



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104830724 B

(45)授权公告日 2018.01.23

(21)申请号 201510222556.X

(22)申请日 2015.05.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104830724 A

(43)申请公布日 2015.08.12

(83)生物保藏信息

CGMCC No.10721 2015.04.15

(73)专利权人 浙江省环境保护科学设计研究院

地址 310007 浙江省杭州市西湖区天目山路109号

(72)发明人 邹艳艳 梅荣武 韦彦斐 李明智

张宇 王慧荣 许青兰

(74)专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司

公司 33224

代理人 黄平英

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

C02F 3/02(2006.01)

C12R 1/41(2006.01)

(56)对比文件

WO 03016241 A1,2003.02.27,全文.

肖继波等.好氧反硝化菌*Deffluviobacter lusatiensis* str.DN7 的分离鉴定和异养硝化性能\*.《应用生态学报》.2012,第23卷(第7期),全文.

魏巍等.1株贫营养好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性.《生态环境学报》.2010,第19卷(第9期),第2166页.

审查员 王思佳

权利要求书1页 说明书4页

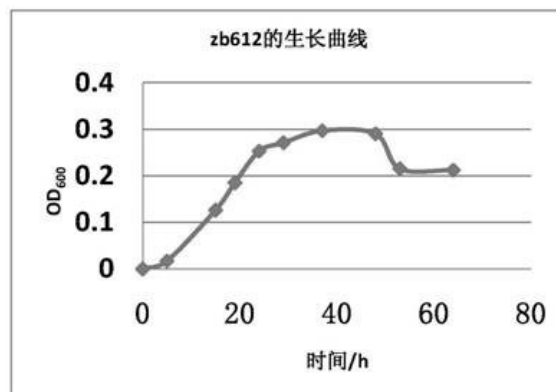
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一株根瘤菌菌株及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株根瘤菌菌株及其应用,根瘤菌菌株命名为根瘤菌(*Rhizobium* sp.),菌株号为zb612,保藏号为CGMCC No.10721,于2015年4月15日保藏于位于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的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。本发明的菌株可用于现场实际污水脱氮,以提高原油污泥的去氨氮效果。本发明所提供的根瘤菌具有脱氨氮特性,能够利用有机碳为唯一碳源,氨氮作为唯一氮源进行新陈代谢,通过异养硝化-好氧反硝化作用直接把氨氮转化为 $N_2$ ,完成脱氮,解决了传统生物脱氮中好氧硝化,缺氧反硝化分段处理的问题。



1. 一株根瘤菌菌株,其特征在于,命名为根瘤菌(*Rhizobium sp.*),菌株号为zb612,保藏号为CGMCC No.10721。

2. 一种如权利要求1所述根瘤菌菌株在降解废水氨氮中的应用,其特征在于,包括:将所述根瘤菌的悬浮液投加到废水处理工艺的好氧池中,所述液体悬浮液的投加量为好氧池内泥水混合物重量的0.5~1.5%;所述废水为生活污水或制药废水,所述好氧池内溶解氧控制为0.2~1mg/L;所述废水中C/N为2~10,所述废水的pH值为6~9。

3. 根据权利要求2所述应用,其特征在于,所述废水的温度为25~40℃。

## 一株根瘤菌菌株及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于环境保护技术领域,具体涉及一种具有异养硝化好氧反硝化功能的根瘤菌菌株及其应用。

### 背景技术

[0002] 氨氮是水体污染的主要污染物之一,氨氮超标能引起水质恶化,水体富营养化,进而导致水生动物大量死亡的主要原因。氨氮降解可以分为生物脱氮,物化脱氮,但作为最经济有效的方法,生物脱氮法也最具有发展前景,但是传统的生化脱氮途径要经过好氧硝化和缺氧反硝化两个过程,工艺复杂,成本较高,因此对于同时具有硝化反硝化功能的异养硝化细菌的分离与应用,以然成为生物脱氮法中一个重要的研究内容,具有很好的发展前景。

[0003] 近年来,已有学者从环境中分离出高效氨氮降解菌,并成功的应用于实际污水中,提高原有污泥活性及氨氮降解特性。因此,基于同步硝化反硝化的机理,异养硝化菌的分离及在实际污水中的应用在当前具有重要的研究价值与意义。

