



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116004463 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 25

(21) 申请号 202310006027.0

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2023.01.04

专利代理师 关畅

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.25399 2022.07.25

CGMCC No.25400 2022.07.25

CGMCC No.25478 2022.08.03

CGMCC No.25438 2022.08.03

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2023.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C02F 101/34 (2006.01)

C02F 103/06 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

申请人 河北省地质环境监测院

(72) 发明人 汪杰 李欣霏 孙源泽 熊玲诗语

田西昭 单强 李红超 王颖

邵思慧 何微 李陆 张晓溪

陈业男

权利要求书3页 说明书24页

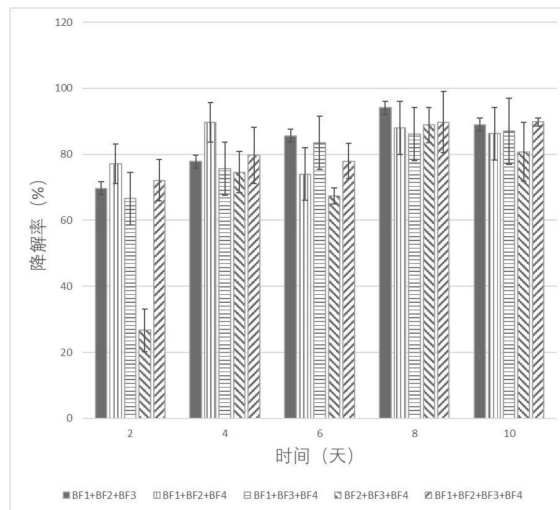
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

苯酚高效降解相关菌群及其应用

(57) 摘要

本发明公开了苯酚高效降解相关菌株及其应用,即公开了具有降解苯酚能力的菌株:法氏柠檬酸杆菌Citrobacterfarmeri保藏编号为CGMCCNo.25400、鲁氏不动杆菌保藏编号为CGMCCNo.25399、Acidovoraxsoli保藏编号为CGMCCNo.25478和Diaphorobacter nitroreducens保藏编号为CGMCCNo.25438。并公开了利用上述菌种降解苯酚的方法。上述的菌株和降解方法具有高效低耗、操作简单、处理形式多样、对环境产生的影响较小且基本不产生二次污染,为苯酚的生物降解打下基础。



1. 降解苯酚的菌剂, 所述菌剂为1+2+3+4菌剂、1+3+4菌剂、1+3菌剂、1+2+3菌剂、1+2+4菌剂、1+2菌剂、1+4菌剂或1菌剂;

所述1+2+3+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述1+3+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述1+3菌剂活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和*Acidovorax soli*组成;

所述1+2+3菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Acidovorax soli* BF3组成;

所述1+2+4菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述1+2菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2组成;

所述1+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述1菌剂的活性成分为所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1;

所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;

所述法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;

所述*Acidovorax soli* BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;

所述*Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

2. 鲁氏不动杆菌, 其特征在于, 所述鲁氏不动杆菌为鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399。

3. 降解苯酚的菌剂, 所述菌剂为2+3+4菌剂、2+3菌剂、2+4菌剂或2菌剂;

所述2+3+4菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述2+3菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Acidovorax soli* BF3组成;

所述2+4菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述2菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2;

所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;

所述法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;

所述*Acidovorax soli*BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;

所述*Diaphorobacter nitroreducens*BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

4. 柠檬酸杆菌,其特征在於,所述柠檬酸杆菌为法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400。

5. 降解苯酚的菌剂,所述菌剂为3+4菌剂或3菌剂;

所述3+4菌剂的活性成分由*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

所述3菌剂的活性成分为法*Acidovorax soli* BF3;

所述鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;

所述法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;

所述*Acidovorax soli* BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;

所述*Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

6. *Acidovorax soli*,其特征在於,所述*Acidovorax soli*在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478。

7. 降解苯酚的菌剂,其特征在於,所述菌剂为4菌剂;所述4菌剂的活性成分为*Diaphorobacter nitroreducens* BF4;所述*Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

8. *Diaphorobacter nitroreducens*,其特征在於,所*Diaphorobacter nitroreducens*在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

9. 权利要求1、3或5所述菌剂、权利要求2所述的鲁氏不动杆菌、权利要求4所述的柠檬酸杆菌、权利要求6所述的*Acidovorax soli*、或权利要求8所述的*Diaphorobacter nitroreducens*在下述任一中的应用:

A1) 上述材料在降解苯酚中的应用;

A2) 上述材料在制备降解苯酚产品中的应用;

A3) 述材料在生物降解苯酚中的应用

A4) 上述材料在制备生物降解苯酚产品中的应用;

A5) 上述材料在降解天然有机质中苯酚的应用;

A6) 上述材料在制备降解天然有机质中苯酚产品中的应用。

10. 培养权利要求2所述鲁氏不动杆菌、权利要求4所述柠檬酸杆菌、权利要求6所述*Acidovorax soli*或权利要求8所述*Diaphorobacter nitroreducens*的方法,其特征在於,所

述方法包括用培养基培养所述菌株的步骤。

## 苯酚高效降解相关菌群及其应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及生物技术领域,尤其涉及苯酚高效降解相关菌株及其应用。

### 背景技术

[0002] 苯酚(Phenol)是一种具有特殊气味的无色针状晶体,可混溶于氯仿、乙醇、甘油、醚等,具有弱酸性和还原性,属于高毒类,是化工业、医药、农业的重要原料,可用于某些杀菌剂、防腐剂、药物(如阿司匹林)以及树脂等生产中。早在1834年苯酚就由德国化学家龙格于煤焦油中分离出来,所以也称为石炭酸。随着社会各行业对苯酚需求量的日益增多,我国苯酚进口量和消费量一直维持在较高水平,苯酚已成为众多工业废水中主要的污染物之一,主要来源于焦炉、炼钢、化学工业、制药、树脂生产等行业。在苯酚使用过程中,由于存在苯酚用量过大、苯酚泄露及下渗、含酚废水处理不当等问题,造成了苯酚污染。苯酚作为一种致癌、致畸、致突变的有机物,在极低的浓度下就会对水生生物造成严重影响,并且这种危害随着浓度增加而愈发明显。酚类废水毒性很大,直接排放到开放的水体中,会引起严重的环境生态问题。同时,人体长期接触苯酚,会引起苯酚慢性中毒。苯酚中毒可通过皮肤吸收、呼吸道吸入、消化道摄取和其他各种方式发生,从而影响健康。因而,去除水体中苯酚对于环境和人类健康至关重要。

