



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102703361 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 23

(21) 申请号 201210201976. 6

C12R 1/38(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 19

C02F 101/16(2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CCTCCM2011430 2011. 11. 27

(56) 对比文件

CN 1834031 A, 2006. 09. 02, 全文.

(73) 专利权人 山东大学

地址 250061 山东省济南市历下区经十路
17923 号

王爱平等. 人工湿地硝化与反硝化细菌分布研究. 《环境科技》. 2010, 第 23 卷 (第 1 期), 全文.

(72) 发明人 裴海燕 胡文容 纪雁

陈朋等. 一株反硝化细菌 LZ214 的筛选及其脱氮特性. 《山东大学学报》. 2009, 第 39 卷 (第 5 期), 全文.

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司 37221

代理人 李健康

审查员 王超

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C02F 1/52(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

C02F 3/28(2006. 01)

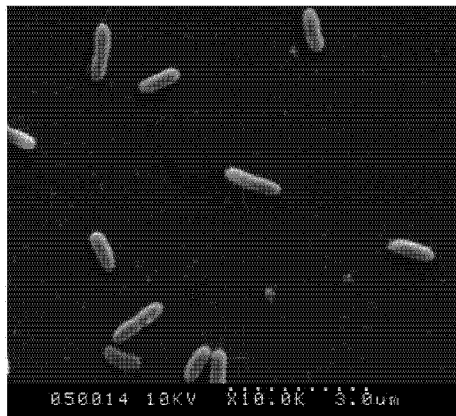
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一株具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌及其用途

(57) 摘要

本发明为一株具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌, 该菌株命名为 *Pseudomonas stutzeri* LZ-4, 属于施氏假单胞菌种, 保藏编号为 CCTCCM2011430。本发明的菌株能够应用于废水脱氮, 其最佳脱氮温度在 20 ~ 35℃。该菌株适应的 pH 值范围广, 在 pH6 ~ 11 之间。当 C/N(mol/mol) 比值大于等于 3 时, 该菌株的脱氮率达 90% 以上。该菌株在微溶氧的环境条件下, 脱氮活性最高。反硝化的终产物气体鉴定为氮气, 能够将水体中硝氮、亚硝氮等无机氮直接还原为无害的氮气排出水体。该菌株在发挥反硝化作用的后期, 开始聚集形成絮体并沉淀在废水的底部。通过对此菌株的性能检测可以看出, 使用该菌株处理含氮废水工艺简单, 处理效果高效稳定, 且不会产生 NO、N₂O 等温室气体, 不会造成空气污染。



CN 102703361 B

1. 一株用于废水脱氮的具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌,其特征在于:该菌株命名为 *Pseudomonas stutzeri* LZ-4,属于假单胞菌属的施氏假单胞菌,已于2011年11月27日保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为:CCTCCM2011430。

2. 权利要求1所述的具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌在废水脱氮中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:脱氮条件为:温度 $20 \sim 35^{\circ}\text{C}$, pH $6.0 \sim 11.0$, C/N ≥ 3 ,溶解氧浓度 $\leq 0.5\text{mg/L}$ 。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:脱氮条件为:温度 25°C , pH $7.0 \sim 9.0$, C/N为3,溶解氧浓度在 0.5mg/L 以下。

5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:具体应用方式为:

(1)用LB培养基活化菌株:将斜面培养基上保存的施氏假单胞菌LZ-4用接种环刮取1环菌苔,接种入装有100mL LB培养基的250mL锥形瓶中, 30°C 摇床震荡培养培养12h,即可获得菌液;

(2)将上述菌液接种于待处理的含氮废水中,投加量为受处理废水体积的10%, pH值 $6.0 \sim 11.0$,室温静置培养。

一株具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一株具有自絮凝能力的兼性厌氧反硝化细菌及其用途,属于环境微生物领域。

