



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102676434 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 201210158500.9

CN 102061277 A, 2011.05.18,

(22) 申请日 2012.05.21

CN 1584014 A, 2005.02.23,

(83) 生物保藏信息

审查员 刘新蕾

CGMCC No. 6052 2012.04.25

(73) 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72) 发明人 倪晋仁 姚硕

(74) 专利代理机构 北京金阙华进专利事务所

(普通合伙) 11224

代理人 吴鸿维

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102174445 A, 2011.09.07,

权利要求书1页 说明书4页

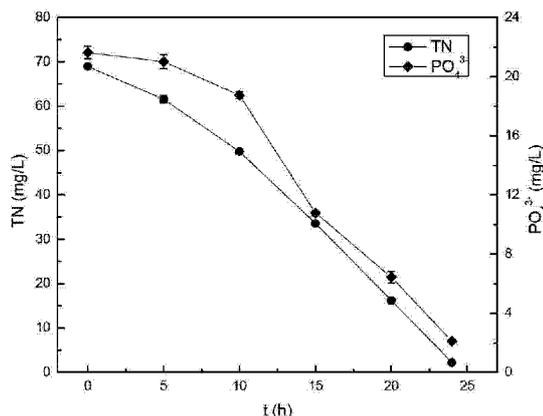
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

一种低温同步异氧硝化-好氧反硝化与除磷的菌株及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种能够在低温条件下同时进行生物脱氮及除磷的不动杆菌菌株及其应用。本发明提供的不动杆菌(Acinetobacter sp.)菌株HA2已于2012年4月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),保藏号为CGMCC No.6052。该菌株对低温的耐受能力强,在低温条件下(10℃)生长良好,并且同时具备异养硝化、好氧反硝化及好氧吸磷的能力。在低温、好氧条件下,该菌株能够进行同步硝化反硝化有效去除废水中总氮并同时去除磷酸盐,从而有效实现了低温条件下一步好氧阶段同时脱氮除磷,具有广阔的应用前景。



1. 不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 菌株 HA2, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC No. 6052。

2. 权利要求 1 所述的不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 菌株 HA2 在水溶液中进行低温脱氮除磷的应用。

3. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于: 所述低温为 10-20℃。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的应用, 其特征在于: 所述的水溶液的溶解氧是 2-6mg/L。

5. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于: 所述的水溶液中的氮是氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮中的一种或者几种。

6. 根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于: 所述的水溶液中的磷是磷酸盐。

7. 一种用于低温脱氮除磷的微生物菌剂, 其活性成分为权利要求 1 所述的不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 菌株 HA2。

## 一种低温同步异氧硝化 - 好氧反硝化与除磷的菌株及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物脱氮除磷领域,特别涉及一种用于低温条件下生物脱氮除磷的不动杆菌菌株及其应用。在低温条件下,该菌株具有异养硝化 - 好氧反硝化的功能,并可以在同步硝化反硝化脱氮的过程中,同时去除污水中的磷酸盐,从而达到同步生物脱氮除磷的目的。

### 背景技术

[0002] 我国水污染的状况十分严峻,其中由氮、磷污染引发的水体富营养化问题尤为突出。据环境部门的监测结果显示,我国七大水系中一半以上河段水质受到污染,全国 1/3 的水体不适于鱼类生存,1/4 的水体不适于灌溉,90% 的城市水域污染严重,50% 的城镇水源不符合饮用水标准,40% 的水源已不能饮用,主要污染物为氨氮、 $COD_{Mn}$ 、BOD、挥发酚和石油类物质。因此,严格控制污水达标排放,有效控制水污染状况已经成为水资源保护的当务之急。

[0003] 人类日常生活产生的生活污水排放量大,含有机物以及氮、磷等营养物质多,已经成为水体的重要污染源。《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)中提出了严格的有机物、氮、磷等污染物的排放标准。

[0004] 目前的城市污水处理厂大都采用运行稳定、成本低廉的生物处理工艺,其中具有脱氮除磷功能的  $A^2O$ 、倒置  $A^2O$ 、SBR 等工艺及 NICH 深度处理工艺的应用日益广泛。通常情况下,这些工艺可以较有效地去除水中的有机物及氮、磷等营养元素,实现达标排放。