[0003] 由于苯酚迁移性强,极易从污染产地迁移到地下水中,是污染场地修复过程中需要关注的重要污染物。随着地下水污染受重视程度日益提高,相关研究不断深入,地下水修复技术实现了较大进步,当前被广泛使用的修复技术按修复方式可分为原位修复和异位修复两种。异位修复即抽出后对地下水进行相关处理,包括抽出处理技术、多相抽提技术。但这类技术费用高、水资源浪费严重、原有自然环境遭到破坏,且污染的根本原因未得到解决,并存在处理范围小的问题。而原位修复技术常见的有渗透性反应墙技术以及原位曝气技术等,但是存在反应介质成本高、反应活性及物化稳定性、以及使用寿命及二次污染等问题风险;而曝气修复同时也会对地下水地质环境有较高要求。

### 发明内容

[0004] 本申请要解决的技术问题是如何高效降解苯酚。尤其是提供苯酚高效降解相关菌群。

[0005] 为了解决上述问题本申请提供了降解苯酚的菌剂。

[0006] 所述菌剂为1+2+3+4菌剂、1+3+4菌剂、1+3菌剂、1+2+3菌剂、1+2+4菌剂、1+2菌剂、1+4菌剂或1菌剂;

[0007] 所述1+2+3+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)BF1、法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2、*Acidovorax soli*BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

[0008] 所述1+3+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)BF1、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens*BF4组成;

- [0009] 所述1+3菌剂活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和 *Acidovorax soli*组成;
- [0010] 所述1+2+3菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2和 *Acidovorax soli*BF3组成;
- [0011] 所述1+2+4菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2和 *Diaphorobacter nitroreducens*BF4组成;
- [0012] 所述1+2菌剂由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2组成;
- [0013] 所述1+4菌剂的活性成分由鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和 *Diaphorobacter nitroreducens*BF4组成;
- [0014] 所述1菌剂的活性成分为所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)BF1;
- [0015] 所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;
- [0016] 所述法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;
- [0017] 所述 *Acidovorax soli* BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;
- [0018] 所述 *Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。
- [0019] 上文中,所述1+2+3+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2、*Acidovorax soli* BF3和 *Diaphorobacter nitroreducens* BF4菌落形成单位比值为1:1:1:1。
- [0020] 上文中,所述1+2+3+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有  $4 \times 10^8$  菌落形成单位。
- [0021] 所述1+3+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、*Acidovorax soli* BF3和 *Diaphorobacter nitroreducens*BF4菌落形成单位比值为  $5.3 \times 10^8$ 。
- [0022] 上文中,所述1+3+4菌剂的中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有  $5.3 \times 10^8$  菌落形成单位。
- [0023] 所述1+3菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)BF1和 *Acidovorax soli* 组成菌落形成单位比值为1:1。
- [0024] 上文中,所述1+3菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有  $8 \times 10^8$  菌落形成单位。
- [0025] 所述1+2+3菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*)BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2和 *Acidovorax soli* BF3菌落形成单位比值为1:1:1;
- [0026] 上文中,所述1+2+3菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有  $5.3 \times 10^8$  菌落形成单位。
- [0027] 所述1+2+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1、法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*)BF2和 *Diaphorobacter nitroreducens*BF4菌落形成单位比值为1:1:1;

[0028] 上文中,所述1+2+4菌剂的中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有 $5.3 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0029] 所述1+2菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2菌落形成单位比值为1:1。

[0030] 所述1+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4菌落形成单位比值为1:1。

[0031] 上文中,所述1+4菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有 $8 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0032] 所述1菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1。

[0033] 上文中,所述1菌剂中,鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1含有 $16 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0034] 为了解决上述的问题,本申请还提供了鲁氏不动杆菌。

[0035] 所述鲁氏不动杆菌为鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399。

[0036] 为了解决上述的问题,本申请还提供了降解苯酚的菌剂。

[0037] 所述菌剂为2+3+4菌剂、2+3菌剂、2+4菌剂或2菌剂;

[0038] 所述2+3+4菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

[0039] 所述2+3菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Acidovorax soli* BF3组成;

[0040] 所述2+4菌剂的活性成分由法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

[0041] 所述2菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2;

[0042] 所述鲁氏不动杆菌 (*Acinetobacter lwoffii*) BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;

[0043] 所述法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;

[0044] 所述*Acidovorax soli* BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;

[0045] 所述*Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

[0046] 上文中,所述2+3+4菌剂中,法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2、*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4菌落形成单位比值为1:1:1。

[0047] 上文中,所述2+3+4菌剂中,法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2含有 $5.3 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0048] 上文中,所述2+3菌剂中,法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2和*Acidovorax soli* BF3菌落形成单位比值为1:1。

[0049] 上文中,所述2+3菌剂中,法氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter farmeri*) BF2含有 $8 \times 10^8$

菌落形成单位

[0050] 上文中,所述2+4菌剂中,法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成菌落形成单位比值为1:1。

[0051] 上文中,所述2+4菌剂中,法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2含有 $8 \times 10^8$ 菌落形成单位

[0052] 上文中,所述2菌剂中,法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2含有 $16 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0053] 为了解决上述的问题,本申请还提供了柠檬酸杆菌。

[0054] 所述柠檬酸杆菌为法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2,其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400。

[0055] 为了解决上述的问题,本申请还提供了降解苯酚的菌剂。

[0056] 所述菌剂为3+4菌剂或3菌剂;

[0057] 所述3+4菌剂的活性成分由*Acidovorax soli*BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4组成;

[0058] 所述3菌剂的活性成分为法*Acidovorax soli*BF3;

[0059] 所述鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)BF1在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25399;

[0060] 所述法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25400;

[0061] 所述*Acidovorax soli* BF3在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478;

[0062] 所述*Diaphorobacter nitroreducens*BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

[0063] 上文中,所述3+4菌剂中,*Acidovorax soli* BF3和*Diaphorobacter nitroreducens* BF4菌落形成单位比值为1:1。

[0064] 上文中,所述3+4菌剂中,*Acidovorax soli* BF3含有 $8 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0065] 上文中,所述3菌剂中,*Acidovorax soli* BF3含有 $16 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0066] 为了解决上述的问题,本申请还提供了*Acidovorax soli*。