[0004] 例如,公开号为CN 103243050A的中国发明专利申请文献公开了一株低温氨氮降解菌,应用于低温饮用水氨氮降解,在菌株量达到 $107 \sim 109$ 个/ml,初始氨氮浓度为 $5.0\text{mg/L}$ 时,用乙酸钠作为碳源,C/N比为2,在温度 $2^{\circ}\text{C}$ ,pH值7.2,150rpm(溶解氧大于 $5\text{mg/L}$ )条件下,对氨氮降解30min后,降解速率可达 $6.36\text{mg NH}_4^+/\text{L} \cdot \text{h}$ 。

[0005] 公开号为CN 104478091A的中国发明专利申请文献公开了一种高效氨氮降解复合菌种的培养方法,(1)取进入生化池待降解的氨氮废水,经过滤、脱色、出油预处理后,用蒸馏水稀释制备成10倍、8倍、5倍、2倍及0倍废水稀释液,备用;(2)制备氨氮降解复合菌种的废水稀释液培养基;(3)氨氮降解复合菌种液制备;(4)保存与活化氨氮降解复合菌种液。复合菌种液主要用于高氨氮废水的处理。

[0006] *Paracoccus pantotrophus*是最早被发现具有异养硝化—好氧反硝化功能的一株细菌,世界各地的学者对其特殊的代谢途径展开了广泛深入的研究,有关异养硝化细菌的分类,降解动力学,以及酶学的研究都在深入。但到目前为止,异养硝化细菌的工程应用还不成熟。

[0007] 生物脱氮技术是最广泛应用的污水脱氮技术,具有经济,有效,低污染的作用。具有处理量大,成本低,以及不产生二次污染等优点成为大家的选择,在不改变现有处理设施的基础上,通过添加特定的高效微生物菌来进行生物强化,能够提高原有生物系统对目标物的去除,污水治理效果得到提高,因而备受大家重视与喜爱。

### 发明内容

[0008] 本发明提供一株根瘤菌菌株及其应用,能够在碳源存在的情况下快速有效的降解氨氮,为同步去除氨氮提供了新的途径。

[0009] 一株根瘤菌菌株,命名为根瘤菌(*Rhizobium* sp.),菌株号为zb612,保藏号为CGMCC No.10721。

[0010] 本发明的根瘤菌菌株于2015年4月15日保藏于位于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的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0011] 本发明的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) zb612, 属于革兰氏阴性细菌, 是从垃圾渗滤液处理厂的生化池污泥中取样, 在异养硝化培养基中进行富集驯化培养, 氨氮作为唯一的氮源, 最后通过稀释平板划线分离得到。

[0012] 其中, 富集驯化菌株的异养硝化细菌培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g, 葡萄糖 5.0g, 维氏盐溶液 50ml, 加水溶解, 补充蒸馏水至 1L, 调节 pH 至 7.0。

[0013] 其中维氏盐溶液:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5g,  $\text{NaCl}$  2.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05g, 溶解后加水定容至 1L。

[0014] 本发明所提供的菌株, 具有以下表型特征: 在 20–40℃ 下, 在 LB 培养基上培养 12–24h 后, 菌落为丝状, 成分散型, 菌落颜色为白色, 通过革兰氏染色成阴性。

[0015] 本发明所提供的菌株的 16S rRNA 序列长度为 1405bp, 其碱基序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0016] 本发明所提供的根瘤菌 zb612 具有脱氨氮特性, 能够利用有机碳为唯一碳源, 氨氮作为唯一氮源进行新陈代谢, 通过异养硝化–好氧反硝化作用直接把氨氮转化为  $\text{N}_2$ , 完成脱氮, 解决了传统生物脱氮中好氧硝化, 缺氧反硝化分段处理的问题。

