



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116555069 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 08

(21) 申请号 202211688170.4

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.27

C02F 103/20 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C02F 103/24 (2006.01)

CGMCC No.25879 2022.10.08

C02F 101/16 (2006.01)

(71) 申请人 华北电力大学

地址 102208 北京市昌平区回龙观北农路2号

(72) 发明人 郑茂盛 姚伟

苏吉拉.穆雷克齐.吉文森 詹莹

(74) 专利代理机构 北京箴思知识产权代理有限公司

11913

专利代理师 谭艳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2023.01)

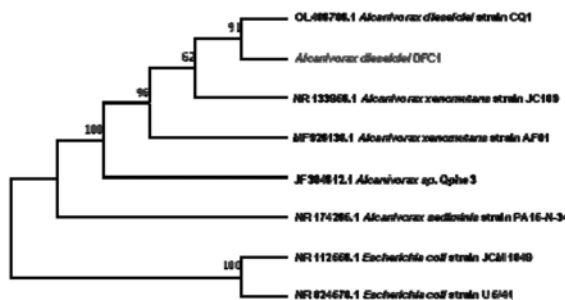
权利要求书1页 说明书6页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌

(57) 摘要

本公开提供了一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌,为柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*) DFC1,其保藏编号为CGMCC No.25879,还提供上述柴油食烷菌DFC1在高盐污水/废水生物脱氮中的应用。本公开提供的柴油食烷菌新菌株DFC1能够在高盐环境下进行反硝化。柴油食烷菌目前已被发现广泛存在于海洋环境中,是海洋环境中最为重要的专性烷烃降解菌,但本公开首次发现柴油食烷菌DFC1还具备脱氮新功能,可能在其他应用场景,例如海水养殖业中同步发挥脱氮功能,减轻海水养殖尾水氮污染问题。



1. 一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌,为柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*)DFC1,其保藏编号为CGMCC No.25879。
2. 权利要求1所述的柴油食烷菌DFC1在高盐污水/废水生物脱氮中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用,所述高盐污水/废水的盐度为1-6%;优选所述高盐污水/废水的盐度为1-4%。
4. 根据权利要求2或3所述的应用,所述生物脱氮中,所用碳源选自乙醇、乙酸钠、葡萄糖、柠檬酸钠和丁二酸钠中的任何一种及以上;优选为乙醇或乙酸钠。
5. 根据权利要求2-4中任一项所述的应用,所述生物脱氮中,所述生物脱氮中,处理时间为12-48h;优选为16-32h,进一步优选为20-32h。
6. 根据权利要求2-5中任一项所述的应用,所述生物脱氮中,所述柴油食烷菌DFC1的对数期菌液与所述高盐污水/废水的盐度的体积比为1:10。
7. 根据权利要求2-4中任一项所述的应用,所述生物脱氮中,所述生物脱氮中,使用含柴油食烷菌DFC1的干粉菌剂施与污水/废水中以除氮。
8. 根据权利要求7所述的应用,所述干粉菌剂为将柴油食烷菌DFC1发酵培养至对数期后与一定量的米糠、草炭土混合后干燥所得。
9. 一种用于高盐污水/废水生物脱氮的干粉菌剂,其特征在于,所述干粉菌剂的制备方法包括:将权利要求1所述的柴油食烷菌DFC1发酵培养至对数生长期的菌液,然后由所述菌液与一定量的草炭土、米糠混合离心去上清后干燥所得。
10. 根据权利要求9所述的干粉菌剂,其特征在于,上述制备方法中,每1L所述菌液中加入100ml所述米糠和50ml所述草炭土。

## 一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌

### 技术领域

[0001] 本公开属于环境微生物技术领域,具体涉及一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌。

### 背景技术

[0002] 近年来,由于人为的过度捕捞和生态环境的严重破坏,野生渔业资源急剧减少。但是人们对海产品的需求在不断增加,所以海水养殖业迅速发展。然而海水养殖过程中会产生大量的含氮污染物并释放到周围环境中,如果未经处理直接排放入海,会增加接收水体中营养成分的含量,导致水体富营养化,严重威胁沿海生态系统。因此,对海水养殖废水进行适当的处理以去除含氮化合物已迫在眉睫。

[0003] 目前为止,人们对海水养殖废水处理进行了各种研究,物理法、化学法和生物法是处理海水养殖废水的三种常用方法。与物理、化学法相比,生物法处理海水养殖废水以其脱氮效率高、能耗低、运行成本低等优点受到广泛关注。自养好氧硝化和异养厌氧反硝化是典型的生物脱氮过程中的两个步骤。然而,这些硝化和反硝化细菌在去除海水废水中氮的过程中存在着一定的不足之处:(1)自养硝化细菌生长缓慢,难以维持较高的生物浓度,且在废水处理中容易被淘汰,不能与异养硝化细菌竞争养分。(2)在传统的生物脱氮系统中,自养硝化菌生长需要好氧条件,而反硝化作用需要缺氧环境,这样势必需要分开建造硝化池和反硝化池。分级硝化反硝化工艺冗长,容易增加基建费用和运行成本。