[0067] 所述*Acidovorax soli*在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25478。

[0068] 为了解决上述的问题,本申请还提供了降解苯酚的菌剂。

[0069] 所述菌剂为4菌剂;所述4菌剂的活性成分为*Diaphorobacter nitroreducens* BF4;所述*Diaphorobacter nitroreducens* BF4在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。

[0070] 上文中,所述4菌剂中,*Diaphorobacter nitroreducens* BF4含有 $16 \times 10^8$ 菌落形成单位。

[0071] 为了解决上述的问题,本申请还提供了*Diaphorobacter nitroreducens*。

[0072] 所*Diaphorobacter nitroreducens*在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为CGMCC No.25438。



[0073] 上述菌剂除活性成分外,还可包括辅料,如水、碳源和/或氮源等。碳源是微生物生长一类营养物,是含碳化合物,包括糖类、油脂、有机酸及有机酸酯和小分子醇等速效、迟效碳源。氮源是指提供微生物营养所需氮元素的物质,包括花生饼粉、黄豆饼粉、酵母粉、蛋白胨、氨水、铵盐和硝酸盐等速效、迟效氮源。

[0074] 上述菌剂除含有所述活性成分外,还可含有载体。所述载体可为固体载体或液体载体。所述固体载体可为矿物材料、植物材料或高分子化合物;所述矿物材料可为粘土、滑石、高岭土、蒙脱石、白碳、沸石、硅石和硅藻土中的至少一种;所述植物材料可为玉米粉、豆粉和淀粉中的至少一种;所述高分子化合物可为聚乙烯醇和/或聚二醇。所述液体载体可为植物油、矿物油或水;所述有机溶剂可为癸烷和/或十二烷。所述菌剂中,所述活性成分可以以被培养的活细胞、活细胞的发酵液、细胞培养物的滤液或细胞与滤液的混合物的形式存在。所述菌剂的剂型可为多种剂型,如液剂、悬浮剂、粉剂、颗粒剂、可湿性粉剂或水分散剂。

[0075] 上述菌剂、鲁氏不动杆菌、柠檬酸杆菌、*Acidovorax soli*、或*Diaphorobacter nitroreducens*在下述任一中的应用:

[0076] A1) 上述材料在降解苯酚中的应用;

[0077] A2) 上述材料在制备降解苯酚产品中的应用;

[0078] A3) 述材料在生物降解苯酚中的应用

[0079] A4) 上述材料在制备生物降解苯酚产品中的应用;

[0080] A5) 上述材料在降解天然有机质中苯酚的应用;

[0081] A6) 上述材料在制备降解天然有机质中苯酚产品中的应用。

[0082] 为了解决上述的问题,本申请还提供了上述鲁氏不动杆菌、柠檬酸杆菌、*Acidovorax soli*或*Diaphorobacter nitroreducens*的培养方法,其特征在于,所述方法包括用培养基培养所述菌株的步骤。

[0083] 发酵过程作为活细胞催化剂的微生物,包括细菌、放线菌、酵母菌和霉菌四大类。

[0084] 上文中,所述法氏柠檬酸杆菌、鲁氏不动杆菌、*Acidovorax soli*和*Diaphorobacter nitroreducens*可为培养后的菌株。

[0085] 所述培养步骤可为将上述菌种置于LB液体培养基中,150r/min,30℃条件下振荡培养至OD<sub>600</sub>大于1。

[0086] 上文中,所述培养的时间可为38h。

[0087] 上文中,所述培养的接种量可为 $1 \times 10^8$ CFU/ml。上文中,所述降解苯酚的降解可在存在天然有机质的环境下进行。所述天然有机质的浓度可为0-10mgC/L。所述天然有机质(NOM)主要来源于动植物分解的残体,广泛地存在于水体、土壤、大气和岩层,对全球碳氮循环都具有重要的生态与环境意义,前人研究了天然有机质对菌群的影响,发现NOM可以在短时间内提高菌内酶的活性,且这一促进作用与NOM的种类和浓度有关。本研究中,降解菌对苯酚的降解效率与相关酶及其活性相关性较大,由于国际腐植酸协会提供的Suwannee River natural organic matter在天然有机质的相关研究中较为常用。

[0088] 有益效果

[0089] 本发明筛选出具有降解苯酚能力的菌株4株:法氏柠檬酸杆菌*Citrobacter farmeri*保藏编号为CGMCC No.25400、鲁氏不动杆菌保藏编号为CGMCC No.25399、

Acidovorax soli保藏编号为CGMCC No.25478和Diaphorobacter nitroreducens保藏编号为CGMCC No.25438。

[0090] 并优化其降解苯酚时的条件,发现在pH7-8,盐浓度在<0.1%时,可保持较高的降解能力。且天然有机质SRNOM并不会影响其降解率。

[0091] 本申请筛选的菌株和提供的方法能够将污染物转化为无毒无害的二氧化碳、水或其他无毒无害物质,具有高效低耗、操作简单、处理形式多样、对环境产生的影响较小且基本不产生二次污染。

[0092] 保藏说明

[0093] 菌种名称:鲁氏不动杆菌

[0094] 拉丁名:Acinetobacter lwoffii

[0095] 菌株编号:BF1

[0096] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0097] 保藏机构简称:CGMCC

[0098] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

[0099] 保藏日期:2022年07月25日

[0100] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.25399

[0101] 菌种名称:法氏柠檬酸杆菌

[0102] 拉丁名:Citrobacter farmeri

[0103] 菌株编号:BF2

[0104] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0105] 保藏机构简称:CGMCC

[0106] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

[0107] 保藏日期:2022年07月25日

[0108] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.25400

[0109] 菌种名称:Acidovorax soli

[0110] 拉丁名:Acidovorax soli

[0111] 菌株编号:BF3

[0112] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0113] 保藏机构简称:CGMCC

[0114] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

[0115] 保藏日期:2022年08月03日

[0116] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.25478

[0117] 所述Acidovorax soli菌中文名为食酸菌。

[0118] 菌种名称:Diaphorobacter nitroreducens

[0119] 拉丁名:Diaphorobacter nitroreducens

[0120] 菌株编号:BF4

[0121] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

[0122] 保藏机构简称:CGMCC

[0123] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号

- [0124] 保藏日期:2022年08月03日  
[0125] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No.25438  
[0126] 所述*Diaphorobacter nitroreducens*菌中文名为硝基还原型黄杆菌。

