



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103468667 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201310423208. X

(22) 申请日 2013. 09. 17

(73) 专利权人 中国科学院水生生物研究所
地址 430071 湖北省武汉市武昌东湖南路 7 号

(72) 发明人 吴振斌 张雪琪 周巧红 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 11/02(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102392011 A, 2012. 03. 28,

CN 203593664 U, 2014. 05. 14,

白雪 等. 聚乙烯醇载体制备及其固定化

微生物处理污水研究进展. 《离子交换与吸附》. 2010, 第 26 卷 (第 4 期), 377-384.

王玲 等. 固定化菠萝果酒酵母菌的制备及其应用. 《食品与机械》. 2012, 第 28 卷 (第 6 期), 218-222.

审查员 李楠

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,其步骤:1. 丝瓜络的预处理:取老熟的丝瓜剥去外皮,除去内瓤,剪成一定体积的小长方体,放在沸水中煮沸,然后在水龙头下洗涤,放在去离子水中浸泡,在烘箱中烘至恒重,于干燥器中贮存备用。2. 好氧反硝化细菌的富集培养及菌悬液的制备:挑选斜面保存的好氧反硝化细菌,加入到经过高温高压灭菌的富集培养基中,得到菌液;3. 以聚乙烯醇为载体,以丝瓜络为支持物制备固定化好氧反硝化细菌。聚乙烯醇和丝瓜络均来源广泛,价格低廉,机械强度高,稳定性好,提高固定化细菌的浓度,该方法工艺操作简单,生产成本低,易于在工业上应用。

1. 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,其步骤是:

1) 丝瓜络的预处理:取老熟的丝瓜剥去外皮,除去内瓤,剪成体积为 $1.2\text{cm} \times 1.2\text{cm} \times 0.7\text{cm}$ 的小长方体,放在沸水中煮沸 $20 \sim 30\text{min}$,然后在水龙头下洗涤,放在去离子水中浸泡 $12 \sim 24\text{h}$,在 $68 - 72^\circ\text{C}$ 烘箱中烘 $5 \sim 6\text{h}$ 至恒重,于干燥器中贮存备用;

2) 好氧反硝化细菌菌悬液的制备:

挑选 $1 \sim 2$ 环斜面保存的好氧反硝化细菌,加入到经过高温高压: 121°C , $105-110\text{kPa}$ 灭菌的富集培养基中,在 $29 - 31^\circ\text{C}$ 下曝气培养 $47 - 50\text{h}$,得到菌液;将得到的菌液离心,弃去上清液,用 0.9% 生理盐水离心洗涤 $3 \sim 4$ 次,再用 0.9% 生理盐水稀释至体积为 $1500\text{mL}-1600\text{mL}$,混合均匀, 4°C 贮藏备用,最后得到细菌浓度为 $9 \times 10^5 \sim 9 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ 的好氧反硝化细菌菌悬液;

3) 以聚乙烯醇为载体:以丝瓜络为支持物制备固定化好氧反硝化细菌,将聚乙烯醇加热溶解于 260mL 温度为 $60-80^\circ\text{C}$ 的去离子水中,冷却至 $30-40^\circ\text{C}$ 后放置于室温下 $23 - 25\text{h}$,同 40mL 细菌浓度为 $9 \times 10^5 \sim 9 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ 的好氧反硝化细菌的菌悬液混合均匀,然后放入已灭菌的丝瓜络块,混合液浸入到丝瓜络的缝隙中,用无菌镊子将浸满混合液的丝瓜络转移到饱和硼酸溶液中,于 4°C 冰箱中交联固化 $12 \sim 24\text{h}$,用无菌水洗涤 $2 \sim 3$ 次后转移至 0.9% 的生理盐水中,于 4°C 冰箱中贮存备用;

所述的富集培养基组成如下:去离子水 1000mL , $\text{KNO}_3 2\text{g}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 1\text{g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 1\text{g}$, $\text{MgSO}_4 0.4\text{g}$, 柠檬酸钠 5g , 微量盐溶液 2mL 。

一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术和水处理领域,更具体涉及一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,适用于脱氮除磷等细菌的固定化。

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。

[0003] 生物反硝化是解决水体中硝态氮污染问题的主要方法之一,传统的生物脱氮理论认为细菌的反硝化作用是在缺氧或厌氧条件下进行的,但好氧反硝化菌的发现打破了此规律,其利用好氧反硝化酶使反硝化作用可以在有氧条件下进行。随着生物脱氮技术的不断改进、更新,固定化微生物脱氮技术日益受到广泛关注。固定化好氧反硝化菌脱氮技术在一定程度上解决了好氧反硝化菌直接投放于工艺研究中存在的脱氮效率低,菌种易流失,脱氮稳定性差等问题。

