



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1768131 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200380110277. X

(22) 申请日 2003. 12. 09

(30) 优先权数据

10/393, 380 2003. 03. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005. 10. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2003/005878 2003. 12. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02004/083411 EN 2004. 09. 30

(73) 专利权人 科学工业研究委员会

地址 印度新德里

(72) 发明人 丽塔·库马拉 德帕·卡契儒·蒂库

浦那姆·莎伦玛

(74) 专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限

公司 31211

代理人 丁纪铁

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006. 01)

*C02F 3/34* (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020100729 A1, 2002. 08. 01, 全文.

US 20010054586 A1, 2001. 12. 27, 全文.

WO 0192162 A1, 2001. 12. 06, 全文.

审查员 奚静

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

一种菌株及一种减少总溶解固体的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种入藏登记号为 MTCC 5098 的菌株, 该菌株可用于减少纸浆废水的总溶解固体 (TDS); 本发明还涉及一种菌株接种体的制备方法及利用上述菌株减少纸浆废水中总溶解固体 (TDS) 的方法。

1. 一种菌株,入藏登记号为 MTCC 5098,可用于降低纸浆废水中的总溶解固体 (TDS) 水平。

2. 一种利用权利要求 1 所述菌株降低纸浆废水中的总溶解固体 (TDS) 水平的方法,包括如下步骤:

a) 将所述菌株接种于纸浆废水以获得细胞泥浆,

b) 在 37°C、100rpm 下培养所述细胞泥浆,

c) 使用改进的 TDS 方法检测纸浆废水的 TDS 水平,该改进的 TDS 方法具体如下:

为检测 TDS 的下降水平,抽取 70ml 处理作分析;抽取的样品,放入用三次蒸馏水漂净的干燥洁净的离心管 7000rpm 离心 20 分钟,温度是 4°C;上清液立刻收集在干燥洁净的容器中,该容器预先用三次蒸馏水清洗,然后用 0.45 μ 的微孔过滤器过滤,再用干净并预先漂净的量筒量取 25ml 过滤液后放入一洁净、过夜干燥且预先称重过的烧杯中;再用 20ml 蒸馏过三次的水漂净量筒,然后再量取同量的过滤液加入已装有样品的烧杯中;重复以上步骤处理所有样品,然后将烧杯放入干烤箱中在 180±2°C 下进行干烤;干燥后,把烧杯转移到真空干燥器中冷却 45 分钟到 1 小时,至室温后称重;TDS(mg/l) 按如下公式计算:TDS(mg/l) = (A-B)/样品体积,其中,A = 烧杯和干燥的滤出液最终重量,B = 未装入样品的烧杯的初始重量。

## 一种菌株及一种减少总溶解固体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种入藏登记号为 MTCC 5098 B11 的菌株,该菌株可用于减少纸浆废水的总溶解固体(TDS, Total dissolved solids);本发明还涉及菌株接种体的制备方法以及利用上述菌株减少纸浆废水的总溶解固体的方法。

### 背景技术

[0002] 纸浆行业是高费水行业,在每吨纸的生产中都需耗费大量水。令人关注的是,在生产过程中大约 70% 的用水流失,而这些流出的水不再是可以生产利用的清洁水。取而代之,这些水含有大量从原材料和生产过程中使用的化学物质所产生的有机物和无机物。因而水源就承受着急剧上升的污染压力。由于以上原因,纸浆业的废水问题吸引了全世界的环境保护论者及人们的注意。

[0003] 生化需氧量(BOD)和化学需氧量(COD)分别是废水的生物可降解及化学可氧化部分的指标。对这些指标进行定期监控可说明废水的排放量。

[0004] 总溶解固体(TDS)是一个反映所述的纸浆废水中溶解物的指标,溶解物包括有机物和无机物(APHA, 20<sup>th</sup> ed.)。总溶解固体是指化学物的溶解浓度,其反映了废水的毒性程度,因而也反映了整体污染程度。然而,由于缺乏适当的工艺技术,这个指标被长久的忽略了。

[0005] 废水中的总溶解固体(TDS)应当被定期检测,因为这些物质同时改变着接收水体的质量和组成,会在多方面造成危害,包括审美问题。溶解固体会直接影响诸如接收水体的水硬度、重金属含量、致癌性等很多指标,从而会引发该水体的生态失衡并降低生活用水的质量。最近一个在泰国湄公(Nam Phong)河的调查表明,该河深受附近的凤凰纸浆公司排出的污水影响,并且据报道很多河里的鱼被污水毒死。对该河水体的检测表明除 BOD 和 COD 指标外,TDS 含量指标也非常高(Immuong, 1998)。因此,虽然到目前为止监控机构似乎仍不重视该指标(TDS),但高指标对环境的影响却是复杂的。

