(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 5 月 22 日 (22.05.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/097994 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 11/14* (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/118165

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 29 日 (29.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811346777.8 2018年11月13日 (13.11.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 邓敬轩(DENG, Jingxuan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。阮文权(RUAN, Wenquan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。黄振兴(HUANG, Zhenxing); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。施万胜(SHI, Wansheng); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。单晓红(SHAN, Xiaohong); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(54) **Title:** SPHINGOBACTERIUM HAVING BOTH HETEROTROPHIC NITRIFICATION AND AEROBIC DENITRIFICATION FUNCTIONS AND APPLICATION THEREOF

(54) **发明名称:** 一株兼具异养硝化和好氧反硝化功能鞘氨醇杆菌及其应用

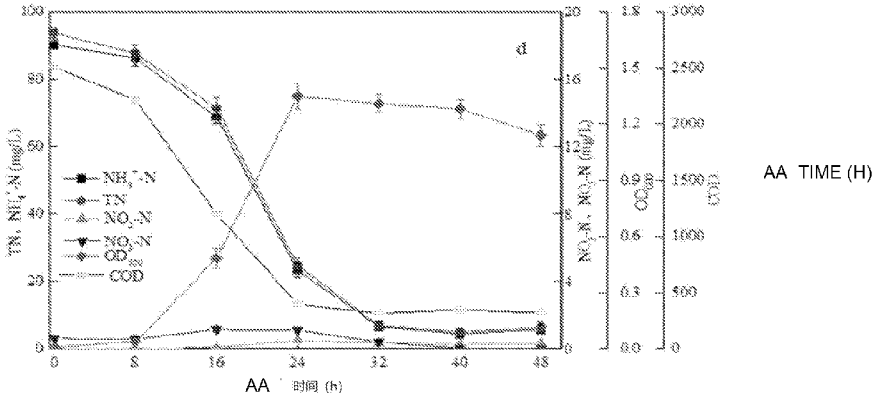


图 1

(57) **Abstract:** The invention provides a Sphingobacterium having both heterotrophic nitrification and aerobic denitrification functions and application thereof, in the technical field of biological engineering and environmental engineering. The sphingomyelin was deposited at the General Microbiology Center of the China General Microbiological Culture Collection Center on October 17, 2018, with a accession number of CGMCC No.16596. The strain has both heterotrophic nitrification and aerobic denitrification functions, and can be applied in the fields of nitrogen-containing wastewater treatment and river management. The removal rate for ammonia and nitrogen is greater than 90% and is pollution-free.

(57) **摘要:** 提供了一株兼具异养硝化和好氧反硝化功能鞘氨醇杆菌及其应用，属于生物工程、环境工程技术领域。所述鞘氨醇杆菌已于2018年10月17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，保藏编号为CGMCC No.16596，该菌株具有异养硝化、好氧反硝化特性，能够应用于含氮污水处理、河道治理领域，在对氨氮的去除率大于90%并对环境无污染。

WO 2020/097994 A1

[见续页]

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一株兼具异养硝化和好氧反硝化功能鞘氨醇杆菌及其应用

技术领域

本发明涉及一株兼具异养硝化和好氧反硝化功能鞘氨醇杆菌及其应用，属于生物工程、环境工程技术领域。

背景技术

河流、湖泊中氨氮含量超标常常导致水体富营养化，水中溶氧减少，这已成为我国水体污染的主要原因之一。水体中氨氮主要来源于农田化肥的使用，养殖业产生的动物粪便污水等等，这些污染物质通过地表径流进入湖泊河流带入大量的硝氮和氨氮，造成水体质量恶化和水生态环境结构的破坏。

传统的生物脱氮理论中，氨氮经自养硝化、亚硝化细菌逐步转化成亚硝态氮、硝态氮，再经反硝化菌作用转化成氮气从环境中去除。由于现实环境复杂，这两个部分在真实的生态系统中，是比较难实现的。

兼性异养硝化和好氧反硝化菌不仅仅能使硝化过程和反硝化成过程同步进行成为可能，而且生长速率远大于自养菌，大大缩短了生长周期，。硝化过程的产物可直接成为反硝化过程的底物，避免了硝化产物积累对硝化反应的抑制作用，大大提高生物脱氮效率。整个过程能保持酸碱相对平衡，反硝化作用的产物能够补充环境碱度，从而是使 pH 保持在一定范围之内。大部分兼性异养硝化和好氧反硝化菌环境适应性强，适合治理大面积污染水域。

目前，研究者对于兼性异养硝化和好氧反硝化菌的研究还很少，且仅有的一些研究也多是聚焦在其降解机理。因此，对兼性异养硝化和好氧反硝化菌的生理生化特性及脱氮效能进行深入研究是必要的，具有重要的理论和实际应用价值。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一株鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium sp.*），于 2018 年 10 月 17 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，保藏编号为 CGMCC No. 16596，保藏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。

