



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102392011 A

(43) 申请公布日 2012.03.28

(21) 申请号 201110320854.4

(22) 申请日 2011.10.20

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌区东湖南路
7号

(72) 发明人 吴振斌 周巧红 张燕 王莹
贺锋 徐栋

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12N 11/08(2006.01)

C12N 11/04(2006.01)

C02F 3/02(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法及应用。1. 制备步骤:1) 在恒温箱中筛选培养从人工湿地中筛选出的好氧反硝化菌株;2) 挑选斜面保存的好氧反硝化细菌,接种到灭菌的富集培养基中,曝气,得到菌悬液;3) 用海藻酸钠-聚乙烯醇包埋获得的固定化好氧反硝化细菌;4) 将好氧反硝化细菌小球从冰箱中取出,用双蒸水或生理盐水洗涤后,浸泡在生理盐水中,曝气以活化固定化小球。2. 固定化细菌在人工湿地中的应用:将固定化小球填充到人工湿地模拟柱中,进行废水脱氮处理。此种固定化细菌制备方法简单,生产成本低,易于在工业污水处理上应用,脱氮效率高,亚硝态氮积累量低,使用寿命长。

1. 一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法：其步骤是：

1) 从增氧型复合垂直流人工湿地中筛选出好氧反硝化菌株，在恒温 28℃ 的培养箱中进行菌株的筛选培养；

所述培养基组成是：琼脂 20g，硝酸钾 1g，磷酸二氢钾 1g，六水氯化亚铁 0.5g，七水氯化钙 0.2g，七水硫酸镁 1g，琥珀酸钠 8.5g，溴瑞香草酚兰试剂 1mL；蒸馏水 1000mL，用 1mol L^{-1} 氢氧化钠调节 pH 至 7.0-7.3；

2) 好氧反硝化细菌的菌悬液的制备：

挑选 1-2 环斜面保存的好氧反硝化细菌，加入到经过高温高压：121℃，105-110kPa 灭菌的富集培养基中，在 30℃ 下曝气培养 5 天，得到菌液，将得到的菌液离心，弃去上清液，用 0.9%w/v 生理盐水离心洗涤 2-3 次，再用 0.9%w/v 生理盐水稀释到 500ml 左右（菌体：生理盐水 = 20 : 250v/v），混合均匀，4℃ 贮藏备用；

所述培养基组成是：双蒸水 750mL，硝酸钾 2 g，磷酸二氢钾 1 g，磷酸氢二钾 1 g，硫酸镁 0.2 g，柠檬酸钠 5 g，微量盐溶液 2mL；

3) 用海藻酸钠 - 聚乙烯醇包埋获得的固定化好氧反硝化菌：

5%w/v 聚乙烯醇和 5%w/v 海藻酸钠的混合溶液 60mL，微波加热，使其完全混合，高温高压灭菌：121℃，105-110kPa，冷却至室温，与 80mL 好氧反硝化菌悬液充分混合；将此混合液用注射器挤入到 4%w/v 氯化钙溶液中，冰浴，边滴边搅拌，使其形成直径为 2mm 的小球；将形成的小球放置于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h，用无菌水清洗小球，再放入饱和硼酸溶液中，于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h，用生理盐水洗涤 2-3 次备用。

2. 权利要求 1 所述的一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌在人工湿地中的应用。

一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体涉及一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法以及一种将制备好的固定化微球在人工湿地中的应用。