[0006] 由于纸浆厂在生产中使用多种原材料和化学物质,在这些厂排出的废水中出现了这些化学物质的不同形式,并构成了溶解固体。有机溶解化合物主要由氯化物组成,并以氯化木质素的衍生物、氯化酚醛塑料、氯化树脂酸如松香酸(abietic acid)或松酯酸(pimaric acid)等的形式出现。有机卤化物(通常是有机氯化物)会污染排出水,该有机卤化物被称作可吸收有机卤化物(AOX, Adsorbable Organic halide)(berry, 1992)。除了上述氯化物外,不饱和脂肪酸、可降解氧化纤维素和碳水化合物也促成了 TDS 指标的升高。

[0007] 在无机溶解化合物成分中,自由氯离子、硫酸盐、硫化物、碳酸盐、碳酸氢盐构成了主要的阴离子,而钙、镁、铝、铁及其他重金属离子构成了主要的阳离子。所有这些有机和无机的溶解固体使 TDS(mg/l) 提高到一个非常高的水平。在印度,印度标准局(BIS)规定可排放入河流的废水 TDS 上限是 2100mg/l。然而,如果彻底检测,纸浆污水并不符合上面的标准,尽管事实上是如果 TDS 水平超过 1200mg/l 即是对生态系统有害(USEPA)。但因为目前可用的 TDS 减少技术并不能有效的大幅度减少 TDS,政府部门只得不降低最高标准。

[0008] 目前可用的 TDS 减少技术严格的说在本质上属于物理化学方法,主要技术为反渗透法 (RO)、反向电渗析法 (EDR) 和离子交换法。

[0009] 反渗透法 (RO):是一种物理方法,即利用流水压力使其通过半透膜来去除污染物。这种方法需要仔细研究未净化的水的特性并预先防止膜被污垢堵塞、生水垢或其他膜退化现象。建立和操作这项技术相对昂贵,需要经常性对膜进行监测和维护,并保持水流严格的压强、温度和 PH 值以适应膜的容许强度。

[0010] 反向电渗析法 (EDR):是一种电气化学方法,即利用具有离子选择功能的半透膜使离子移动到两端带电的膜表面。EDR 通过使用有规律转换电极性的方法来释放聚集在膜表面的离子。但是 EDR 不适合用于分离高浓度的 Fe、Mn、H<sub>2</sub>S、氯或高硬度的污水,并且该方法仅适用于 TDS 在 3000mg/l 以下的污水净化。

[0011] 离子交换法 (Ion Exchange):依据各组分的离子电荷不同,离子交换树脂可以沉积溶解成分,降低 TDS 浓度。但是这种离子交换树脂的再使用问题会加重经济负担。

[0012] 所有这些物理化学技术都有经济性、再使用性、适用范围等主要缺陷。如何处理这些固体废物仍然悬而未决,因为这些方法没有彻底消除 TDS,只不过是把这些固体废物以其他形式堆积在其他地方罢了。

[0013] 纸浆业的污水在性质和成分上与其他污水明显不同,因此这种污水中的溶解固体也与其他污水不同。尽管生物处理方法通常优于物理化学方法,通常的生物处理方法并不能有效减少纸浆业污水中的 TDS。通过以上方法,整个污染程度也无法顾及到,因为这些污水都缺少氮和磷,所以 ETP 的处理人员在处理污水时只能加入辅助营养剂,如尿素、磷酸等。过度使用这些营养剂会使氮过度富余。因此,处理过的污水通常不仅含有固体物质而且含有过度的营养剂,会使接收水体过度营养化 (DMEHIA, 1999)。

[0014] 由于以上原因,很有必要开发一种既可减少 TDS 水平,又便宜且环保的生物处理方法。一般认为从自然界分离出的细菌,可以用来降低污水中的 TDS 水平。最初发明人研究了多种菌团,后来又观察到单一的细菌也可达到同样效果。

