

(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 7 日 (07.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/088062 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 15/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/102713

(22) 国际申请日: 2019 年 8 月 27 日 (27.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811277233.0 2018 年 10 月 30 日 (30.10.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

(72) 发明人: 王硕(WANG, Shuo); 中国江苏省无锡市
滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000
(CN)。 石岩(SHI, Yan); 中国江苏省无锡市滨湖区
蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。

吕慧(LV, Hui); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 李激(LI, Ji); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (CN)。 王燕(WANG, Yan); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214000 (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 E 区 501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(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,

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING OPTIMAL STORAGE TEMPERATURE AEROBIC DENITRIFYING BACTERIA IN SEWAGE TREATMENT

(54) 发明名称: 一种确定污水处理好氧反硝化菌最适保存温度的方法

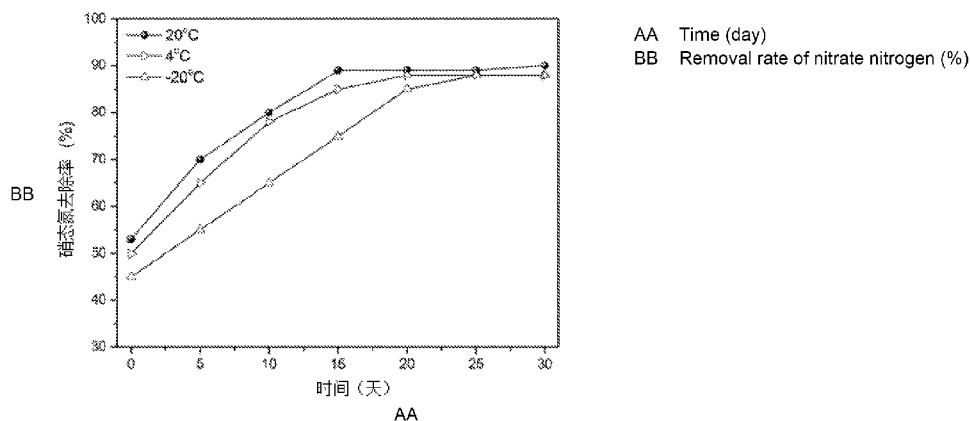


图 1

(57) Abstract: A method for determining an optimal storage temperature for aerobic denitrifying bacteria in a sewage treatment, which relates to the technical field of environmental engineering. In the method for determining the optimal storage temperature for aerobic denitrifying bacteria in a sewage treatment, flow cytometry is used to determine the cell viability status of aerobic denitrifying bacteria stored at different temperatures, and the storage temperature of the cell viability status closest to the cell viability status of the aerobic denitrifying bacteria during a trial operation is determined to be the optimal storage temperature. After test data is restored by viability, the cell viability status and performance are verified to be reliable. The step of recovering the viability of aerobic denitrifying bacteria may be omitted, which effectively helps sewage treatment plants preparing to employ aerobic denitrification technology for efficiently removing nitrate nitrogen and total nitrogen to conserve energy and reduce consumption, and thus reduce operating costs, wherein the removal rates of nitrate nitrogen and total nitrogen may reach over 90% and over 88% respectively. At the same time, the described method may effectively shorten the start-up time of an aerobic denitrifying bacteria engineering application and maintain the long-term stable operation of the aerobic denitrification process, which has very high industrial feasibility.

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))。

(57) 摘要: 一种确定污水处理好氧反硝化菌最适保存温度的方法, 属于环境工程技术领域。确定污水处理好氧反硝化菌最适保存温度的方法利用流式细胞术测定不同温度保存的好氧反硝化菌的细胞活性状态, 将其中细胞活性状态最接近好氧反硝化菌中试运行时的细胞活性状态的保存温度确定为最适保存温度, 测试数据经活性恢复后细胞活性状态和性能效果验证可靠。可以省略好氧反硝化菌活性恢复的步骤, 有效帮助准备采用好氧反硝化技术进行硝态氮和总氮高效去除的污水处理厂实现节能降耗, 降低运行成本, 其中硝态氮和总氮的去除率分别可达90%和88%以上, 同时可以有效缩短好氧反硝化菌工程化应用的启动时间, 维持好氧反硝化工艺长期稳定运行, 具有很高的工业可行性。

一种确定污水处理好氧反硝化菌最适保存温度的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种确定污水处理好氧反硝化菌最适保存温度的方法，属于环境工程技术领域。