[0004] 目前主要使用的细菌固定化方法为包埋法,即将菌体包埋在各种多孔载体中,使菌体固定化。而最常用的包埋材料是海藻酸钠和聚乙烯醇,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,聚乙烯醇作为有机合成高分子载体强度较高,化学稳定性好,价格低廉,但传质性能较差,包埋后对细胞的活性有影响。因此,开发研制性能优良的包埋载体材料仍是生物固定化技术的重要课题之一。

[0005] 丝瓜络,为葫芦科一年生草本植物丝瓜的成熟果实中的维管束或者说丝瓜的枯老果实,其来源广泛,作为一种生物亲和性载体,它具有良好的化学稳定性,可回收利用性,可再生性以及机械强度,表面粗糙多孔,比表面积大,适合作为固定化细菌的载体。经文献检索,未发现用聚乙烯醇和丝瓜络固定好氧反硝化细菌的发明专利。

发明内容

[0006] 本发明针对游离好氧反硝化细菌在实际污水处理工艺中菌体易被流水冲走,浓度易被稀释,导致脱氮效率低,脱氮稳定性差等问题,是在于提供了一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,采用聚乙烯醇和丝瓜络,以聚乙烯醇和丝瓜络为载体,制备固定化好氧反硝化细菌,聚乙烯醇和丝瓜络均来源广泛,价格低廉,机械强度高,稳定性好,丝瓜络表面多孔粗糙,可以改善聚乙烯醇的传质性能,聚乙烯醇则进一步防止细菌的流失,提高固定化细菌的浓度;该方法工艺操作简单,生产成本低,易于在工业上应用。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,其步骤是:

[0009] 1) 丝瓜络的预处理:取老熟的丝瓜剥去外皮,除去内瓤,剪成体积为 $1.2\text{cm}\times 1.2\text{cm}\times 0.7\text{cm}$ 的小长方体,放在沸水中煮沸 $20\sim 30\text{min}$,然后在水龙头下洗涤,放在去离子水中浸泡 $12\sim 24\text{h}$,在 $68\sim 72^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘 $5\sim 6\text{h}$ 至恒重,于干燥器中贮存备用。

[0010] 2) 好氧反硝化细菌菌悬液的制备:

[0011] 挑选 1~2 环斜面保存的好氧反硝化细菌(来源于实验室已筛选出的细菌,该菌已发表文章《人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究》农业环境科学学报 2010, 29(6):1193-1198),加入到经过高温高压:121℃,105-110kPa 灭菌的富集培养基中,在 29-31℃ 下曝气培养 47-50h,得到菌液;将得到的菌液离心,弃去上清液,用 0.9% 生理盐水离心洗涤 3~4 次(6000r/min,10min),再用 0.9% 生理盐水稀释至体积为 1500mL-1600mL (菌体:生理盐水=1:40v/v),混合均匀,4℃ 贮藏备用,最后得到细菌浓度为 $9 \times 10^5 \sim 9 \times 10^7$ cfu/mL 的好氧反硝化细菌菌悬液。

[0012] 所述的富集培养基组成如下:去离子水 1000mL, KNO_3 2g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.4g, 柠檬酸钠 5g, 微量盐溶液 2mL。

[0013] 3) 以聚乙烯醇为载体,以丝瓜络为支持物制备固定化好氧反硝化细菌:

[0014] 将 30g 聚乙烯醇加热溶解于 260mL 温度为 60-80℃ 的去离子水中,冷却至 30-40℃ 后放置于室温(20-25℃)下 23-25h,同 40mL 细菌浓度为 $9 \times 10^5 \sim 9 \times 10^7$ cfu/mL 的好氧反硝化细菌的菌悬液混合均匀,然后放入 40 粒已灭菌的丝瓜络块,待混合液充分浸入到丝瓜络的缝隙中,用无菌镊子将浸满混合液的丝瓜络转移到饱和硼酸溶液中,于 4℃ 冰箱中交联固化 12-24h,用无菌水洗涤 2-3 次后转移至 0.9% 的生理盐水中,于 4℃ 冰箱中贮存备用;

[0015] 本发明选择以聚乙烯醇为载体,以丝瓜络为支持物制备的固定化好氧反硝化细菌同颗粒状的载体相比,更容易保存,分离,具有脱氮效率高,亚硝态氮累积量低,机械强度高,性质稳定,使用寿命长,重复利用性好,方法简单,生产成本低等特点。相关试验研究结果表明所制备的固定化好氧反硝化细菌对硝态氮的去除率最高可达 97.2%,并且无亚硝态氮的累积,在重复利用 7 批之后,仍具有良好的脱氮效果,对硝态氮的去除率为 96.9%。