[0017] 本发明的菌株可用于现场实际污水脱氮, 以提高原油污泥的去氨氮效果, 因此, 本发明还提供一种根瘤菌菌株在降解废水氨氮中的应用。

[0018] 所述废水为生活污水或制药废水等。

[0019] 具体应用时, 将所述根瘤菌的悬浮液投加到废水处理工艺的好氧池中。所述液体悬浮液的投加量为好氧池内泥水混合物重量的 0.5~1.5%。

[0020] 所述好氧池内溶解氧控制为 0.2~1mg/L。进一步地, 溶解氧控制为 0.5~0.8mg/L。

[0021] 所述废水的 pH 值为 6~9; 进一步地, 所述废水的 pH 值为 7~8。

[0022] 所述废水中 C/N 为 2~10。

[0023] 所述废水的温度为 25~40℃; 进一步地, 所述废水的温度为 25~35℃。

[0024] 本发明的根瘤菌 (*Rhizobium* sp.) zb612, 能够在碳源存在下, 去除氨氮和 COD, 进一步研究发现, 其能够在低溶氧状态下去除氨氮, 并且无硝酸盐, 亚硝酸盐的积累, 能够很好的克服传统工艺的问题。

[0025] 本发明的菌株应用于高氨氮废水的处理, 能够在低溶氧, 高 COD, 高氨氮情况下生长繁殖, 进行异养硝化好氧反硝化作用, 把氨氮直接转化为氮气, 无硝酸盐, 亚硝酸盐的残留, 同时 COD 也去除。氨氮小于 80mg/L 的情况下, 能几乎全部降解完全, 氨氮在大于 100 小于 200 情况下降解效率可达 50%–76%。

## 附图说明

[0026] 图1是实施例1中根瘤菌 zb612 的生长曲线。

[0027] 图2是实施例4中出水氨氮含量结果图。

## 具体实施方式

[0028] 实施例中各种污染物的监测分析方法参考《水和污水监测分析方法》(第四版, 中

国环境科学出版社,2002),实施例中使用各种单位,统一采用国家标准。

[0029] 氨氮降解培养基成分:葡萄糖5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g, NaCl 0.3g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g,  $\text{CaCO}_3$  7.5g,加水定容至1L。

[0030] 葡萄糖硝酸盐培养基成分:5g、葡萄糖,2g  $\text{KNO}_3$ ,1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,0.20g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,1 000mL蒸馏水,pH 7.2~7.5。

[0031] 异养硝化细菌培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g,葡萄糖5.0g,维氏盐溶液50ml,加水溶解,补充蒸馏水至1L,调节pH至7.0。其中维氏盐溶液:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5g, NaCl 2.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05g,溶解后加水定容至1L。

[0032] 实施例1

[0033] 一、根瘤菌zb612的分离筛选

[0034] (1) 污泥的驯化:取某垃圾渗滤液处理厂活性污泥5g,将其置于250ml氨氮降解培养基中,温度30℃,转速100连续摇床培养两天,两天后往锥形瓶中加入5ml灭菌处理的硫酸铵溶液(1.5g/L),继续对其驯化,重复此步骤3次,取出泥水5ml于灭菌好的离心管中静置。

[0035] (2) 极限稀释分离:取上述上清液1ml置于有10ml无菌生理盐水的离心管中,逐级稀释到 $10^{-6}$ ,做三个平行,从 $10^{-5}$ 与 $10^{-6}$ 段中取0.2ml平板涂布,培养48小时,观察菌落生长。

[0036] (3) 菌株挑选纯化:从平板上挑选长势好的菌株做平板划线处理,待长成单菌落,将其置于上述氨氮降解培养基中,观察氨氮降解情况,从中挑选氨氮降解率最高的做进一步鉴定。

[0037] 二、根瘤菌zb612的鉴定

[0038] (1) 培养形态:在LB液体培养基上培养12~24h后,菌落为丝状,成分散型,菌落颜色为白色,固体培养基培养基中平板培养24~36小时后,菌落呈圆形,凸起,表面有黏液层。

[0039] (2) 革兰氏染色:通过革兰氏染色为革兰氏阴性菌。

[0040] (3) 16s rRNA鉴定:将固体斜面送至生工生物工程(上海)股份有限公司做16s rRNA鉴定,序列如SEQ ID NO:1所示,鉴定结果为根瘤菌。