背景技术

[0002] 总氮的稳定高效去除一直是污水处理厂运行的重点和难点，随着污水处理排放标准的日益提高，研发和推广适宜脱氮技术尤为重要。由于污水处理厂用地的限制，向缺氧池投加碳源成为大多数污水处理厂提升总氮去除效能的方法，采用这一方法不仅会显著增加污水处理的成本，同时也会造成污水中缓慢降解有机物和污泥内碳源的浪费。因此，基于节地目标和零外加碳源的污水脱氮技术被日益重视。好氧反硝化是指在好氧条件下，好氧反硝化菌通过周质硝酸盐还原酶（periplasmic nitrate reductases），将好氧池中较高浓度的硝态氮转化为氮气的过程。此工艺无需额外投加碳源，只需要将富集了好氧反硝化菌的聚氨酯填料投加至好氧池，通过周质硝酸盐还原酶的催化作用，实现污水处理厂总氮的稳定达标排放和节能降耗运行。

[0003] 好氧反硝化菌因具有良好的反硝化能力，一般使其附着在聚氨酯类悬浮填料上生长，以防止其随好氧池出水而排出，如果将培养成熟的富集了好氧反硝化菌的聚氨酯悬浮填料进行保存，应用于总氮达标存在难度，用地有限的污水处理厂，不仅可以有效缩短污水处理厂总氮达标排放的时间，同时可以有效节省碳源类物质资源。温度是影响微生物活性的重要参数，确定最适于好氧反硝化菌保存的温度，有助于简化好氧反硝化菌的微生物活性恢复过程，缩短好氧反硝化菌工程化应用启动时间，进而实现节能降耗效果。目前，尚未有针对好氧反硝化菌活性保存和活性恢复的研究，使好氧反硝化菌的工程化应用受到影响。

[0004] 发明内容

[0005] 为了简化好氧反硝化菌微生物活性的恢复过程，使污水处理厂总氮可以短时间达标排放，同时实现节能降耗的效果。本发明基于流式细胞术对不同温度条件

下保存的好氧反硝化菌的细胞活性状态进行表征，通过好氧反硝化菌活性恢复效果和微生物活性恢复后细胞活性状态，对流式细胞术的表征结果进行验证，最终建立基于流式细胞术的确定好氧反硝化菌最适保存温度的方法，为污水处理厂总氮稳定达标排放和节能降耗运行提供技术支撑。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种确定好氧反硝化菌最适保存温度的方法，所述方法是利用流式细胞术测定不同温度保存的好氧反硝化菌的细胞活性状态，将最接近好氧反硝化菌在中试运行中的细胞活性状态时的保存温度确定为最适保存温度；所述好氧反硝化菌细胞活性状态的测定包括活细胞、凋亡早期细胞、凋亡晚期细胞和死细胞的含量测定。

[0007] 在本发明的一种实施方式中，所述利用流式细胞术确认最适温度的方法包括：

[0008] (1) 好氧反硝化菌测试样液的制备：用缓冲液稀释好氧反硝化菌样品，混合均匀后过滤取沉淀，离心，留用上清液，使用预冷缓冲液吹洗细胞，重复离心和清洗两次，再取上清液作为样品，使用适量10x Annexin V Binding Buffer混匀制得；

[0009] (2) 置于流式细胞仪测定各样液的细胞活性状态。

[0010] 在本发明的一种实施方式中，所述缓冲液包括磷酸盐缓冲液。

[0011] 在本发明的一种实施方式中，所述缓冲液包括（8~28）%v/v磷酸二氢钠和（72~92）%v/v磷酸氢二钠。

[0012] 在本发明的一种实施方式中，所述缓冲液的pH为7.3~7.6。

[0013] 在本发明的一种实施方式中，所述缓冲液与好氧反硝化菌的稀释体积比为4~10：1。

[0014] 在本发明的一种实施方式中，所述过滤是利用孔径6~15 μm 的尼龙膜。

[0015] 在本发明的一种实施方式中，所述离心速度为5000~10000 rpm/min。

[0016] 在本发明的一种实施方式中，所述样品清液与10x Annexin V Binding Buffer的混合体积比例为1：2~4。

[0017] 在本发明的一种实施方式中，所述流式细胞仪测定各样液的细胞活性状态是在对照FITC Annexin V组加入0.5 μl PI染色剂，对照PI组加入0.5 μl FITC Annexin V，检测组加入0.5 μl FITC Annexin V和0.5 μl PI，混匀后室温下避光孵育，之后于

流式细胞仪上机检测。

[0018] 在本发明的一种实施方式中，所述孵育为10~20 min。

[0019] 本发明的第二个目的是提供一种快速启动好氧反硝化菌的方法，是利用上述方法确定最适保存温度，在最适保存温度下，将培养成熟的好氧反硝化菌置于保存基质中进行保存，活性恢复后即可启动好氧反硝化菌工程。