附图说明

[0016] 图 1 为一种固定化好氧反硝化细菌去除硝态氮效果图。

[0017] 将固定化好氧反硝化细菌,菌量相同的游离好氧反硝化细菌以及未包埋好氧反硝化细菌的聚乙烯醇和丝瓜载体(即空白固定化载体)投入到等体积的液体培养基中,每隔 12h 采样一次,测定硝态氮含量。

[0018] 所述培养基组成如下去离子水 1000mL, KNO_3 2g, K_2HPO_4 1g, KH_2PO_4 1g, MgSO_4 0.4g, 柠檬酸钠 5g, 微量盐溶液 2mL。

[0019] 图 2 为一种固定化好氧反硝化细菌扫描电镜观察图。

[0020] 将固定化好氧反硝化细菌进行预处理后送至测试部门进行 SEM 电子扫描电镜观察

[0021] 图 3 为一种固定化好氧反硝化细菌重复利用性效果图。

[0022] 将固定化好氧反硝化细菌进行第一次反硝化性能测试后,再重复试验 6 次,每次反硝化试验结束后,测定硝态氮的含量。

具体实施方式

[0023] 实施例 1:

[0024] 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,其步骤是:

[0025] 1) 丝瓜络的预处理:取老熟的丝瓜剥去外皮,除去内瓢,剪成体积为 1.2cm×1.2cm×0.7cm 的小长方体,放在沸水中煮沸 20 或 23 或 26 或 28 或 30min,然后在水龙头下洗涤,放在去离子水中浸泡 12 或 14 或 17 或 19 或 22 或 24h,在 68 或 69 或 70 或 71 或 72℃烘箱中烘 5 或 6h 至恒重,于干燥器中贮存备用。

[0026] 2) 好氧反硝化细菌的菌悬液的制备:

[0027] 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 29 或 30 或 31℃下曝气培养 47 或 48 或 49 或 50 或 51h,得到菌液;将得到的菌液离心,弃去上清液,用 0.9% 生理盐水离心洗涤 3 或 4 次(6000r/min,10min),再用 0.9% 生理盐水稀释到一定体积,混合均匀,4℃贮藏备用;

[0028] 所述的富集培养基组成如下:去离子水 1000mL, KNO₃2g, K₂HPO₄1g, KH₂PO₄1g, MgSO₄0.4g, 柠檬酸钠 5g, 微量盐溶液 2mL。

[0029] 3) 以聚乙烯醇为载体,以丝瓜络为支持物制备固定化好氧反硝化细菌:

[0030] 将 30g 聚乙烯醇加热溶解于 260mL 温度为 60 或 65 或 70 或 75 或 80℃的去离子水中,冷却至 30 或 32 或 34 或 36 或 38 或 40℃后放置于室温下 23 或 24 或 25h,同 40mL 细菌浓度为 $9 \times 10^5 \sim 9 \times 10^7$ cfu/mL 的好氧反硝化细菌的菌悬液混合均匀,然后放入 40 粒已灭菌的丝瓜络块,待混合液充分浸入到丝瓜络的缝隙中,用无菌镊子将浸满混合液的丝瓜络转移到饱和硼酸溶液中,于 4℃冰箱中交联固化 12 或 14 或 15 或 18 或 20 或 22 或 24h,用无菌水洗涤 2 或 3 次后转移至 0.9% 的生理盐水中,于 4℃冰箱中贮存备用;

[0031] 4) 将步骤 3 中的固定化好氧反硝化细菌,菌量相同的游离好氧反硝化细菌以及未包埋好氧反硝化细菌的聚乙烯醇和丝瓜络载体(即空白固定化载体)分别放入步骤 2 所述的液体培养基中,每隔 12h 采样一次,测定硝态氮含量。空白固定化载体,游离细菌、聚乙烯醇和丝瓜络对硝态氮的最高去除率分别为 8.7%,

[0032] 61.3% 和 97.2% (图 1)。

[0033] 实施例 2:

[0034] 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法,其步骤是:

[0035] 将实施例 1 中步骤 3 制得的等量固定化好氧反硝化细菌分别置于 0.01mol·L⁻¹、0.1mol·L⁻¹、1mol·L⁻¹ 的 HCl 和 NaOH、1mol·L⁻¹ 的 NaCl、CaCl₂、KH₂PO₄ 等溶液中浸泡 24h,观察固定化好氧反硝化细菌完好性及强度等的变化。并同公知的分别以海藻酸钠(SA),聚乙烯醇(PVA),海藻酸钠+聚乙烯醇(SA+PVA)为包埋材料的固定化小球的稳定性能进行对比,结果如表 1 所示,固定化好氧反硝化细菌在酸碱盐溶液中具有更好的稳定性。

[0036] 表 1 固定化好氧反硝化细菌在酸、碱、盐溶液中的稳定性(溶液单位:mol·L⁻¹)

[0037]

固定化载体	KH ₂ PO ₄		CaCl ₂		NaCl		NaOH			HCl	
	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	+	+	0	+	+	
PVA	0	++	++	++	+++	++	++	++	++	++	
PVA+丝瓜 络	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	

[0038] 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(+++)

[0039] 其它实施步骤与实施例 1 相同。

[0040] 实施例 3：

[0041] 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法，其步骤是：

[0042] 将实施例 1 中步骤 3 制得的固定化好氧反硝化细菌用 2.5% 的戊二醛溶液浸泡 4h，然后用磷酸盐缓冲溶液清洗样品三次，每次静置浸泡 10min，再用乙醇梯度脱水(10%、30%、50%、70%、90% 各一次；每次 10min，100% 乙醇两次，每次 15min)，叔丁醇置换两次，每次 20min，送至相关测试部门进行真空冷冻干燥，喷金及 SEM 电子扫描电镜观察。观察结果如图 2，可见以聚乙烯醇为载体，以丝瓜络为支持物制备的固定化载体表面固定了大量的好氧反硝化细菌。

[0043] 其它实施步骤与实施例 1 相同。

[0044] 实施例 4：

[0045] 一种固定化好氧反硝化细菌的制备方法，其步骤是：

[0046] 将实施例 1 中步骤 3 制得的固定化好氧反硝化细菌放入步骤 2 所述的液体培养基中，在第一次反硝化结束后，倾滤出培养基，将固定化好氧反硝化细菌用无菌水洗涤 3～4 次去除杂质后，再放入与第一次反硝化试验成分相同的无菌培养基，继续进行第二次反硝化试验，同样的方法再进行固定化好氧反硝化细菌的洗涤和第 3～6 次重复反硝化试验。对第 1～6 次反硝化结束后的反硝化溶液分别采样，测定硝态氮的含量。结果如图 3 所示，所制备的固定化好氧反硝化细菌在重复利用 7 批之后，仍具有良好的脱氮效果，对硝态氮的去除率为 96.9%。