背景技术

[0002] 随着工农业的迅速发展,工业“三废”排放量的增加,生活污水、医药污水、生活垃圾以及农业大量施用化肥、农药导致水资源受到不同程度污染,其中硝酸盐污染是水资源的主要污染类型之一。近年来,人工湿地在污水治理上发挥了重大作用。基质、高等植物、微生物是人工湿地发挥净化作用的三个主要因素。许多研究表明,湿地对氮的去除的首要因素是微生物的降解,基质和湿地植物的作用相对较小。由于湿地中厌氧的条件比较缺乏,反硝化过程并不能完全进行,所以对于传统意义上的反硝化而言,氮的去除并不是很彻底。20世纪70年代,固定化微生物技术开始应用于工业废水的生物处理。与其它应用游离微生物的过程相比,固定化微生物技术可以使微生物在某一固定区域具有较高的密度,减轻或消除微生物的流失,提高反应速度,同时便于培养优势微生物种群,提高处理过程的稳定性,减少或消除副反应的发生,便于控制处理过程。目前,固定化微生物技术已成为国内外生物科学、环境科学及其相关学科的研究的重点。好氧反硝化菌是利用好氧反硝化酶的作用,在有氧条件下进行反硝化作用的一类反硝化菌。自20世纪80年代,Robertson等(Robertson et al. Archives of Microbiology, 1984, 139, 351-354)在除硫和反硝化处理系统中首次分离出好氧反硝化菌以来,人们对于好氧反硝化菌的脱氮性能已经进行了一定程度上的研究,而且在此种细菌的包埋固定处理含氮废水方面也进行了一定的研究,但是将包埋固定化后的好氧反硝化菌应用到湿地系统中还未见报道。

[0003] 目前,文献中已经出现了很多关于分别利用海藻酸钠和聚乙烯醇作为固定化材料进行反硝化的研究,但是对于聚乙烯醇这种合成高分子凝胶载体,它的抗微生物分解性好,机械强度高,化学稳定性好,但传质性能较差,在包埋细胞的过程中会降低细胞的活性;而海藻酸钠这种天然高分子凝胶载体对微生物无毒性,传质性能好,但强度较低,厌氧条件下易被微生物分解,使用寿命短。所以,基于上述两种材料的优缺点,本发明将这两种包埋材料结合起来进行研究,克服其各自的缺点,将更有利于增强固定化小球的各种性能,以便于更好的进行固定化小球的脱氮研究。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法,即采用海藻酸钠-聚乙烯醇包埋法对好氧反硝化细菌进行固定化;具有固定化微球机械强度高,稳定性好,反硝化活性高以及使用寿命长等优点,海藻酸钠价格便宜,生物相容性好;其工艺操作简单,生产成本低,易于在工业污水处理上应用。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供了一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌在人工湿地中的应用,即将固定化小球填充到人工湿地中进行好氧反硝化脱氮;有效降低水中

硝态氮的含量,并使亚硝态氮的残留量几乎为零;弥补了人工湿地中厌氧环境缺乏导致的脱氮效率低下的不足。

[0006] 为了实现上述的目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法,其步骤是:

[0008] 1) 从增氧型复合垂直流人工湿地中筛选出好氧反硝化菌株,在恒温 28℃ 的培养箱中进行菌株的筛选培养;

[0009] 所述培养基组成是:琼脂 20g,硝酸钾 1g,磷酸二氢钾 1g,六水氯化亚铁 0.5g,七水氯化钙 0.2g,七水硫酸镁 1g,琥珀酸钠 8.5g,溴瑞香草酚兰试剂 1mL;蒸馏水 1000mL,用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH 至 7.0-7.3;

[0010] 2) 好氧反硝化细菌的菌悬液的制备:

[0011] 挑选 1-2 环斜面保存的好氧反硝化细菌,加入到经过高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌的富集培养基中,在 30℃ 下曝气培养 5 天,得到菌液;将得到的菌液离心,弃去上清液,用 0.9% w/v 生理盐水离心洗涤 2-3 次,再用 0.9% w/v 生理盐水稀释到 500ml 左右(菌体:生理盐水 = 20 : 250v/v),混合均匀,4℃ 贮藏备用;

[0012] 所述富集培养基组成是:双蒸水 750mL,硝酸钾 2g,磷酸二氢钾 1g,磷酸氢二钾 1g,硫酸镁 0.2g,柠檬酸钠 5g,微量盐溶液 2mL;

[0013] 3) 用海藻酸钠-聚乙烯醇包埋获得固定化好氧反硝化菌:

[0014] 5% w/v 聚乙烯醇和 5% w/v 海藻酸钠的混合溶液 60mL,微波加热,使其完全混合,高温高压灭菌:121℃,105-110kPa,冷却至室温,与 80mL 好氧反硝化菌悬液充分混合;将此混合液用注射器挤入到 4% w/v 的氯化钙溶液中,冰浴,边滴边搅拌,使其形成直径为 2mm 的小球;将形成的小球放置于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h,用无菌水清洗小球,再放入饱和硼酸溶液中,于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h,用生理盐水洗涤 2-3 次备用;

[0015] 一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌在人工湿地中的应用,其步骤是:

[0016] 1) 活化上述固定化小球:

[0017] 将制备步骤 3 制得的好氧反硝化细菌固定化小球从冰箱中取出,用双蒸水或者 0.9% w/v 的生理盐水洗涤 3-4 次,然后浸泡在 0.9% w/v 的生理盐水中,曝气约 11-13h 以活化固定化小球;

[0018] 2) 人工湿地脱氮研究:

[0019] 将固定化小球填充到人工湿地模拟柱中,进行废水脱氮处理研究。实验结果与实施例 3 相同。

[0020] 与已有的包埋法相比,具有以下优点和效果:

[0021] 具有固定化微球机械强度高,稳定性好,脱氮效率高,亚硝态氮积累量低,反硝化活性高,将其作为基质填充在湿地中,能有效降低水中硝态氮的含量,并使亚硝态氮的残留量几乎为零;弥补人工湿地厌氧环境缺乏导致的脱氮效率低下的缺点;海藻酸钠价格便宜,生物相容性好;其工艺操作简单,生产成本低,易于在工业污水处理上应用,脱氮效率高,亚硝态氮积累量低,使用寿命长的优点。使用固定化微球进行实验室小试试验,进水采用模拟废水,其中 COD_{Cr} 约为 400mg/L 左右,硝态氮的浓度约为 80mg/L 左右,当水力停留时间为 36h 时,硝态氮的去除率达到了 98% 以上,并且亚硝态氮的残留量趋近于零。

附图说明

[0022] 图 1 为 3 种固定化小球好氧反硝化速率变化曲线。

[0023] 将使用 3 种不同固定化技术进行包埋的好氧反硝化微球投入到等体积的液体培养基中,每 2h 对其中硝态氮的浓度进行测定,得平均好氧反硝化速率。

[0024] 所述培养基组成如下:双蒸水 750mL,硝酸钾 2g,磷酸二氢钾 1g,磷酸氢二钾 1g,硫酸镁 0.2g,柠檬酸钠 5g,微量盐溶液 2mL;

[0025] 图 2 为进行废水脱氮处理的人工湿地模拟柱结构示意图。

[0026] 设置 3 组人工湿地模拟柱,分别标记为 A、B、C。其中,A、B、C 中 1 都表示填埋的是新鲜的陶粒层,2 分别表示填充了好氧反硝化固定化微球、使用好氧反硝化菌悬液浸泡的陶粒、大小相等的新陶粒,3 表示水层。

[0027] 图 3 为三种不同基质填埋条件下硝态氮的去除率曲线。

[0028] 系统 A、B、C 与图 2 中的 A、B、C 相同。

[0029] 图 4 为三种不同基质填埋条件下亚硝态氮的积累量曲线。

[0030] 系统 A、B、C 与图 2 中的 A、B、C 相同。

具体实施方式

[0031] 实施例 1:

[0032] 一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌制备方法,其步骤是:

[0033] 1) 从增氧型复合垂直流人工湿地中筛选出好氧反硝化菌株,在恒温 28℃ 的培养箱中进行菌株的筛选培养;

[0034] 所述培养基组成是:琼脂 20g,硝酸钾 1g,磷酸二氢钾 1g,六水氯化亚铁 0.5g,七水氯化钙 0.2g,七水硫酸镁 1g,琥珀酸钠 8.5g,溴瑞香草酚兰试剂 1mL;蒸馏水 1000mL,用 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH 至 7.0-7.3。