[0015] 发明目的

[0016] 本发明的主要发明目的是分离出一种新的菌株。

[0017] 本发明的另一个主要发明目的是分离出一种新菌株,该菌株可降低纸浆业排放污水的 TDS 水平。

[0018] 本发明的另一个主要发明目的是提供一种新的生物方法,该方法用于纸浆厂降低废水 TDS 水平的需氧处理中。

[0019] 本发明的另一个发明目的是提供一种方法,该方法使用权利要求 1 中的菌株以降低纸浆污水的 TDS 水平。

[0020] 本发明的另一个发明目的是提供一种新的菌株接种体的制备方法。

[0021] 本发明的另一个发明目的是提供一种分离出的好氧菌,该菌可减少纸浆厂污水的 TDS。

## 发明概要

[0022] 本发明涉及一种入藏登记号为 MTCC 5098 的菌株,该菌株可用于减少纸浆废水的总溶解固体 (TDS);本发明还涉及一种菌株接种体的制备方法及利用上述菌株减少纸浆废

水中总溶解固体 (TDS) 的方法。

[0023] 本发明的详细描述

[0024] 如前所述,本发明涉及一种入藏登记号为 MTCC 5098 的菌株,该菌株可用于减少纸浆废水的总溶解固体;本发明还涉及一种菌株接种体的制备方法及利用上述菌株减少纸浆废物中总溶解固体的方法。

[0025] 在本发明的一个方面,提供了一种入藏登记号为 MTCC 5098 的菌株,该菌株可用于减少纸浆废水的总溶解固体。

[0026] 在本发明另一方面,提供了一种方法,该方法利用权利要求 1 所述的菌株减少纸浆废水中的总溶解固体,包括如下步骤:

[0027] • 在排水槽中植入菌株以获得细胞泥浆,

[0028] • 在 37°C 及 100rpm 的环境下培育细胞泥浆,

[0029] • 使用改进的 TDS 方法估计水平。

[0030] 在本发明另一方面,利用所述方法在大约 48 小时内 TDS 减少了 4.0 到 12.2。

[0031] 在本发明另一方面,排污槽单位面积内生物的数量比率为 1 : 20 到 1 : 1。

[0032] 在本发明的另一方面,利用所述方法在大约 24 小时内 TDS 含量减少了 10.1%。

[0033] 在本发明的另一方面,当排污槽单位面积内生物的数量比率为 1 : 1 时,利用所述方法在大约 48 小时内 TDS 含量减少了 12.2%。

[0034] 在本发明另一方面,排污槽单位面积内生物的数量比率 1 : 1。

[0035] 在本发明另一方面,提供了一种方法,该方法用于制备权利要求 1 所述新的菌株接种体,包括如下步骤:

[0036] • 分离出分离菌株,

[0037] • 在培养基上培养分离出的菌株以获得纯培养物,培养基包含精土和浓度 0.3% 的木质素,

[0038] • 再将该纯培养物接种于含 0.01% 吐温 80 (Tween 80) 的营养肉汤内以获得发酵剂培养物,

[0039] • 再将该发酵剂培养物接种到等分的营养肉汤内以获得培养基,

[0040] • 然后,将该培养基在 37°C 及 100rpm 转速下培养 16-18 小时以获得光学密度 OD 1.0 的菌液培养物,

[0041] • 离心步骤 (e) 的菌液获得沉淀物,

[0042] • 再将该沉淀物用 pH 6.8 的 0.05M 的  $PO_4^{3-}$  缓冲液洗两次,

[0043] • 在约 4°C 下再次离心洗过的沉淀物,

[0044] • 步骤 (h) 离心后得到的沉淀物通过溶解于最小体积的排污槽中再经洗涤,

[0045] • 再次离心步骤 (i) 洗过的沉淀物以获得细胞沉淀物,

[0046] • 再使最小体积的排污槽中的细胞沉淀物均匀化以获得用于降低 TDS 的细胞泥浆。

[0047] 在本发明另一方面,所述营养肉汤由 5.0g 氯化钠、1.5g 蓼叶提取物 (betel extract)、1.5g 酵母抽提物及 0.2ml 吐温 80 组成。

[0048] 在本发明另一方面,所述离心在 4°C 下,转速 6000rpm 持续大约 20 分钟。

[0049] 本发明涉及菌株储存在印度昌迪加尔 (Chandigarh) 的国际微生物菌种保藏

(MTCC) 中心,其分配的入藏登记码是 MTCC 5098。最近,该中心已被布达佩斯公约授权为国际保藏中心。

[0050] 如在临时专利中所述,在初步试验中,在五天中菌团可以降低纸浆厂排出污水中的 TDS 水平约 20-25%。但是后来研究发现可以减少处理时间,在 48 小时内用分离出的单一菌株可降低纸浆厂排出污水中的 TDS 水平约 12%,这样就比早期的 5 天处理期好的多。单一菌株虽然在降低 TDS 数量上效果相对弱,但只需 48 小时(两天)。由于更短的污水处理期在行业中更可行,所以在专利全文说明书中,使用单一菌株的效果已描述,该效果比菌团处理的方法明显更好。