[0047] 其它实施步骤与实施例 1 相同。

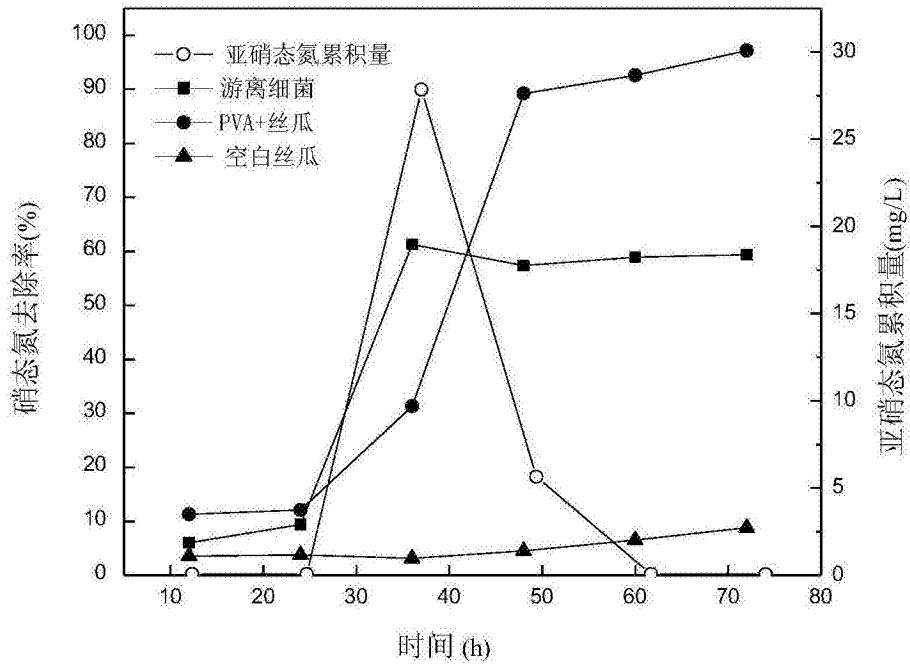


图 1

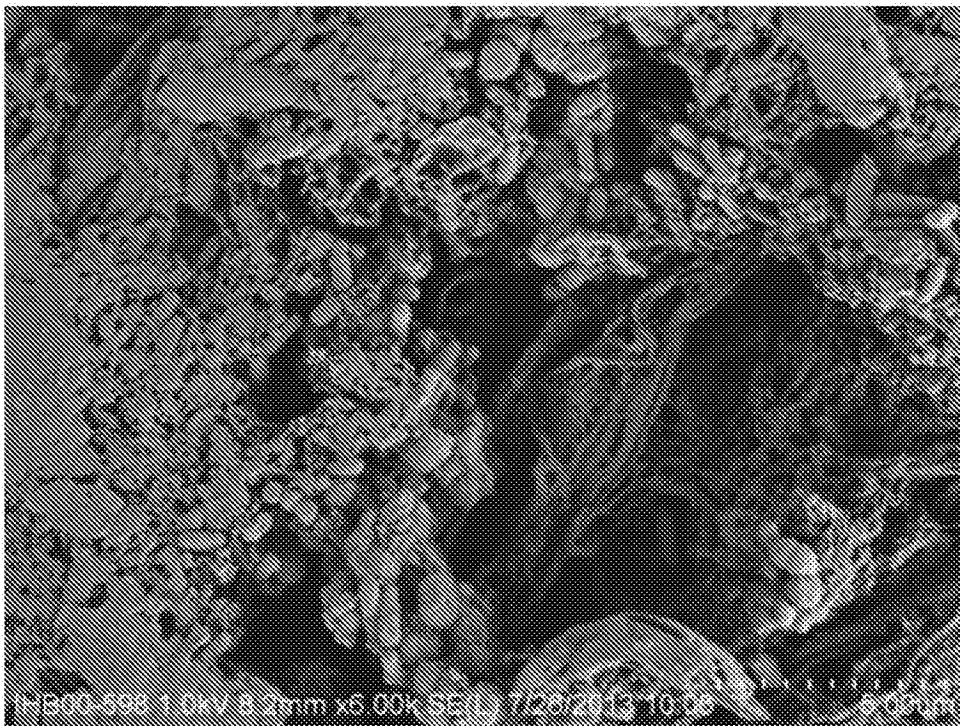


图 2

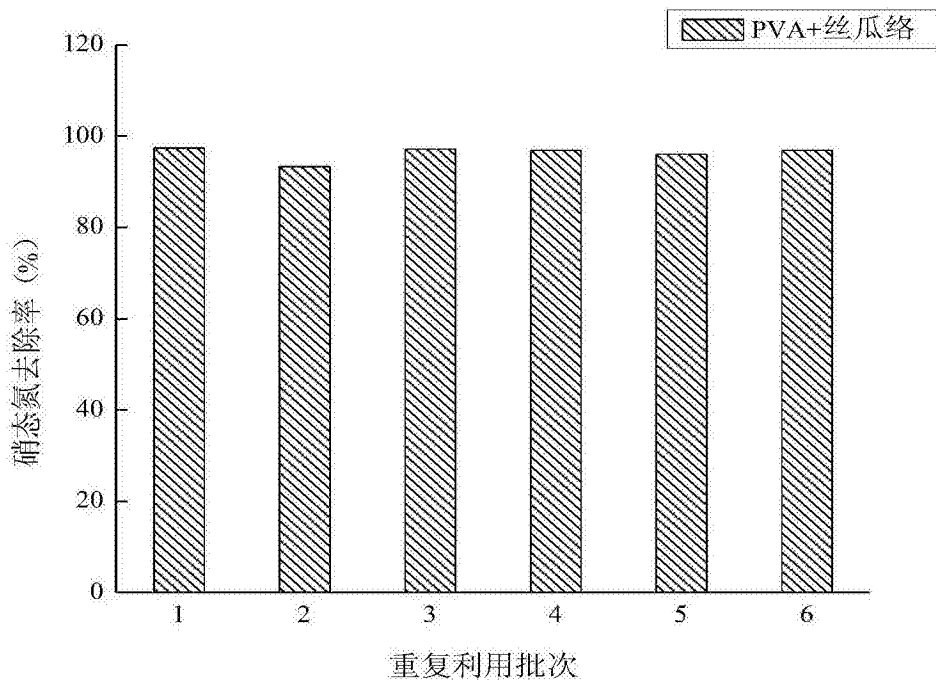


图 3