[0020] 在本发明的一种实施方式中，所述保存基质的COD浓度为100-150 mg/L, NH_4^+ -N浓度为27.5-38.5 mg/L, NO_3^- -N浓度为4.5-8.0 mg/L。

[0021] 在本发明的一种实施方式中，所述活性恢复是将好氧反硝化菌的聚氨酯悬浮填料接种于生物反应器中，所述生物反应器有效容积8.0~20.0 L，控制反应器DO为4-5 mg/L，HRT为4-8 h，聚氨酯悬浮填料填充比为30-40%。

[0022] 本发明的第三个目的是提供一种污水处理的方法，是利用上述方法快速启动好氧反硝化菌工程。

[0023] 本发明的有益效果：

[0024] 本发明通过流式细胞术对好氧反硝化菌中活细胞，凋亡早期细胞，凋亡晚期细胞和死细胞比例进行表征，并与好氧反硝化菌活性恢复过程的特征指标进行关联性分析，建立了基于流式细胞术的确定好氧反硝化菌最适保存温度的方法。运用此方法，可以省略好氧反硝化菌活性恢复的步骤，有效帮助准备采用好氧反硝化技术进行硝态氮和总氮高效去除的污水处理厂实现节能降耗，降低运行成本，其中硝态氮和总氮的去除率分别可达90%和88%以上，同时可以有效缩短好氧反硝化菌工程化应用的启动时间，维持好氧反硝化工艺长期稳定运行，具有很高的可行性。

发明概述

对附图的简要说明

附图说明

[0025] 图1为活性恢复后的好氧反硝化菌的硝态氮去除率；

[0026] 图2为活性恢复后的好氧反硝化菌的总氮去除率。

[0027] 具体实施方式

[0028] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容，特举以下实施例详细说明，其目的仅在于更好地理解本发明的内容而非限制本发明的保护范围。

[0029] 实施例1好氧反硝化菌最适保存温度测定

[0030] 好氧反硝化菌的保存：

[0031] 好氧反硝化菌的保存温度设置为-20℃，4℃和20℃。将中试反应装置（处理规模100 t/d）中好氧反硝化菌聚氨酯悬浮填料约180个取出，平均三等份分别置于装有600 ml保存基质的1000 ml血清瓶中，保存基质为污水处理厂缺氧池出水（即好氧池进水，COD浓度为100-150 mg/L， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为27.5-38.5 mg/L， NO_3^- -N浓度为4.5-8.0 mg/L。将血清瓶（每个保存温度下设置3个平行样）分别置于-20℃，4℃和20℃，静止遮光保存。

[0032] 流式细胞术测试好氧反硝化菌微生物细胞状态：

[0033] 于-20℃，4℃和20℃保存的好氧反硝化菌在保存超过60 d后，用于测定好氧反硝化菌细胞状态，具体步骤如下：

[0034] （1）取好氧反硝化菌聚氨酯悬浮填料约20个（体积约200-300 ml），用pH为7.5的磷酸盐缓冲液稀释至1 L，采用超声波破碎仪（超声能量密度90 kJ/g），使聚氨酯悬浮填料中的好氧反硝化菌释放到磷酸盐缓冲液中并保证其均匀分布；

[0035] （2）用10 μm孔径的尼龙膜过滤絮体样品，并于8000 rpm/min 离心5 min；

[0036] （3）取沉淀置于50 ml离心管中，样品于8000 rpm/min 离心5 min；

[0037] （4）用移液枪吸取离心后的样品上清液，留下约0.1 ml样品，使用预冷磷酸盐缓冲液（pH为7.8）吹洗细胞，重复离心和清洗两次；

[0038] （5）离心后的样品用移液枪吸取上清液，留下约0.1 ml样品，使用0.3 ml 10x Annexin V Binding Buffer混匀；

[0039] （6）对照FITC Annexin V组加入0.5 μl PI染色剂，对照PI组加入0.5 μl FITC Annexin V，检测组加入0.5 μl FITC Annexin V和0.5 μl PI，混匀后室温下避光孵育15 min，之后于流式细胞仪上机检测。

