



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114292762 B

(45) 授权公告日 2023.06.23

(21) 申请号 202111664267.7

(22) 申请日 2021.12.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114292762 A

(43) 申请公布日 2022.04.08

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No.22737 2021.06.21

(73) 专利权人 青岛蔚蓝赛德生物科技有限公司  
地址 266100 山东省青岛市崂山区九水东  
路596-1号(云游路南首)

(72) 发明人 朱文卉 张洁 刘圣鹏 朱威

(51) Int. Cl.  
C12N 1/16 (2006.01)  
C02F 3/34 (2006.01)  
C12R 1/72 (2006.01)  
C02F 101/16 (2006.01)  
C02F 103/20 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110372105 A, 2019.10.25  
CN 112961790 A, 2021.06.15  
EP 2500324 A1, 2012.09.19  
US 2018148681 A1, 2018.05.31  
WO 2018133411 A1, 2018.07.26  
Jensen, RH等.Candida palmioleophila:  
Characterization of a Previously  
Overlooked Pathogen and Its Unique  
Susceptibility Profile in Comparison with  
Five Related Species.《JOURNAL OF CLINICAL  
MICROBIOLOGY》.2011,第49卷(第2期),第549-  
556页.

张双凤等.假丝酵母(CandidaSp . J W4 )  
的产脂肪酶条件及脱脂能力.《河北大学学报》  
.2002,第22卷(第3期),第268-272页.

审查员 竹怀婷

权利要求书1页 说明书13页  
序列表1页

(54) 发明名称

一种棕榈油假丝酵母及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种棕榈油假丝酵母(Candida palmioleophila),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC No.22737。本发明筛选出来的棕榈油假丝酵母同时具有异养硝化和好氧反硝化功能,能够耐受高浓度的亚硝酸盐且具有优异的降解效果,在初始pH=4.0~8.0之间的培养基上生长都能够达到较高的活菌数,酸碱耐受度广,对恶劣环境的适应性较强。

1. 一种棕榈油假丝酵母(*Candida palmioleophila*), 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为CGMCC No.22737。

2. 根据权利要求1所述的棕榈油假丝酵母, 其特征在于, 所述棕榈油假丝酵母的18S rDNA序列如SEQ ID No:1所示, 26S rDNA序列如SEQ IDNo:2所示。

3. 一种微生物菌剂, 其特征在于, 包含权利要求1或2所述的棕榈油假丝酵母。

4. 权利要求3所述微生物菌剂的制备方法, 其特征在于, 包含如下步骤:

(1) 菌种活化: 取棕榈油假丝酵母接种于营养肉汤培养基中, 于25-35℃、150-300rpm的条件下培养12-48h, 得到菌种活化液;

(2) 发酵: 待发酵罐内的发酵培养基消毒完毕后, 将步骤(1)所得的菌种活化液按照5-15vol%的接种量接种于发酵罐中的发酵培养基中, 控制温度25-35℃, 通气比为(1-2):1、150-300rpm的条件下发酵, 待溶氧开始上升时停止发酵, 得发酵液;

(3) 制备微生物菌剂: 将步骤(2)所得的发酵液稀释, 即得微生物菌剂。

5. 根据权利要求4所述的制备方法, 其特征在于, 所述发酵培养基的组成如下: 碳源15-30g/L, 氮源5-15g/L,  $PO_4^{3-}$  6-10g/L,  $K^+$  0.2-0.5g/L,  $Mg^{2+}$  0.03-0.1g/L,  $Na^+$  0.2-0.8g/L,  $Fe^{2+}$   $(5-15) \times 10^{-3}$ g/L, 余量为水, 且pH为6.5-8;

所述碳源选自葡萄糖、淀粉、蔗糖、糊精、琥珀酸钠、柠檬酸钠中的一种或多种;

所述氮源选自酵母浸粉、蛋白胨、铵盐、尿素、豆粕粉中的一种或多种。

6. 一种净化水体的方法, 包括向水体中接种权利要求1或2所述的棕榈油假丝酵母或权利要求3所述的微生物菌剂的步骤, 所述水体为养殖污水/废水, 所述水体的pH为4.0-8.0, 且水体的NaCl含量不超过25%, 所述水体中亚硝酸盐氮的浓度不超过400mg/L。

