(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114908002 A
(43)申请公布日 2022.08.16

(21)申请号 202210391937.0

(22)申请日 2022.04.14

(71)申请人 华南理工大学
地址 510640 广东省广州市天河区五山路381号

(72)发明人 陈元彩 钱丹石

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
专利代理师 林奕聪

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
C02F 3/30(2006.01)
C02F 101/16(2006.01)
C12R 1/11(2006.01)
C12R 1/40(2006.01)
C12R 1/01(2006.01)

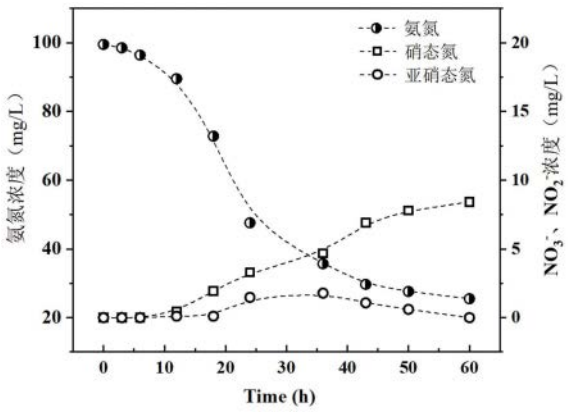
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54)发明名称

一种生物纳米硒强化复合菌株及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种生物纳米硒强化复合菌株及其应用，所述复合菌株包括巨大芽孢杆菌、鞘氨醇单胞菌YT甲橙、恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌。所述处理方法包括以下步骤：1)培养巨大芽孢杆菌合成制备生物纳米硒；2)培育、驯化鞘氨醇单胞菌YT甲橙、恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌混合菌体；3)将步骤1)、步骤2)所提供的菌体离心、混合，接种至待处理水体中进行脱氮处理。负载生物纳米硒的混合菌株能高效的去除水中的氨氮与硝态氮，可以在以氨氮或硝态氮为唯一氮源的条件下生长，在异养好氧条件下通过硝化反硝化作用，表明该发明纳米硒/复合异养硝化-好氧反硝化细菌在水体异养硝化-好氧反硝化方面具有很大的应用潜力。



CN 114908002 A

1.一种生物纳米硒强化复合菌株，其特征在于，所述复合菌剂包括合成生物纳米硒的巨大芽孢杆菌与鞘氨醇单胞菌YT甲橙、恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌的多种组合。

2.根据权利要求1所述的生物纳米硒强化的复合菌剂，其特征在于：巨大芽孢杆菌、杆状菌、戈登氏菌、恶臭假单胞菌、鞘氨醇单胞菌YT甲橙的体积比为(10-15％)：(15-20％)：(10-15％)：(10-25％)：(30-45％)，每种菌种的活菌数大于4.5亿/g。

3.权利要求1或2所述生物纳米硒强化复合菌株的应用于水体总氮处理，其特征在于，所述处理的方法包括以下步骤：

1)将巨大芽孢杆菌菌液加入到营养液中，并加入2.2mL含有1g/L的Na_2SeO_3的母液，菌种接种量为营养液的体积百分比的5％-10％，培养的温度为30～35℃，转速为120-150rpm，培养24-48h，离心处理，获得上述菌体的对数生长期细胞；用磷酸盐缓冲液洗涤1-2次后，获得合成生物纳米硒的菌体A；

2)将恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌与鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合菌体分别转移到营养液中，在30-35℃、转速为150rpm的条件下培养1-3天，以5-18％的体积比例接种至含增殖培养基的容器中，在35-37℃的条件下培养1-3天，离心处理，获得上述菌体的对数生长期细胞；用磷酸盐缓冲液洗涤1-2次后；按体积百分比计，分别取15-25％杆状菌，10-19％戈登氏菌，13-27％恶臭假单胞菌和35-45％鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合，获得用于异养硝化-好氧反硝化细菌的菌体B；

3)按体积百分比计，将10％步骤1)所得的菌体A与90％步骤2)所得混合菌体B，共同接种至待处理水体中进行脱氮处理，混合后的菌体与待处理水体的体积比为1:100。

4.根据权利要求3所述应用，其特征在于，步骤1)和步骤2)中，所述营养液的主要成分为：NaCl 10.0g/L，蛋白胨10.0g/L，酵母粉5.0g/L，其余为水，pH自然。

5.根据权利要求3所述应用，其特征在于，步骤2)中，所述增殖培养基的主要成分为：氯化铵0.382g/L，磷酸二氢钾1.5g/L，磷酸氢二钠4.2g，硫酸镁0.1g，葡萄糖1g，其余为水，pH自然。