[0005] 然而,在寒冷的冬季,水温严重下降,尤其在广大的北方地区,排水温度可以达到  $10^{\circ}C$  甚至更低。低温严重抑制了生物处理系统中微生物的活性,从而使污染物去除速率明显降低,出水难以达标。其中,自养的硝化细菌受到低温的抑制作用更加显著,在低温条件下生长极其缓慢,极易从处理系统中流失,使得低温硝化无法进行;而低温条件下水中溶解氧浓度的明显升高也对缺氧反硝化的进行造成了不利影响。另外,低温条件下污泥增长缓慢,污泥龄明显延长,这也使得依赖剩余污泥排放实现磷去除的生物除磷效率明显降低。因此,在低温条件下进行生物脱氮除磷已经成为城镇生活污水处理厂实现达标排放的一大难题。

[0006] 为了应对寒冷天气条件下出现的上述问题,常常在工程上采用降低污泥负荷、增加污泥回流量、增加污水停留时间、以及对部分构筑物采取保温或升温等措施来保证出水水质。然而,这些措施不仅会增加工程投资和运行费用,而且很难保证污水处理效果,还常会引起污泥膨胀等问题。

[0007] 分离、筛选高活性的低温微生物用于冬季生活污水的处理,能够从根本上解决低温条件下污染物去除率低下的问题。研究者们已尝试向生物处理池中投加自养硝化污泥来提高氨氮的去除效率,但是在低温、较高溶解氧条件下反硝化难以进行,从而导致硝化反应产生的硝氮、亚硝氮无法得到有效去除,出水总氮仍然难以达标。而氧化态氮的积累对磷的厌氧释放有一定的抑制作用,从而使得除磷效果通常无法得到保证。此外,由于自养硝化菌在低温条件下生长极其缓慢,容易随着剩余污泥排放从处理体系中洗脱出去,往往需要连

续投加,增加了运行费用。

[0008] 针对这种情况,本发明筛选出耐冷的、并同时具有脱氮及除磷功能的菌株用于低温生活污水的处理。在低温、好氧条件下,该菌株能够进行同步硝化反硝化有效去除污水中总氮并同时去除磷酸盐。此外,该菌在低温条件下生长良好,可以在生物处理系统中长期停留,无须进行连续投加。该菌株的应用对于解决低温脱氮除磷的难题具有重要意义。

## 发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种用于低温生物脱氮除磷的不动杆菌菌株及其应用。

[0010] 本发明提供的不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) 菌株 HA2 已与 2012 年 4 月 25 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC),保藏号为 CGMCCNo. 6052,保藏单位地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所,邮政编码为 100101。

[0011] 菌株 HA2 是从活性污泥中分离、筛选得到的一株革兰氏阴性细菌。

[0012] 形态特征:菌株 HA2 在 15-20℃ 下,营养琼脂培养基上培养 24-36h 后,菌落呈蜡滴状,表面光滑,无色;通过革兰氏染色后在显微镜下呈阴性;菌体呈球状或球杆状,成双排列为主。

[0013] 该菌株的 16S rRNA 基因序列特征:其 16S rRNA 具有如序列表中序列 1 所示的核苷酸序列,序列长度为 1417bp。

[0014] 根据其形态特征及其 16S rRNA 基因序列,鉴定该菌株为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。

[0015] 该菌株 HA2 可在低温条件下脱氮除磷,在实际应用中,可将菌株 HA2 置于废水中,进行生物脱氮除磷。

[0016] 所述废水的温度 10-20℃。

[0017] 所述废水的溶解氧可为 2-6mg/L。

[0018] 所述废水的碳源为为醋酸钠或琥珀酸钠。

[0019] 所述废水的氮是氨氮、硝酸盐氮和 / 或亚硝酸盐氮。

[0020] 所述废水的磷是磷酸盐。

[0021] 所述废水的 pH 可为 6-9。

[0022] 本发明的又一目的在于提供一种用于低温生物脱氮除磷的微生物菌剂,其活性成分为所述的菌株 HA2。

[0023] 本发明的不动杆菌及其应用与现有技术相比较有如下有益效果:

[0024] 1. 本发明的菌株 HA2 对低温的耐受能力强,在低温条件下能够快速生长并且去除氨氮,有效克服了传统自养硝化菌在低温条件下生长困难、在处理体系中难以有效停留的难题;

[0025] 2. 菌株 HA2 能够在进行硝化反应的同时进行好氧反硝化,实现了一步好氧条件下氮素的彻底去除,相比传统的缺氧-好氧脱氮工艺,简化了工艺流程,节省了基建投资和运行费用;

[0026] 3. 菌株 HA2 在好氧条件下脱氮的同时可以有效吸磷,实现磷的去除,亦有效解决了脱氮除磷由自养硝化菌与异养聚磷菌两种不同类型的菌群分别进行时所需污泥不同而

产生的矛盾；

[0027] 4. 本发明的菌株 HA2 适用于各种废水的脱氮除磷处理,应用前景广阔,具有很好的经济效益、环境效益和社会效益。

#### 附图说明

[0028] 图 1 为菌株 HA2 的温度特性；

[0029] 图 2 为菌株 HA2 在 10℃ 下对磷酸盐和氮素的去除；

[0030] 图 3 为菌株 HA2 在不同温度下对氮的去除；

[0031] 图 4 为菌株 HA2 在不同温度下对磷的去除；

#### 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但本发明并不限于以下实施例。

[0033] 下述实施例中,如无特殊说明,均为常规方法。

[0034] 下述实施例中,所述百分含量如无特殊说明,均为质量百分含量。

[0035] 实施例 1. 菌株 HA2 的温度特性

[0036] 在不同的温度 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃ 条件下考察菌株的生长性能,具体实施步骤如下：

[0037] 将菌株 HA2 接种于 150ml 的 BM 培养基中(每升含醋酸钠 :2.73g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  :0.306g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :0.1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  :0.1g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  :0.001g, pH :7.0-7.3, 121℃ 20min 蒸汽灭菌),分别于摇床 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃, 160r/min 进行预培养。待菌株生长至对数生长期后期时,取 10ml 的菌液接入新鲜的 150ml BM 培养基中,分别于 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃, 160r/min 进行振荡培养。每隔一段时间取反应液,测定  $\text{OD}_{600}$ ,表征菌株的生长情况。

[0038] 结果如图 1 所示,菌株在 20℃ 到 30℃ 之间生长最佳,在 20℃ 生长速率达到最高。在 15℃ 及 10℃,生长速率较最大生长速率均有小幅度下降,但即使在 10℃,菌株仍然维持较高的生长速率,在 24h 左右即可达到最大生长量。由此可见,该菌株为对低温有良好耐受能力的耐冷菌。其温度特性明显不同于一般最适温度高于 30℃,在 15℃ 以下生长速率严重下降,在 10℃ 时生长困难的中温菌。该菌株在低温条件下的生长速率远超过传统的自养硝化菌株,具有良好的应用潜力。

[0039] 实施例 2. 菌株 HA2 在 10℃ 下对磷酸盐和氮素的去除

[0040] 以醋酸钠为有机碳源,氨氮为氮源,磷酸盐为磷源,所述菌株 HA2 对氮、磷的去除能力测定。具体实施步骤如下：

[0041] 将菌株 HA2 接种于 150ml 的 BM 培养基中,于摇床 10℃, 160r/min 进行预培养。待菌株生长至对数生长期后期时,取 10ml 的菌液接入新鲜的 150ml BM 培养基中, 10℃, 160r/min 进行振荡培养。每隔一段时间取反应液, 8000rpm 离心 10min 之后,取上清液测定各种含氮化合物以及磷酸盐浓度。

[0042] 结果如图 2 所示,整个实验过程中,氮、磷浓度均不断下降。在 24h 之内氨氮的去除率接近 100%,氨氮降解速率可达 3.12mg-N/L/h。此外,在整个降解过程中,硝氮和亚硝氮几乎没有任何积累,废水中大部分的氨氮通过异养硝化-好氧反硝化作用直接转化为气体产物,实现了总氮的有效去除。另外,在脱氮的同时磷也得到了有效去除,在 24h 之内磷的