7. 权利要求1或2所述的棕榈油假丝酵母或权利要求3所述的微生物菌剂用于降解水中的氨氮和亚硝酸盐氮的应用。

## 一种棕榈油假丝酵母及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种棕榈油假丝酵母及其应用,具体涉及一种特别适合于降解养殖废水中的氨氮、亚硝酸盐氮和总氮的棕榈油假丝酵母,属于环境微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 自改革开放以来,我国的水产养殖业在科学的指导下迅速发展,现在渔业养殖产量已经超过了捕捞产量,为提高养殖产量,我国水产养殖业走上了集约化、工厂化的养殖道路。在高密度的养殖方式下,养殖水环境恶化,超过了水体的自净能力,污水治理需求日渐增大。有研究数据表明,在养殖动物的饵料中,氮盐的同化利用效率仅有30%,大量有机氮、无机氮被残存在排泄物和剩余饵料中,过量的饵料不能被水产动物完全吸收利用,导致大量有机物废物的沉积,破坏了水体自身的分解系统,使水体自净能力减弱,导致水体中氨氮和亚硝酸盐氮等污染物浓度升高。

[0003] 据相关报道,当水体中氮含量 $>0.2\text{mg/L}$ 时,就具备了使水体富营养化的条件。在含氮化合物中,氨氮和亚硝酸盐氮对水产养殖生物的影响较大,水生生物对氨非常敏感,过高浓度的氨通过鳃和皮膜进入水产养殖动物体内的话,会使鳃表皮细胞损伤,降低其血液的携氧能力,影响水生生物的生理、生化反应,严重时导致水生动物窒息死亡。一定浓度的亚硝酸盐对水产动物具有毒害作用,主要表现在与水产动物血液中的血红蛋白反应,降低了其运输氧的能力,导致养殖动物组织缺氧、窒息死亡,在影响其生长发育的同时,也对人类的生命健康造成严重威胁。有文章表明,人类在摄入足量亚硝酸盐的情况下,亚硝酸通过与人体蛋白质分解产生的仲胺发生反应生成亚硝胺,亚硝胺是具有致畸和胚胎毒性的致癌物质。亚硝酸盐会引起肠源性青紫症,引起呼吸困难,损害中枢神经系统,诱发昏迷、惊厥、意识丧失等多种症状。

[0004] 目前,脱氮的技术方法主要是从物理、化学和生物三大类方向进行研究。生物脱氮技术由于具有处理效果好、没有二次污染、处理成本低、操作管理方便等优点得到广泛应用,成为水体中有效的脱氮方法。自然界中存在能够高效将氨氮与亚硝酸盐氮降解的菌株,通过人工将具有该性状的菌株筛选出来,深入研究该菌的生长特性、脱氮特性及其在污水脱氮中的应用,对提高污水的脱氮处理效率和经济性有着重要的理论价值和实际意义。

[0005] 中国专利申请CN202110333162.7公开了一种能够耐高盐环境的异养硝化棕榈油假丝酵母(*Candida palmioleophila*),其是从含盐量为9%的异养硝化培养基中筛选分离得到,于盐度为4600mg/L的医药化工废水中测试效果,36h氨氮去除率达到69.3%,42h总氮去除率达到52.9%,COD去除率达到93.1%,其适用于具有高盐和高浓度有机污染物特点的医药化工废水,但其仅具有异养硝化作用,不能同时进行好氧反硝化,不能在含高含量亚硝酸盐氮的养殖废水中降解亚硝酸氮,因而不适合用于含氨氮、高含量亚硝酸盐氮和低盐的养殖废水的净化。

## 发明内容

[0006] 本发明针对现有的微生物菌种不适用于含氨氮、高含量亚硝酸盐氮和低盐的养殖废水的现状,提供一种适用于养殖废水/污水净化的棕榈油假丝酵母、含该棕榈油假丝酵母的微生物菌剂及其应用。

[0007] 本发明要求保护一种棕榈油假丝酵母 *Candida palmioleophila* NOB-1,其18S rDNA序列如SEQ ID No:1所示,26S rDNA序列如SEQ ID No:2所示,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏号为CGMCC No.22737,保藏日期为2021年6月21日。

[0008] 本发明还要求保护包含上述棕榈油假丝酵母的微生物菌剂。

[0009] 本发明技术方案的有益效果是:

[0010] (1) 本发明筛选出来的棕榈油假丝酵母同时具有异养硝化和好氧反硝化功能,在接种菌液量为1250ppm时,48h后养殖污水中的氨氮降解率达到99.3%,亚硝酸盐降解率达到98.7%,总氮降解率达到61.2%。