[0040] 测试结果如表1所示，中试反应装置中好氧反硝化菌活细胞比例较高，表明中

试系统好氧反硝化效果良好。保存于-20℃的用于测定好氧反硝化菌的活细胞含量最低，表明-20℃不适于好氧反硝化菌的保存。保存于4℃的好氧反硝化菌其活细胞比例为57.7%，凋亡晚期细胞和死细胞比例约为29.0%，较高的凋亡晚期细胞和死细胞比例表明4℃亦不适于好氧反硝化菌的保存。保存温度为20℃时，好氧反硝化菌活细胞比例达到66.0%，仅比中试反应装置中好氧反硝化菌活细胞比例低25.4%，同时其死细胞比例约为14.5%，20℃是死细胞比例最低的温度。因此，初步确定20℃为保存好氧反硝化菌的最适温度。

[0041] 表1保存后好氧反硝化菌微生物细胞状态（%）

[0042] [表1]

好氧反硝化菌	活细胞	凋亡早期细胞	凋亡晚期细胞	死细胞
中试运行系统	88.5±4.9	4.7±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1
保存于-20℃	45.5±2.2	12.5±0.8	9.9±0.5	32.1±1.7
保存于4℃	57.7±3.0	13.3±0.8	12.5±0.7	16.5±0.5
保存于20℃	66.0±3.5	12.5±0.7	7.0±0.3	14.5±0.4

[0043] 实施例2好氧反硝化菌最适保存温度的验证

[0044] 保存的好氧反硝化菌的活性恢复：取源于不同血清瓶的好氧反硝化菌聚氨酯悬浮填料，接种于生物反应器（有效容积10.0 L）中，用以对好氧反硝化菌进行活性恢复。于-20℃，4℃和20℃保存的好氧反硝化菌分别置于R1，R2和R3中。控制反应器DO为4-5 mg/L，HRT为6 h，聚氨酯悬浮填料填充比为35%。

[0045] 活性恢复后好氧反硝化菌特性：

[0046] 经过30 d的活性恢复后，R1，R2和R3中的好氧反硝化菌特性如表2所示，在好氧反硝化菌活性恢复后，R1和R2中的硝态氮去除速率和总氮去除速率均低于保存之前的好氧反硝化菌的硝态氮去除速率和总氮去除速率，只有保存在20℃的好氧反硝化菌硝态氮去除速率和总氮去除速率与保存之前的较为一致。不同保存温度下好氧反硝化菌的反硝化速率和同步硝化反硝化速率均低于保存之前，经过活性恢复后，R2中好氧反硝化菌的反硝化速率和R3中好氧反硝化菌的反硝化速率和同步硝化反硝化速率较接近保存之前，但R1中保存的好氧反硝化菌的反

硝化速率和同步硝化反硝化速率均相对较低。

[0047] 通常好氧反硝化菌的反硝化速率和同步硝化反硝化速率分别为 $6.0 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 和 $1.5 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ，中试运行系统驯化的好氧反硝化菌达到相同反硝化速率和同步硝化反硝化速率的时间分别为21和30 d。将保存的好氧反硝化菌进行活性恢复后，R1中好氧反硝化菌达到相同反硝化速率和同步硝化反硝化速率的时间分别需要18和25 d，R2中好氧反硝化菌达到相同反硝化速率和同步硝化反硝化速率的时间分别需要15和20 d，R3中好氧反硝化菌达到相同反硝化速率和同步硝化反硝化速率的时间分别需要11和18 d。说明经活性恢复后的好氧反硝化菌均具有较好的脱氮效果，其中保存于 20°C 条件的好氧反硝化菌膜具有最短的微生物活性恢复时间，是较为适宜保存好氧反硝化菌的温度。

[0048] 表2 保存和活性恢复后好氧反硝化菌的特性

[0049]

	硝态氮去除速率 $\text{mg}/(\text{h})$	总氮去除速率 $\text{mg}/(\text{h})$	好氧反硝化速率 大于 $6.0 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 所需时间 (d)	同步硝化反硝化速率 超过 $1.5 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 所需时间 (d)
保存前	4.5	5.8	21	30
好氧反硝化菌保存后				
-20℃保存后	2.0	2.7	--	--
4℃保存后	2.1	2.9	--	--
20℃保存后	2.5	3.1	--	--
好氧反硝化菌活性恢复后				
-20℃保存好氧反硝化菌	3.5	4.5	18	25
4℃保存好氧反硝化菌	4.1	5.1	15	20
20℃保存好氧反硝化菌	4.3	5.7	11	18