6.根据权利要求3所述应用，其特征在于，所述磷酸盐缓冲液的成分为：氯化钠9.0g/L，氯化钾0.3g/L，磷酸氢二钾1.2g/L和磷酸二氢钾0.3g/L，其余为水，pH自然。

7.根据权利要求3所述应用，其特征在于，步骤1)和步骤2)中，所述离心处理是指以8000rpm的速度离心5-10min。

8.根据权利要求3所述应用，其特征在于，所述待处理水体是指含有氨氮、硝态氮的含氮废水。

9.根据权利要求3所述应用，其特征在于，所述待处理水体为含有氨氮、硝态氮、抗生素的发酵类制药废水。

10.根据权利要求3的应用，其特征在于：在进行含氮废水的处理过程中，需要外加1g/L葡萄糖作为碳源。

一种生物纳米硒强化复合菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境微生物领域，具体涉及生物纳米硒强化的复合菌株及其应用。

背景技术

[0002] 近年来，大量的含氮废水排入水体中，水体中氮元素超标引起水体富营养化问题，导致水质恶化。水体中氮的去除成为目前亟需解决的重要环境问题。生物法因具有操作简单、处理效果好、不引起二次污染等优势，被广泛用于含氮废水的去除。

[0003] 传统的生物脱氮一般包括好氧硝化和厌氧反硝化两个过程，由于这两个反应对于溶解氧、有机物等因素的要求不同，通常在两个反应池中独立进行，导致污水处理难度和成本显著增加、微生物繁殖缓慢。异养硝化-好氧反硝化作为一种新型的脱氮技术，硝化和反硝化可以在异养和好氧的条件下同时发生，可以克服不同需氧量引起的硝化反硝化不相容的问题，大大节省了基建费用和运行成本。同时，这些菌生长速率快，水中的碳源除了可以用于菌自身生长外，还可以作为异养硝化和好氧反硝化的能源。在常规A^2/O池中筛选出的异养硝化-好氧反硝化菌，主要针对的是常规市政废水，大多具有较好的脱氮效果，可以高效去除废水的氨氮、总氮。但是，发酵类制药废水相对于市政废水，具有氨氮、有机氮浓度浓度高的特点，BOD_5/N一般在1～4之间，低于常规生物处理需求。此外，制药废水中含有大量抗生素，残留的抗生素对微生物活性具有强烈的抑制作用和毒性，使得生物脱氮效果受限。

[0004] 如果在传统的生物处理体系中投加具有特定功能的微生物或某些基质，增强它对特定污染物的降解能力，从而改善整个污水处理体系的处理效果，我们称这种技术为生物强化技术。近年来，纳米材料由于其巨大的比表面积和高活性，使反应速率得到提高，应用于被污染的土壤和地下水修复以及污水处理。硒是人和动物必需的微量元素之一，与机体的抗氧化能力、免疫功能、抗病毒、抗癌作用等有着重要关系。与无机硒和有机硒相比，红色纳米硒具有毒性低、生物活性高等特征，在动物生产、医药及保健品方面有着广泛的应用。目前纳米硒的合成主要通过化学反应，结晶技术，反向胶束法等技术生成，这些技术会受到高温、高压、催化剂等条件限制，而且容易对环境造成危害，生产的纳米硒在没有保护剂存在的条件下，容易团聚，理化性质不稳定，常温下就容易失去生物活性，而转变成灰黑色晶型的单质硒。然而利用微生物生长发育过程中的产物和硒盐反应制备纳米硒，该方法反应条件温和，制备的纳米硒生物活性高、尺寸较小、粒径均匀，无细胞毒性，稳定性强且环境友好。因此将生物合成纳米硒与从发酵制药废水中筛选出耐受抗生素的异养硝化-好氧反硝化菌相结合，将其应用于生物脱氮具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于针对现有技术的不足，提供一种异养硝化-好氧反硝化效率高、微生物毒性小、原材料来源价格低廉的纳米硒强化复合菌株及其制备方法，可以广泛应用于含氮废水的处理。

[0006] 本发明利用生物手段，利用菌体直接合成生物纳米硒，耦合其他多种具有好氧硝

化-异养反硝化的菌株在含氮废水的处理上形成协同效应，不仅可以利用纳米硒颗粒高的比表面积和表面活性，还可以保证微生物的稳定性和活性；制成的生物纳米硒适合原位修复且无二次污染。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现：

[0008] 一种生物纳米硒强化复合菌株，所述复合菌剂包括合成生物纳米硒的巨大芽孢杆菌与鞘氨醇单胞菌YT甲橙、恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌的多种组合。