[0011] (2) 本发明筛选出来的棕榈油假丝酵母能够耐受高浓度的亚硝酸盐且具有优异的降解效果,针对浓度220mg/L以内的亚硝酸盐氮,48h降解率达到99%以上,针对浓度300-400mg/L的亚硝酸盐氮,72h后经定性检测,培养液中亚硝酸盐氮为阴性。

[0012] (3) 本发明筛选出来的棕榈油假丝酵母在初始pH=4.0~8.0之间的培养基上生长都能够达到较高的活菌数,酸碱耐受度广,对恶劣环境的适应性较强。

[0013] (4) 本发明筛选出来的棕榈油假丝酵母对盐含量耐受程度较高,在NaCl含量为25‰以下的培养基中生长时,活菌数基本不受影响。

[0014] 上述微生物菌剂的制备方法如下:

[0015] (1) 菌种活化:取棕榈油假丝酵母 *Candida palmioleophila* NOB-1接种于营养肉汤培养基中,于25-35℃、150-300rpm的条件下培养12-48h,得到菌种活化液;

[0016] (2) 发酵:待发酵罐内的发酵培养基消毒完毕后,将步骤(1)所得的菌种活化液按照5-15vol%的接种量接种于发酵罐中的发酵培养基中,控制温度25-35℃,通气比为(1-2):1、150-300rpm的条件下发酵,待溶氧开始上升时停止发酵,得发酵液;

[0017] (3) 制备微生物菌剂:将步骤(2)所得的发酵液稀释,即得微生物菌剂。

[0018] 进一步,所述发酵培养基的组成如下:碳源15-30g/L,氮源5-15g/L, $PO_4^{3-}$ 6-10g/L, $K^+$ 0.2-0.5g/L, $Mg^{2+}$ 0.03-0.1g/L, $Na^+$ 0.2-0.8g/L, $Fe^{2+}$ (5-15) $\times 10^{-3}$ g/L,余量为水,且pH为6.5-8;

[0019] 优选的,所述发酵培养基的组成如下:碳源20-25g/L,氮源8-12g/L, $PO_4^{3-}$ 7-9g/L, $K^+$ 0.2-0.4g/L, $Mg^{2+}$ 0.03-0.05g/L, $Na^+$ 0.3-0.5g/L, $Fe^{2+}$ (8-10) $\times 10^{-3}$ g/L,余量为水,pH为6.5-7.5。

[0020] 进一步,所述营养肉汤培养基的组成为:蛋白胨10g/L,牛肉粉3g/L,氯化钠5g/L,余量为水,pH自然。

[0021] 进一步,所述碳源选自葡萄糖、淀粉、蔗糖、糊精、琥珀酸钠、柠檬酸钠中的一种或多种。

[0022] 进一步,所述氮源选自酵母浸粉、蛋白胨、铵盐、尿素、豆粕粉中的一种或多种,所述铵盐优选磷酸二氢铵和硫酸铵。

[0023] 优选的,所述 $K^+$ 的来源为磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸钾、氯化钾、硝酸钾中的一种或多种,所述 $Mg^{2+}$ 的来源为硫酸镁、氯化镁中的一种或多种,所述 $Na^+$ 的来源为氯化钠、硫酸钠、硝酸钠、碳酸钠、醋酸钠、琥珀酸钠中的一种或多种,所述 $Fe^{2+}$ 的来源为硫酸亚铁、氯化亚铁、硫酸亚铁铵中的一种或多种。

[0024] 微生物菌剂的制备方法中所述的通气比是指每分钟内通入发酵罐的空气体积与发酵液总体积之比。

[0025] 本发明还要求保护使用棕榈油假丝酵母或包含棕榈油假丝酵母的微生物菌剂净化水体的方法,包括向水体中接种棕榈油假丝酵母或包含棕榈油假丝酵母的微生物菌剂的步骤。

[0026] 进一步,所述水体的pH为4.0-8.0,水体的NaCl含量不超过25%,优选NaCl含量不超过15%;

[0027] 进一步,所述水体中亚硝酸盐氮的浓度不超过400mg/L,优选220mg/L以下。

[0028] 进一步,所述水体为养殖污水/废水。

[0029] 本发明还要求保护棕榈油假丝酵母或包含棕榈油假丝酵母的微生物菌剂在水净化领域的应用。

[0030] 进一步,所述棕榈油假丝酵母或包含棕榈油假丝酵母的微生物菌剂用于降解水中的含氮物质,所述含氮物质优选含氨氮和亚硝酸盐氮的物质,更优选含亚硝酸盐氮的物质。