[0004] 近几十年来,研究报道证实一些菌株在好氧条件下也能进行反硝化作用。好氧反硝化菌在有氧的条件下,利用 $\text{NO}_3^-$ 作为电子受体还原脱氮,提供了在一个反应器中同时硝化和反硝化的可能性。但是目前的好氧反硝化细菌几乎筛选于淡水或土壤环境,不能有效地处理海水养殖废水、海产品加工、制革制油等高盐度废水。在高盐度环境中,渗透压的增加会抑制细胞代谢和酶活性。因此,分离耐盐好氧反硝化细菌,研究高盐度条件下的好氧反硝化性能,具有重要的科学意义和现实意义。同时,也有助于我们重新审视和解决海水养殖废水中的氮污染问题。

[0005] 本发明人新筛选出一株耐盐好氧反硝化菌株DFC1,被鉴定为柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*),之前还尚未发现该菌种具有耐盐好氧反硝化特性。该菌株能够实现含盐废水高效脱氮处理,为污水厂实现同步硝化反硝化工艺提供了一种新思路。

### 发明内容

[0006] 在下文中给出了关于本公开的简要概述,以便提供关于本公开的某些方面的基本理解。应当理解,这个概述并不是关于本公开的穷举性概述。它并不意图确定本公开的关键或重要部分,也不意图限定本公开的范围。其目的仅仅是以简化的形式给出某些概念,以此作为稍后论述的更详细描述的前序。

[0007] 为解决上述技术问题,本公开提供的技术方案是:

[0008] 第一方面,本公开提供一株具有耐盐好氧反硝化特性的柴油食烷菌,为柴油食烷

菌(*Alcanivorax dieselolei*)DFC1,其保藏编号为CGMCC No.25879。

[0009] 本公开的柴油食烷菌DFC1分离于卜蜂水产(东方)有限公司的养殖尾水缺氧段水样,通过富集驯化、梯度稀释及平板划线分离出纯菌,经鉴定表明该菌株与食烷菌(*Alcanivorax*)属的多种细菌具有较高的同源性,为柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*)。经试验发现,该菌株能够实现含盐废水比如养殖废水、工业废水等的高效脱氮处理。

[0010] 第二方面,本公开还提供柴油食烷菌DFC1在高盐污水/废水生物脱氮中的应用。

[0011] 优选地,上述高盐污水/废水的盐度为1-6%(比如1.5%、2%、3%、4%、5%、5.5%等);更优选地,上述高盐污水/废水的盐度为1-4%。

[0012] 优选地,所述生物脱氮中,所用碳源可选自乙醇、乙酸钠、葡萄糖、柠檬酸钠和丁二酸钠中的任何一种及以上;更优选为乙醇或乙酸钠。

[0013] 优选地,所述生物脱氮中,处理时间为12-48h(比如15h、18h、20h、24h、28h、32h、35h、40h、45h等);更优选为16-32h,进一步优选为20-32h。

[0014] 优选地,所述生物脱氮中,所用柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*)DFC1的对数期菌液与上述高盐污水/废水的盐度的体积比为1:10。

[0015] 优选地,所述生物脱氮中,使用柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*)DFC1的干粉菌剂施与污水/废水中以除氮;更优选地,所述干粉菌剂为将柴油食烷菌DFC1发酵培养至对数期后,与一定量的米糠、草炭土混合后干燥所得。

[0016] 第三方面,本公开还提供一种用于高盐污水/废水生物脱氮的干粉菌剂,其制备方法包括:将柴油食烷菌DFC1发酵培养至对数生长期的菌液,然后由所述菌液与一定量的草炭土、米糠混合离心去上清后干燥所得。

[0017] 优选地,上述制备方法中,每1L的菌液中加入100ml米糠和50ml草炭土。

[0018] 相比于现有技术,本公开的有益效果包括但不限于:

[0019] 第一,本公开提供的柴油食烷菌新菌株DFC1能够在高盐环境下进行反硝化。近年来,我国海水养殖产业迅速发展,大量海水养殖尾水需要排放,对其进行适当的处理尤其重要。但是由于盐的存在,使得废水中的脱氮处理过程受到很大影响。因此,筛选出能够耐盐的好氧反硝化菌至关重要。本公开提供的柴油食烷菌新菌株DFC1为解决高盐废水的脱氮问题提供良好的基础。

[0020] 第二,柴油食烷菌目前已被发现广泛存在于海洋环境中,是海洋环境中最为重要的专性烷烃降解菌,但本公开提供的柴油食烷菌DFC1还具备脱氮新功能,可能在其他应用场景,例如海水养殖业中同步发挥脱氮功能,减轻海水养殖尾水氮污染问题。