[0051] 在本发明的另一方面,所述发明提供了一种新的有氧处理方法,该方法可用于减少纸浆废水的 TDS 水平,该过程使用了一种改进方法分析 TDS。同时还公开了一种分离出的好氧菌,该菌可显著降低纸浆厂废水的 TDS 污染程度。

[0052] 在本发明的另一方面,所述发明涉及一种新的有氧生物处理方法,该方法可用于减少纸浆排放废水的 TDS 水平,且该方法使用了一种分离出的菌株及一种改进方法分析 TDS。

[0053] 在本发明的另一方面,所述发明提供了一种新的有氧生物处理方法,该方法可用于减少纸浆排放废水的 TDS 水平。同时还公开了一种从特定地点(土壤)分离出的菌株,该菌株可显著降低纸浆厂废水的 TDS 污染程度。

[0054] 在本发明的另一方面,本发明分离出的菌株按 CBTCC 被保藏在 IGIB,其鉴定仍在进行。

[0055] 在本发明的另一方面,所述分离出的菌株可用于减少纸浆排放废水的 TDS 水平。

[0056] 在本发明的另一方面,本发明所述分离出的菌株是从锯屑积累有十年的地方的土壤中分离出的。

[0057] 在本发明的另一方面,取自上述地点的 5 克新鲜土接种在富集培养基上,所述富集培养基按下列方法配制:把 75ml 土壤浸出液加入 150ml 的营养肉汤中,各加入 5ml 0.1% 的木质素、0.1% 纤维素储存液同时加入 100  $\mu$ l 的假丝菌素 B(Candid B),再在 121  $^{\circ}$ C、151bs 下高压灭菌 20 分钟。上述培养基在 30  $^{\circ}$ C 及 120rpm 下放置 48 小时。

[0058] 在本发明的另一方面,所述土壤浸出液由取自上述地点的土壤制得,其配制方法如下:将 1kg 土在 50  $^{\circ}$ C 下干燥 2 小时,取 400 克干燥过的土加入 960ml 蒸馏水后在 151bs 下高温灭菌 1 小时,然后将样品在 5  $^{\circ}$ C, 5000rpm 转速下离心 10 分钟。收集上清液并储存于无菌容器中为分离培养基做准备。

[0059] 在本发明的另一方面,所述富集土样用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 6.8, 0.05M) 进行逐级稀释,再取不同浓度的稀释液 100  $\mu$ l 分别涂抹于两块相同的培养基平板上,该平板含有土壤浸出液 0.3% 木质素,100  $\mu$ l 的假丝菌素 B 和 2% 琼脂,获得的培养基平板再在 30  $\pm$  2  $^{\circ}$ C 下倒放培养 16-24 小时。

[0060] 在本发明的另一方面,所述单个分离菌落被挑出并在含相同培养基的新鲜平板上划线,重复该步骤直到获得纯菌落。

[0061] 在本发明的另一方面,上面提及的菌株通过无菌镍铬合金环接种到 15-20ml 无菌营养肉汤 (NB) 中,该营养肉汤每升含有:5.0g 可消化的动物组织,5.0g 氯化钠,1.5g 牛肉浸膏,1.5g 酵母抽提物和 0.2ml Tween-80。接种了菌的营养肉汤培养液在 37  $^{\circ}$ C 培养混合器

中培养约 16-18 小时。为了轻微摇晃,混和器维持在一合适的转速,最好在 100rpm。当菌充分生长以后,把含菌的肉汤存放于 4℃ 直至等到下一步的使用。将 250 μ l 上述准备的起子培养物接种到装有 250ml 无菌营养肉汤 NB 的烧瓶中,再于 37℃ /100rpm 培养 16-18 小时,直到获得菌液的光学密度 OD(650nm) 为 1.0,然后通过合适的转速,最好 6000rpm 离心 20 分钟以获得这些细胞。