[0009] 进一步地，巨大芽孢杆菌、杆状菌、戈登氏菌、恶臭假单胞菌、鞘氨醇单胞菌YT甲橙的体积比为(10-15％)：(15-20％)：(10-15％)：(10-25％)：(30-45％)，每种菌种的活菌数大于4.5亿/g。

[0010] 一种生物纳米硒强化复合菌株的应用于水体总氮处理，所述处理的方法包括以下步骤：

[0011] 1)将巨大芽孢杆菌菌液加入到100mL营养液中，并加入2.2mL含有1g/L的Na_2SeO_3的母液，菌种接种量为营养液的体积百分比的5％-10％，培养的温度为30～35℃，转速为120-150rpm，培养24-48h，离心处理，获得上述菌体的对数生长期细胞；用磷酸盐缓冲液洗涤1-2次后，获得合成生物纳米硒的菌体A；

[0012] 2)将恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌与鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合菌体分别转移到100mL营养液中，在30-35℃、转速为150rpm的条件下培养1-3天，以5-18％的体积比例接种至含增殖培养基的容器中，在35-37℃的条件下培养1-3天，离心处理，获得上述菌体的对数生长期细胞；用磷酸盐缓冲液洗涤1-2次后；按体积百分比计，分别取15-25％杆状菌，10-19％戈登氏菌，13-27％恶臭假单胞菌和35-45％鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合，获得用于异养硝化-好氧反硝化细菌的菌体B；

[0013] 3)按体积百分比计，将10％步骤1)所得的菌体A与90％步骤2)所得混合菌体B，共同接种至待处理水体中进行脱氮处理，混合后的菌体与待处理水体的体积比为1:100。

[0014] 上述应用中，步骤1)和步骤2)中，所述营养液的主要成分为：NaCl 10.0g/L，蛋白胨10.0g/L，酵母粉5.0g/L，其余为水，pH自然。

[0015] 上述应用中，步骤2)中，所述增殖培养基的主要成分为：氯化铵0.382g/L，磷酸二氢钾1.5g/L，磷酸氢二钠4.2g，硫酸镁0.1g，葡萄糖1g，其余为水，pH自然。

[0016] 上述应用中，所述磷酸盐缓冲液的成分为：氯化钠9.0g/L，氯化钾0.3g/L，磷酸氢二钾1.2g/L和磷酸二氢钾0.3g/L，其余为水，pH自然。

[0017] 上述应用中，步骤1)和步骤2)中，所述离心处理是指以8000rpm的速度离心5-10min。

[0018] 上述应用中，所述待处理水体是指含有氨氮、硝态氮的含氮废水，进一步可以适用于含有氨氮、硝态氮、抗生素的发酵类制药废水。

[0019] 上述应用中，在进行含氮废水的处理过程中，需要外加1g/L葡萄糖作为碳源。

[0020] 本发明具有以下有益效果：

[0021] 1)本发明生物纳米硒强化复合菌株，利用生物纳米硒反应条件温和，制备的纳米硒生物活性高、尺寸较小、粒径均匀，稳定性强且环境友好，对微生物的吸附性，以及纳米硒可与微生物的线粒体的细胞色素c作用，改变细胞色素c的氧化还原电位和加强电子传递能力，因此复合菌株能够产生协同效应共同促进废水的异养硝化-好氧反硝化。在本发明的实

施例范围值条件下,经过本发明制备的复合菌株与相同实验条件下单一的微生物实验和单一的纳米硒实验对比,可以验证复合菌剂能够产生协同效应共同促进废水的异养硝化-好氧反硝化。

[0022] 2)本发明所提供的复合菌株能分别以氨氮和硝酸盐作为氮源生长,在好氧条件下,利用葡萄糖为碳源实现氨氮和硝酸盐的同步去除。方法使用简单方便,可将制成的复合菌株直接投放在污染水体中,实现污染水体的原位修复,有效避免微生物的流失,无二次污染,解决了传统生物废水处理中好氧硝化和厌氧反硝化需要独立运行的问题,具有较好的经济效益。此外,该复合菌株均属于异养菌,生长速率快,可以克服自养硝化细菌生长缓慢的缺点。

附图说明

[0023] 图1为复合菌株以氨氮为唯一氮源的生长特性图;

[0024] 图2为生物纳米硒强化复合菌株以氨氮为唯一氮源的生长特性图;

[0025] 图3为复合菌株以氨氮为唯一氮源的脱氮性能图;

[0026] 图4为生物纳米硒强化复合菌株以氨氮为唯一氮源的脱氮性能图;

[0027] 图5为复合菌株以硝态氮为唯一氮源的生长特性图;

[0028] 图6为生物纳米硒强化复合菌株以硝态氮为唯一氮源的生长特性图;