本发明的第二个目的是提供含有鞘氨醇杆菌的微生物制剂。

在本发明的一种实施方式中，所述微生物制剂中鞘氨醇杆菌的活菌含量≥1×10^9 cfu/g。

在本发明的一种实施方式中，所述微生物制剂为生物微胶囊。

在本发明的一种实施方式中，所述生物微胶囊的制备方式为：（1）将活性炭 10-50g/L、壳聚糖 5-50g/L、海藻酸钠 10-50g/L 称量溶解并混合均匀，得到凝胶液；（2）将 50-100g 固态

菌体接入凝胶液中，得到菌体浓度为 1×10^{8}-1×10^{11}cfu/ml 的微生物凝胶液；（3）将微生物凝胶液按照 15-25 滴/分钟的速度滴入质量浓度为 1-50g/L 的 $CaCl_2$ 溶液中，得到微生物活性颗粒；（4）将微生物活性颗粒于 5%戊二醛溶液中在室温下交联 24 小时；（5）将（4）中交联后的微生物活性颗粒用无菌水浸泡 24-48 小时后，增殖得到鞘氨醇杆菌 BT1 生物微胶囊。

本发明的第二个目的是提供所述鞘氨醇杆菌的应用。

在本发明的一种实施方式中，所述应用包括降解河道、湖泊污染物或污水处理等。

在本发明的一种实施方式中，所述应用是对含氮污水进行处理。

在本发明的一种实施方式中，所述对含氮污水进行处理是将所述鞘氨醇杆菌 BT1 按终浓度 10~30 mg 菌体/L 污水投放至含氮污水中。

在本发明的一种实施方式中，所述鞘氨醇杆菌 BT1 以生物微胶囊的形式投放至水体中。

本发明还要求保护应用所述鞘氨醇杆菌 BT1 进行污水处理的装置设备，包括但不限于脱氮反应器、污水处理装置、人工湿地或反硝化池。

在本发明的一种实施方式中，所述设备更具体的，可以是高效脱氮反应器、一体化污水处理装置、污水处理厂反硝化池等。

本发明还要求保护用于污水处理过程的生物膜，所述生物膜以餐厨垃圾、植物秸秆或贝壳中的至少一种制备生物膜载体，负载所述的鞘氨醇杆菌。

有益效果：本发明提供了一株鞘氨醇杆菌，该菌株具有异养硝化、好氧反硝化特性，能够应用于含氮污水处理、河道治理领域，在对氨氮的去除率大于 90%并对环境无污染，达到快速生物脱氮、恢复河道自净能力的效果，在环境水处理领域具有重大意义。

生物材料保藏

一株鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium sp.*），于 2018 年 10 月 17 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，保藏编号为 CGMCC No. 16596，保藏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。

附图说明

图 1 为鞘氨醇杆菌 BT1 生长及氨氮降解曲线；

图 2 为鞘氨醇杆菌 BT1 对硝氮降解变化曲线图；

图 3 为鞘氨醇杆菌 BT1 对亚硝氮降解变化曲线图；

图 4 为 amoA 基因验证的凝胶电泳图；其中，Marker：DL2000（100bp~2000bp）；1：基因片段：amoA；

图 5 为 nirK 基因验证的凝胶电泳图；其中，Marker：DL2000（100bp~2000bp）；1：基因

片段为 nirS；2：基因片段为 nirK。

具体实施方式

异养硝化培养基（g/L）：$(NH_4)_2SO_4$ 0.47, $C_4H_4Na_2O_4$ 5.62，维氏盐溶液 50 ml，C/N=10，pH=7.0，琼脂 2%。

维氏盐溶液(g/L)：K_2HPO_4 5.0，$MgSO_4•7H_2O$ 2.5 ，NaCl 2.5，$MnSO_4•4H_2O$ 0.05，$FeSO_4•7H_2O$ 0.05。

好氧反硝化培养基：硝酸盐培养基：KNO_3 2g，柠檬酸钠 5 g，K_2HPO_4 1g，KH_2PO_4 1g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g，微量元素溶液 2mL，补充蒸馏水至 1 L，pH7.2-7.5

亚硝酸盐培养基：$NaNO_2$ 2g，柠檬酸钠 5 g，K_2HPO_4 1g，KH_2PO_4 1g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2g，微量元素溶液 2mL，补充蒸馏水至 1 L，pH7.2-7.5