[0021] 本公开的柴油食烷菌新菌株保藏日期为2022年10月08日,保藏编号为CGMCC No.25879,分类命名为:柴油食烷菌(*Alcanivorax dieselolei*)DFC1,保藏单位名称为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,邮编为100101。

## 附图说明

[0022] 图1为实施例1中柴油食烷菌DFC1的系统发育树;

[0023] 图2为实施例2中柴油食烷菌DFC1在高盐(盐度3%)条件下的脱氮曲线;

- [0024] 图3为实施例3中柴油食烷菌DFC1在不同碳源条件下的脱氮曲线；  
[0025] 图4为实施例4中柴油食烷菌DFC1在不同盐度条件下的脱氮曲线；  
[0026] 图5为实施例5中柴油食烷菌DFC1在不同溶解氧条件下的脱氮曲线；  
[0027] 图6为实施例1中分离纯化得到的不同菌株的24小时后硝氮去除率柱状图；  
[0028] 图7为应用例1中制备的干粉菌剂32小时内的脱氮曲线。

## 具体实施方式

[0029] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。再不背离本发明精神和实质的情况下,本发明方法、步骤或条件所做的修改或替换,属于本发明的范围。

[0030] 在下文中将结合示范性实施例对本公开的技术方案进行描述。

[0031] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0032] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0033] 实施例1:耐盐好氧反硝化菌的筛选、鉴定和保藏。

[0034] (1) 菌株及培养基准备

[0035] 菌株来源于卜蜂水产(东方)有限公司的养殖尾水缺氧段水样。

[0036] 液体耐盐反硝化培养基(硝氮浓度约100mg/L)包含以下化学物质:CH<sub>3</sub>COONa 1.71g/L,NaNO<sub>3</sub> 0.6g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.6g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g/L,CaCl<sub>2</sub> 0.02g/L,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005g/L,NaCl 30g/L,微量元素溶液0.1mL。其中,微量元素溶液包含MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.0344g/L、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.05g/L、ZnCl<sub>2</sub> 0.07g/L、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.0726g/L、CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.02g/L、NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.024g/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.08g/L、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0g/L。

[0037] 琼脂平板培养基是在每升上述液体耐盐反硝化培养基的基础上加入1mL BTB溶液(1%无水酒精溶解)和20g琼脂,其他成分不变。

[0038] 所有培养基在使用前均在120℃下灭菌90分钟,以确保无微生物污染。

[0039] (2) 富集驯化:将10mL养殖尾水加入含有90mL无菌液体耐盐反硝化培养基的锥形瓶中。将接种的培养基在30℃和120rpm的条件下培养至液体浑浊。然后,取10ml细胞悬液转移到新的90ml无菌液体耐盐培养基中,同样条件下进行驯化。最后在同样条件步骤下完成第三次富集驯化。

[0040] (3) 分离纯化:将步骤(2)所得富集驯化好的菌悬液进行梯度稀释。将稀释后的细胞悬液均匀涂覆在琼脂平板培养基上,置于30℃恒温生化培养箱中培养。随时观察,当平板上长出小型菌落时,挑取不同菌落分别进行平板划线分离多次,在进行最后一步平板划线后,挑选不同形态的菌落,接入30ml步骤(1)所述的液体耐盐反硝化培养基中培养活化14h到菌株对数生长期,得到了不同纯菌株菌液,编号分别为A1、A2、B1、B2、C1和C2。

[0041] 对这六种菌分别进行初始硝氮为100mg/L的去除实验,步骤如下:分别各取3ml分离纯化后获得的6种纯菌株菌液,分别加入到30ml液体耐盐反硝化培养基,30℃培养,计算24h后硝氮去除率,结果如图6所示。可知,菌株C1的24h后硝氮去除率最高,为99.32%,因此,选择菌株C1作为后续研究对象并对其进行鉴定。

[0042] (4) 菌株鉴定:用土壤FastDNA SPIN试剂盒(MPbio,America)提取菌株C1基因组DNA,通过聚合酶链反应(PCR)扩增16S rDNA基因。PCR扩增产物由Magi Biomedical(上海)

测序。使用BLAST工具对获得的序列与GenBank数据库中的其他相关细菌进行比较, BLAST比对结果表明该菌株与食烷菌 (*Alcanivorax*) 属的多种细菌具有较高的同源性, 并鉴定为柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*)。利用MEGA软件 (6.0版) 采用邻域连接法构建菌株的系统发育树, 如图1所示。

[0043] 发明人将之命名为柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*) DFC1, 并提交保藏, 保藏日期为2022年10月08日, 保藏编号为CGMCC No. 25879, 分类命名为: 柴油食烷菌 (*Alcanivorax dieselolei*) DFC1, 保藏单位名称为: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称CGMCC), 地址为: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 邮编为100101。