## 具体实施方式

[0031] 以下结合实例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0032] 实施例1.菌株的筛选与初步性能评价

[0033] 1.1样品富集与筛选

[0034] 于青岛市胶南地区某污水处理厂的好氧段活性污泥中取得样品,放入盛有100ml无菌水的三角烧瓶中,加入玻璃珠震荡至均匀;震荡均匀后,取上清液10ml加入灭菌的一级富集培养基中进行第一级富集。72h后吸取10ml一级富集液至新鲜的二级富集培养基中,进行第二级富集;类推得到三级富集液。

[0035] 在每级富集中均采用三种培养基,每一种培养基均进行3个平行实验,富集培养基的组成如下:

[0036] 培养基(一):葡萄糖10g,硫酸铵2.0g,亚硝酸钠0.75g,七水合硫酸镁1.0g,二水合磷酸氢二钾1.0g,水1000mL,pH=7.8。

[0037] 培养基(二):硫酸铵1g,丁二酸钠3.4g,七水合硫酸镁0.1g,磷酸氢二钾1.5g,四水合硫酸锰0.01g,七水合硫酸亚铁0.01g,氯化钠0.5g,亚硝酸钠0.5g,水1000mL,pH=7.8。

[0038] 培养基(三):葡萄糖5.0g,亚硝酸钠2g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,氯化钠1.0g,水1000mL,pH=7.8。

[0039] 使用格里斯试剂对富集培养液中的亚硝酸盐进行定性检测。

[0040] 格里斯试剂的配制方法如下:

[0041] 格里斯I:在加热下溶解0.5g对氨基苯磺酸于50ml 30%的乙酸中,于暗处保存;

[0042] 格里斯II:将0.4g 1-萘酚与100ml水混合煮沸,再向蓝色渣滓中倾出的无色溶液

中加入6ml 80%乙酸。

[0043] 格里斯试剂使用方法：在离心管中加入200 $\mu$ L待测样品，滴入1滴格里斯I试剂，再滴入1滴格里斯II试剂，盖上离心管盖。如混合液显示粉红色则样品中含有亚硝酸根离子。

[0044] 实验结果如表1所示，阴性对照为去离子水，阳性对照为1mg/L的亚硝酸钠溶液。

[0045] 表1. 各级富集液中亚硝酸盐氮含量的定性检测

培养液编号		一级富集	二级富集	三级富集
阴性对照		-	-	-
阳性对照		+	+	+
培养基(一)	平行1	+	+	+
	平行2	+	+	+
	平行3	+	-	+
培养基(二)	平行1	+	+	+
	平行2	-	-	-
	平行3	+	+	+
培养基(三)	平行1	-	-	-
	平行2	+	+	-
	平行3	-	-	-

[0047] 如表1可见,培养基(三)的平行1、平行3,培养基(二)的平行2,在第一、二、三级富集过程中均表现出对亚硝酸盐的良好适应及降解能力,因此选取以上三组的第三级富集液,作为功能性菌株分离纯化的样本。

## [0048] 1.2. 功能性菌株分离纯化

[0049] 对于上一步选取的样本,使用梯度稀释、平板涂布的方式试分离单菌落,再使用多级平板划线法进行单菌落的纯化。采取上述分离纯化方法,最终得到2株单菌,分别命名为NOB-1和NOB-2,斜面法保藏于4℃冰箱中。

## [0050] 1.3. 功能性菌株的效果评价

[0051] 将分离得到的两株功能菌使用营养肉汤培养基活化24h后,以0.2vol%的接种量接种至含亚硝酸盐氮的评价培养基中,定时测定培养基中的亚硝酸盐氮的含量并计算降解率,亚硝酸盐氮的检测方法按《GB/T 7493水质亚硝酸盐氮的测定分光光度法》执行,结果如表2和表3所示。

[0052] 评价培养基配方:葡萄糖5.0g,亚硝酸钠0.43g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,氯化钠1.0g,水1000mL,pH=7.8。

[0053] 表2. 菌株NOB-1对评价培养基中亚硝酸盐氮的降解情况

时间 (h)	平行样 1		平行样 2	
	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	降解率 (%)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	降解率 (%)
0	81.6	0	86.7	0
16	18.3	77.6	40.8	52.9

21	0.9	98.2	20.4	76.5
41	0.02	99.79	0.24	99.7
46	0.01	99.98	0.195	99.7
69	0.01	99.98	0.3	99.7