微量元素溶液：EDTA 50.0g，$ZnSO_4$ 2.2g，$CaCl_2·2H_2O$ 5.5g，$MnCl_2·4H_2O$ 5.06g，$FeSO_4·7H_2O$ 5.0g，（NH_4）$6Mo_7O_2·4H_2O$ 1.1 g，$CuSO_4·5H_2O$ 1.57 g，$CoCl_2·6H_2O$ 1.61g，补蒸馏水至 1L，pH 6.0

实施例 1

垃圾渗滤液好氧发酵罐运行稳定的某周期的活性污泥作为分离用泥。在异养硝化培养基上，采用稀释混合平板法进行分离获得纯种鞘氨醇杆菌 BT1 菌株。提取菌株鞘氨醇杆菌 BT1 的基因组，进行 16S rDNA 测序。将测序结果与 Genbank 数据库中的已知序列进行相似度对比，结果显示，菌株鞘氨醇杆菌 BT1 与鞘氨醇杆菌属（Sphingobacterium）序列同源性最高，鉴定为鞘氨醇杆菌。

实施例 2 鞘氨醇杆菌（Sphingobacterium）鞘氨醇杆菌 BT1 氨氮降解能力测定

将鞘氨醇杆菌（Sphingobacterium）鞘氨醇杆菌 BT1 活化富集培养后，移取 1ml 悬浊液至含有 100ml 不含琼脂的异养硝化培养基中，在 30℃，160rpm/min 条件下培养 48 小时。每隔 8 小时取培养液。取部分培养液在 600nm 处测定鞘氨醇杆菌 BT1 的生长曲线，然后剩余培养液经 0.22μm 微孔滤膜过滤，检测滤液氨氮、亚硝氮、硝氮和 COD 等指标。结果如表 1 及图 1 所示。

表 1 鞘氨醇杆菌 BT1 对氨氮降解速率的变化

时间 h	氨氮 mg/L	总氮 mg/L	亚硝态氮 mg/L	硝态氮 mg/L	OD600	COD mg/L
0	90.21312	93.77625	0.00412	0.61231	0.01	2512
8	86.21868	87.62116	0.00228	0.58407	0.04	2216
16	68.84966	71.39245	0.0935	1.17453	0.484	1204
24	23.29157	24.71647	0.49641	1.12041	1.349	401
32	6.77677	7.01747	0.36946	0.41037	1.31	318
40	4.49886	5.11547	0.30636	0.05265	1.281	352

48	5.92711	6.49512	0.31231	0.05161	1.14	322

由表 1 OD_{600} 指标可以得到菌株的生长曲线。菌株只需要经过 8 h 的迟缓期就可进入指数期，在 24 h 内，OD 值从 0.01 达到了 1.349，24h 后进入稳定期，与常见的硝化细菌生长周期相比，缩短了 24-48 小时。

在 40 h 内，氨氮从 90.21mg/L 降至 4.49mg/L，氨氮降解率达到 95.01%，总氮从 93.77mg/L 降至 5.11mg/L，总氮的降解率为 94.65%。

需要注意的是，48 小时内，亚硝氮含量从 0 mg/L 积累至 0.3mg/L，硝氮从 0.6mg/L 降低至 0.05mg/L，表明鞘氨醇杆菌 BT1 具有积累亚硝氮的和降解硝氮的能力，由此我们推测鞘氨醇杆菌 BT1 可能具有好氧反硝化的能力。

与常见的硝化细菌或者厌氧反硝化细菌相比，鞘氨醇杆菌 BT1 兼具异养硝化和好氧反硝化功能，硝化过程和反硝化过程可同时进行，硝化的产物可直接作为反硝化的底物。从表 1 可以看出，鞘氨醇杆菌 BT1 生长周期短，24 小时内即可达到平台期，生长速率远大于自养硝化菌；环境适应力强，对高浓度氨氮的耐受力强。

实施例 3 鞘氨醇杆菌（Sphingobacterium）BT1 好氧反硝化能力测定

（1）采用硝酸盐培养基对鞘氨醇杆菌 BT1 的反硝化性能进行筛选和表征。

将鞘氨醇杆菌（Sphingobacterium）BT1 活化富集培养后，移取 1ml 悬浊液至含有 100ml 不含琼脂的硝酸盐培养基或亚硝酸盐培养基中，在 30℃，160rpm/min 条件下培养，每隔 8 小时取培养液分别测定细菌浓度（OD_{600}）、硝氮、亚硝氮。

表 2 鞘氨醇杆菌 BT1 对硝氮降解变化

时间 h	亚硝态氮 mg/L	硝态氮 mg/L	OD_{600}
0	0	240.42	0
20	0	263.7188	0.013
27	0.097	279.33	0.009
46	1.32	275.43	0.011
52	2.74	278.36	0.029
68	7.09	265.67	0.123
80	38.67	149.92	0.934
100	39.1	133.32	0.836
172	40.59	149.43	0.518