[0029] 图7为复合菌株以硝态氮为唯一氮源的脱氮性能图;

[0030] 图8为生物纳米硒强化复合菌株以硝态氮为唯一氮源的脱氮性能图;

[0031] 图9为生物纳米硒强化复合菌株去除含NH_4^+-N实际污水的能力图。

具体实施方式

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例和附图对本发明进行进一步的说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 本发明中的“巨大芽孢杆菌与鞘氨醇单胞菌YT甲橙、恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌”的购买公司为广东省广州市黄埔区科学城尖塔山路1号,广州市微生物研究所有限公司。

[0034] 以下实施实例中涉及到的氨氮、硝态氮和亚硝态氮的测定方法如下:

[0035] 氨氮采用测定纳氏试剂分光光度法(GB/T 7479-1987)测定;

[0036] 亚硝态氮采用盐酸萘乙二胺分光光度法(GB/T 7493-1987)测定;

[0037] 硝态氮采用紫外分光光度法(HJ/T 346-2007)测定;

[0038] COD采用快速密闭消解法(HJ 828-2017)测定;

[0039] TN采用检测碱性过硫酸钾紫外分光光度法(HJ 636-2012)测定。

[0040] 实施例1:生物纳米硒强化复合菌株培养

[0041] 异养硝化培养基:每升溶液中含有4.2g Na_2HPO_4,1.5g KH_2PO_4,0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1g葡萄糖,0.382g NH_4Cl。

[0042] 反硝化培养基:每升溶液中含有4.2g Na_2HPO_4,1.5g KH_2PO_4,0.1g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1g葡萄糖,0.72g $NaNO_3$。

[0043] LB培养基:每升溶液中含有10g胰蛋白胨,5g酵母提取物,10g NaCl。液体培养基和PBS均用去离子水配制,在使用前先经高压121℃湿热灭菌处理20min。

[0044] 1)巨大芽孢杆菌合成生物纳米硒:用100mL LB培养基接种巨大芽孢杆菌放入30℃和150rpm摇床培育24h至对数期。取10mL上述菌液加入90mL的LB培养,再加入2.2mL含有1g/L的Na_2SeO_3的母液,使Se浓度最终为20mg/L,透气封口膜扎口后,放入30℃和150rpm摇床继续培育24h,至培养基颜色由无色变为红色,培养基内亚硒酸钠全部被还原,视为培养完成,记为菌液A。

[0045] 2)生物纳米硒强化复合菌株的培育:将恶臭假单胞菌、杆状菌、戈登氏菌和鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合菌体分别转移到100mLLB培养基中,在33℃、转速为150rpm的条件下培养48h至对数期,8000r/min离心5min,收集菌体,用磷酸盐缓冲液洗涤1-2次并重悬菌体,按体积百分比计,分别取20%杆状菌,20%戈登氏菌,20%恶臭假单胞菌和40%鞘氨醇单胞菌YT甲橙混合,记为菌液B。按体积百分比计,将10%合成生物纳米硒的巨大芽孢杆菌菌液A与90%上述菌液B混合,则得到生物纳米硒强化复合菌株。

[0046] 3)未合成生物纳米硒的复合菌株的培育:用100mL LB培养基接种巨大芽孢杆菌放入30℃和150rpm摇床培育24h至对数期。按体积百分比计,将10%对数期巨大芽孢杆菌菌液与90%上述菌液B混合,则得到未合成生物纳米硒的复合菌株的培育。

[0047] 实施例2:生物纳米硒强化复合菌株针对含氨氮废水的应用

[0048] 取实施例1中所得到的生物纳米硒强化复合菌株与未合成生物纳米硒的复合菌株分别按1%体积比接入LB液体培养基中,在30℃、150rpm的摇床中培养24h后,8000r/min离心5min,收集菌体,用PBS磷酸盐缓冲溶液重悬菌体,按照10%(体积比)接种量接种在装有150mL异养硝化培养基中的锥形瓶中,放入30℃和150rpm摇床中。定时取样,测定菌液光密度(OD_{600}),氨氮(NH_4^+-N),亚硝态氮(NO_2^--N)和硝态氮(NO_3^--N)的浓度。根据OD_{600}值绘制菌体的生长曲线,如图1、2所示,菌体第12小时进入对数生长期,第43小时进入稳定期,生物纳米硒强化复合菌株OD600值最高可达到1.001,未合成生物纳米硒的复合菌株OD600值最高可达到0.980。如图4所示,对比图7未合成生物纳米硒的复合菌株,60小时后,菌株YT甲橙对氨氮的去除率更高可达74.5%,硝态氮有少量积累(8.43mg/L),亚硝态氮无明显积累,具有较强的去除氨氮的能力。相对与常规的硝化菌,该菌株可以完成硝化和反硝化的两个过程,实现氨氮的去除且无明显的硝态氮与亚硝态的积累,提高总氮的去除率。