[0044] 实施例2: 菌株在高盐 (盐度3%) 条件下的脱氮实验

[0045] 将实施例1初筛得到的柴油食烷菌DFC1按照实施例1的方法活化得到菌液, 再取菌液3ml接种到30ml液体耐盐反硝化培养基 (盐度3%) 中, 30℃振荡培养48h, 期间每隔一段时间测定培养液中硝态氮、亚硝态氮、氨氮的含量, 计算硝态氮降解率, 由此对通过富集驯化、分离纯化得到的耐盐好氧反硝化菌进行性能测试。

[0046] 通过紫外分光光度法在波长275nm和220nm处测定硝氮吸光度, 用N-(1-萘)-乙二胺分光光度法在540nm处测定亚硝氮吸光度, 用纳氏试剂分光光度法在420nm处测定氨氮吸光度。计算得出的校正后的吸光度, 可根据标准曲线计算出对应的硝态氮、亚硝氮及氨氮浓度, 所得数据乘以相应的稀释倍数。

[0047] 菌株对硝氮的去除结果如图2所示。结果显示该菌株在高盐 (3%) 条件下对硝氮仍有较好的去除效果。培养32小时后菌株在3%的盐度下对硝氮的去除率甚至达到了100%, 因此, 该菌株在高盐条件下有效实现了脱氮过程。

[0048] 实施例3: 菌株在不同碳源条件下的脱氮实验

[0049] 将实施例1筛选出的柴油食烷菌DFC1接种于碳源为乙酸钠的液体耐盐反硝化培养基中, 于30℃、120r/min的摇床中进行活化 (同实施例1)。等到菌株生长至对数生长期后, 取3mL菌液接入到新鲜30mL碳源分别为甲醇、柠檬酸钠、葡萄糖、乙酸钠、乙醇和丁二酸钠的反硝化培养基中, 于30℃、120r/min的摇床中进行振荡培养。每隔2h取少量菌液, 在12000rpm下离心2min, 取上清液分别测定硝氮、亚硝氮浓度, 结果参见图3。

[0050] 从图3可以看出, 以甲醇为唯一碳源时, 菌株的生长速度较慢, 32小时后 $\text{NO}_3^-$ -N去除率仅为13.24%。当以葡萄糖为唯一碳源时, 培养基中 $\text{NO}_3^-$ -N浓度在18h到32h之间迅速下降, 由18小时的73.79mg/l降至32小时的21.05mg/l,  $\text{NO}_3^-$ -N的去除率由9.69%提高到74.2%。在以柠檬酸钠和丁二酸钠为碳源的培养基中, 18h后 $\text{NO}_3^-$ -N的去除率分别为70%和50%左右。除此之外, 以乙醇为唯一碳源时, 20h后 $\text{NO}_3^-$ -N去除率可达100%。而以乙酸钠为唯一碳源时,  $\text{NO}_3^-$ -N去除率在95%~100%之间, 未达到100%。由以上数据分析可知, 乙醇是最有效的碳源, 对 $\text{NO}_3^-$ -N的去除率最高, 其次是乙酸钠、葡萄糖、柠檬酸钠和丁二酸钠, 以甲醇为底物时,  $\text{NO}_3^-$ -N去除率最差。

[0051] 实施例4: 菌株在不同盐度条件下的脱氮实验

[0052] 提前将实施例1筛选出的柴油食烷菌DFC1活化好 (同实施例1), 待菌株生长至对数生长期后, 取3mL菌液接入到新鲜的盐度已调为0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%和6%的30mL反硝化培养基 (配方参照实施例1, 仅调整盐度) 中, 于30℃、120r/min的摇床中进行振荡培养。然后每隔2h取少量菌液, 在12000rpm下离心2min, 取上清液测定硝氮亚硝氮浓度, 结果参见

图4。

[0053] 图4示出了菌株在不同盐度下的反硝化速率。在培养基中不添加氯化钠的情况下,32小时内硝酸盐浓度基本没有变化。盐度为1%时,18h时硝酸盐浓度已经降到0mg/L,去除率为100%。随着盐度的增加,硝酸盐浓度达到最低所需时间增加。在盐度为2%和3%的条件下,分别经过22小时和24小时,硝酸盐被完全去除。而在盐度为4%时,菌株的32h反硝化率为94.06%,在盐度为5%时,菌株的32h反硝化率下降到73.70%。当盐度继续增加到6%时,菌株的反硝化率显著下降,培养32h后,硝酸盐浓度由97.63mg/l降至50mg/l,去除率为51.50%。这些数据表明柴油食烷菌DFC1在盐度为1-6%的培养基中均能实现反硝化,但只有在盐度为1-3%时,仍能保持较高的硝酸盐去除效率。因此,该菌株被分类为耐盐菌。

#### [0054] 实施例5:菌株在不同溶解氧条件下的脱氮实验

[0055] 通过纯氮气排空血清瓶的顶空,然后将装满氧气的针管插在血清瓶的橡胶塞上,在血清瓶中补充不同体积的氧气,使溶解氧(DO)体积占比血清瓶顶空体积分别为0%、10%、20%、30%、50%和100%,从而考察溶解氧对实施例1所得新菌株柴油食烷菌DFC1脱氮的影响,其他实验条件同实施例1。同样地,在实验之前,需要将菌株提前活化好,活化步骤同实施例1。每隔2h监测硝态氮和亚硝酸盐氮的变化,结果参见图5。