[0050] 活性恢复后好氧反硝化菌对污染物的去除效能：

[0051] 经过活性恢复过程后，不同保存温度下的好氧反硝化菌对硝态氮和总氮的去除

率均逐渐升高（图1和图2），其对硝态氮和总氮的去除率分别超过90%和88%。在活性恢复的第18 d，R3中的好氧反硝化菌对硝态氮和总氮的去除效果最好，并一直呈现硝态氮和总氮去除率稳定升高的趋势，此结果也同表2中R3内好氧反硝化菌最快恢复较高的反硝化速率和同步硝化反硝化速率相对应，说明20°C的条件较为适宜保存好氧反硝化菌，在实际应用中具有很高的可行性。

[0052] 活性恢复后好氧反硝化菌特性与细胞状态相关性

[0053] 在好氧反硝化菌活性恢复30 d后，采用流式细胞术对好氧反硝化菌细胞状态进行分析，结果如表3所示。不同保存温度下的好氧反硝化菌中活细胞含量与中试运行系统中好氧反硝化菌中活细胞含量基本接近，说明经过活性恢复后，好氧反硝化菌均可发挥稳定的硝态氮和总氮去除效果。其中R3内好氧反硝化菌活细胞比例（80.3%±4.2%）最高，且凋亡晚期细胞比例（7.5%±0.3%）和死细胞比例（6.7%±0.1%）最低，说明20°C的保存条件下好氧反硝化菌细胞活性最高，较为适宜作为保存好氧反硝化菌的条件。

[0054] 表3 活性恢复后（30 d）好氧反硝化菌细胞活性状态（%）

[0055] [表2]

好氧反硝化菌	活细胞	凋亡早期细胞	凋亡晚期细胞	死细胞
中试运行系统	87.0±4.5	4.5±0.1	3.6±0.1	4.9±0.2
保存于-20°C	78.0±4.3	6.0±0.1	7.1±0.1	8.9±0.3
保存于4°C	78.5±4.3	6.0±0.1	7.5±0.3	9.0±0.3
保存于20°C	80.3±4.2	5.5±0.1	7.5±0.3	6.7±0.1

[0056] 依据Correl相关性分析发现，好氧反硝化菌的反硝化速率和同步硝化反硝化速率和好氧反硝化菌活细胞比例具有较高的相关性（如表4所示），相关系数分别为0.9088和0.9507，表明利用好氧反硝化菌活细胞比例作为评价好氧反硝化菌活性的方法具有较高可行性。同时，由于保存的好氧反硝化菌中，20°C的保存条件下好氧反硝化菌活细胞比例最高，与活性恢复后R3中好氧反硝化菌活细胞比例

结果相吻合。

[0057] 表4 活性恢复后（30 d）好氧反硝化菌特性与细胞活性状态关联性

[0058]

	保存于-20℃ 好氧反硝化 菌	保存于4℃ 好氧反硝化 菌	保存于20℃ 好氧反硝化 菌
好氧反硝化速率 $\text{mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$	5.5	5.8	6.0
同步硝化反硝化速率 $\text{mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$	1.0	1.2	1.2
活细胞比例 (%)	78.0±4.3	78.5±4.3	80.3±4.2
好氧反硝化速率 与活细胞比例 相关性	0.9088		
同步硝化反硝化速率 与活细胞比例 相关性	0.9507		

[0059] 因此，确定20℃是保存好氧反硝化菌的最适温度，利用流式细胞术可以作为确定好氧反硝化菌最适保存温度的依据。流式细胞术操作简便，数据快速易得且准确可靠，亦可省略好氧反硝化菌活性恢复过程，对于好氧反硝化菌的保存与活性恢复意义重大。

[0060] 对比例1

[0061] 好氧反硝化菌的保存:

[0062] 好氧反硝化菌的保存温度设置为-20℃，4℃和20℃。将中试反应装置（处理规模100 t/d）中好氧反硝化菌聚氨酯悬浮填料约180个取出，平均三等份分别置于装有600 ml保存基质的1000 ml血清瓶中，保存基质为污水处理厂缺氧池出水（

即好氧池进水，COD浓度为100-150 mg/L, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为27.5-38.5 mg/L, NO_3^- -N浓度为4.5-8.0

mg/L。将血清瓶（每个保存温度下设置3个平行样）分别置于-20°C, 4°C和20°C，静止遮光保存。

[0063] 流式细胞术测试好氧反硝化菌微生物细胞状态：

[0064] 于-20°C, 4°C和20°C保存的好氧反硝化菌在保存超过60 d后，用于测定好氧反硝化菌细胞状态，具体步骤如下：

[0065] （1）取好氧反硝化菌聚氨酯悬浮填料约20个（体积约200-300 ml），分别用pH为7.2和7.8的磷酸盐缓冲液稀释至1 L，采用超声波破碎仪（超声能量密度90 kJ/g），使聚氨酯悬浮填料中的好氧反硝化菌释放到磷酸盐缓冲液中并保证其均匀分布；