背景技术

[0002] 随着工农业生产的发展和人们生活水平的提高,我国含氮污染物的排放量迅速增加,大小水体成为这些污染物的“收容所”,水体质量急剧恶化。目前,全国各地已经建立起了一大批废水生物处理工程,有效地遏制了水质污染持续恶化的势头。但是,污水二级处理后的排放水含氮量依然较高,俨然成为一个严重的环境污染源。在二级生化处理后出水中氨氮和硝态氮是氮的主要存在形式。氮素污染会对水环境以及人们的生产生活造成严重的危害,主要表现在:(1)加速水体的富营养化;(2)增加给水处理的困难;(3)消耗水体中的溶解氧;(4)对水生生物有毒害作用。因此,必须加大对污水中氮素的治理。

[0003] 对于氮素污染的治理,生物脱氮是最经济有效的治理技术。生物脱氮技术通常由硝化工艺和反硝化工艺组成。硝化工艺以去除氨氮为主,虽然能够把氨氮转化为硝酸盐,但是不能彻底将氮素从水体中除去;反硝化工艺则能从根本上消除水体氮素对环境的污染。反硝化作用是反硝化细菌以硝态氮或亚硝态氮为终端电子受体,在反硝化酶系的作用下通过电子传递,将硝态氮或亚硝态氮逐步还原为氮气的过程。从 NO_3^- 还原到 N_2 的脱氮反应通常由以下四步

[0004] 组成: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

[0005] 一般在缺氧的情况下,兼性厌氧反硝化菌首选硝酸盐进行其呼吸作用,将 NO_3^- -N 还原为 N_2 ,生化反应式为:

[0006] $\text{NO}_3^- + 6\text{H}^+ + 5\text{e}^- = 1/2\text{N}_2(\text{g}) + 3\text{H}_2\text{O}$

[0007] 反硝化细菌是反硝化作用发生的主体,探明反硝化细菌的种属及特性,搞清它们的营养条件和环境条件,将有助于废水生物脱氮工艺的研究、开发和应用。

[0008] 细菌的反硝化是在各种还原酶的催化作用下完成的,各反应酶系的活性高低受温度、pH 值、溶解氧、C/N 比等条件的影响。理论上讲,反硝化作用要求 C/N 为 4.6 (质量比),但由于细胞的生长繁殖也会消耗溶解性有机碳,实际情况下,要求 $\text{C/N} > 4.6$ 。因此,多数情况下,可溶向有机碳成为水环境中反硝化作用的限制因子。pH 值也是影响反硝化速率和反硝化终产物的一个重要的环境因子。对反硝化细菌的生长来说,最佳 pH 值为 6.5 ~ 7.5。在此 pH 范围内,反硝化速率最大,当 pH 值不在最佳范围时,反硝化速率降低。废水生物处理中的反应温度,对微生物的生长、繁殖关系密切,温度支配着酶反应动力学、微生物生长速度以及化合物的溶解度等,因而对污染物的降解转化起着关键作用,溶解氧(DO)的存在对反硝化过程有很大影响。如果反应器的溶解氧过多,将会对反硝化菌的异化作用发生抑制作用。因此考察温度、pH、溶解氧、C/N 比等因素对反硝化菌株发挥高效反硝化活性的影响,进而获得高效反硝化菌株,实现废水高效经济脱氮,对解决日益严重的水环境氮素污染问题具有重要意义。

[0009] 许多细菌具有将硝酸盐还原为亚硝酸盐的酶,可实现第一步转化,但要完成彻底脱氮,则要求细菌必须具有完整的反硝化酶系。探明反硝化细菌是否具有完整又高效的反硝化酶系是采用生物反硝化工艺脱氮的先决条件。

[0010] 好氧颗粒污泥 (Aerobic Granular Sludge, AGS) 是通过微生物自凝聚作用形成的直径 0.5-6mm 的边界清晰的球形或椭球形污泥,具有不易发生污泥膨胀、抗冲击能力强、能承受高有机负荷,集不同性质的微生物(好氧、兼氧和厌氧微生物)于一体等优点。AGS 在降解有机碳的同时,具有脱氮除磷的功能。但由于 AGS 系统内絮凝细菌不足,形成颗粒污泥的时间较长,如在 SBAR 反应器中培养 AGS 需 1.5 ~ 3 个月时间,这极大地限制了 AGS 的应用。本发明细菌在具有完全反硝化酶系的同时具有自絮凝作用,能够很好地促进颗粒污泥的生成,缩短启动周期,同时强化颗粒污泥对废水中氮的去除,提高去污能力,降低运行成本。因此,将本发明菌株应用于 AGS 工艺中,可实现废水高效脱氮,为解决日益严重的含氮废水对环境的污染问题作出贡献。