[0056] 从图5可以看出,当氧体积比为0%时,即在厌氧条件下,硝酸盐的去除速度相对较慢,32h时硝酸盐浓度由初始的90.46mg/L降至30.38mg/L, $\text{NO}_3^-$ -N的最终去除率达到66.42%。此外,从图5还可以看出,随着DO浓度的增加,微生物反硝化作用基本呈增强趋势。溶解氧浓度的增加对该菌株的反硝化作用没有抑制作用,反而有促进作用。氧的存在不抑制硝酸还原酶的活性,反硝化酶与有氧呼吸系统可以共存。因此,该菌株可鉴定为好氧反硝化菌。而当溶解氧浓度进一步增加时,在氧体积比为100%时,由于菌株活性受到抑制,硝酸盐的去除率略有下降。

#### [0057] 应用例1:

[0058] 利用吸附法制备固定化菌剂,选用草炭土、米糠作为载体材料。将菌液培养至对数生长期,然后在每1L的菌液中,加入100ml米糠和50ml草炭土(均以量筒称取,草炭土提前过10目筛),在12000rpm/min转速下,高速离心机离心5min。离心完成后,去掉上清液,保留沉淀,并装入无菌容器中,放入35℃恒温干燥箱低温烘干,保存备用。

[0059] 按照每立方米废水含300g菌剂的比例,将上述得到的菌剂加入实验室模拟的含盐废水中(配方和实施例1中一样),每隔一段时间取少量水样,在12000rpm下离心2min,取上清液分别测定硝氮浓度,结果如图7所示。结果表明通过上述方法制作成的菌剂加入含盐废水中有一定的脱氮作用,32小时后硝氮去除率达到70.56%。

[0060] 最后,还需要说明的是,在本公开中,如有,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其他任何其变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0061] 尽管上面已经通过本公开的具体实施例的描述对本公开进行了披露,但是,应该

