菌静置培养。取 10L 备用的液体培养基, 接种酿酒酵母、汉逊酵母、沼泽红假单胞菌、细黄链霉菌, 32℃ 培养 24h, 培养期间用叶轮式搅拌电机每 4h 搅拌一分钟, 搅拌速率 60r/min。之后接种地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌并搅拌充分, 继续静置培养 24h。

[0054] 2.3 初始发酵

[0055] 将已制备好的复合菌种泵入种子罐, 不设条件地自然培养 48h 后泵入发酵罐。在发酵罐中以 32℃, pH 下限 4.2, 每 8h 搅拌 1min, 提供光照 (使用金属卤化物灯, 从上方向液面投射, 强度为约 2000LUX), 再培养 3 天至出现漂浮物。

[0056] 2.4 高糖发酵

[0057] 向发酵罐中泵入新制备的上述液体培养基与基于新培养基 5% 的糖蜜至约四分之三体积, 搅拌均匀。以 28℃, pH 下限 3.9, 每 12h 搅拌 1min, 提供光照, 继续培养 5 天至 pH 不再明显下降。

[0058] 2.5 静默发酵

[0059] 不再加热、搅拌、光照, pH 下限 3.9, pH 上限 4.4, 培养至 80% 的漂浮物下沉, 培养物颜色呈鲜红色或橙黄色, 气味呈酸味或酯味, 活菌数达 1×10^{10} cfu/mL 以上即可放罐。

[0060] 最终得到约 17.5 吨此微生态制剂。

[0061] 使用方法及效果

[0062] (1) 将实施例 1 最后得到微生态制剂稀释 200 倍后用背负式喷雾器均匀喷洒于某垃圾中转站内, 其除臭效果显著, 氨、硫化氢的浓度变化如下表所示:

[0063]

臭气组分	使用 前 浓 度 (mg/m ³)	使用 后 浓 度 (mg/m ³)	去除率
氨	0.492	0.107	78.3%
硫化氢	0.004	0.003	25.0%

[0064] (2) 将实施例 2 中得到的微生态制剂以污水进水量的 0.1% 的用量投加至某食品企业污水处理系统的曝气池中, 每日一次, 效果较为理想, 水质变化如下表所示: (投加微生态制剂从 8 月 14 日开始)

[0065]

采样时间	化学需氧量 (COD _{Cr})	总氮 (TN)	悬浮物 (SS)
8-11	187.0	32.0	71.0
8-12	188.5	29.0	69.0

8-13	154.5	30.5	71.0
8-14	161.0	21.3	69.3
8-15	122.7	16.5	54.0
8-16	103.0	16.8	49.0