[0066] （2）用10 μm 孔径的尼龙膜过滤絮体样品，并于8000 rpm/min 离心5 min；

[0067] （3）取沉淀置于50 ml离心管中，样品于8000 rpm/min 离心5 min；

[0068] （4）用移液枪吸取离心后的样品上清液，留下约0.1 ml样品，使用预冷磷酸盐缓冲液（pH为7.8）吹洗细胞，重复离心和清洗两次；

[0069] （5）离心后的样品用移液枪吸取上清液，留下约0.1 ml样品，使用0.3 ml 10x Annexin V Binding Buffer混匀；

[0070] （6）对照FITC Annexin V组加入0.5 μl PI染色剂，对照PI组加入0.5 μl FITC Annexin V，检测组加入0.5 μl FITC Annexin V和0.5 μl PI，混匀后室温下避光孵育15 min，之后于流式细胞仪上机检测。

[0071] 细胞状态测试结果如表5和表6所示。

[0072] 表5 保存的好氧反硝化菌细胞活性状态（pH为7.2的磷酸盐缓冲液）

[0073]

[表3]

好氧反硝化菌	活细胞	凋亡早期细胞	凋亡晚期细胞	死细胞
中试运行系统	88.5±4.9	4.7±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1
保存于-20℃	52.5±3.1	6.3±0.5	11.7±0.8	29.5±1.4
保存于4℃	57.0±3.0	3.2±0.2	13.8±0.8	26.0±1.3
保存于20℃	59.7±3.1	3.1±0.2	17.9±1.0	19.3±1.0

[0074] 由表5结果发现，保存于20℃的好氧反硝化菌活细胞比例最高，但是三种温度下的好氧反硝化菌，其活细胞含量较为接近，且凋亡晚期细胞和死细胞的总含量亦较为接近，因此当pH为7.2时，流式细胞分析结果的显著性较差，不适合作为确定好氧反硝化菌最适保存温度的适宜pH。

[0075] 表6 保存的好氧反硝化菌细胞活性状态（pH为7.8的磷酸盐缓冲液）

[0076] [表4]

好氧反硝化菌	活细胞	凋亡早期细胞	凋亡晚期细胞	死细胞
中试运行系统	88.5±4.9	4.7±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1
保存于-20℃	49.2±2.7	0.5±0.1	21.5±1.7	27.6±1.9
保存于4℃	47.9±2.5	0.2±0.1	22.9±1.8	29.0±2.3
保存于20℃	48.9±2.5	0.3±0.1	21.8±1.9	29.0±2.1

[0077] 由表6结果发现，保存于三种温度下的好氧反硝化菌不仅活细胞含量较为接近，且凋亡晚期细胞和死细胞的含量亦较为接近，同时，基于凋亡早期细胞检测的结果偏低，表明当pH为7.8时，流式细胞分析结果无法有效确定好氧反硝化菌的最适保存温度。

[0078] 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

- [权利要求 1] 一种确定好氧反硝化菌最适保存温度的方法，其特征在于，所述方法是利用流式细胞术测定不同温度保存的好氧反硝化菌的细胞活性状态，将最接近好氧反硝化菌在中试运行中的细胞活性状态的保存温度确定为最适保存温度；所述好氧反硝化菌细胞活性状态的测定包括活细胞、凋亡早期细胞、凋亡晚期细胞和死细胞的含量测定；所述利用流式细胞术确认最适温度的方法包括：
- （1）好氧反硝化菌测试样液的制备：用缓冲液稀释好氧反硝化菌样品，混合均匀后过滤取沉淀，离心，留用上清液，使用预冷缓冲液吹洗细胞，重复离心和清洗两次，再取上清液作为样品，使用适量10x Annexin V Binding Buffer混匀制得；其中，所述缓冲液的pH为7.3~7.6；所述过滤是利用孔径6~15 μm 的尼龙膜进行过滤；
- （2）置于流式细胞仪测定各样液的细胞活性状态。
- [权利要求 2] 一种确定好氧反硝化菌最适保存温度的方法，其特征在于，所述方法是利用流式细胞术测定不同温度保存的好氧反硝化菌的细胞活性状态，将最接近好氧反硝化菌在中试运行中的细胞活性状态的保存温度确定为最适保存温度；所述好氧反硝化菌细胞活性状态的测定包括活细胞、凋亡早期细胞、凋亡晚期细胞和死细胞的含量测定。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的方法，其特征在于，所述利用流式细胞术确认最适温度的方法包括：
- （1）好氧反硝化菌测试样液的制备：用缓冲液稀释好氧反硝化菌样品，混合均匀后过滤取沉淀，离心，留用上清液，使用预冷缓冲液吹洗细胞，重复离心和清洗两次，再取上清液作为样品，使用适量10x Annexin V Binding Buffer混匀制得；
- （2）置于流式细胞仪测定各样液的细胞活性状态。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述缓冲液的pH为7.3~7.6。
- [权利要求 5] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述缓冲液包括磷酸盐缓