理解,本领域技术人员可在所附方案的精神和范围内设计对本公开的各种修改、改进或者等同物。这些修改、改进或者等同物也应当被认为包括在本公开所要求保护的范围内。



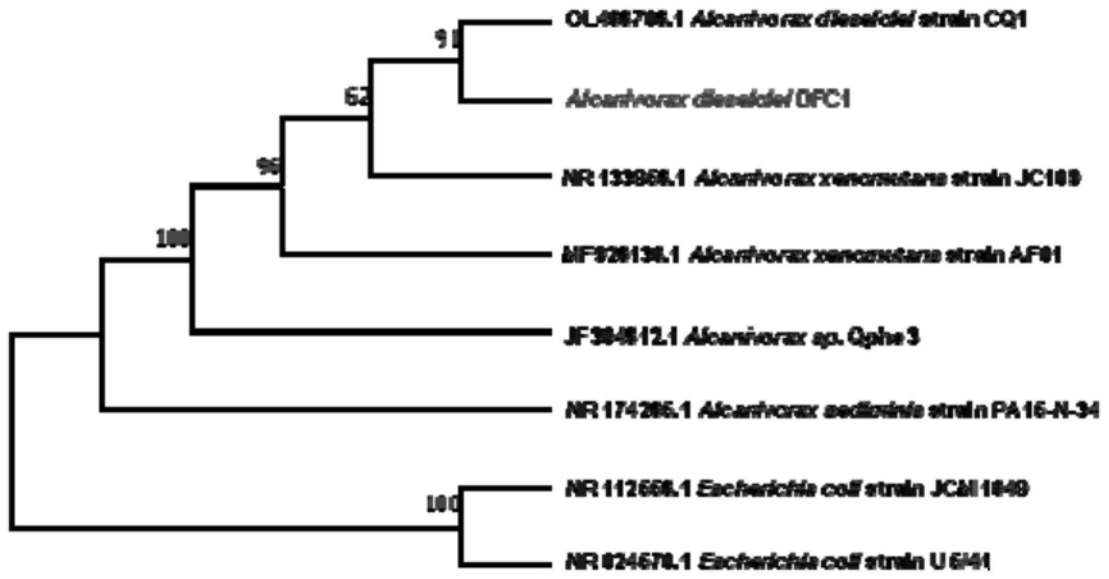


图1