### 附图说明

- [0127] 图1为菌株BF1的进化树。  
[0128] 图2为菌株BF2的进化树。  
[0129] 图3为菌株BF3的进化树。  
[0130] 图4为菌株BF4的进化树。  
[0131] 图5为苯酚标准曲线。  
[0132] 图6为单一菌种降解率变化,其中圆形代表BF1菌株,三角形代表BF2菌株,插形表示BF3菌株,方形表示BF4菌株。  
[0133] 图7为两种菌种组合降解率变化。  
[0134] 图8为多菌种组合降解率变化。

### 具体实施方式

[0135] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。以下提供的实施例可作为本技术领域普通技术人员进行进一步改进的指南,并不以任何方式构成对本发明的限制。

[0136] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。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。

[0137] 下述实施例采用SPSS16统计软件对数据进行处理,实验结果以平均值±标准偏差表示,采用One-wayANOVA检验, $P < 0.05$  (\*)表示具有显著性差异, $P < 0.01$  (\*\*)表示具有极显著性差异, $P < 0.001$  (\*\*\*)表示具有极显著性差异。

[0138] 实施例1苯酚高效降解菌的筛选分离、测序鉴种

[0139] 实验材料

[0140] 无机盐培养基(MSM培养基): $\text{NaCl}$ 1.0g/L、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.79g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 1g/L、微量元素1mL/L,配置无机盐固体培养基时加入琼脂20g/L。于121℃高压灭菌20min,根据需要添加苯酚。

[0141] 实验方案

[0142] 菌源来自唐山滦宏焦化厂土壤样品,于2021年11月20日由发明申请人汪杰(jiewangcau@cau.edu.cn)采集,选用100mL玻璃培养瓶,于瓶底铺设1cm厚土样,加入80mL无机盐培养基,按唯一碳源苯酚浓度为500mg/L加入苯酚溶液,于20℃、150r/min条件下振荡富集培养3~4d,移取含菌悬浊液10mL至新的培养基中,于20℃、150r/min条件下振荡富集培养3~4d,反复操作4~5次。

[0143] 取生长状态良好的含菌浊液,经梯度稀释后,选择 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 两个稀释倍数的菌液,取100uL涂布至含有500mg/L苯酚的固体培养基,于20℃下培养15d,期间观察菌落形态及其生长状况。待菌落生长完成后进行平板划线,直至分离出单菌株,保存菌株并进行菌株鉴

定。

[0144] 使用正向引物27F和反向引物1492R进行PCR扩增,其中27F引物序列为AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG(其中,M为a或c),1492R引物序列为TACGGYTACCTTGTTACGACTT(其中,Y为t或c),PCR反应体系为:10×Ex Tap buffer5uL,2.5mM×dNTP Mix4uL,10p primer1 2uL,10p primer2 2uL,5u Ex Tap0.5uL,Template2uL,ddH<sub>2</sub>O34.5uL。PCR反应程序为:预变性94℃,3min;变性94℃,30s;退火54℃,30s;延伸72℃,1min30s,循环24次后,终延伸72℃,10min。扩增后的序列在NCBI进行同源性比对,鉴定菌株的种类。

[0145] 菌株鉴定

[0146] 要实现对菌株的认识、特性探究与应用,首先需要鉴定其种类,这样便可以从其亲缘关系较近的属种对其进行了解。当代菌株鉴种技术包括经典分类和现代分类鉴定法,经典分类鉴定法耗时长且实验繁琐,而现代分类鉴定法中的分析生物法,如16SrDNA鉴定具有能对位置样品进行快速种属分析的优点,较适合本文的研究情况,故本文选择16SrDNA对菌株进行鉴定。

[0147] 通过对苯酚高效降解菌进行筛选分离操作,本研究共获得了四种苯酚降解菌,并将其命名为BF1、BF2、BF3、BF4,使用上述1492R和27F对16SrDNA进行扩增,获得扩增片段,后委托北京睿恩诺生物科技有限公司对菌株的扩增片段进行测序(结果如下)并在NCBI进行同源性比对,并建立系统发育树,分析鉴定菌种的种属。结果显示待检菌株BF1的16SrDNA序列与不动杆菌属相似性达到100%,并与Acinetobacter lwoffii亲缘关系最近(图1)鉴定该菌株为洛菲不动杆菌(Acinetobacter lwoffii);BF2的16SrDNA序列与柠檬酸杆菌相似性达到61%,与Citrobacter farmeri亲缘关系最近(图2),鉴定该菌株为柠檬酸杆菌(Citrobacter),命名为Citrobacter sp.BF2;BF3的16SrDNA序列与食酸菌属相似性为100%,并与Acidovorax soli亲缘关系最近(图3),鉴定该菌株为土壤食酸菌(Acidovorax soli);BF4的16SrDNA序列与属细菌相似性为100%,并与Diaphorobacter nitroreducens亲缘关系最近(图4),鉴定该菌株为硝基还原菌(Diaphorobacter nitroreducens)。

[0148] BF1的16S rDNA序列如下:

[0149] TACCTACTTCTGGTGACAAACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTC  
ACCGCGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTAC  
GATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCTCTCGCGAGGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCC  
CTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCTCCGCTTCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTT  
CCCGGCTTAACCCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGA  
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTTACTATGT  
CAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT  
CATTTGAGTTTTAGTCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGCCTCAA  
AGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCATGCTTTC  
GCACCTCAGTGTGAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCG  
CTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAGCCAACCAGTATCGAATGCAATCCCAAGTTAAGCTCGG  
GGATTTACATTTGACTTAATTGGCCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTTGCACCCTCT  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCTACTATCCAAGAGTATTAAT  
CTCGGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTTACAACAAAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAG

GGTTCCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC  
GGATCATCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAG  
GCTCATCTATTAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCATCCCTTTCCG  
AGATGTTGTCCCCACTAATAGGCAGATTCCCTAAGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTAGGTCAAGTAGCAAGCTAC  
TTTTCCCGCTCGACTG;序列1,又称SEQ ID No.1。

[0150] BF2的16S rDNA序列如下:

[0151] AGTGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG  
CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGA  
GTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTACTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTT  
GTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCC  
AGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCAGCCAATCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG  
GGACTTAACCCAACATTTCAACACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTT  
CCTCATCTCTGACAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCT  
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTATTTAA  
CGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAGGGGAACAACCTCCAAATAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGT  
ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGT  
ATTCCTCCAGATCTCTACGCATTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGACTCAAGCCTGCCAGT  
TTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCC  
AGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCG  
GGTAACGTCAATGAATGCGGTTATTAACCACANNCCCTTCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTT  
CTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT  
CTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTT  
ACCTCACCAACAAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCG  
ACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCAGTTTCCAGACATTACTCACCCG  
TCCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAAGCTGCTTCTGTTTACCGTCGACTGCA;序列2,又称SEQ ID No2。

[0152] BF3的16S rDNA序列如下:

[0153] CTACTTCTGGCAGAACCCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCAC  
CGCGACATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGA  
CTGGCTTTATGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCC  
ACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCC  
CTTTCGTAGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC  
AGCCATGCAGCACCTGTGTTATGGCTCTCTTTCGAGCACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCATACATGTCAAAGGT  
GGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGA  
GTTTCAACCTTGC GGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCA  
ACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATG  
AGCGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTACTGCTACACG  
CGGAATTCATCCCCCTCTGCCGTACTCTAGCTATGCAGTCACAAATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTTC  
ACATCTGTCTTACATAACCGCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTAC  
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGACCCCTTTATTAGAAGGAGTCT

TTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGC  
CCATTGTCCAAAATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCTGTC  
CTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCGGCTTGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCC  
GTGAGCGCAAGGCCTTGCGGTCCCCTGCTTTCATCCTGAGATCGTATGCGGTATTAGCAAAGCTTTCGCTCCGTTA  
TCCCCACTCTCGGGCAGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGT  
CGACTGCA;序列3,又称SEQ ID No3。

[0154] BF4的16S rDNA序列如下:

[0155] CTACTTCTGGCAGAACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCAC  
CGCGACATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGA  
CTGGCTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATGACGTGTGTAGCCCC  
ACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCCCATTAGAGTGCC  
CTTTCGTAGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC  
AGCCATGCAGCACCTGTGTGCAGGTTCCCTTTCGGGCACGAATCCATCTCTGAAAACCTCCCTGCCATGTCAAAGGT  
GGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGA  
GTTTCAACCTTTCGCGCCGACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCA  
ACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATG  
AGCGTCAGTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTTCTCCGCATATCTACGCATTTACTGCTACACG  
CGGAATTCCATCCCCCTCTGCCGCACTCCAGCCTTGCAAGTCAAAAGGCAGTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTC  
ACCTCTGTCTTACAAAACCGCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTACGTATTAC  
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTATTCTTACGGTACCGTCATGACCCCTCTTTATTAGAAAGAGGCT  
TTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGC  
CCATTGTCCAAAATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATC  
CTCTCAGACCAGCTACAGATCGTCGGCTTGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCC  
GTCCGCGGAGGTCCGAAGATCCCCGCTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAGCAAAGCTTTCGCTCCGTTA  
TCCCCACGATCGGGCAGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTTACCG  
TCGACTGCAGGTA;序列4,又称SEQ ID No4。

[0156] 通过菌株的形态特征、培养特征、生理生化特性、Biolog微生物自动分析系统分析和16S rDNA将BF1鉴定为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)。鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)BF1已于2022年07月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.25399。下文简称鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399。

[0157] 通过菌株的形态特征、培养特征、生理生化特性、Biolog微生物自动分析系统分析和16S rDNA将BF2鉴定为法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)。法氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter farmeri*)BF2已于2022年07月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.25400。下文简称法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400。

[0158] 通过菌株的形态特征、培养特征、生理生化特性、Biolog微生物自动分析系统分析和16S rDNA将BF3鉴定为*Acidovorax soli*。*Acidovorax soli*BF3已于2022年08月03日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),其在中国微生物菌种保

藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.25478。下文简称Acidovorax soliCGMCC No.25478。

[0159] 通过菌株的形态特征、培养特征、生理生化特性、Biolog微生物自动分析系统分析和16S rDNA将BF4鉴定为Diaphorobacter nitroreducens。Diaphorobacter nitroreducens BF4已于2022年08月03日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的登记入册编号为CGMCC No.25438。下文简称Acidovorax soliCGMCC No.25438。

[0160] 实施例2苯酚高效降解菌降解特性探究

[0161] 本研究筛选分离得到四种苯酚降解菌,虽然菌来自同样的环境样本,但由于种属各异,其对苯酚的降解特性会存在差异,故探究四种单菌种对苯酚的降解特性是必要的。另一方面,单株菌一般在土壤中定植能力较差,而菌株组合对土壤环境具有较强的适应能力,故本文设置了不同菌种组合降解苯酚的实验,以探明最佳的菌种组合,以期实现更好地降解苯酚的实际应用。

[0162] 实验材料

[0163] 酵母蛋白胨培养基(LB培养基):10g/L蛋白胨、5g/L酵母粉、10g/LNaCl,其余为水,于121℃高压灭菌20min。

[0164] 无机盐培养基(MSM培养基):NaCl1.0g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L、 $NH_4NO_3$ 1g/L、微量元素( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.03g,  $H_3BO_3$ 0.3g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03g,去离子水1000mL, pH3.4)1mL/L,其余为水,于121℃高压灭菌20min。

[0165] 根据需要添加苯酚、盐酸、氢氧化钠、天然有机质(采用国际腐植酸协会提供的Suwannee Rivernatural organic matter代表天然有机质进行实验)、氯化钠,以设置不同培养条件,探究降解菌降解特性。

[0166] 苯酚无机盐培养基(MSM培养基):NaCl1.0g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L、 $NH_4NO_3$ 1g/L、微量元素( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.03g,  $H_3BO_3$ 0.3g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03g,去离子水1000mL, pH3.4)1mL/L,其余为水,于121℃高压灭菌20min。之后加入过0.22微米滤膜的苯酚溶液,使得苯酚最终浓度为500mg/L;使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH,使得培养液pH为7.0。

[0167] 实验指标

[0168] 细菌生长情况的测定:用空白培养基做参比,在波长600nm下测定菌液的光吸收值,记作OD600nm,反映液体培养基中该菌株的生长状况。

[0169] 苯酚含量的测定:高效液相色谱法,EclipsePlusC18色谱柱,40/60(体积比)的甲醇/水为流动相,检测波长270nm,流速1mL/min,进样量10uL。苯酚降解率=(空白样苯酚浓度-样品苯酚浓度)/空白样苯酚浓度 $\times$ 100%。