发明内容

[0011] 针对以上问题,本发明的目的是提供一株具有自絮凝能力的高效兼性厌氧反硝化细菌,该细菌具有完整的反硝化酶系,能够彻底脱除水体中的氮素,不产生 NO、N₂O 等有害气体。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种培养条件,使该细菌能够表现出更强的异养反硝化活性。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种培养条件,使该细菌表现出完整的反硝化活性。

[0014] 本发明可以通过以下技术方案实现:

[0015] 本发明中的菌种是一株兼性厌氧反硝化细菌,该菌株命名为 *Pseudomonas stutzeri* LZ-4,属于施氏假单胞菌,已于 2011 年 11 月 27 日保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为:CCTCCM2011430。其菌学特征为:细胞呈短杆状,菌落浅褐色、皱褶、致密、无光泽、边缘呈放射状、不整齐。适宜温度在 20 ~ 35℃ 的微氧条件下进行脱氮,最佳 C/N (mol/mol) 为 3,适合的 pH 值范围为 6.0 ~ 11。在脱氮过程中,无亚硝酸盐积累。

[0016] 该菌株能够有效脱除水体中的氮元素,适用于较高浓度亚硝酸盐或硝酸盐废水的处理;并且该菌株在脱氮的过程中具有自絮凝能力,适用于在传统活性污泥系统中强化污泥脱水性;因此该菌株具有更加广泛的适用性。其最佳脱氮条件为:温度 20 ~ 35℃, pH 6.0 ~ 11.0,最佳 C/N 为 3,溶解氧为微溶氧条件(< 0.5mg/L)。

[0017] 具体应用时,使用方法为:

[0018] (1) 使用前用 LB 培养基活化菌株:将斜面培养基上保存的施氏假单胞菌 LZ-4 用接种环刮取 1 环菌苔,接种入装有 100mL LB 培养基的 250mL 锥形瓶中,30℃ 摇床震荡培养 12h,即可获得菌液。

[0019] (2) 将活化后的菌液接种于待处理的含氮废水中,投加量为受处理废水体积的 10%,pH 值范围在 7.0 ~ 9.0 之间,室温静置培养,定时取样检测水样中硝氮去除情况及亚硝酸盐的积累情况。

[0020] (3) 检测方法

[0021] COD_{Cr}:重铬酸钾法;

- [0022] TN:过硫酸钾氧化-紫外分光光度法;
- [0023] NO_3^- -N:紫外分光光度法;
- [0024] NO_2^- -N:N-(1-萘基)-乙二胺光度法。
- [0025] OD值:采用UV-2450紫外分光光度计(Shimadzu),在波长600nm下测定培养液的OD值。
- [0026] 本发明的菌株是从南四湖芦竹植物根际土壤中筛选得到的一种具有高效脱氮活性的反硝化细菌,可以通过反硝化作用脱除水体中的亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。经实验研究表明,该菌株具有自絮凝能力,在脱氮的同时形成菌胶絮体;另外,该菌株具有完全的反硝化能力,能够将硝态氮逐步还原为氮气排出水体,适用于较高浓度亚硝酸盐或硝酸盐废水的处理,具有更加广泛的适用性。使用该菌株处理废水工艺简单,脱氮彻底,效果稳定,节约运行成本。
- [0027] 本发明中的脱氮是指水体中无机氮的去除,无机氮是指 NH_4^+ 、 NO_3^- -N和 NO_2^- -N。
- [0028] 本发明中的C/N比是指碳元素与氮元素的物质的量之比。
- [0029] 本发明中的微溶氧条件是指废水在静置且接触空气的条件下,溶解氧浓度在0.5mg/L以下。
- [0030] 本发明的菌株具有以下优点:
- [0031] (1)本发明菌株具有自絮凝能力,能够形成菌胶絮体,在活性污泥系统中能够促进颗粒污泥的生成,提高污泥的脱水性。
- [0032] (2)本发明菌株具有完全的反硝化酶系,能够将硝态氮直接还原为氮气,实现彻底脱氮且不污染空气。
- [0033] (3)本发明菌株的适宜pH值宽泛,为6.0~11.0。
- [0034] (4)本发明菌株具有非常高的反硝化活性,适用于较高浓度亚硝酸盐或硝酸盐废水的处理。