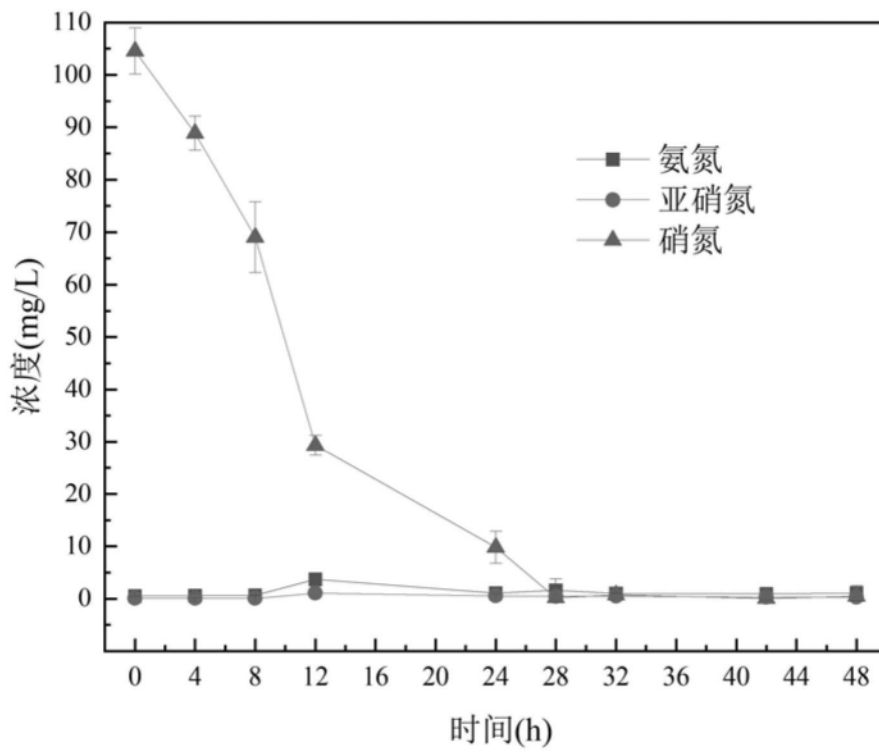


图2

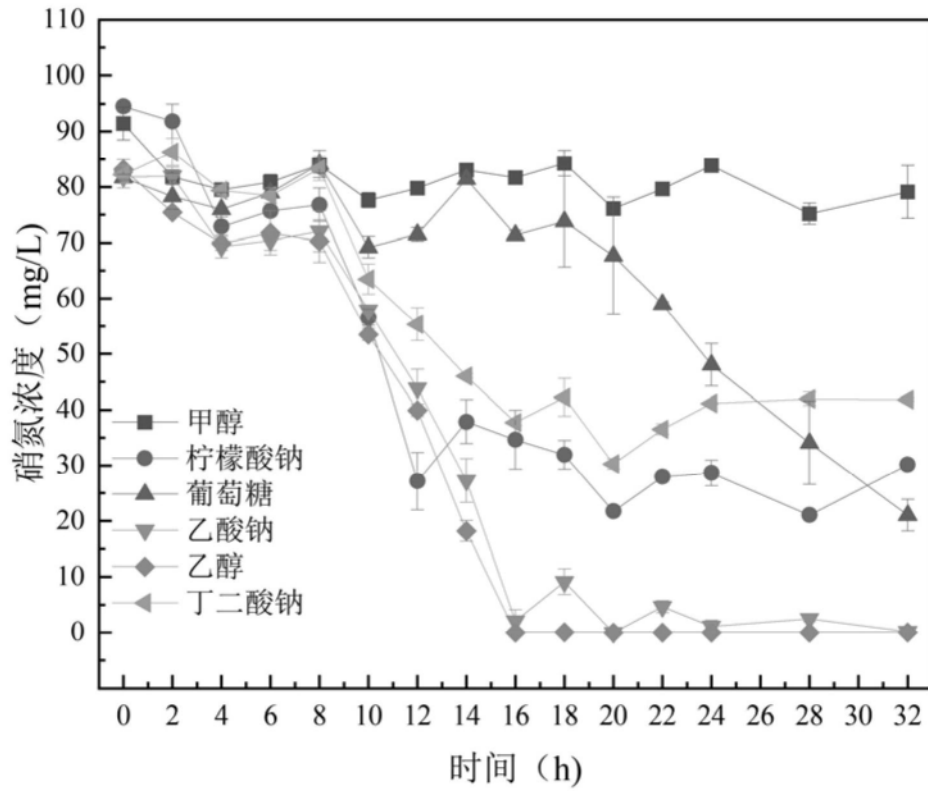


图3

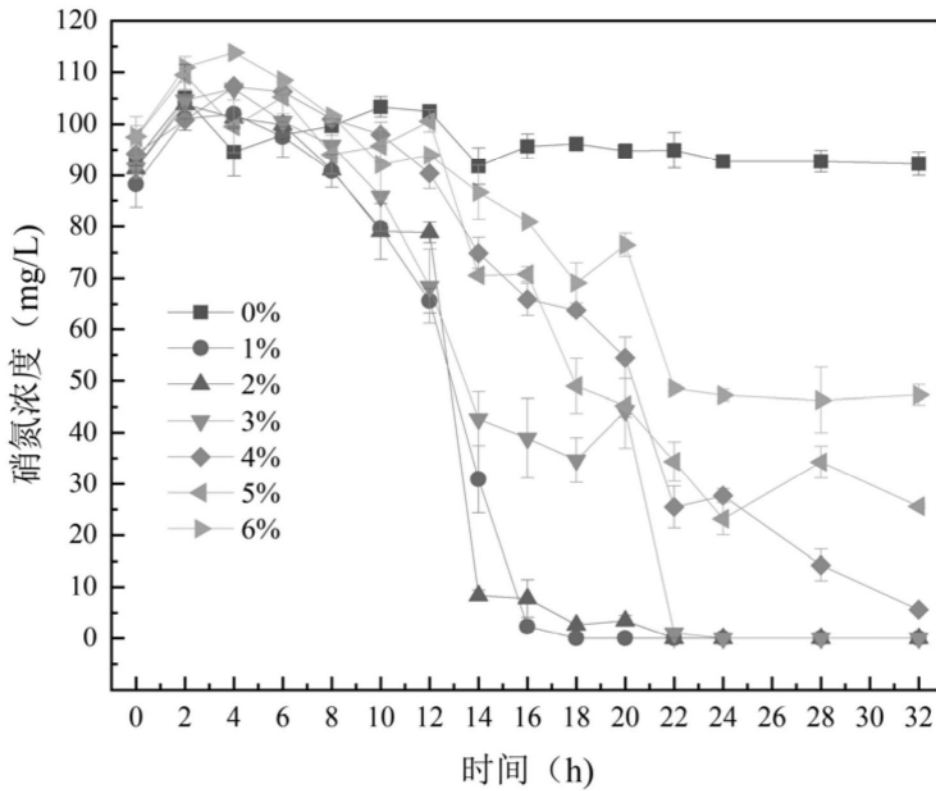


图4