[0170] 苯酚标准曲线:

[0171] 通过配置一系列浓度梯度的苯酚标准溶液并使用高效液相色谱进行测定,根据峰面积与苯酚浓度的对应关系,以苯酚浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制苯酚标准曲线(图5),在0~50mg/L具有较好的线性关系,方程为 $y = 10.759x - 2.2885$ ,相关指数 $R^2$ 为

0.999, 准确度较高, 故能作为后续实验的参照。

[0172] 1. 不同菌剂对苯酚降解的影响

[0173] 分别将分离出的单菌株BF1、BF2、BF3或BF4接种到LB液体培养基进行扩大培养, 于150r/min, 30℃条件下振荡培养38h, 使其OD600nm大于1, 即达到菌生长较好的时期, 后在2500r/min条件下离心8min, 收集沉淀(菌体), 用MSM液体培养基对菌体进行冲洗收集, 用MSM液体培养基稀释菌液OD600nm至1.6(以MSM液体培养基为空白对照), 进行下一步接种和探究。

[0174] 1、降解苯酚菌剂的制备

[0175] 1.1 1菌剂的制备

[0176] 挑取鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399(BF1)单菌落接种到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 制备成母液, 将母液按照1%(体积比)的比例加入到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 收集发酵液, 该发酵液即为1菌剂。该1菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399, 该1菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $16 \times 10^8$ cfu/mL。cfu为菌落形成单位。

[0177] 1.2 2菌剂的制备

[0178] 挑取法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400(BF2)单菌落接种到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 制备成母液, 将母液按照1%(体积比)的比例加入到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 收集发酵液, 该发酵液即为2菌剂。该2菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400, 该2菌剂中法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $16 \times 10^8$ cfu/mL。cfu为菌落形成单位。

[0179] 1.3 3菌剂的制备

[0180] 挑取Acidovorax soli CGMCC No.25478(BF3)单菌落接种到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 制备成母液, 将母液按照1%(体积比)的比例加入到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 收集发酵液, 该发酵液即为3菌剂。该3菌剂的活性成分为Acidovorax soli CGMCC No.25478, 该3菌剂中Acidovorax soli CGMCC No.25478的含量为 $16 \times 10^8$ cfu/mL。cfu为菌落形成单位。

[0181] 1.4 4菌剂的制备

[0182] 挑取Diaphorobacter nitroreducens CGMCC No.25438(BF4)单菌落接种到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 制备成母液, 将母液按照1%(体积比)的比例加入到LB液体培养基中, 温度30℃, 转速150rpm, 振荡培养38h, 收集发酵液, 该发酵液即为4菌剂。该4菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25438, 该4菌剂中Diaphorobacter nitroreducens CGMCC No.25438的含量为 $16 \times 10^8$ cfu/mL。cfu为菌落形成单位。

[0183] 1.5-1+2菌剂的制备

[0184] 将上述1菌剂和上述2菌剂进行混合, 得到1+2菌剂。该1+2菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399和法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400, 该1+2菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL, 法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0185] 1.6 1+3菌剂的制备



[0186] 将上述1菌剂和上述3菌剂进行混合,得到1+3菌剂。该1+3菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399和*Acidovorax soli* CGMCC No.25478,该1+3菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL,*Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0187] 1.7 1+4菌剂的制备

[0188] 将上述1菌剂和上述4菌剂进行混合,得到1+4菌剂。该1+4菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399和*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该1+4菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL,*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0189] 1.8 2+3菌剂的制备

[0190] 将上述2菌剂和上述3菌剂进行混合,得到2+3菌剂。该2+3菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400和*Acidovorax soli* CGMCC No.25478,该2+3菌剂中法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL,*Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0191] 1.9 2+4菌剂的制备

[0192] 将上述2菌剂和上述4菌剂进行混合,得到2+4菌剂。该2+4菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400和*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该1+2菌剂中法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL,*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0193] 1.10 3+4菌剂的制备

[0194] 将上述3菌剂和上述4菌剂进行混合,得到3+4菌剂。该3+4菌剂的活性成分为*Acidovorax soli* CGMCC No.25478和*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该1+2菌剂中*Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL,*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $8 \times 10^8$ cfu/mL。

[0195] 1.11 1+2+3菌剂的制备

[0196] 将上述1菌剂、上述2菌剂和上述3菌剂进行混合,得到1+2+3菌剂。该1+2+3中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399、菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400和*Acidovorax soli* CGMCC No.25478,该1+2+3菌剂中中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL,法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL,*Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL。

[0197] 1.12 1+2+4菌剂的制备

[0198] 将上述1菌剂、上述2菌剂和上述4菌剂进行混合,得到1+2+4菌剂。该1+2+4菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399、法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400和*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该1+2+4菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL,法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL,*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL。

[0199] 1.13 1+3+4菌剂的制备

[0200] 将上述1菌剂、上述3菌剂和上述4菌剂进行混合,得到1+3+4菌剂。该1+3+4菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399、*Acidovorax soli* CGMCC No.25478和

*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该1+3+4菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL, *Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL, *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL。

[0201] 1.14 2+3+4菌剂的制备

[0202] 将上述2菌剂、上述3菌剂和上述4菌剂进行混合,得到2+3+4菌剂。该2+3+4菌剂的活性成分为法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400、*Acidovorax soli* CGMCC No.25478和 *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该2+3+4菌剂中法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL, *Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL, *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $5.3 \times 10^8$ cfu/mL。

[0203] 1.15 1+2+3+4菌剂的制备

[0204] 将上述1菌剂、上述2菌剂、上述3菌剂和上述4菌剂进行混合,得到1+2+3+4菌剂。该1+2+3+4菌剂的活性成分为鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399、法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400、*Acidovorax soli* CGMCC No.25478和 *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438,该2+3+4菌剂中鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399含量为 $4 \times 10^8$ cfu/mL,法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量为 $4 \times 10^8$ cfu/mL, *Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量为 $4 \times 10^8$ cfu/mL, *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量为 $4 \times 10^8$ cfu/mL。