附图说明

- [0035] 本发明的菌株命名为*Pseudomonas stutzeri* LZ-4,属于施氏假单胞菌,已于2011年11月27日保藏于中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为:CCTCCM2011430。
- [0036] 图1:施氏假单胞菌LZ-4菌体的扫描电镜照片。
- [0037] 图2:温度对施氏假单胞菌LZ-4脱氮活性的影响。
- [0038] 图3:pH值对施氏假单胞菌LZ-4脱氮活性的影响。
- [0039] 图4:C/N比对施氏假单胞菌LZ-4脱氮活性的影响。

具体实施方式

- [0040] 实施例1 本发明菌株的分离鉴定:
- [0041] (1)培养基:
- [0042] A、菌株分离、纯化、保藏培养基(/L):
- [0043] CH_3COONa , 2g; 蛋白胨, 15g; 酵母膏, 3g; 葡萄糖, 1g; NaCl , 6g; 琼脂, 12g; KNO_3 , 1.5g; pH控制在7.0~7.2。
- [0044] B、菌株筛选、脱氮培养基(DM:Denitrifying Medium) (/L):

[0045] CH_3COONa , 2g ; KH_2PO_4 , 0.4g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6g ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.07g ; KNO_3 , 1g ; Tris 缓冲液 12mL ; 微量元素 2mL ; pH 控制在 7.0 ~ 7.2。

[0046] C、LB 培养基(/L) :

[0047] 蛋白胨, 10g ; 酵母膏, 5g ; 氯化钠, 10g ; pH 控制在 7.5。

[0048] (2) 施氏假单胞菌 LZ-4 菌株的分离、纯化 :

[0049] 称取 10g 芦竹根际土壤样品置于 250mL 三角瓶中, 加 100mL 无菌水及几粒玻璃珠, 摇床振荡 15min 使土样分散均匀。待土样分散后, 静置 5min 后, 吸取 1mL 土壤悬液至 9mL 稀释液(无菌水), 得到 10^{-2} 稀释度悬液, 依次按 10 倍稀释法稀释至 10^{-7} , 由此制得各稀释度土壤悬液。

[0050] 分别吸取各稀释度悬液 0.1mL 至反硝化细菌分离用固体培养基平板(已放置过夜, 无杂菌生长), 用玻璃刮刀将土壤悬液涂布均匀。之后将平板倒置, 放入 30℃ 恒温培养箱, 培养至长出明显菌落。

[0051] 挑取单菌株, 在平板上多次划线纯化本发明中的施氏假单胞菌 LZ-4, 直至显微镜下观察显示无杂菌为止, 此时可认为菌株已纯化完毕。分离出的菌株在含有硝酸盐的固体培养基上生长良好, 具有潜在的反硝化特性, 接种至斜面培养基保存备用。

[0052] (3) 施氏假单胞菌 LZ-4 的硝酸盐还原产气试验

[0053] 为了解本发明菌株的反硝化能力和特性, 对本发明菌株进行硝酸盐还原产气试验。

[0054] 接种 : 于小试管(规格 : 15mm × 100mm) 中加入 10mL 灭菌的反硝化液体培养基, 用接种环挑取纯化后的菌落 1 环至小试管中, 搅拌混匀。之后加入 1mL 的灭菌后的液体石蜡封口。以未接种菌株的试管作为空白对照。制作完毕后将所有试管一同置入 30℃ 恒温培养箱静置培养。培养一段时间后, 观察发现石蜡与培养基之间有气泡生成, 证明本发明菌株具有反硝化能力。

[0055] (4) 施氏假单胞菌 LZ-4 的菌落形态特征 :

[0056] 在培养基 A 上培养 2 天后, 菌落呈浅褐色、圆形、表面皱褶无光泽、致密、边缘呈放射状不整齐。

[0057] (5) 施氏假单胞菌 LZ-4 的菌体形态特征 :