[0056] 表3. 菌株NOB-2对评价培养基中亚硝酸盐氮的降解情况

时间 (h)	平行样 1		平行样 2	
	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	降解率 (%)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	降解率 (%)
0	84.2	0	85.6	0
16	55.1	34.6	57.2	33.2
21	30.9	63.3	42.3	50.6
41	15.0	82.2	20.0	76.6
46	7.8	90.7	10.8	87.4
69	2.1	97.5	1.5	98.2

[0057] 如表可见, NOB-1菌株在41h内能够将亚硝酸盐氮降解至0.24mg/L, 降解率达到99%以上, NOB-2菌株在69h内能够将亚硝酸盐氮降解至2.1mg/L, 降解率达到97%以上; 综合效果及起效时间, 将NOB-1菌株进行-80℃甘油管冷冻保藏留待进一步研究。

[0058] 实施例2. 菌株NOB-1的检测鉴定

[0059] 2.1实验方法

[0060] 2.1.1基因组DNA提取

[0061] 1) 取1.5ml离心管, 加入200μL预处理液和三颗玻璃珠, 然后加入适量菌样品, 放入研磨仪中研磨至充分。

[0062] 2) 加入20μL Proteinase K溶液, 混匀, 37℃放置30~60min。

[0063] 3) 加入200μL裂解液, 充分颠倒混匀, 70℃放置10min。

[0064] 4) 加200μL无水乙醇, 充分颠倒混匀, 短离心以去除管盖内壁液滴。

[0065] 5) 过吸附柱, 洗涤液洗1次, 漂洗液洗2次。

[0066] 6) 吸附柱室温放置5~10分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

[0067] 7) 将吸附转入一个新离心管, 向吸附膜中间位置悬空滴加50~100μL ddH<sub>2</sub>O, 室温放置5~10min, 12,000rpm离心2min, 将溶液收集到离心管中。

[0068] 2.1.2 16S/18S扩增

[0069] 表4: 引物信息

检测片段	引物名称	引物序列	片段大小
[0071] 细菌 16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500bp
	1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	
	V4-515F	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	
	V4-806R	GGACTACCAGGGTATCTAA	
[0072] 真菌 26S	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	400~800 bp
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
真菌 18S	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	400~800 bp
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

[0073] 表5:PCR扩增反应体系和条件

	反应体系	$\mu\text{L}$	扩增程序
[0074]	Super Mix	15	96°C 5min
	Primer F (10p)	1	96°C 20s
	Primer R (10p)	1	X°C 20s 35cycles
	模板 (ng/ $\mu\text{L}$ )	1	
	ddH <sub>2</sub> O	12	
	合计	30	72°C 30s 72°C 10min 16°C forever 注: 扩增 16S 时, X=62; 扩增
[0075]			18S 时, X=56。

[0076] 2.2 PCR产物检测及纯化

[0077] 3 $\mu\text{L}$  PCR产物进行1.0%的琼脂糖凝胶检测,观察条带性状。

[0078] PCR产物纯化按照磁珠纯化标准操作流程操作,利用磁珠能够吸附或者释放带电荷物质的原理,在高盐低pH溶液吸附DNA,在低盐高pH溶液释放DNA,从而达到分离提纯DNA产物的目的。

[0079] 2.3测序

[0080] 将纯化好的PCR产物进行上机检测,其18S rDNA序列如SEQ ID No:1所示,26S rDNA序列如SEQ ID No:2所示,在NCBI中进行比对,该菌株鉴定结果为棕榈油假丝酵母 *Candida palmioleophila*。

[0081] 实施例3.棕榈油假丝酵母NOB-1对环境条件的耐受度探究

[0082] 3.1、菌株NOB-1在不同pH下的生长情况

[0083] 挑取一环菌苔至营养肉汤培养基内,于30°C、220rpm摇床培养24h进行活化;活化后按10vol%接种量接种至各组新鲜的灭菌发酵培养基中,30°C150rpm摇床培养48h。培养好的发酵液使用梯度稀释和平板涂布法进行计数。

[0084] 发酵培养基配方:葡萄糖20g,磷酸氢二铵10g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,七水合硫酸亚铁0.04g,氯化钠1.0g,水1000mL,分别调节pH=3、pH=4、pH=5、pH=6、pH=7、pH=8、pH=9。