[0049] 实施例3:生物纳米硒强化复合菌株针对含硝酸盐废水的应用

[0050] 取实施例1中所得到的生物纳米硒强化复合菌株与未合成生物纳米硒的复合菌株分别分别按1%体积比接入LB液体培养基中,在30℃、150rpm的摇床中培养24h后,8000r/min离心5min,收集菌体,用PBS磷酸盐缓冲溶液重悬菌体,按照10%(体积比)接种量接种在装有150mL好氧反硝化培养基中的锥形瓶中,放入30℃和150rpm摇床中。定时取样,测定菌液光密度(OD_{600}),氨氮(NH_4^+-N),亚硝态氮(NO_2^--N)和硝态氮(NO_3^--N)的浓度。根据OD_{600}值绘制菌体的生长曲线,如图5、6所示,两种复合菌株均在第6小时进入对数生长期,第43小时进入平台期,生物纳米硒强化复合菌株OD_{600}值最高可达到1.225,未合成生物纳米硒的复合菌株OD_{600}值最高可达到1.172。如图8所示,对比图7未合成生物纳米硒的复合菌株,生物纳米硒强化复合菌株在60小时后,降解硝态氮效果显著,去除率更高可达67.11%,亚硝态氮最高积累量为16.78mg/L,最终降低至6.94mg/L。

[0051] 实施例4:生物纳米硒强化复合菌株对于实际发酵类制药废水(含有氨氮、硝态氮)的应用

[0052] 取250mL发酵类制药废水于1L的容器中,得到废水初始氨氮为172.4mg/L,COD为490.8mg/L。加入10mL由实施例2中异养硝化培养基扩大培养至对数期的生物纳米硒强化复合菌株,置于室温下,利用曝气装置使溶解氧保持在2ppm以上。定时取样,离心去沉淀,检测上清液中的氨氮、亚硝态氮、硝态氮和COD浓度。如图9所示,生物纳米硒强化复合菌株能较好地适应实际发酵类制药废水,60小时后,氨氮去除率可达72.9%,COD去除率也能达到73.34%,过程中亚硝态氮无明显积累,硝态氮有少量的积累(10.95mg/L)。发酵制药过程中产生的废水具有COD浓度高、氮负荷高、C/N比低等特点,废液中的氮主要以有机氮和氨氮的形式存在,BOD_5/N一般在1～4之间,低于常规生物处理需求,且污水中常含有残留抗生素,其抑菌性给传统的生物污水处理工艺造成挑战,该复合菌株具有较高的耐受抗生素的能力,在应用于该种废水处理时,仍然具有高效的去除氨氮、总氮的效果,且相较于其他应用于抗生素废水的菌株,无明显的亚硝态氮与硝态氮的积累。

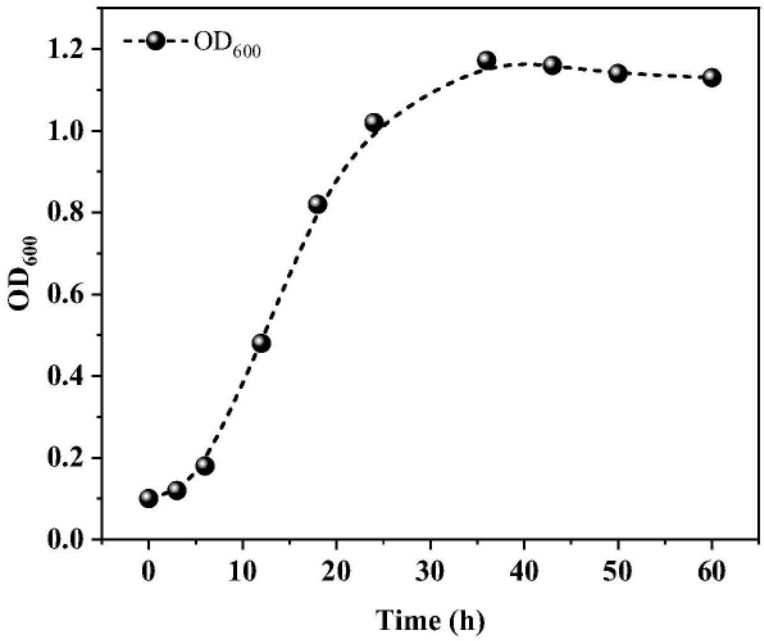

OD600
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD600
0
10
20
30
40
50
60
Time (h)