[0035] 2) 好氧反硝化细菌的菌悬液的制备:

[0036] 挑选 1-2 环斜面保存的好氧反硝化细菌,加入到 750mL 经过高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌的富集培养基中,在 30℃ 下曝气培养 5 天,得到菌液;将得到的菌液离心,弃上清,0.9% w/v 生理盐水离心洗涤 2-3 次,用 0.9% w/v 的生理盐水稀释到 500ml 左右(菌体:生理盐水 = 20 : 250v/v),混合均匀,4℃ 贮藏备用:

[0037] 所述富集培养基组成是:双蒸水 750mL,硝酸钾 2g,磷酸二氢钾 1g,磷酸氢二钾 1g,硫酸镁 0.2g,柠檬酸钠 5g,微量盐溶液 2mL;

[0038] 3) 用海藻酸钠-聚乙烯醇包埋所获得的好氧反硝化菌:

[0039] 5% w/v 聚乙烯醇和 5% w/v 海藻酸钠的混合溶液 60mL,加热使其完全混合,高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌,冷却至室温,与 80mL 好氧反硝化菌悬液充分混合;将此混合液用针筒挤入到 4% w/v 氯化钙溶液中,冰浴,边滴边搅拌,使其形成直径为 2mm 的小球;将形成的小球放置于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h 后,用无菌水清洗小球,再放入饱和硼酸溶液中,于 4℃ 冰箱中交联固化 11-13h 后,用生理盐水洗涤 2-3 次备用。

[0040] 4) 用海藻酸钠和聚乙烯醇分别包埋所获得的好氧反硝化菌:

[0041] 海藻酸钠固定法:称取 4g 海藻酸钠溶解到 60mL 的 0.9% w/v 的生理盐水中,高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌,冷却至室温,与 80mL 好氧反硝化细菌悬浮液充分混合,滴入

4% w/v 氯化钙溶液中,冰浴,边滴边搅拌,使其形成直径为 2mm 的小球;将形成的小球放置于 4℃ 冰箱中交联固化 22-25h,用生理盐水洗涤 2-3 次备用。

[0042] 聚乙烯醇固定法:配制 60mL 10% w/v 的聚乙烯醇溶液,高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌,冷却到室温,与 80mL 好氧反硝化菌悬液充分混合,滴入饱和硼酸溶液中,冰浴,边滴边搅拌,使其形成直径为 2mm 的小球;将形成的小球放置于 4℃ 冰箱中交联固化 22-25h 后,用生理盐水洗涤 2-3 次备用。

[0043] 5) 活化固定化小球:

[0044] 将制备步骤 3 中所制得的好氧反硝化细菌固定化小球从冰箱中取出,用双蒸水或者 0.9% w/v 的生理盐水洗涤 3-4 次,然后浸泡在 0.9% w/v 的生理盐水中,曝气 11-13h 以活化固定化小球。

[0045] 6) 将制备步骤 5 中的固定化小球放入制备步骤 2 所述的液体培养基中,每 2 小时采样一次,则制备步骤 3,4 中所得固定化小球不同阶段的平均好氧反硝化速率如图 1 所示。前 6h 的平均好氧反硝化速率 SAL 小球 > SAL+PVA 小球 > PVA 小球,分别为 $45.85\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $45.70\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $26.71\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

[0046] 实施例 2:

[0047] 将实施例 1 中制备步骤 1-5 制得的等量的三种固定化小球分别置于 $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 NaOH、 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl、CaCl₂、KH₂PO₄ 等溶液中浸泡 24h,观察固定化小球的完好性及强度等的变化。结果如表 1 所示,海藻酸钠-聚乙烯醇固定化小球在酸碱盐溶液中具有更好的稳定性。

[0048] 表 1 3 种载体包埋固定化小球在酸、碱、盐溶液中的稳定性

[0049]