[0085] 表6. 菌株NOB-1在不同pH下的生长情况

[0086]	培养基 pH 值	培养液活菌数 (CFU/ml)
	3.0	$4.4 \times 10^8$
	4.0	$6.5 \times 10^8$
[0087]	5.0	$7.3 \times 10^8$
	6.0	$7.8 \times 10^8$
	7.0	$6.9 \times 10^8$
	8.0	$5.7 \times 10^8$
	9.0	$3.8 \times 10^8$

[0088] 如表6所示,菌株NOB-1在初始pH=4.0~8.0之间都能够达到较高的活菌数,酸碱耐受度广,对恶劣环境的适应性较强。

[0089] 3.2、菌株NOB-1对不同盐度的耐受能力评价

[0090] 挑取一环菌苔至营养肉汤培养基内,30℃、220rpm摇床培养24h进行活化;活化后按5vol%接种量接种至各组新鲜的灭菌发酵培养基(氯化钠含量1‰~35‰不等)中,35℃、220rpm摇床培养48h,培养好的发酵液使用梯度稀释和平板涂布法进行计数。

[0091] 发酵培养基配方:葡萄糖20g,磷酸氢二铵10g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,七水合硫酸亚铁0.04g,氯化钠分别为1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0和35.0g,水1000mL,pH=6.5。

[0092] 表7. 菌株NOB-1对不同盐度的耐受能力

NaCl 含量	活菌数 (CFU/ml)	NaCl 含量	活菌数 (CFU/ml)
1‰	$7.9 \times 10^8$	20‰	$6.9 \times 10^8$
5‰	$7.8 \times 10^8$	25‰	$5.5 \times 10^8$
10‰	$7.9 \times 10^8$	30‰	$0.8 \times 10^8$
15‰	$7.2 \times 10^8$	35‰	$0.2 \times 10^8$

[0094] 由表7中的数据可以看出,菌株NOB-1对盐含量的耐受程度较高,在25‰氯化钠浓度的条件下活菌数下降不明显,而对30‰及以上的氯化钠浓度较为敏感,由此可以看出,NOB-1对盐度的耐受达到了25‰左右。

[0095] 3.3、菌株NOB-1在高浓度亚硝酸盐氮中的降解能力评价

[0096] 挑取一环菌苔至营养肉汤培养基内,30℃、220rpm摇床培养24h进行活化;配制30L的发酵培养基,在50L小试罐中依次进行空消、实消。冷却后将活化液按15vol%的接种量接种至小试罐内进行发酵,30℃、300rpm、通气比为(1-2):1的条件下进行发酵,发酵20h左右。发酵结束放料后,使用适量辅料进行稀释,制得活菌数为 $3.0 \times 10^8$ CFU/mL的菌液。后将该溶液按0.2vol%的接种量加入到评价培养基中,于30℃、220rpm条件下摇床培养,后定时检测培养液中的亚硝酸盐氮含量,亚硝酸盐氮的检测方法按《GB/T 7493水质亚硝酸盐氮的测定

分光光度法》执行,结果如表8所示。

[0097] 发酵培养基的配方如下:葡萄糖20g,磷酸氢二铵10g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,七水合硫酸亚铁0.04g,氯化钠1.0g,水1000mL,pH=6.0。

[0098] 评价培养基的配方如下:葡萄糖5.0g,七水合硫酸镁0.5g,二水合磷酸氢二钾1.0g,氯化钠1.0g,实验组1至5亚硝酸钠的添加量分别为0.25g、0.5g、1.0g、1.5g和2.0g,水1000mL,pH=7.8。

[0099] 表8. 菌株NOB-1对高浓度亚硝酸盐氮的降解能力评价

	0 h		24 h		48 h	
	NO <sub>2</sub> -N	降解率	NO <sub>2</sub> -N	降解率	NO <sub>2</sub> -N	降解率
实验组 1	55.2	0	0.5	99.1%	0.2	99.6%
[0100] 实验组 2	116.8	0	36.1	69.1%	0.98	99.2%
实验组 3	223.6	0	106.7	52.3%	1.4	99.4%
实验组 4	304.3	0	186.8	38.6%	74.7	75.5%
实验组 5	416.5	0	323.6	22.3%	142.5	65.8%

[0101] 由表8中数据可知,棕榈油假丝酵母NOB-1对220mg/L以内的亚硝酸盐氮在48h内降解率均达到了99%以上,对300~400mg/L的亚硝酸盐氮也具有好的降解能力,48h降解率分别达到了75.5%和65.8%,且之后仍有降解能力,72h经定性检测,培养液中亚硝酸盐氮为阴性。