[0205] 2.降解苯酚

[0206] 苯酚无机盐培养基(MSM培养基):NaCl1.0g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L、 $NH_4NO_3$ 1g/L、微量元素( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.03g,  $H_3BO_3$ 0.3g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03g,去离子水1000mL,pH3.4)1mL/L,其余为水,于121℃高压灭菌20min。之后加入过0.22微米滤膜的苯酚溶液,使得苯酚最终浓度为500mg/L;使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH,使得培养液pH为7.0。

[0207] 下述处理中除了所用的菌剂不同外,其它操作均相同。

[0208] 2.1利用1菌剂降解苯酚

[0209] 具体方法如下:

[0210] 将上述1菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量计为 $0.16 \times 10^8$ cfu/mL,30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0211] 2.2利用2菌剂降解苯酚

[0212] 将上述2菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中2菌剂的含量以法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量计为 $0.16 \times 10^8$ cfu/mL,30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离

心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0213] 2.3利用3菌剂降解苯酚

[0214] 将上述3菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以 *Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量计为 $0.16 \times 10^8$ cfu/mL,30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0215] 2.4利用4菌剂降解苯酚

[0216] 将上述4菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中4菌剂的含量以 *Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量计为 $0.16 \times 10^8$ cfu/mL,30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0217] 2.5利用2联系菌剂降解苯酚

[0218] 具体方法如下:

[0219] 分别将上述1+2菌剂、1+3菌剂、1+4菌剂、2+3菌剂、2+3菌剂或3+4菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,分别得到1+2菌剂降解苯酚发酵瓶、1+3菌剂降解苯酚发酵瓶、1+4菌剂降解苯酚发酵瓶、2+3菌剂降解苯酚发酵瓶、2+3菌剂降解苯酚发酵瓶和3+4菌剂降解苯酚发酵瓶;各发酵瓶中的菌株饭量如表5所示。30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0220] 表5

[0221]

	菌株种类	含量
1+2 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
1+3 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
1+4 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
2+3 菌剂降解苯酚发酵瓶	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
2+4 菌剂降解苯酚发酵瓶	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
3+4 菌剂降解苯酚发酵瓶	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.08 \times 10^8$ cfu/mL

[0222] 2.6利用3联系菌剂降解苯酚

[0223] 分别将上述1+2+3菌剂、1+2+4菌剂、1+3+4菌剂、2+3+4菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,分别得到1+2+3菌剂降解苯酚发酵瓶、1+2+4菌剂降解苯酚发酵瓶、1+3+4菌剂降解苯酚发酵瓶、2+3+4菌剂降解苯酚发酵瓶;各发酵瓶中的菌株饭量如表6所示。30℃ 150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃ 150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0224] 表6

	菌株种类	含量	
[0225]	1+2+3 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
[0225]	1+2+4 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
[0225]	1+3+4 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
[0225]	2+3-4 菌剂降解苯酚发酵瓶	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.053 \times 10^8$ cfu/mL

### [0226] 2.7利用4联菌剂降解苯酚

[0227] 将上述1菌、上述2菌、上述3菌和上述4菌剂接入装有100mL培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以法鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中2菌剂的含量以法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中3菌剂的含量以*Acidovorax soli* CGMCC No.25478的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL和锥形瓶中4菌剂的含量以*Diaphorobacter nitroreducens* CGMCC No.25438的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL,30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养2、4、6、8和10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

### [0228] 3.结果如下所述

[0229] 各组苯酚降解率变化如图6、图7和图8所示。不同菌种及混菌的苯酚降解率在前四天有明显提升,后随时间推移波动上升,最终降解率在77.94%~94.56%,各组之间差异较明显,且不同菌种降解苯酚的方式有差异,大致可分为两种情况:(1)初期便达到了较高的苯酚降解率,后期有提升,但效率提升幅度较小,这类菌适合周期较长的苯酚降解实验,拉长时间尺度来探究其降解的特性;(2)初期苯酚降解率较低,后期实现大幅提升,这类菌则适合作为短期高效降解苯酚的相关研究。

[0230] 由图6可知,BF1在整个降解过程中保持着四者中最高的降解率,且能随时间推移(2~6d)实现降解率的稳定上升,是四种单菌中综合降解性能最高的(85.59%)。BF2在初期

苯酚降解率最低,在2~6d有大幅提升,最终降解效果仅次于BF1,推测BF2在降解过程中,对苯酚降解中间产物的利用与转换较快即BF2菌的邻苯双加氧酶活性更高,故在后期出现了苯酚降解率迅速提高的现象。BF3与BF4在各阶段的苯酚降解率变化情况相似,均为初期较低,后期逐渐升高。四种菌对苯酚的降解率相差不大,在80.43%~85.59%之间。

[0231] 相比于单一菌种(图6),菌种组合(图7)使得各组间的差异进一步放大,在由两种菌种组合降解苯酚的实验中,初期降解最好的是BF1+4,且在后期其降解效率较稳定,但在末期,BF1+3的降解效率超过了BF1+4,且是单菌与混菌实验中,苯酚降解最佳的菌种(89.56%),推测其原因是BF1+4对苯酚降解中间产物的耐受性较低,以至于其在末期稍有降低。BF1+2在降解苯酚的过程中降解效率波动较大,应该是由于两菌种的相互适应情况不太好,造成降解过程中降解能力时好时坏。而BF2+3、BF2+4、BF3+4组在初期降解情况均不佳,2~4d有较大提高,后期则波动上升。由两种菌混合降解的探究中,各组最终降解率在77.94%~89.56%,不同菌相互促进或抑制使得菌种之间的降解特性差异被放大。

[0232] 多菌种组合降解苯酚(图8)时,各组降解率为79.93%~89.75%,其组间差异介于单菌(图6)与两种菌种组合(图7)之间,体现了混合菌群的协同代谢作用,且一般情况下,多种菌组合能比两种菌组合更好地实现互助互惠、动态平衡,这一情况与前人的相关研究情况类似,如孙文静等富集得到的降解菌群则能在最优条件下50h降解72mg/L的苯;张磊等<sup>[40]</sup>从污染土壤中分离得到了一组降解菌群,该菌群在最优条件下6h内可全部降解100mg/L的苯;张永敏等从河流表层沉积物分离得到了一组好氧菌降解菲的菌群,可60h降解95.78%的100mg/L菲,菌群适应环境能力、抗压能力均较强。且已有研究证实,多菌株协同作用比单一降解菌降解效率更好,稳定性更强。在苯酚降解初期,降解最好的是BF1+2+4,降解稳定,整个过程降解率变化不大,而BF2+3+4组,虽然在整个过程中降解速率一直较低,但是其在2~4d速率大幅提升,其中的机理值得进一步探究,以更好地实现对菌群降解速率的掌握、调控及应用。在随后的实验中,考虑到整个周期降解的稳定性、适用性以及降解效率,均使用BF1+BF2+BF3+BF4的组合进行。