从表 2 及图 2 可知，鞘氨醇杆菌 BT1 在第 46 小时开始生长，在 80 小时达到峰值。在 100 小时内，硝态氮从 240.42mg/L 下降至 133.32mg/L，硝态氮降解率为 44.5%，亚硝酸盐从 0 累积至 40.59mg/L，表明鞘氨醇杆菌 BT1 对硝态氮的去除率较好，具有较强的反硝化功能。

（2）采用亚硝酸盐培养基对鞘氨醇杆菌 BT1 的反硝化性能进行筛选和表征。在硝酸盐培养基的基础上，将其中的硝酸钾替换为亚硝酸钠。

表 3 鞘氨醇杆菌 BT1 对亚硝氮降解变化

时间 h	亚硝态氮 mg/L	硝态氮 mg/L	OD600
0	439.86	80.27	0
20	444.690	82.81225	0.021
27	465.71	89.646	0.030
46	448.73	83.59	0.214
52	434.99	76.75	0.434
68	390.52	59.187	0.692
80	381.63	59.96	0.580
100	375.97	53.134	0.521

从表 3 和图 3 中可以看出，菌种在接种后第 27 小时开始生长，在 68 小时达到顶峰。在 100 小时内，亚硝氮含量从 439.86mg/L 降至 375.97mg/L，亚硝酸盐含量下降了 14.5%，硝态氮从 80.27mg/L 降至 53.13mg/L，含量下降了 33.8%。

综合鞘氨醇杆菌 BT1 降解硝酸盐和亚硝酸盐的效果，可以得出，鞘氨醇杆菌 BT1 以硝酸盐或亚硝酸盐为氮源时，会有一个 25-40 小时的潜伏期，菌株的对数生长期为 12-22 小时，30 小时后开始进入稳定期和衰亡期。鞘氨醇杆菌 BT1 可以单纯利用硝酸盐或者亚硝酸盐作为氮源，达到脱氮的效果，从而证明鞘氨醇杆菌 BT1 具有较强的反硝化功能。

实施例 4 鞘氨醇杆菌（Sphingobacterium）鞘氨醇杆菌 BT1 好氧反硝化能力测定

（1）采用 PCR 验证鞘氨醇杆菌 BT1 中是否存在硝化功能基因 amoA 。引物序列如下：

amoA1F（5’-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3’）；

amoA2R（5’-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3’）

反应条件：95℃ 3min；94℃ 1min，54.5℃ 45s，72℃ 1min，35 个循环；72℃，10min；PCR 产物使用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 4 所示：

PCR 产物为 491bp 大小的条带，经测序，与 amoA 基因序列一致，由此可以确认鞘氨醇杆菌 BT1 中存在 amoA 基因，具有硝化功能。

（2）反硝化功能基因 Nir：Nir 基因分为两种，分别是 nirK 和 nirS。nirK 基因编码 Cu 型亚硝酸盐还原酶，另一种 nirS 基因编码细胞色素还原酶。需要注意的是，这两种编码基因不会同时存在于同一株菌中。采用 PCR 验证鞘氨醇杆菌 BT1 中是否存在 nirK 和 nirS 基因。引物序列如下：

nirS -cd3aF(5’-GTSAACGTSAAGGARACSGG)

nirS-R3cd(5’-GASTTCGGRTGSGTCTTGA)

nirK-F1aCu (5’- ATCATGGTSCTGCCGCG)

nirK-R3Cu (5’-GCCTCG ATCAGRTTGTGGTT)

反应条件：95℃ 10min；95℃ 30s，56℃ 30s，72℃ 30s，35 个循环；72℃，10min；PCR

产物使用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 5 所示。

从图中可以看出，菌株鞘氨醇杆菌 BT1 中不存在 nirS 基因，存在 nirK 基因。即表明鞘氨醇杆菌 BT1 中存在 Cu 型亚硝酸盐还原酶，基因型与其表现出来的好氧反硝化功能吻合。

实施例 5

鞘氨醇杆菌 BT1 在异养硝化培养基上培养 24 小时后，按照 1%的体积比例投入 DN 反应器中，DN 反应器为高效脱氮反应器，内有布水系统和三相分离器等核心构建，并设定高径比＞2，可控参数为 HRT，当 HRT 设定为 48h 时，反应器运行参数如下：

污泥浓度（g/L）		8
氨氮（mg/L）	进水	2000
	出水	35
TN（mg/L）	进水	2500
	出水	200
COD（mg/L）	进水	8000
	出水	700
回流比		1000%
SV_{30}（污泥沉降性能）		100%
HRT		48h
DO（mg/L）		＜1