图1

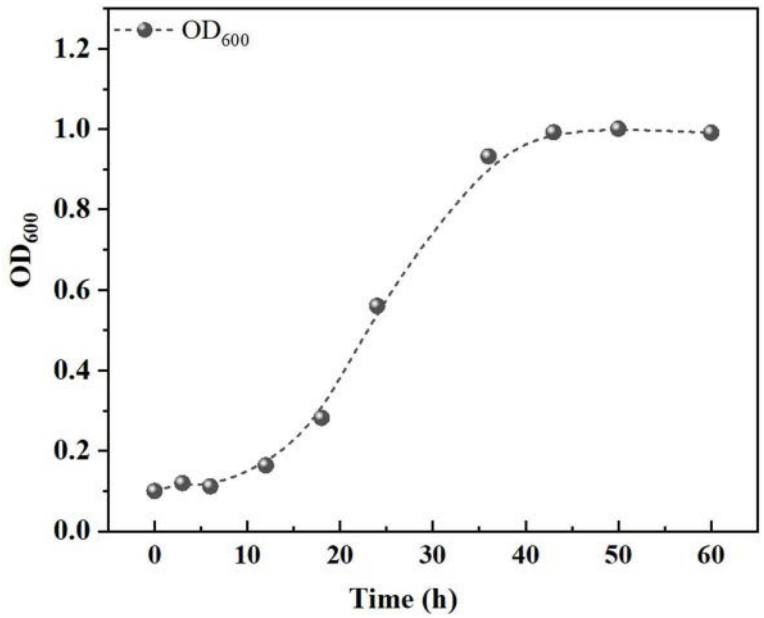

OD600
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD600
0
10
20
30
40
50
60
Time (h)

图2

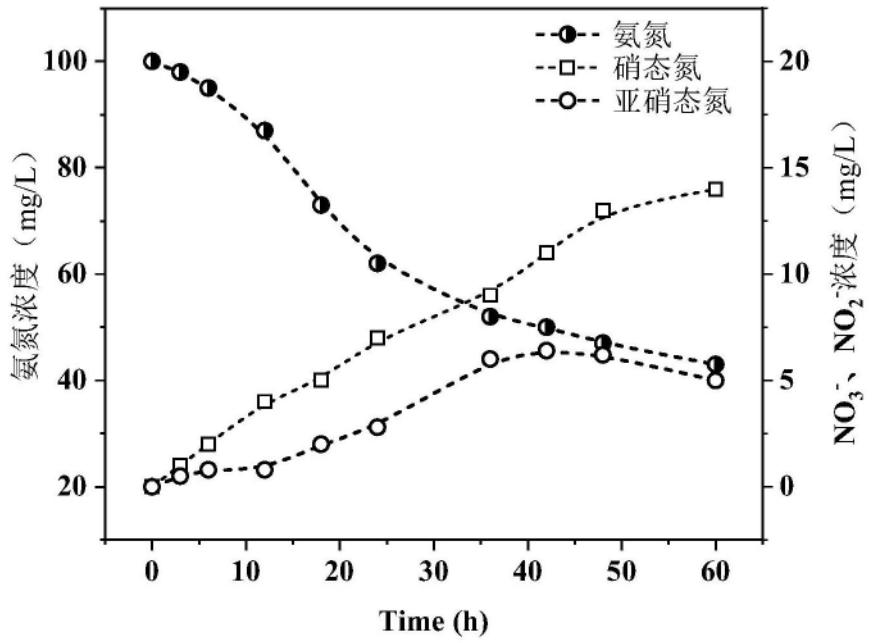

氨氮
硝态氮
亚硝态氮
氨氮浓度（mg/L）
NO_3^-、NO_2^-浓度（mg/L）
Time (h)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
15
5