[0058] 扫描电镜观察表明菌体呈短杆状, 360nm ~ 450nm × 1000nm ~ 1360nm。

[0059] (6) 16S rDNA 的 PCR 扩增与测序 :

[0060] 实验仪器 : 小型离心机(Eppendorf, 转速 >12000r/min) ; 电泳仪(北京六一仪器厂) ; PCR 热循环扩增仪(Eppendorf) ; 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

[0061] 实验方法 : 从菌株 LZ-4 的新鲜斜面上直接挑取菌体, 加入至含 100 μ L 双蒸水的离心管中, 旋涡混匀后, 热裂解菌悬液, 以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA, 扩增引物为一对通用引物。

[0062] 正向引物为 27F : 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ;

[0063] 反向引物为 1492R : 5' -GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

[0064] PCR 反应在 50 μ L 体系中进行。反应体系的组成为 : 模板 DNA (50ng/μ L) 2 μ L ; dNTP 混合物 4 μ L ; Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L ; 正向引物 2 μ L ; 反向引物 2 μ L ; 双蒸水 34.75 μ L。

[0065] PCR 扩增条件:95℃变性 5min;95℃ 30s,55℃ 45s,72℃ 1min30s,循环 30 次;72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶对菌株的 16S rDNA 扩增产物做电泳检测,验证后切下胶条,用 DNA 凝胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)纯化 PCR 产物。回收后的 PCR 扩增产物委托山东省农科院高新技术中心进行测序。

[0066] (7) 16S rDNA 序列分析与系统发育分析:

[0067] 测序后得到 LZ-4 菌株的 16S rDNA 长度为 1408bp 的序列,提交到 Genbank 与其他菌株进行比对(登录号为 JQ268625),发现菌株 LZ-4 与 *Pseudomonas stutzeri* 的进化距离最为接近,确定其属于假单胞菌属,初步认定其为施氏假单胞菌,命名为 *Pseudomonas stutzeri* LZ-4。

[0068] 实施例 2 本发明菌株的培养

[0069] (1) 所使用的培养基

[0070] A、菌株保藏培养基(/L):蛋白胨,5g;酵母膏,3g;葡萄糖,1g;NaCl,6g;琼脂,12g;KNO₃,1.5g;pH 控制在 7.0~7.2。

[0071] B、菌株反硝化培养基(DM:Denitrifying Medium)(/L):CH₃COONa,2g;KH₂PO₄,0.4g;MgSO₄·7H₂O,0.6g;CaCl₂·2H₂O,0.07g;KNO₃,1g;Tris 缓冲液 12mL;微量元素 2mL;pH 控制在 7.0~7.2。

[0072] 上述培养基使用前,121℃,灭菌 20 分钟。

[0073] (2) 培养条件

[0074] 将在保藏培养基斜面上保存的施氏假单胞菌 LZ-4 用接种环刮取 1 环菌苔,接种入装有 100mL 已灭菌的 LB 培养基的 250mL 锥形瓶中,30℃ 恒温振荡培养 12h,即可获得种子液。实验时,按 10% 的接种量将种子液接种于反硝化培养基或是废水中。

[0075] 实施例 3 本发明菌株的最佳脱氮条件

[0076] 将 100mL 已灭菌的反硝化培养基装入 250mL 三角瓶中,按照 10% 的接种量接入种子菌液,静置培养。在 20~30℃ 范围内,施氏假单胞菌 LZ-4 能够去除 95% 的总氮,在 25℃ 时总氮去除率最高,达 97%。本发明菌株能够适应比较宽泛的 pH 值,在 pH6~11 之间,能够将约 150mg/L 的总氮降到 10mg/L 以下,且没有亚硝酸盐积累。本发明菌株的最适 C/N(mol/mol) 比为 3,当 C/N ≥ 3 时,总氮的去除率能达 90% 以上。静置培养的微溶解氧环境(DO ≤ 0.5mg/L) 最适合于本发明菌株反硝化活性的发挥。