以上参数表明，鞘氨醇杆菌 BT1 在实际应用中能够高效的去除氨氮，，在 48 小时内，氨氮含量从 2000mg/L 降低至 35mg/L， 去除速率达到了 40.9 mg/L*h，同时，总氮（TN）含量在 48h 内从 2500mg/L 降低至 200mg/L， COD 从 8000mg/L 降低至 700mg/L，总氮和 COD 的降解率分别达到了 92%和 91.25%。DO 始终保持在小于 1mg/L，这表明鞘氨醇杆菌 BT1 对溶氧的浓度要求低，适应性强，特别适用于治理富营养化、高氨氮水体。

实施例 6 菌株鞘氨醇杆菌 BT1 在含氮污水处理方面的应用

在使用鞘氨醇杆菌 BT1 对南京某污水处理厂含氮污水处理实验中，按照 20ppm 的浓度在好氧池前端流加鞘氨醇杆菌 BT1 菌液。48 小时内，氨氮含量从 20mg/L 降低至 5mg/L，氨氮去除率达到了 75%，日处理污水量可达到 55000-60000m^3，表明鞘氨醇杆菌 BT1 用于处理大规模污水时，可以有效的减少含氮污水中的氨氮浓度。

实施例 7 菌株鞘氨醇杆菌 BT1 在微生物固定化方面的应用

将鞘氨醇杆菌 BT1 菌株与生物载体结合，制备成一种适用于河道水体并能缓慢释放的固定化微生物。

制备固定化菌株的步骤为：

菌株的发酵培养;采用液体发酵的方式在机械搅拌式发酵罐中进行鞘氨醇杆菌 BT1 的纯培养，培养基为异养硝化液体培养基。在 30℃下进行纯培养达到 12-48 小时后，得到高浓度

的鞘氨醇杆菌 BT1 纯培养菌液，菌液活菌计数在 1×10^{8}-1×10^{11}cfu/ml。

固态菌体的制备：菌株发酵结束后 ，离心去除发酵液，得到固态菌体。

生物载体的制备及固定化：（1）将活性炭 10-50g/L、壳聚糖 5-50g/L、海藻酸钠 10-50g/L 称量溶解并混合均匀，得到凝胶液。（2）将 50-100g 固态菌体接入凝胶液中，得到菌体浓度为 1×10^{8}-1×10^{11}cfu/ml 的微生物凝胶液。（3）将微生物凝胶液按照 15-25 滴/分钟的速度滴入质量浓度为 1-50g/L 的 $CaCl_2$ 溶液中，得到微生物活性颗粒。（4）将微生物活性颗粒于 5%戊二醛溶液中以 1:50 在室温下交联 24 小时。（5）将（4）中交联后的微生物活性颗粒用无菌水浸泡 24-48 小时后，增殖得到鞘氨醇杆菌 BT1 生物微胶囊。

获得的鞘氨醇杆菌 BT1 生物微胶囊在 30 天内的释放量达 85%以上，菌存活率大于 5%，有效活菌数经过验证后达到 10^{9}cfu/g。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一株鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium sp.*），于 2018 年 10 月 17 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，保藏编号为 CGMCC No. 16596，保藏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。

2、含有权利要求 1 所述鞘氨醇杆菌的微生物制剂。

3、根据权利要求 2 所述的微生物制剂，其特征在于，鞘氨醇杆菌的活菌含量≥1×10^9 CFU/g。

4、根据权利要求 2 所述的微生物制剂，其特征在于，鞘氨醇杆菌的活菌含量≥1×10^9 CFU/mL。

5、根据权利要求 2 或 3 所述的微生物制剂，其特征在于，所述微生物制剂为生物微胶囊。

6、根据权利要求 4 所述的微生物制剂，其特征在于，所述生物微胶囊包含有壳体以及壳体内部芯材；壳体材料包括但不限于海藻酸钠凝胶；壳体内部芯材包括但不限于氯化钙溶液，所述壳体内部芯材中分散有 1×10^8~1×10^{11}CFU/mL 所述鞘氨醇杆菌的细胞。

7、根据权利要求 6 所述的微生物制剂，其特征在于，所述生物微胶囊的制备方式为：（1）将活性炭 10-50g/L、壳聚糖 5-50g/L、海藻酸钠 10-50g/L 混合，得到凝胶液；（2）将菌体与凝胶液混合，得到菌体浓度为 1×10^8-1×10^{11}cfu/ml 的微生物凝胶液；（3）将微生物凝胶液滴入质量浓度为 1-50g/L 的 $CaCl_2$ 溶液中，得到微生物活性颗粒；（4）将微生物活性颗粒于 5%戊二醛溶液中在室温下交联；（5）将步骤（4）交联后的微生物活性颗粒用无菌水浸泡，增殖得到鞘氨醇杆菌 BT1 生物微胶囊。