冲液。

- [权利要求 6] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述缓冲液包括（8~28）% v/v磷酸二氢钠和（72~92）% v/v磷酸氢二钠。
- [权利要求 7] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述缓冲液与好氧反硝化菌的稀释体积比为4~10: 1。
- [权利要求 8] 根据权利要求3所述的方法，其特征在于，所述过滤是利用孔径6~15 μm 的尼龙膜。
- [权利要求 9] 根据权利要求5~7任一所述的方法，其特征在于，所述过滤是利用孔径6~15 μm 的尼龙膜。
- [权利要求 10] 一种快速启动好氧反硝化菌的方法，其特征在于，是利用权利要求1~7任一所述方法确定最适保存温度，在最适保存温度下，将培养成熟的好氧反硝化菌置于保存基质中进行保存，活性恢复后即可启动好氧反硝化菌工程。
- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的方法，其特征在于，所述保存基质的COD浓度为100~150 mg/L, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为27.5~38.5 mg/L, NO_3^- -N浓度为4.5~8.0 mg/L。
- [权利要求 12] 一种污水处理的方法，其特征在于，是利用权利要求10或11所述方法快速启动好氧反硝化菌工程。

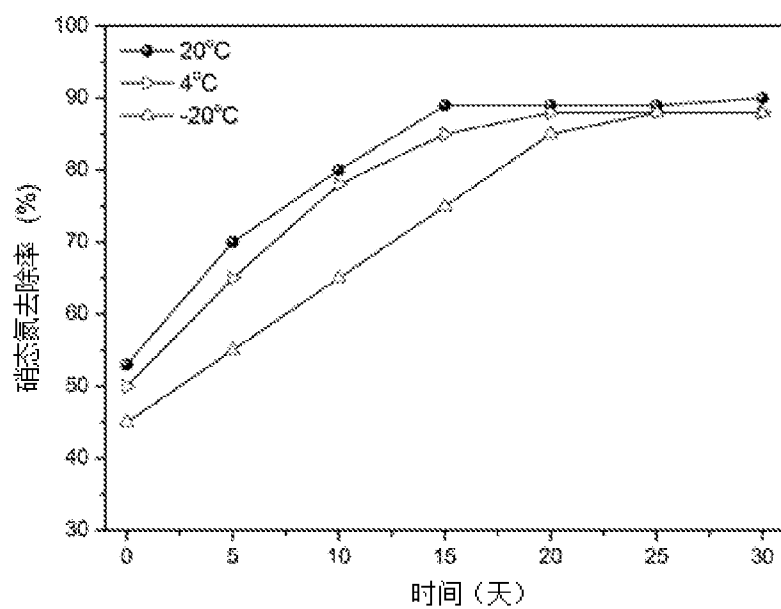


图 1

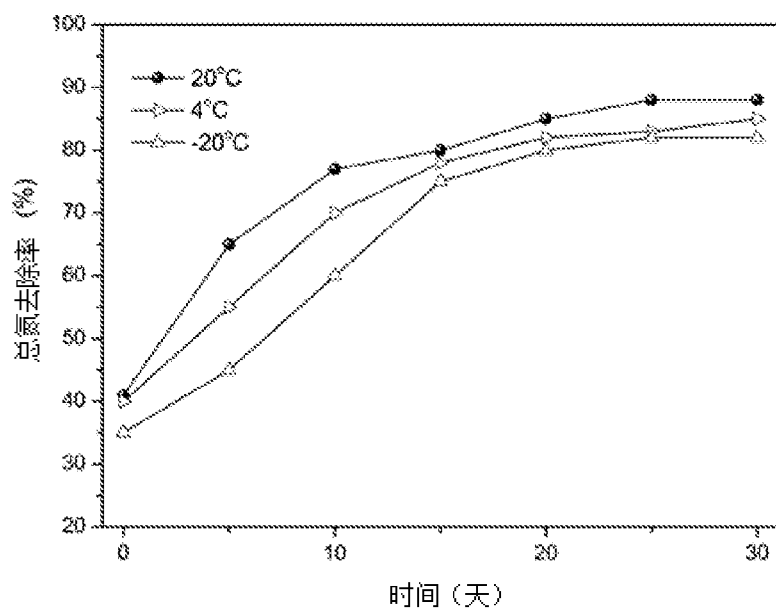


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/102713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 15/14(2006.01)i