[0077] 实施例 4 本发明菌株具有完全的反硝化酶系

[0078] 在 1L 的三角瓶中装满接种了 10% 种子液的反硝化培养基,密封瓶口,室温下静置培养。用气体收集袋收集实验过程中释放的气体,然后通过气象色谱质谱联用分析仪(GC-MS) 分析气体成分。结果显示该气体分子量为 28,且与氮气的相似度最高,推断该气体为 N₂,无其他气体。证明本发明菌株具有完全的反硝化酶系,能够将硝态氮直接还原为 N₂,能够发挥完全的反硝化活性,没有 NO、N₂O 等有毒有害中间产物气体的生成。因此,本菌株更适宜于工程应用。



图 1

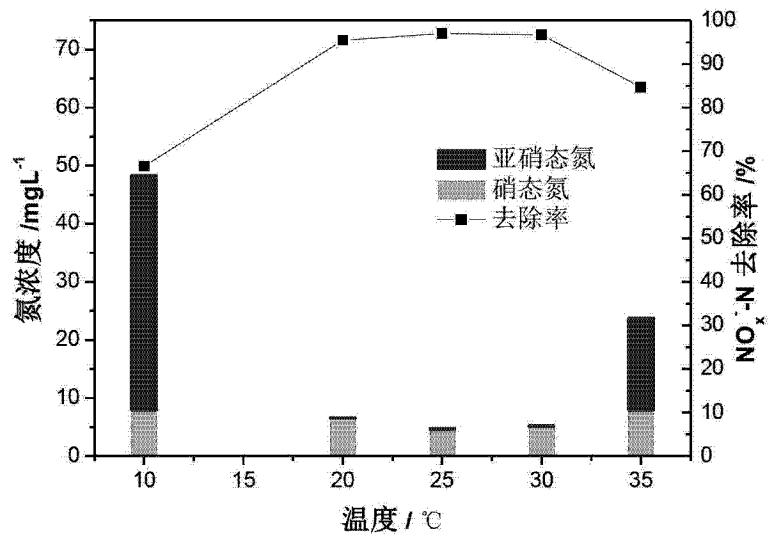


图 2

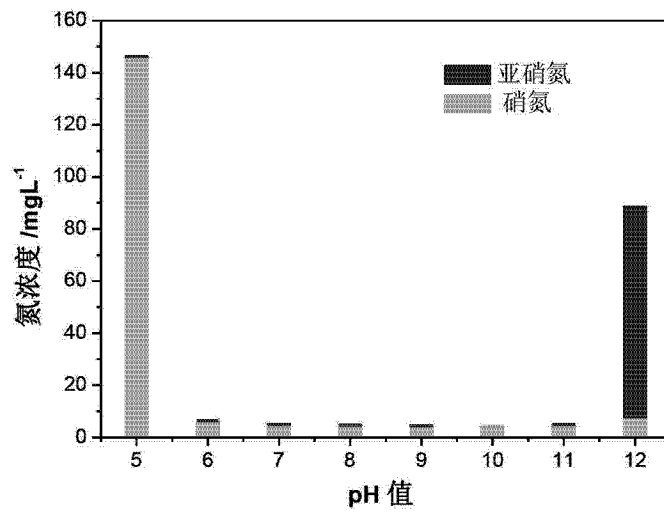


图 3

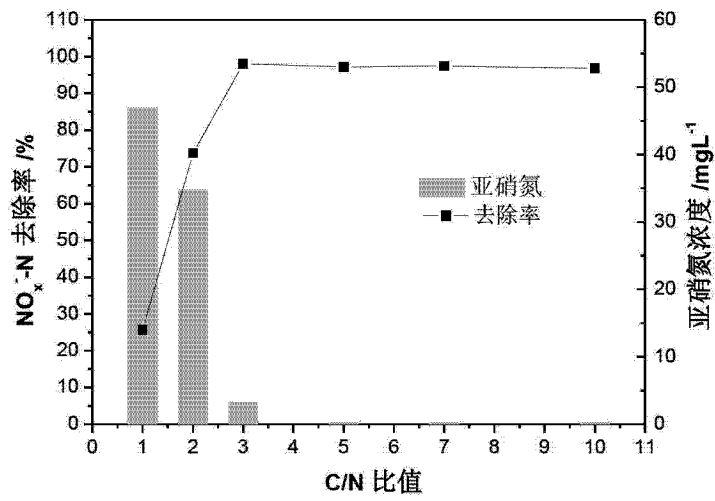


图 4