[0102] 实施例4. 棕榈油假丝酵母NOB-1在养殖污水中的应用

[0103] 4.1、棕榈油假丝酵母菌液的制备

[0104] 挑取一环菌苔至营养肉汤培养基内,30℃、220rpm条件下摇床培养24h进行活化;后配制30L发酵培养基,在50L小试罐中依次进行空消、实消。冷却后将活化液按10vol%的接种量接种至小试罐内进行发酵,30℃、300rpm、通气比为(1-2):1的条件下发酵,发酵20h左右,发酵结束后放料,使用适量辅料稀释,制得 $3.0 \times 10^8$ CFU/mL菌液。

[0105] 4.2、棕榈油假丝酵母菌液对养殖污水的处理

[0106] (1) 实验地点:蔚蓝生物股份有限公司蔚蓝创新园小试实验室。

[0107] (2) 实验流程:

[0108] ①取8L养殖污水,倒入SBR反应器中,开启搅拌机,开启4h,关闭4h,间歇运行,曝气装置开启6h,关闭2h,间歇运行。

[0109] ②第1天向SBR反应器内投加10ml菌液,第3天起隔天SBR反应器更换新鲜污水1000ml/d。

[0110] ③每日取上清液,对氨氮、亚硝酸盐氮、总氮等水质指标进行检测,监测水质变化情况,整个实验过程中控制污水的温度为25-35℃,氨氮检测方法按照《HJ 535-2009氨氮的测定-纳氏试剂分光光度法》执行,亚硝酸盐态氮和总氮的检测方法分别按照《GB/T 7493水质亚硝酸盐氮的测定分光光度法》、《HJ 636水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光

度法》执行,结果如表9所示。

[0111] 表9. 棕榈油假丝酵母NOB-1处理养殖污水的水质指标变化情况

时间	操作	出水氨氮 (mg/L)	出水亚硝酸盐氮 (mg/L)	出水总氮 (mg/L)
0 h	投加 8L 废水	42.8	7.8	69.3
24 h		0.6	0.2	28.5
48 h		0.3	0.1	26.9
72 h	更换 1000mL 废水	23.1	13.4	50.0
96 h		0.7	1.1	33.7
120 h	更换 1000mL 废水	29.6	20.4	67.4
144 h		1.5	0.7	45.3

[0114] 从表9中数据可以看出,棕榈油假丝酵母NOB-1对养殖污水中的氨氮、亚硝酸盐氮、总氮都具有一定的降解效果,在48h对氨氮的降解率达到99.3%,对亚硝酸盐降解率达到98.7%,对总氮降解率达到61.2%;后续进行补充污染物,对氨氮和亚硝酸盐氮能够达到24h内降解率90%以上,对总氮的24h降解率也分别达到了32.6%和32.8%。

[0115] 实施例5. 棕榈油假丝酵母NOB-1在化工废水中的应用

[0116] 5.1、棕榈油假丝酵母菌液的制备

[0117] 挑取一环菌苔至营养肉汤培养基内,30℃、220rpm条件下摇床培养24h进行活化;后配制30L发酵培养基,在50L小试罐中依次进行空消、实消。冷却后将活化液接种至小试罐内进行发酵,25℃、300rpm、通气比为(1-2):1的条件下发酵20h左右,发酵结束后放料,加入适量辅料稀释,制得 $3.0 \times 10^8$ CFU/mL菌液。

[0118] 5.2、棕榈油假丝酵母菌液对化工废水的处理

[0119] (1)实验地点:蔚蓝生物股份有限公司蔚蓝创新园小试实验室。

[0120] (2)实验流程:

[0121] ①取8L化工废水,倒入SBR反应器中,开启搅拌机,开启4h,关闭4h,间歇运行,曝气装置开启6h,关闭2h,间歇运行。

[0122] ②第1天向SBR反应器内投加10ml菌液,第4天起每隔2日SBR反应器更换新鲜废水500ml/d。

[0123] ③每天取上清液经PAC和PAM絮凝沉淀后过滤,检测氨氮、亚硝酸盐氮、总氮等水质指标,整个实验过程中控制废水的温度为25-35℃,氨氮检测方法按照《HJ 535-2009氨氮的测定-纳氏试剂分光光度法》执行,亚硝酸盐态氮和总氮的检测方法分别按照《GB/T 7493水质亚硝酸盐氮的测定分光光度法》、《HJ 636水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法》执行,结果如表10所示。