去除率超过 90%，菌株体现除了良好的好氧吸磷的能力。因此，该菌株在低温好氧条件下有效实现了氮和磷的快速同步去除。

[0043] 实施例 3. 菌株 HA2 在不同温度下对氮的去除

[0044] 在不同的温度 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃ 条件下考察菌株的脱氮性能，具体实施步骤如下：

[0045] 将菌株 HA2 接种于 150ml 的 BM 培养基中，分别于摇床 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃，160r/min 进行预培养。待菌株生长至对数生长期后期时，取 10ml 的菌液接入新鲜的 150ml BM 培养基中，分别与 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃，160r/min 进行振荡培养。每隔一段时间取反应液，8000rpm 离心 10min 之后，取上清液测定各种含氮化合物的浓度。

[0046] 结果如图 3 所示，该菌株在 10-30℃ 的温度范围内，均可以有效的去除总氮。其在 20℃ 时，总氮的平均去除速率最高，为 6.04mg-N/L/h。在 15℃ 及 10℃ 条件下，总氮去除速率亦能分别达到 4.36mg-N/L/h 及 3.12mg-N/L/h。

[0047] 实施例 4. 菌株 HA2 在不同温度下对磷的去除

[0048] 在不同的温度 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃ 条件下考察菌株的除磷性能，具体实施步骤如下：

[0049] 将菌株 HA2 接种于 150ml 的 BM 培养基中，分别于摇床 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃，160r/min 进行预培养。待菌株生长至对数生长期后期时，取 10ml 的菌液接入新鲜的 150ml BM 培养基中，分别与 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃，160r/min 进行振荡培养。每隔一段时间取反应液，8000rpm 离心 10min 之后，取上清液测定磷酸盐的浓度。

[0050] 结果如图 4 所示，该菌株在 10℃ -30℃ 的温度范围内，均可以有效除磷。其在 10℃ 时，对磷的去除效率最高，超过 90%。随着温度的升高，除磷效率呈下降趋势，当温度为 30℃ 时，菌株除磷效率为 57.80%。这可能是由于磷的去除不仅依靠菌株的胞内吸磷作用，也与菌株分泌的胞外 EPS 吸附去除有关，而在较高的温度条件下，菌株分泌的 EPS 减少，也使得菌株的除磷效率有小幅度的下降。

[0001]

序列表

<160> 1

<210> 1

<211> 1417

<212> DNA

<213> 不动杆菌 (Acinetobacter sp.) 菌株 HA2

<400> 1

GGCTACCATGCAGTCGAGCGGGGAAGGATAGCTTGCTATACGACCTAGCGGGCGGACGGGTGA  
GTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATA  
GCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCAGATTAG  
CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG  
GGCGCAAGCCTGATCCAGCCAIGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTAA  
GCGAGGAGGAGGCTACTTGGATTAATACTCTAGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGG  
CTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTA  
AAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAATTGCATTC  
GATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
AGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAA  
GCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTT  
GGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGC  
AAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGA  
TGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTT  
CGGGAACCTTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC  
CCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTAAAGGATACTGC  
CAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTA  
CACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGC  
CGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGA  
TCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAATTTG  
TTGCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACC GCAAGGAGGACGCTACCACG