8、权利要求 1 所述的鞘氨醇杆菌在化工、环境领域降解河道、湖泊污染物或污水处理方面的应用。

9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述污水是含氮污水。

10、根据权利要求 8 或 9 所述的应用，其特征在于，所述污水包括生活污水、工业废水、垃圾渗滤液。

11、一种污水处理方法，其特征在于，将权利要求 1 所述的鞘氨醇杆菌按终浓度 10~30 mg 菌体/L 污水投放至污水中。

12、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述鞘氨醇杆菌以生物微胶囊的形式投放至水体中。

13、应用权利要求 1 所述菌株进行污水处理的装置设备。

14、根据权利要求 13 所述的设备，其特征在于，所述设备包括脱氮反应器、污水处理装置、人工湿地或反硝化池。

15、根据权利要求 14 所述的设备，其特征在于，所述设备为高效脱氮反应器。

16、根据权利要求 14 所述的设备，其特征在于，所述设备为一体化污水处理装置。

17、根据权利要求 14 所述的设备，其特征在于，所述设备为污水处理厂反硝化池。

18、用于污水处理过程的生物膜，其特征在于，含有权利要求 1 所述的鞘氨醇杆菌。

19、根据权利要求 18 所述的生物膜，其特征在于，以餐厨垃圾、植物秸秆或贝壳中的至少一种制备生物膜载体。

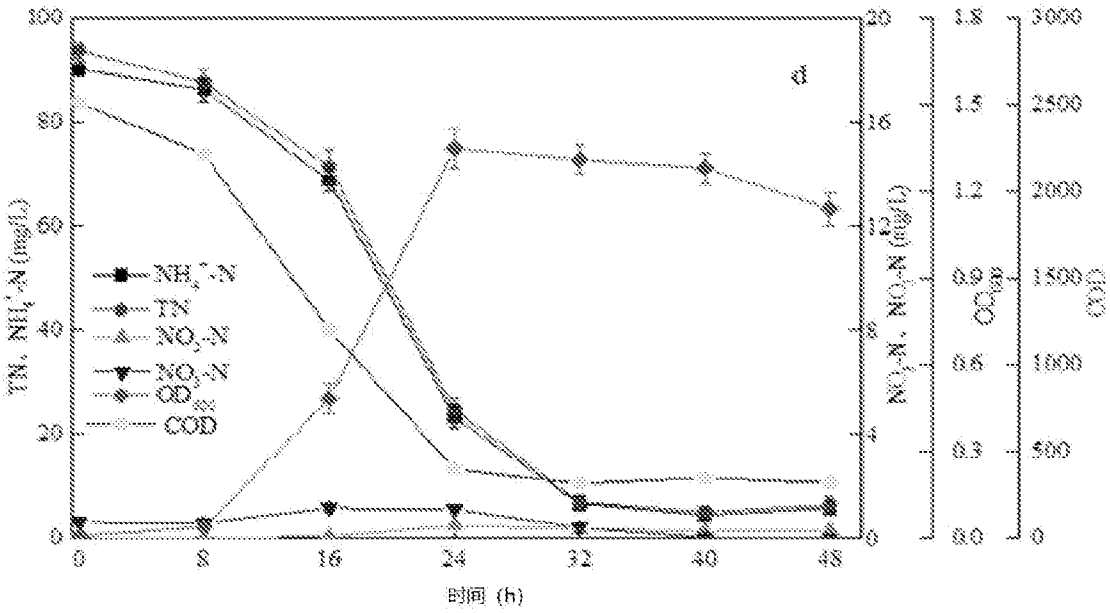

d
TN, NH_4^+-N (mg/L)
NO_2-N, NO_3-N (mg/L)
OD_{600}
COD (mg/L)
NH_4^+-N
TN
NO_2-N
NO_3-N
OD_{600}
COD
时间 (h)