图3

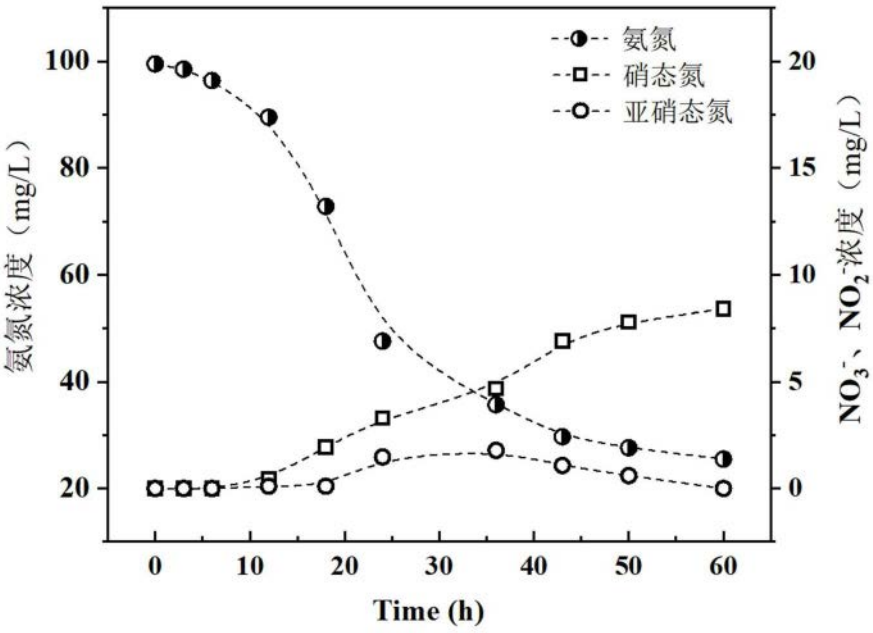

氨氮
硝态氮
亚硝态氮
氨氮浓度（mg/L）
NO_3^-、NO_2^-浓度（mg/L）
Time (h)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
15
5

图4

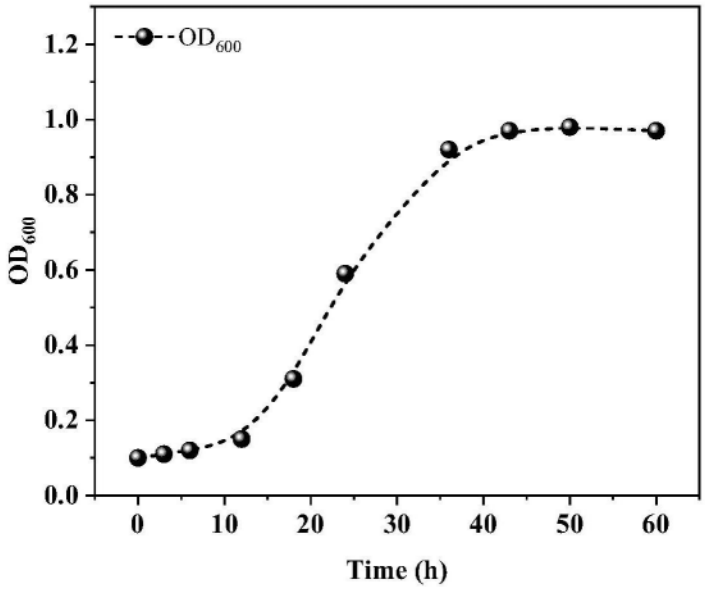

OD600
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD600
0
10
20
30
40
50
60
Time (h)

图5

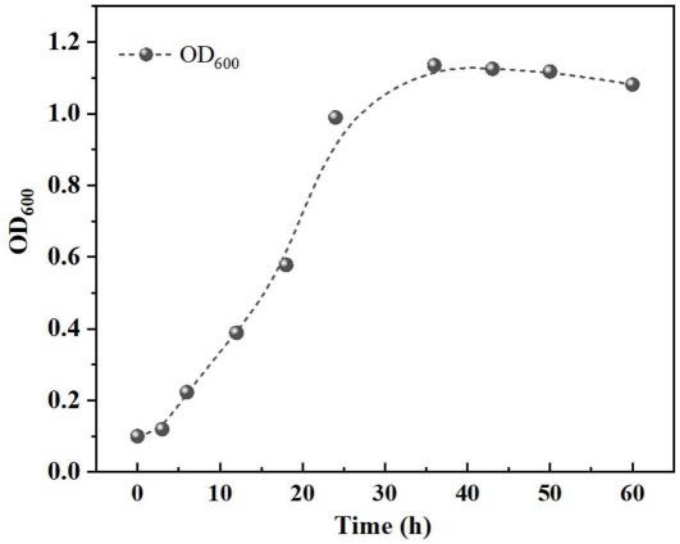

OD600
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OD600
0
10
20
30
40
50
60
Time (h)