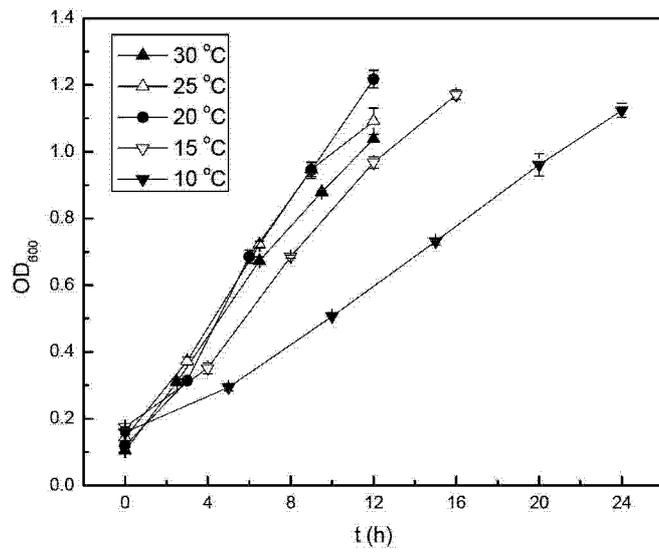


图 1

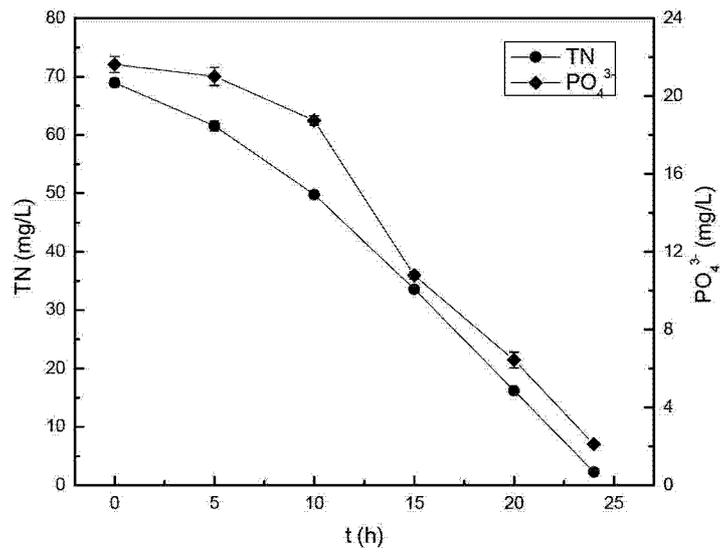


图 2

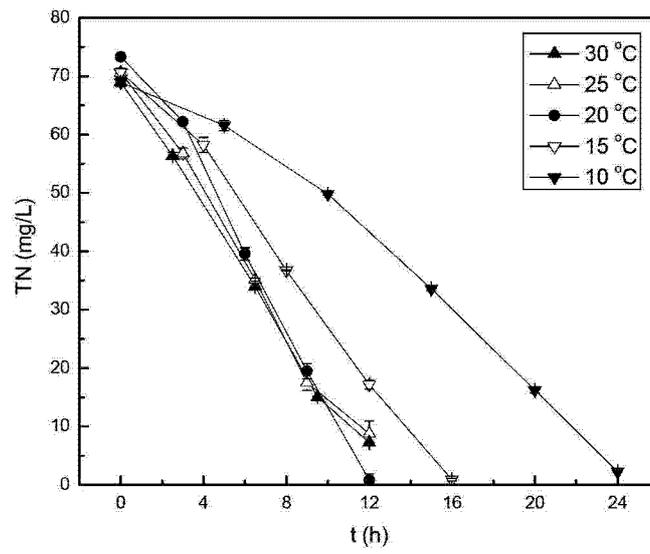


图 3

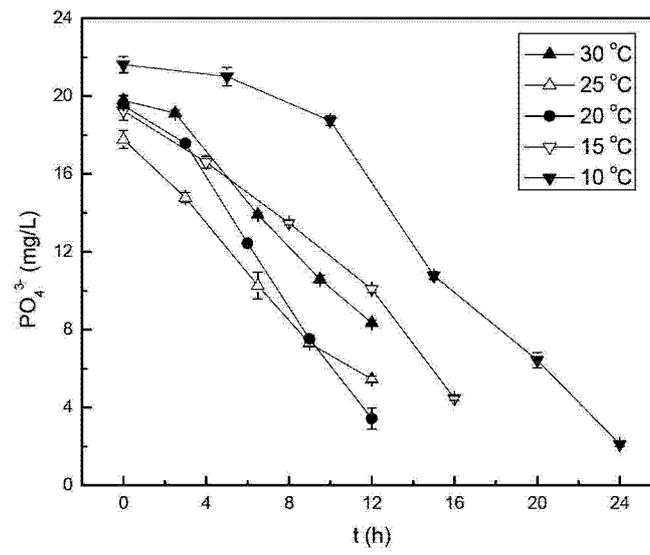


图 4