图 1

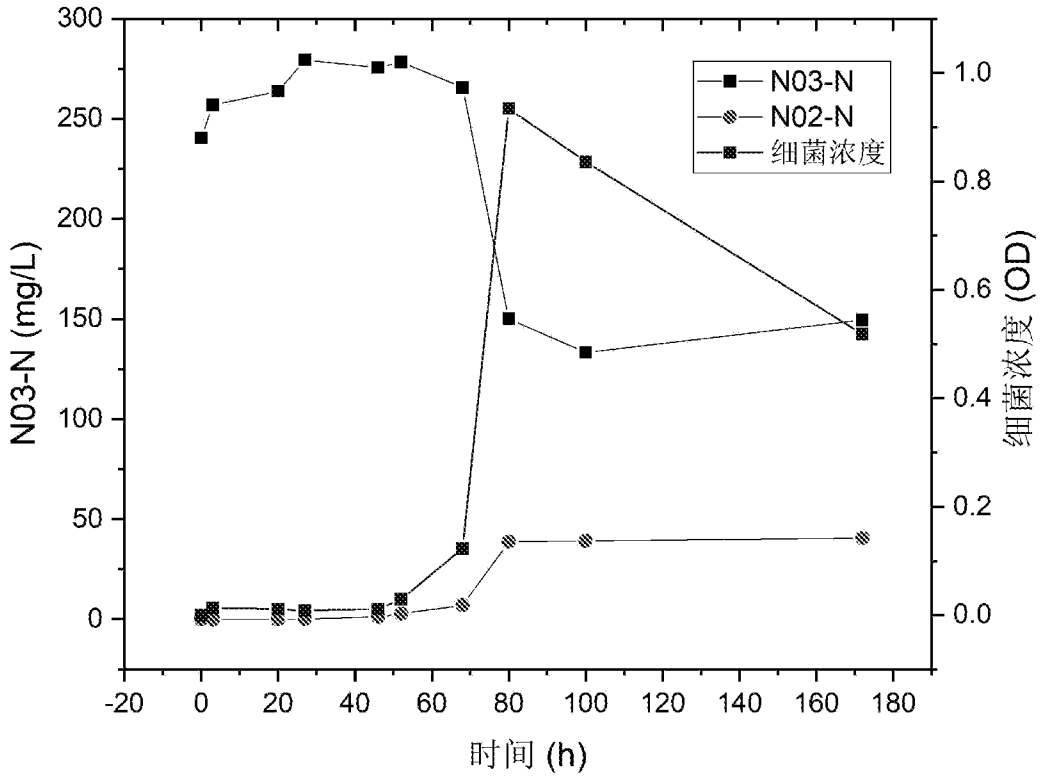

N03-N
N02-N
细菌浓度
N03-N (mg/L)
细菌浓度 (OD)
时间 (h)

图 2

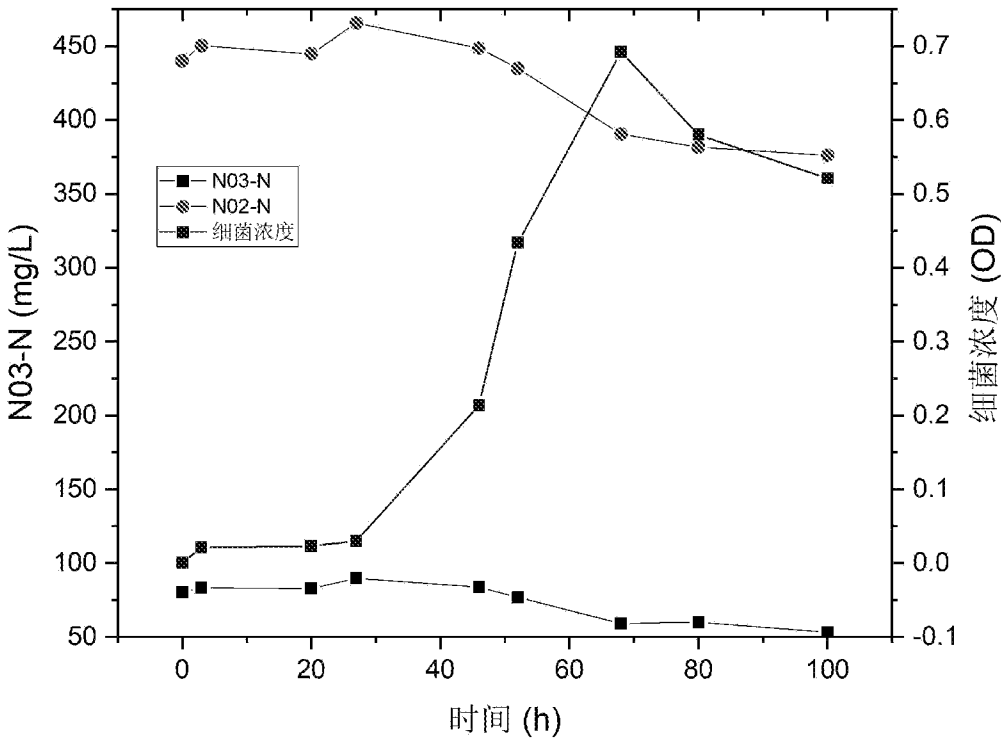

N03-N
N02-N
细菌浓度
N03-N (mg/L)
细菌浓度 (OD)
时间 (h)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
0
20
40
60
80
100