[0062] 这最后得到的沉淀物,由最少量的 0.05M, pH 6.8 的磷酸(盐)缓冲液洗涤两次,然后在同样的转速和时间内再次离心。离心时,温度保持在 4℃。如此获得的沉淀物,用各废水的最少体积进行洗涤,再离心分离以最小化缓冲液盐进入样本的机会,从而避免 TDS 的升高。然后,所得沉淀物用最小体积的各污水进行再次悬浮,且涡旋以使悬浮液均匀,并用于降低纸浆污水的 TDS。

[0063] 在本发明的另一方面,本发明处理纸浆厂废水以降低 TDS。为进行降低 TDS 的试验,取 250ml 样品放入可加螺旋盖的圆锥形烧瓶中。在检测过排放污水样品的 pH 值(比较适宜的值是 7.0 左右)后,在污水样品中加入接种菌。同时有未加任何接种菌的作对比。烧瓶在 37℃,100rpm 下培养 24 小时。

[0064] 在本发明的另一方面,为检测 TDS 的下降水平,大约抽取 70ml 处理作分析。抽取的样品,放入干燥洁净的离心管(用三次蒸馏水漂净)7000rpm 离心 20 分钟,适宜温度是 4℃。上清液立刻收集在干燥洁净的容器中,该容器预先用三次蒸馏水清洗,然后用 0.45 μ 的薄膜滤器(微孔过滤器)过滤,再用干净并预先漂净的量筒量取 25ml 过滤液后放入一洁净、过夜干燥且预先称重过的烧杯中。再用 20ml 蒸馏过三次的水漂净量筒,然后再量取同量的过滤液加入已装有样品的烧杯中。重复以上步骤处理所有样品。然后将烧杯放入干烤箱中在 180±2℃ 下进行干烤。干燥后,把烧杯转移到真空干燥器中冷却 45 分钟到 1 小时,至室温后称重。

[0065] TDS(mg/l) 按如下公式计算:

[0066]  $TDS(mg/l) = (A-B) / \text{样品体积}$

[0067] 此处,

[0068] A = 烧杯和干燥的滤出液最终重量,

[0069] B = 未装入样品的烧杯的初始重量。

[0070] 在本发明的另一方面,本发明进一步提供了一种方法,该方法用来制备所述分离菌株接种体并用作处理降低纸浆厂排放废水的 TDS,包括:

[0071] a) 从土样中分离菌株,该土样取自一个锯屑积聚的地点;

[0072] b) 用收集土样所得的土壤浸出液培养所述分离菌株以获得纯培养物,其中,土壤浸出液中加入 0.3% 木质素和营养琼脂;

[0073] c) 在含 0.01% 的吐温 80 的营养肉汤中接种所述分离菌株的纯培养物以获得发酵剂培养物;

[0074] d) 将发酵剂培养物接种于 250ml 的营养肉汤中,在 37℃ /100rpm 环境下培养 16-18 小时以取得上述菌株需要的(单位面积或体积内的)生物量;

[0075] e) 当培养菌液达到光学密度 1.0 以后,离心以获得沉淀物,再用 0.05M pH 6.8 的  $PO_4^{3-}$  缓冲液洗涤该沉淀物,然后再离心得沉淀物;