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)

G01N

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)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: 江南大学, 王硕, 石岩, 吕慧, 李激, 王燕, 好氧, 硝化菌, 反硝化菌, 温度, 保存, 活性, 细胞, 活细胞, 流式细胞术, 流式细胞, 污水, 废水, oxygen, bacterium, temperature, sewage, waste, water, cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102967545 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 13 March 2013 (2013-03-13) description, paragraphs [0007]-[0077], and figures 1-4	1-12
A	CN 104531595 A (CHONGQING UNIVERSITY) 22 April 2015 (2015-04-22) entire document	1-12
A	CN 102050521 A (CHINA PETROLEUM AND CHEMICAL CORPORATION et al.) 11 May 2011 (2011-05-11) entire document	1-12
A	CN 108585195 A (CHONGQING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 28 September 2018 (2018-09-28) entire document	1-12
A	JP 2007189952 A (FUJI ELECTRIC SYSTEMS CO., LTD.) 02 August 2007 (2007-08-02) entire document	1-12



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

05 November 2019

Date of mailing of the international search report

25 November 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/102713

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102967545	A	13 March 2013	None			
CN	104531595	A	22 April 2015	None			
CN	102050521	A	11 May 2011	CN	102050521	B	12 September 2012
CN	108585195	A	28 September 2018	None			
JP	2007189952	A	02 August 2007	JP	4875367	B2	15 February 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/102713

A. 主题的分类 G01N 15/14 (2006.01) i 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) G01N 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)) CNPAT, CNKI, WPI, EP0D0C: 江南大学, 王硕, 石岩, 吕慧, 李激, 王燕, 好氧, 硝化菌, 反硝化菌, 温度, 保存, 活性, 细胞, 活细胞, 流式细胞术, 流式细胞, 污水, 废水, oxygen, bacterium, temperature, sewage, waste, water, cell																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 102967545 A (清华大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 说明书第[0007]-[0077]段, 附图1-4</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104531595 A (重庆大学) 2015年 4月 22日 (2015 - 04 - 22) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102050521 A (中国石油化工股份有限公司 等) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108585195 A (重庆理工大学) 2018年 9月 28日 (2018 - 09 - 28) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2007189952 A (FUJI ELECTRIC SYSTEMS CO., LTD.) 2007年 8月 2日 (2007 - 08 - 02) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 102967545 A (清华大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 说明书第[0007]-[0077]段, 附图1-4	1-12	A	CN 104531595 A (重庆大学) 2015年 4月 22日 (2015 - 04 - 22) 全文	1-12	A	CN 102050521 A (中国石油化工股份有限公司 等) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 全文	1-12	A	CN 108585195 A (重庆理工大学) 2018年 9月 28日 (2018 - 09 - 28) 全文	1-12	A	JP 2007189952 A (FUJI ELECTRIC SYSTEMS CO., LTD.) 2007年 8月 2日 (2007 - 08 - 02) 全文	1-12
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	CN 102967545 A (清华大学) 2013年 3月 13日 (2013 - 03 - 13) 说明书第[0007]-[0077]段, 附图1-4	1-12																		
A	CN 104531595 A (重庆大学) 2015年 4月 22日 (2015 - 04 - 22) 全文	1-12																		
A	CN 102050521 A (中国石油化工股份有限公司 等) 2011年 5月 11日 (2011 - 05 - 11) 全文	1-12																		
A	CN 108585195 A (重庆理工大学) 2018年 9月 28日 (2018 - 09 - 28) 全文	1-12																		
A	JP 2007189952 A (FUJI ELECTRIC SYSTEMS CO., LTD.) 2007年 8月 2日 (2007 - 08 - 02) 全文	1-12																		
☐ 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 2019年 11月 5日		国际检索报告邮寄日期 2019年 11月 25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		授权官员 郭军宏 电话号码 86-(10)-53962554																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/102713

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	102967545	A	2013年 3月 13日	无	
CN	104531595	A	2015年 4月 22日	无	
CN	102050521	A	2011年 5月 11日	CN 102050521	B 2012年 9月 12日
CN	108585195	A	2018年 9月 28日	无	
JP	2007189952	A	2007年 8月 2日	JP 4875367	B2 2012年 2月 15日