小球	KH ₂ PO ₄ (mol·L ⁻¹)	CaCl ₂ (mol·L ⁻¹)	NaCl (mol·L ⁻¹)	NaOH(mol·L ⁻¹)			HCl(mol·L ⁻¹)		
	1	1	1	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1
SAL	+++	0	+	0	0	+	0	0	+
SAL+PVA	+	0	0	0	+	+	0	+	+
PVA	0	++	++	+++	++	++	++	++	++

[0050] 注:未变(0);略变软,略发泡,弹性较差(+);变软,发泡,弹性差(++);发泡,结构松散,易碎(+++)

[0051] 其它步骤与实施例 1 相同。

[0052] 实施例 3:

[0053] 一种提高人工湿地脱氮效率的固定化细菌在人工湿地中的应用,其步骤是:

[0054] 将实施例 1 中制备步骤 1-5 制得的海藻酸钠-聚乙烯醇固定化小球应用于人工湿地模拟柱中的脱氮研究。进行脱氮处理的硝态氮废水浓度为 80mg/L, COD_{Cr} 约为 400mg/L。填充高度约为 2.5cm,装置如图 2 所示,其中,A、B 系统下层填料为 2-3mm 的圆陶粒,上层分别为固定化小球和被菌悬液浸泡过的陶粒,C 系统中为与 A、B 系统填料高度相等,规格一样的陶粒,分别取 4h、8h、12h、18h、24h、36h、48h、72h 时段的水样进行硝化速率以及亚硝态氮