[0076] f) 收集步骤(e)中所得沉淀物,分别溶入 10ml 的排放污水中洗涤,再离心以取得

可用于研究处理的细胞沉淀物；

[0077] g) 将上述形成的沉淀物分别溶入最小体积的排放污水中,再通过涡旋以获得均匀的细胞泥浆；

[0078] h) 在 250ml 的纸浆厂污水中接种步骤 (g) 所得细胞泥浆作减少 TDS 的研究,同时在烧瓶中加入不含任何接种菌的污水作对照；

[0079] i) 将步骤 (h) 的烧瓶在 37℃、100rpm 下培养 24 小时；

[0080] j) 从上述烧瓶中取 70ml,并处理以检测 TDS 水平；

[0081] k) 用改进的方法分析上述样本中的 TDS 含量；

[0082] l) 在 8000rpm 下离心上述样品 20 分钟,再用 0.45 μ 薄膜滤器过滤 (微孔) 上清液,然后使用滤出液估量干重。

[0083] m) 24 小时后,通过与对照样本的 TDS 水平作比较,分析上述分离菌株对 TDS 的移除效率。

[0084] 在本发明的另一方面,所述分离菌株是用确定成分的培养基,从一个老的锯屑积聚地点取的土壤中分离得到。

[0085] 在本发明的另一方面,所述分离菌株接种于含 0.01% 的吐温 80 的营养肉汤以获得发酵剂 (起子) 培养物。

[0086] 在本发明的另一方面,所述分离菌株培养物是由发酵剂培养物接种于 250ml 营养肉汤获得的。

[0087] 在本发明的另一方面,所述分离菌株在 100rpm 的缓慢摇动下培养。

[0088] 在本发明的一个方面,所述菌株在 37℃ 下培养 16-18 小时。

[0089] 本发明的另一方面,所述分离菌株在长到大约 1.0 的光学密度后,在 4℃ 下以适当转速,最好是 6000rpm 离心 20 分钟。

[0090] 在本发明一个优选的技术方案中,所获沉淀物溶于最小体积的 0.05M、pH 6.8 磷酸 (盐) 缓冲液中洗涤,然后在同等 rpm 和时间条件下离心,离心时保持 4℃。

[0091] 在本发明一个优选的技术方案中,所获沉淀物溶于 10.0ml 排放污水中洗涤,并以先前所述的条件离心。

[0092] 在本发明一个方面,所获沉淀物悬浮于最小体积的排放污水中并通过涡旋使悬浮液均匀。

[0093] 在本发明另一方面,前述细胞泥浆用于接种到排放污水样品中以减少 TDS。

[0094] 本发明进一步提供了一种方法,该方法可用于降低纸浆厂排放污水样品的 TDS 水平。

[0095] 在本发明另一方面,装有上述接种体的烧瓶在 37℃、120rpm 下培养 24 小时。

[0096] 在本发明另一方面,上述样品的 TDS 水平使用改进过的 APHA 方法分析。

[0097] 在本发明一个优选的技术方案中,上述样品在 8000rpm 下离心 20 分钟。

[0098] 在本发明另一方面,上清液通过 0.45 μ 薄膜滤器 (微孔) 过滤,然后用作干重估计。

[0099] 本发明一个优选技术方案,TDS 水平的降低是在 24 小时后观测的。

[0100] 以下实施例仅用来解释本发明目前的应用,而不应解释为对本发明范围的限制。

[0101] 实施例 1

[0102] 细菌分离自废水,该废水取自污水处理厂的进口和出口。排放污水经检查发现 pH 值为  $7.6 \pm 0.2$ 。

[0103] 过滤并经高压灭菌的废水以不同百分比用作分离的原产菌的培养基,即 100%, 80%, 50%, 30% 和 10% 的天然盐培养基 (MSM)。所用的 MSM 由下列成分组成:

[0104]	$K_2HPO_4$	5mM
[0105]	$KH_2PO_4$	5mM
[0106]	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1mM
[0107]	EDTA	0.3mM
[0108]	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01mM
[0109]	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02mM
[0110]	$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0.004mM
[0111]	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1mM
[0112]	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.004HM
[0113]	$(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$	5mM
[0114]	pH	$7.0 \pm 0.2$

[0115] 加入 100ml 营养肉汤 (NB) 中,再加入 1ml 的进口、出口废水,并保持  $37^\circ C$  富集培养 24 到 48 小时。

[0116] 使用 2% 琼脂作凝固剂以制备排放污水 -MSM 培养平板。该培养平板固定后,倒放着以备后用。连续稀释平板是指连续稀释富集的接种体直到稀释液密度为  $10^{-12}$ 。连续稀释是在第一个小瓶里吸入 9ml 的  $Na_2HPO_4$ - $NaH_2PO_4$  缓冲液 (pH 6.8, 0.05M), 并在其中接种 1ml 富集接种体,再涡旋并从该瓶中吸取 1ml 稀释接种液,然后放入另一小瓶中以相同方式进行再稀释,直到获得  $10^{-12}$  级的稀释。这些小瓶中的连续稀释液用于铺在污水 MSM 平板。

[0117] 所有的平板都准备两份,并在  $37^\circ C$  下培养 24 到 48 小时。把这些平板上出现的菌落按不同形态作标记,并挑选以进一步纯化。

[0118] 用无菌的接种针挑取不同形态的菌落,并在含有各种生长培养基的平板上进行种菌划线。在 2 到 3 次的移种后,获得纯化的分离菌种,再测试其纯度并以斜面和穿刺的方式保存在各自的培养基中。

[0119] 培养菌被取出并接种于无菌营养肉汤,在  $37^\circ C$ 、120rpm 转速下、培养 16 到 18 小时,再在 650nm 下测试这些母培养菌的光学密度 OD 值。