[0041] 通过以上鉴定结果,确认上述菌株为根瘤菌属的革兰氏阴性菌,将其命名为根瘤菌(*Rhizobium* sp.),菌株号为zb612,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏号为:CGMCC No.10721,保藏时间:2015年4月15日。

[0042] 实施例2

[0043] 根瘤菌*Rhizobium* sp.zb612的生长及氨氮降解测定

[0044] 将根瘤菌*Rhizobium* sp.zb612接种于100ml的LB液体培养基(酵母膏5g/L,蛋白胨10g/L,NaCl 10g/L)中,于30℃,100rpm,摇床振荡进行培养。培养48h后,将菌体分装保存于灭菌好的保存管中,每个保存管加0.5ml菌液,0.5ml30%甘油。负80℃保存,以备后用。

[0045] 将菌株挑一环接种于100ml异养硝化细菌培养基中,30℃、100rpm,振荡培养24h,用作正式降解实验的活性接种液,取活性接种液5%分别进行2组实验,每组分别接入三个含有100ml灭菌好的氨氮降解培养基中(氨氮的浓度为150mg/L),于30℃、100rpm,振荡培养,其中一组,每隔几个小时取样测定菌体光密度,绘制出菌体生长曲线,另一组48h之后测定氨氮剩余浓度。

[0046] 菌体生长曲线如图1所示:根瘤菌zb612生长适应期段,很快能进入到对数期的生长,对数期到稳定期时间为50h小时,之后进入到衰退期,原因可能是培养基碳源消耗殆尽

导致菌体无法继续分裂生长。在菌体生长48小时之后,氨氮降解达到86.6%。

[0047] 实施例3

[0048] 根瘤菌*Rhizobium* sp.zb612的好氧反硝化试验

[0049] 在500ml的锥形瓶中加入200ml葡萄糖硝酸盐培养基,菌体悬浮液按2%体积加入,摇床培养48小时,观察硝酸盐残留量。

[0050] 试验结果表明:48h之后,硝酸盐浓度的残留量为48.4mg/L,亚硝酸盐很少的积累,原水硝酸盐浓度352.7mg/L,降解率为:86.2%。

[0051] 试验结果表明,在好氧的条件下,根瘤菌zb612具有好氧反硝化的功能,同时几乎没有要亚硝酸盐的积累。

[0052] 实验例4

[0053] 根瘤菌zb612的实际污水脱氮小试研究

[0054] 在模拟现场污水处理装置的小型装置中,菌体的液体悬浮液按1%体积的量投加,同时加入2%体积的活性污泥,进水 $\text{NH}_3\text{-N}$ 为160mg/l,COD为2000,溶解氧控制在0.5-0.8mg/L之间,回流时间为2天,每两天测定出水氨氮含量,实验连续运行3个月

[0055] 实验结果如图2所示:如图可知出水氨氮稳定,维持在10-30mg/l。由此可知:本发明提供的根瘤菌在低溶氧状态下,能够很好的进行硝化反硝化,并且效果稳定。

## SEQUENCE LISTING

<110> 浙江省环境保护科学设计研究院

<120> 一株根瘤菌菌株及其应用

<130>

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1405

[0001] <212> DNA

<213> 根瘤菌 (Rhizobium sp. )

<400> 1

gcttaccatg cagtcgacgc cccgcaaggg gagtggcaga cgggtgagta acgcgtggga	60
acataccett tctcgcgaa tagctccggg aaactggaat taataccgca tacgccctac	120
gggggaaaga ttatcgggg aaggattggc ccgcgttga ttagctagtt ggtggggtaa	180
aggcctacca aggcgacgat ccatagctgg tctgagagga tgatcagcca cattgggact	240
gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga atattggaca atgggcgcaa	300
gcctgatcca gccatgccgc gtgagtgatg aaggccttag ggttgtaaag ctctttcacc	360
ggagaagata atgacggtat ccggagaaga agccccggct aattcgtgc cagcagccgc	420
ggtaatacga agggggctag cgttgctcgg aattactggg cgtaaagcgc acgtaggcgg	480
atatttaagt caggggtgaa atcccagagc tcaactctgg aactgccttt gatactgggt	540
atcttgagta tggaagaggt aagtggaatt ccgagtgtag aggtgaaatt cgtagatatt	600
cggaggaaca ccagtggcga aggcggctta ctggtccatt actgacgctg aggtgcgaaa	660

	gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtcac gccgtaaagc atgaatgtta	720
	gccgtcgggc agtatactgt tcggtggcgc agctaacgca ttaaaccattc cgctgggga	780
	gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggagca	840
	tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccagct cttgacattc ggggtatggg	900
	cattggagac gatgtccttc agttaggctg gccccagaac aggtgctgca tggctgtcgt	960
	cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct cgcccttagt	1020
[0002]	tgccagcatt gagggtggca ctctaagggg actgccggtg ataagccgag aggaaggtgg	1080
	ggatgacgtc aagtctcat ggcccttacg ggctgggcta cacacgtgct acaatggtgg	1140
	tgacagtggg cagcgagaca gcgatgtcga gctaattcc aaaagccatc tcagttcgga	1200
	ttgcactctg caactcgagt gcatgaagtt ggaatcgcta gtaatcgag atcagcatgc	1260
	tgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaaca caccgcccgt cacaccatgg gagggtgtt	1320
	tacccgaagg tagtgcgcta accgcaagga ggcagctaac cacggtaggg tcagcgactg	1380
	ggggaagtcg agcaagtgca tggcc	1405



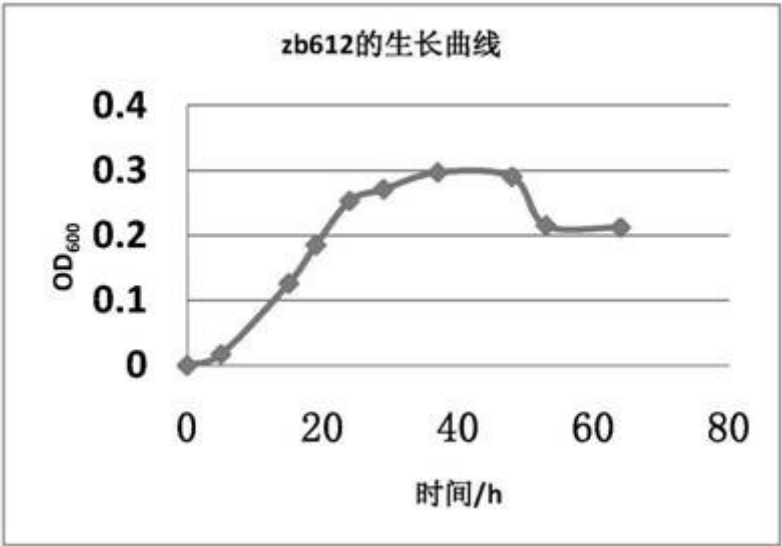


图1

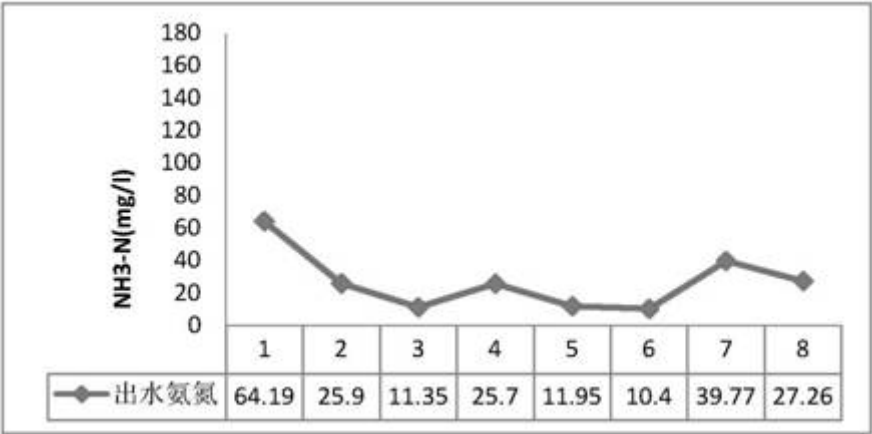


图2