残留量的分析,结果分别如图 3、4 所示。36h 时,三个系统的硝态氮的去除率都达到了 98% 以上,但是填充了固定化小球的系统,亚硝态氮的残留量几乎为零。

[0055] 其它步骤与实施例 1 相同。

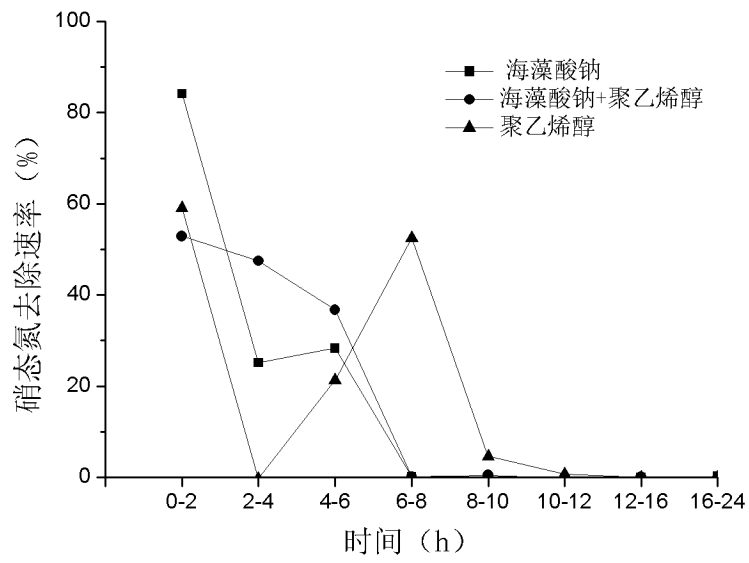


图 1

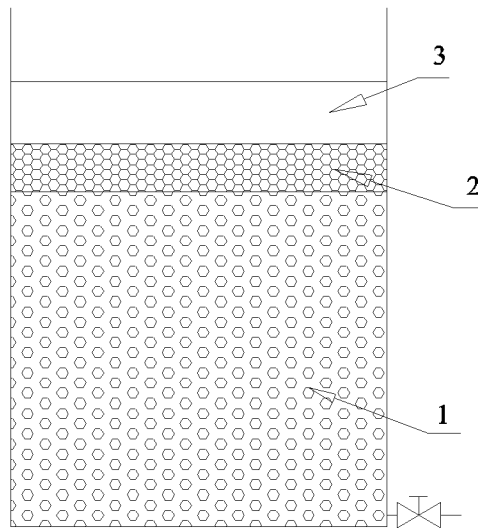


图 2

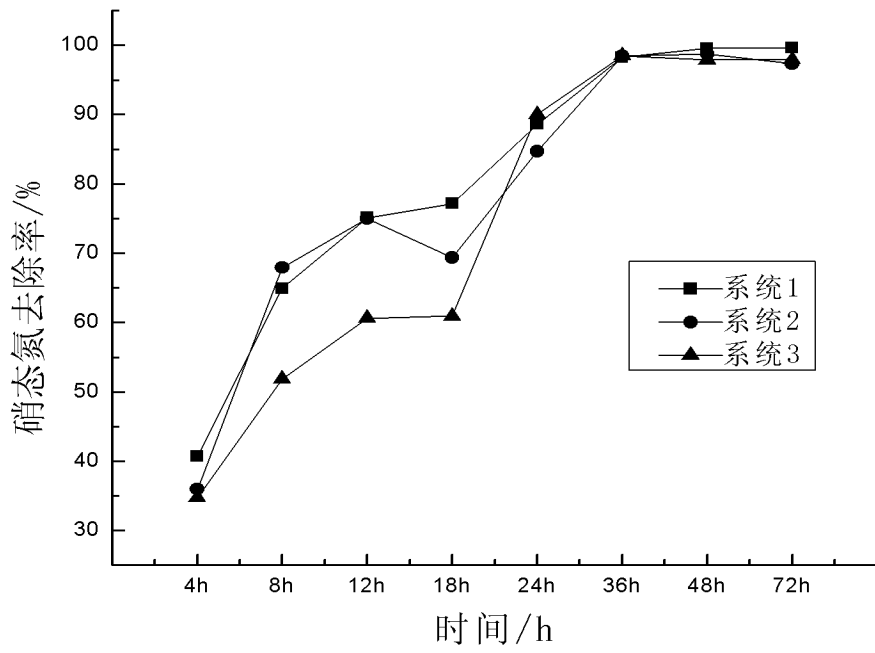


图 3

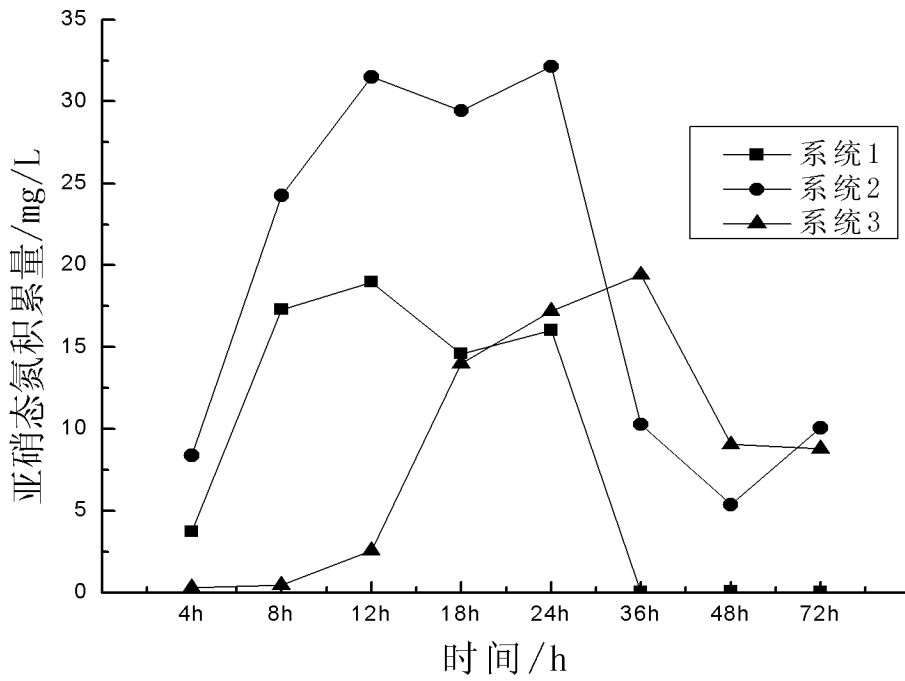


图 4