图 3

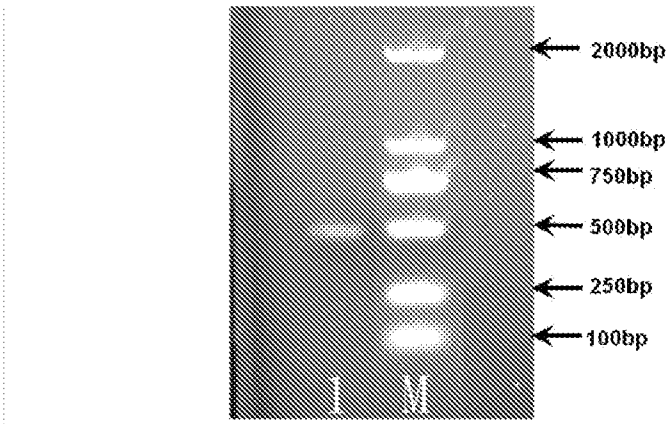

2000bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp

图 4

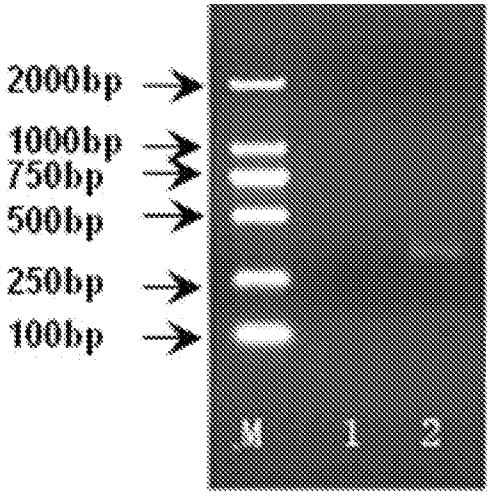


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C02F 3/34(2006.01)i; C12N 11/10(2006.01)i; C12N 11/14(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C02F; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, PUBMED; Search Terms: 鞘氨醇杆菌, 降解, 氮, 氨氮, 污水, 废水, sphingobacterium sp., degrade, degradation, nitrogen, ammonia nitrogen, wastewater, waste water, sewage, effluent, liquid waste,对申请人和发明人进行检索, a search is carried out on the applicant and inventor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	项宏伟 (XIANG, Hongwei). "生物强化与固体碳源结合处理小城镇低碳源污水及其微生物群落动态变化分析 (Study on the Treatment of Low Carbon Source Wastewater and its Microbial Community Dynamics in Small Towns by Bioaugmentation and Solid Carbon Sources)" *中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-Text Database, Engineering Science & Technology I),* No. no. 06, 15 June 2018 (2018-06-15), abstract, page 14, paragraph 1, pages 42-43, section 3.3 and page 66, paragraphs 1-2	1-19
A	CN 101580309 A (IBIDEN CO., LTD.) 18 November 2009 (2009-11-18) see entire document	1-19
A	JP 2010158649 A (YAN, S.C.) 22 July 2010 (2010-07-22) see entire document	1-19
A	KR 20160041361 A (OIKOS CO., LTD.) 18 April 2016 (2016-04-18) see entire document	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 February 2019	**06 March 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118165

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101580309	A	18 November 2009	CN	101031637	A	05 September 2007
				CN	101580309	B	27 March 2013
				CN	101580308	A	18 November 2009
JP	2010158649	A	22 July 2010		None		
KR	20160041361	A	18 April 2016	KR	101636849	B1	07 July 2016

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/118165

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; C02F 3/34(2006.01)i; C12N 11/10(2006.01)i; C12N 11/14(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C02F; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, CNKI, 百度学术, PUBMED 检索词：鞘氨醇杆菌，降解，氮，氨氮，污水，废水，sphingobacterium sp., degrade, degradation, nitrogen, ammonia nitrogen, wastewater, waste water, sewage, effluent, liquid waste, 对申请人和发明人进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	项宏伟. "生物强化与固体碳源结合处理小城镇低碳源污水及其微生物群落动态变化分析" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技Ⅰ辑, 第06期, 2018年 6月 15日 (2018-06-15), 参见摘要，第14页第1段，第42-43页第3.3节，第66页第1-2段	1-19
A	CN 101580309 A (揖斐电株式会社) 2009年 11月 18日 (2009-11-18) 参见全文	1-19
A	JP 2010158649 A (YAN SUN CHAN) 2010年 7月 22日 (2010-07-22) 参见全文	1-19
A	KR 20160041361 A (OIKOS CO LTD) 2016年 4月 18日 (2016-04-18) 参见全文	1-19

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 2月 15日	2019年 3月 6日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 于婷 电话号码 010-62411103

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118165

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101580309	A	2009年 11月 18日	CN	101031637	A	2007年 9月 5日
				CN	101580309	B	2013年 3月 27日
				CN	101580308	A	2009年 11月 18日
JP	2010158649	A	2010年 7月 22日		无		
KR	20160041361	A	2016年 4月 18日	KR	101636849	B1	2016年 7月 7日