[0120] 从准备好的母培养菌中选择形态不同的细菌,准备工作菌以筛选它们减少纸浆厂废水颜色的能力。100ml 的无菌 NB 中接种  $100 \mu l$  的不同母培养菌并在  $37^\circ C$ 、120rpm 下培养 16-18 小时。当培养菌长到 OD650 后,通过  $4^\circ C$ 、6000rpm 离心 20 分钟,以收集培养菌。所得沉淀用无菌磷酸 (盐) 缓冲液 (pH 6.8 0.05M) 洗涤两次,并悬浮于很小体积的同样液体中。这种悬浮液然后以 1 : 1 比例用于处理化验中,即 100ml 排放污水样品用 100ml 培养菌液离心获得的沉淀物进行处理。

[0121] TDS 降低试验在锥形烧瓶中成批培养菌液,条件是保持  $37^\circ C$ 、120rpm 持续 5 天。未加任何额外接种体的同样烧瓶作结果对照。五天后,TDS 含量会用 APHA 里提到的标准程序分析。随 (单位面积或体积内) 生物的数量累积,可观察到 TDS 水平会上升,也许是由于细菌通过 GFC 过滤器 (孔径  $1.2 \mu$ ) 流出,从而增加了获得残渣的重量 (表 1),因此在后来的

所有试验中使用了一种改进的 TDS 分析方法。

[0122] 表 1 混和菌团对减少 TDS 的百分比对比

[0123]

菌团	第五天
C1	0.10
C2	-0.20
C3	-0.40
C4	-0.02
C5	-1.30
C6	2.6
C7	-3.2
C8	0.05
C9	0.35

[0124] 实施例 2

[0125] 同样的菌团,除了七种外还包括别的菌种,通过修改 TDS 分析方法使用该菌团来检查它们降低纸浆厂排放污水中 TDS 的有效性。

[0126] 组成菌团的个别菌在适当的 NB 中长至 O. D.<sub>650</sub> 为 1.0。菌团的准备与实施例 1 中的方法是一样的。100ml 的营养肉汤按 1 : 1 的比例与准备好的菌团配比。在 5 天后,用改进的方法对 TDS 进行分析。

[0127] 样品按合适的整数取出,并在 7000rpm 下离心 20 分钟。然后上清液通过一个 0.45 μ 的过滤器(微孔)过滤。

[0128] 滤出液再由一个干净的量筒量取后转入一个干净的预先称重的烧杯。该烧杯预先用 3 次蒸馏过的水漂洗,并在 180°C 下烘焙过夜,再在转移样品前完全变干并预先称重。

[0129] 然后,装有样品的烧杯被放在 180°C 的热烤炉中烘烤过夜。然后干的烧杯被凉至室温并称重以计算残渣的重量。然后同样计算实际的 TDS 值(按 mg/l),如表 2 所示。

[0130] 五天后,在一种菌团的作用下纸浆厂排放污水中的 TDS 减少了 12%。

[0131] 表 2 :在混和菌团作用下纸浆厂排放污水中的 TDS 减少百分比

	菌团	TDS 减少百分比	
		第三天	第五天
	C1	5.2	10.2
	C2	4.4	12.7
	C3	4.1	11.2
	C4	6.4	10.6
	C5	6.8	9.6
	C6	10.2	9.6
[0132]	C7	5.6	10.3
	C8	9.5	8.3
	C9	7.2	7.8
	C10	5.2	10.0
	C11	3.8	9.2
	C12	1.0	9.0
	C13	5.2	10.3
	C14	2.4	5.4
	L1	3.8	8.9
[0133]	L2	0.97	8.4

[0134] 所有数值为三次分析 (A S. D. Of  $\pm 0.5$ ) 的平均值。

### [0135] 实施例 3

[0136] 上述菌团 5 天后会显出降低 TDS 的效果。为了在更短时间内取得降低 TDS 的效果，将采取从合适地点分离新鲜菌株，并对这些分离菌降低 TDS 的能力进行筛选。

[0137] 本发明的分离菌株是从一个有十年历史的地点分离的，该地点在上述时间内一直在积聚锯屑。

[0138] 从上述地点取出 5gm 的新鲜土样，并接种到富集培养基上。为配制富集培养基，先由 75ml 的土壤浸出液加到 150ml 的营养肉汤中，再分别加入 5ml 的 0.1% (v/v) 木质素和纤维素及 100  $\mu$  l 的假丝菌素 B，然后在 121°C、15lbs 高压灭菌 20 分钟。上述培养基在