[0124] 5.3、水质变化情况

[0125] 表10. 棕榈油假丝酵母NOB-1处理化工废水的水质指标变化情况

时间	操作	出水氨氮 (mg/L)	出水亚硝酸盐氮 (mg/L)	出水总氮 (mg/L)
0 h	投加 8L 废水	115.3	56.3	252.7
24 h		70.7	49.2	210.9
48 h		36.0	26.5	173.2
72 h		12.1	3.6	88.7
96 h	更换 500mL 废水	33.5	20.1	132.6
120 h		15.8	7.8	90.1
144 h		3.6	0.4	64.2
168 h	更换 500mL 废水	40.9	28.5	118.9
192 h		17.6	14.8	82.5
216 h		4.4	1.1	50.4
240 h	更换 500mL 废水	44.7	29.0	139.4
264 h		20.3	12.4	110.1
288 h		6.3	0.7	87.7
312 h		1.2	0.3	64.9

[0127] 从表10中数据可以看出,棕榈油假丝酵母NOB-1对化工废水中的氨氮、亚硝酸盐氮、总氮都具有一定的降解效果,在72h对氨氮的降解率达到89.5%,对亚硝酸盐降解率达到93.6%,对总氮降解率达到64.9%;后续进行补充污染物,对氨氮可以达到48h降解率85%以上,对亚硝酸盐氮能够达到48h内降解率96%以上,对总氮的48h降解率也分别达到了51.6%和57.6%。

[0128] 由此可见,该菌株对水体中不同形式的氮类污染物均具有不错的降解效果,在污水处理中具有广阔的应用场景。

[0129] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 青岛蔚蓝赛德生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种棕榈油假丝酵母及其应用
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 2
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 609
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 棕榈油假丝酵母(*Candida palmioleophila*)
- [0011] <400> 1
- [0012] cctgcggaag gatcattact gtattctaata tgccagcgct taattgcgcg gcgattaaac 60
- [0013] cttacacaca atgtttttct ttattagaaa ctattgcttt ggcttggcta agaaattagt 120
- [0014] cgggccagag gtttacacaa acttcaattt ttaattgaat tgttatttaa tactttgtca 180
- [0015] atttgttgat taaattcaaa caatcttcaa aactttcaac aacggatctc ttggttctcg 240
- [0016] catcgatgaa gaacgcagcg aatgcgata agtaatatga attgcagatt ttcgtgaatc 300
- [0017] atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgcctc tggattcca gagggcatgc ctgtttgagc 360
- [0018] gtcatttctc tctcaaacc ttgggtttgg tattgagtga tactcttagt cgaactagc 420
- [0019] gtttgcttga aattttattgg catgagtgc gctgagaagt gcattcagga aatatcaatg 480
- [0020] tattaggttt atccaactcg ttgacaattc ttggttgtga atttttggtg ttaggctttg 540
- [0021] ccttaaaaa caacaacaa gtttgacctc aatcaggta ggattaccg ctgaacttaa 600
- [0022] gcatatcaa 609
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 595
- [0025] <212> DNA
- [0026] <213> 棕榈油假丝酵母(*Candida palmioleophila*)
- [0027] <400> 2
- [0028] atatcaaaa agcggaggaa aagaaaccaa caggattgc cttagtaacg gcgagtgaag 60
- [0029] cggcaaaagc tcaaatttga aatctggcac ctctcggtgc cgagttgtaa tttgaagaag 120
- [0030] gtaaccttgg ggttggctct tgtctatgtt tcttgaaca gaacgtcaca gaggtgaga 180
- [0031] atcccgtgcg atgagatgcc caattctatg taaggtgctt tcgaagagtc gagttgtttg 240
- [0032] ggaatgcagc tctaagtggg tggtaaattc catctaaagc taaatattgg cgagagaccg 300
- [0033] atagcgaaca agtacagtga tggaaagatg aaaagaactt tgaaaagaga gtgaaaaagt 360
- [0034] acgtgaaatt gttgaaaggg aagggtatga gatcagactt ggtgttttgc aaccttactc 420
- [0035] tcgggtgggg cccctgcagt tcatcgggcc agcatcagtt tggatggtag gataatggca 480
- [0036] ttggaatgta gcttggcttc ggttaagtgt tatagccttt gttgatactg cctgtctaga 540
- [0037] ctgaggactg cgtctttgac taggatgctg gcataatgat cctataaccg ccgtc 595