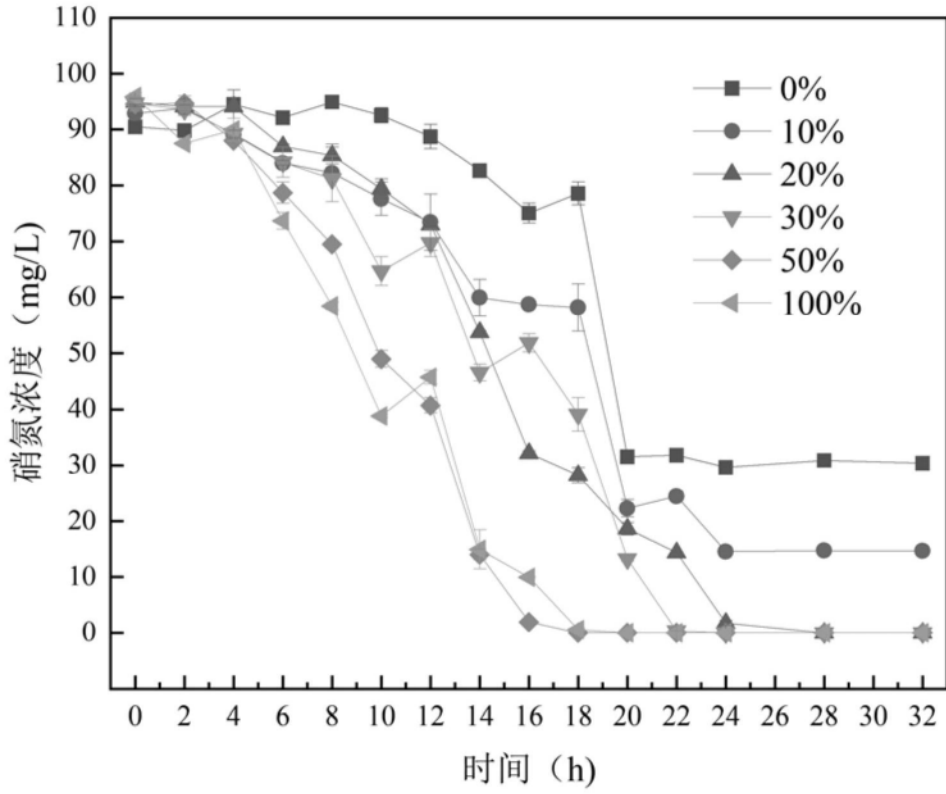


图5

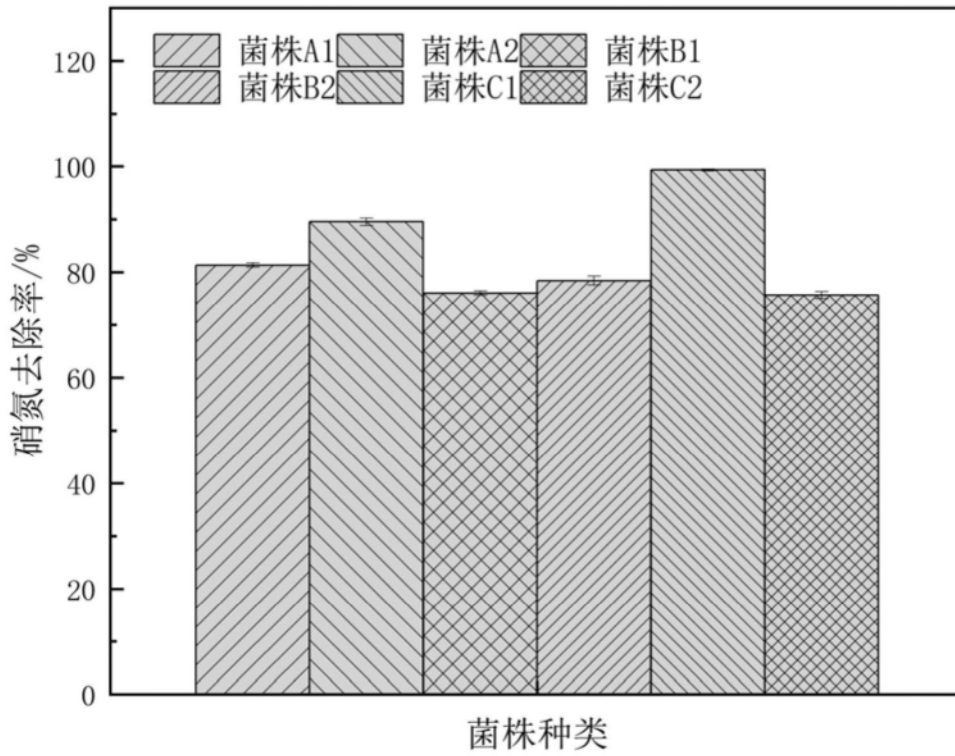


图6

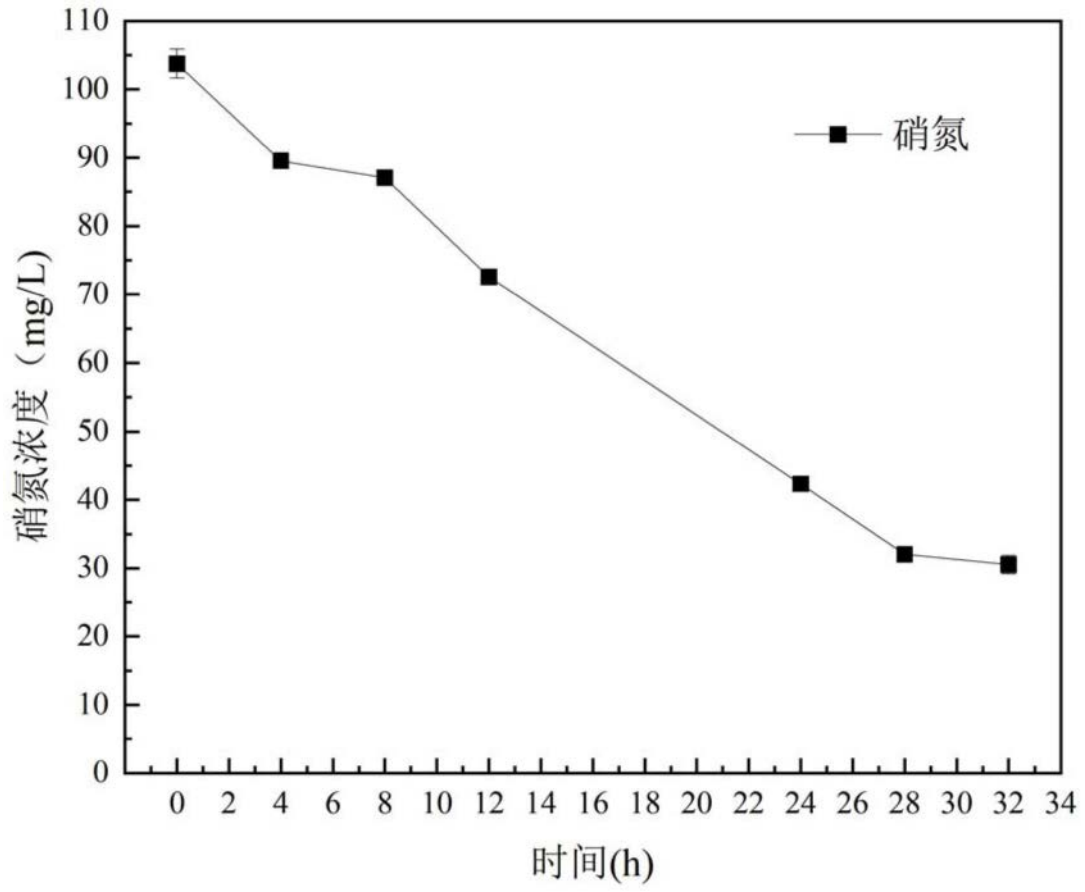


图7