30°C, 120rpm 的条件下保存 48 小时。

[0139] 土壤浸出液是由上述地点收集的土壤制得的。1kg 的土在 50°C 下干燥 2 小时。400gm 干土与 960ml 一次蒸馏水在 15lbs 下高压灭菌 1 小时。高压灭菌后, 样品在 5°C, 5000rpm 的条件下离心 10 分钟, 收集上清液并储存于无菌容器, 为制备分离培养基作准备。

[0140] 富集土样在  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 6.8, 0.05M) 中进行连续稀释。从各稀释液中取 100  $\mu\text{l}$  两次涂抹于培养基平板上, 该平板含有土壤浸出液、0.3% 木质素、100  $\mu\text{l}$  的假丝菌素 B 和 2% 琼脂。如此所得平板在  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  下倒放培养 16-24 小时。

[0141] 挑出单个分离菌落被, 并在含相同培养基的新鲜平板上种菌划线。重复以上步骤直到获得纯菌落。

[0142] 菌株是按其不同形态和重量特性来选择的。

[0143] 不同的菌团是随机形成的, 且以它们降低 TDS 的能力而被筛选。处理能力试验是在排放污水:(单位面积或体积内)生物的数量比率为 1:1 的情况下进行, 并在 48 小时期间内分析。发现三个菌团在 48 小时后可降低 TDS 6-8%。

[0144] 表 3:48 小时内在菌团(菌团取自土壤)作用下 TDS 减少百分比

菌团	TDS 减少百分比	
	24 小时	48 小时
C1	2.9	5.3
C2	0.0	5.3
C3	5.1	8.4
C4	4.4	6.2
C5	1.3	6.6
C7	1.3	2.2

[0145] 实施例 4

[0146] 由最好的三种菌团组成的单一菌被各自检验一验证它们降低 TDS 的能力。

[0147] 上述细菌沉淀物按实施例 1 中的方法制备, 并用作处理。

[0148] 处理能力试验完全按实施例 4 进行, 并按实施例 2 进行分析。在所有的单一细菌中, 发现号码为 B11 的分离菌(本发明入藏登记号为 MTCC 5098)可在 24 小时后减少 TDS 达 10.1%, 48 小时后减少 TDS 达 12.2%。

[0149] 表 4:在单一土壤菌作用下 48 小时后 TDS 减少百分比

	细菌	TDS 减少百分比	
		24 小时	48 小时
[0151]	B1	4.9	7.96
	B2	9.3	9.5
	B3	3.8	9.4
	B4	0.5	6.4
	B5	4.4	4.4
	B6	6.7	9.1
	B7	2.3	6.2
	B8	4.2	6.4
	B9	2.8	4.6
[0152]	B10	6.1	6.4
	B11 (MTCC5098)	10.1	12.2
	B12	2.6	4.6
	B13	5.1	5.1
	B14	2.0	6.2
	B15-	3.1	3.1

[0153] 实施例 5

[0154] 对减少纸浆厂排放污水的 TDS 的研究可采用排放污水:(单位面积或体积内)生物的数量比例分别是 1 : 0.25, 1 : 0.50, 1 : 0.75 和 1 : 1 的四种情况。

[0155] 分离菌 B11(入藏登记号 5098)按实施例 4 所述的方法制备,为获得不同的排放污水与单位面积或体积内生物的数量比率的比率可准备不同的等量试样。处理能力试验按实施例 1 所述。

[0156] 按实施例 2 所述改进方法来分析样本降低 TDS 的水平,发现排放污水:(单位面积或体积内)生物的数量比率为 1 : 1 时,在所有试验比率中的效果最好。

[0157] 表 5 :在不同(单位面积或体积内)的数量比率时分离菌 B11 减少 TDS 的百分比

[0158]

分离菌 B11(入藏登记号 5098)	48 小时
1 : 0.25	4.2
1 : 0.50	4.7

1 : 0.75	7.1
1 : 1	11.9

[0159] 本发明优点

- [0160] 1、分离菌在可再生的情况下能够减少纸浆厂排放污水中 TDS 水平。
- [0161] 2、天然分离菌不致病且可在简单营养培养基中培养,没有任何经济负担。
- [0162] 3、这种细菌降低纸浆厂排放污水中 TDS 的方法具有新颖性。