图6

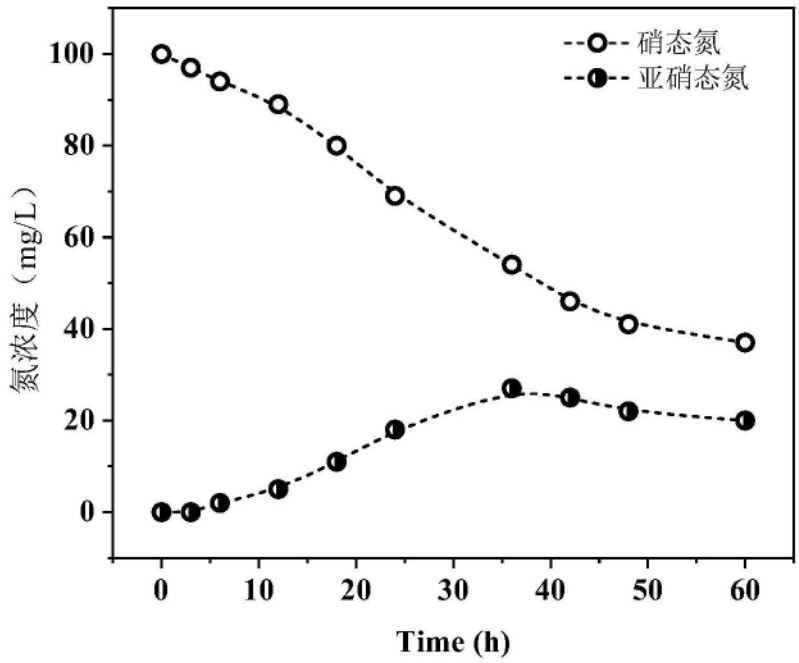

硝态氮
亚硝态氮
氮浓度（mg/L）
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
60

图7

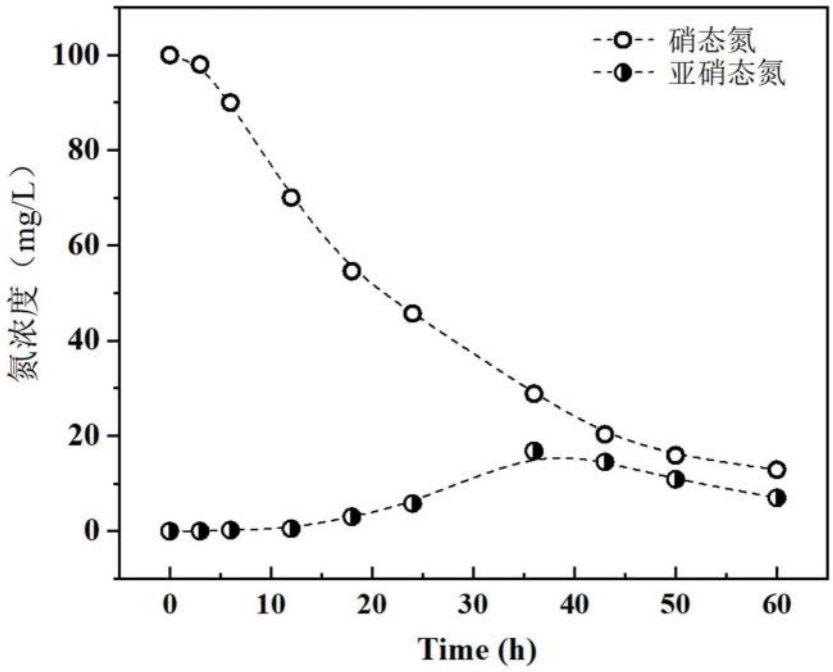

硝态氮
亚硝态氮
氮浓度（mg/L）
Time (h)
0
20
40
60
80
100
0
10
20
30
40
50
60

图8

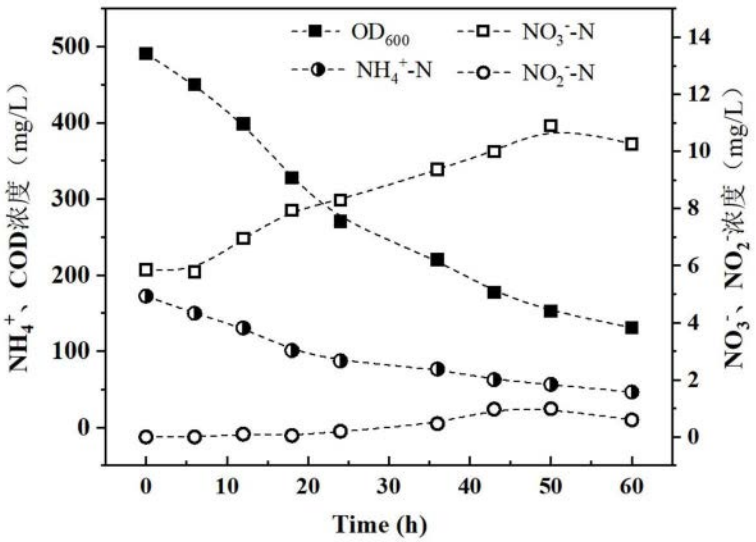

OD600
NO3-N
NH4+-N
NO2-N
NH4+、COD浓度（mg/L）
NO3-、NO2-浓度（mg/L）
Time (h)
0
100
200
300
400
500
0
2
4
6
8
10
12
14
0
10
20
30
40
50
60

图9