[0233] 实施例2不同环境因素对苯酚降解的影响

[0234] 为探究环境条件对苯酚降解菌降解率的影响,本文设置了不同pH(5,6,7,8,9)、不同盐度(0.5%,1.0%,2.0%)、不同天然有机质浓度(2.5,5.0,10.0mgC/L)的MSM培养基对菌进行培养,并测定第10天的苯酚浓度,分析得到不同条件对苯酚降解率的影响。

[0235] 1. 不同pH值对苯酚降解的影响

[0236] pH对菌的生长代谢往往具有多方面的影响,首先pH会使核酸、蛋白质等生物大分子所带的电荷发生变化,从而影响菌内酶等的生物活性,其次pH能影响细胞膜电荷变化,从而导致菌对外界营养物质的吸收能力改变,另外,pH还能改变环境中营养物质的可给性以及有害物质的毒性,进而影响菌的生存。故探究pH对降解菌降解苯酚效率的影响是必要的。

[0237] 1. 制备不同pH的苯酚培养基:

[0238] pH=5苯酚培养基的制备:

[0239] 向容器中加入NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/LHCl溶液或1mol/LNaOH溶液调节PH至5,于121℃高压灭菌20min,得pH=5培养基加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得pH=5的苯酚培养基,重复上述操作获得多个pH=5的苯酚培养基,用于后续实验。

[0240] pH=6苯酚培养基的制备:重复上述操作,获得多个pH=6苯酚培养基,用于后续实验。

[0241] pH=7苯酚培养基的制备:重复上述操作,获得多个pH=7苯酚培养基,用于后续实验。

[0242] pH=8苯酚培养基的制备:向容器中加入NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL, ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/LHCl溶液或1mol/L NaOH溶液..调节PH至8,于121℃高压灭菌20min,得pH=8培养基,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得pH=8的苯酚培养基,重复上述操作获得多个pH=8的苯酚培养基,用于后续实验。

[0243] pH=9苯酚培养基的制备:重复上述操作,获得多个pH=9苯酚培养基,用于后续实验。

[0244] 将上述1菌、上述2菌、上述3菌和上述4菌剂分别接入装有100mL上述pH=5苯酚培养基、pH=6苯酚培养基、pH=7苯酚培养基、pH=8苯酚培养基或pH=9苯酚培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以法鲁氏不动杆菌CGMCCNo.25399的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中2菌剂的含量以法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量计为Acfu/mL、锥形瓶中3菌剂的含量以Acidovorax soli CGMCC No.25478的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL和锥形瓶中4菌剂的含量以Diaphorobacter nitroreducens CGMCCNo.25438的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL,获得不同pH的4联菌剂降解苯酚发酵瓶(具体如表7所述),30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0245] 表7

	菌株种类	含量	
[0246]	pH=5 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	pH=6 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	pH=7 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	pH=8 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
[0247]		25438	
	pH=9 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL

[0248] 结果如表2所示,混合菌群在酸性较大或碱性较强的环境中均不能较好的产生降解作用,推测这是由于较高浓度的酸/碱使得菌内不同酶的活性受到抑制,进而阻碍了菌对外界环境中碳源苯酚的利用,也无法获得足够的能量生长繁殖,如此往复,便进一步降低了苯酚降解效能。从本结果得出菌群的最佳pH条件为7-8。

[0249] 表2



[0250]	培养条件	pH				
		5	6	7	8	9
	降解率	26.83%±0.5%	70.32%±3.4%	82.46%±2.4%	86.08%±2.1%	26.51%±4.1%

[0251] 实施例3不同盐浓度对苯酚降解的影响

[0252] 无机盐是菌生长的必需元素,在生长过程中,无机盐对维持细胞膜平衡、调节渗透压和酶反应有重要作用。为了保护胞内原生质,菌会在一定盐度范围内通过调节渗透压维持正常生理活动,但在高盐环境,无机盐会破坏菌的细胞膜及体内酶系统,进而影响其正常生长繁殖。故环境的盐度对菌的生长代谢会产生极大影响,本文通过设置0.5%,1.0%,2.0%的盐度梯度,来探究苯酚降解菌被影响的情况,降解情况见表3。

[0253] 1.不同盐浓度的苯酚培养基的制备:

[0254] 0.5%NaCl苯酚培养基的制备:

[0255] 向容器中加入NaCl5g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,得0.5%NaCl培养基,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,0.5%NaCl苯酚培养基,获得重复上述操作获得多个0.5%NaCl苯酚培养基,用于后续实验。

[0256] 1%NaCl苯酚培养基的制备:

[0257] 向容器中加入NaCl10g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,得0.5%NaCl培养基,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,1%NaCl苯酚培养基,获得重复上述操作获得多个1%NaCl苯酚培养基,用于后续实验。

[0258] 2%NaCl苯酚培养基的制备:

[0259] 向容器中加入NaCl20g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,得2%NaCl培养基,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,2%NaCl苯酚培养基,获得重复上述操作获得多个2%NaCl苯酚培养基,用于后续实验。

[0260] 将上述1菌、上述2菌、上述3菌和上述4菌剂分别接入装有100mL上述0.5%NaCl苯酚培养基、1%NaCl苯酚培养基或2%NaCl苯酚培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以法鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中2菌剂的含量以法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中3菌剂的含量以Acidovorax soli CGMCC No.25478的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL和锥形瓶中4菌剂的含量以Diaphorobacter nitroreducens CGMCC No.25438的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL,获得不同NaCl浓度的4联菌剂降解苯酚发酵瓶(具体如表8所述),30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0261] 表8

	菌株种类	含量	
[0262]	0.5%NaCl 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	1%NaCl 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
[0263]		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	2%NaCl 的 4 联菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
		<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL

[0264] 表3

[0265] 由表3可知,随着苯酚降解菌生长环境盐度的增大,其苯酚降解率逐渐降低,且在盐度为2.0%时仅能在10d降解26.24%500mg/L的苯酚。而在1%的盐度条件下,菌群对苯酚的降解效果并没有显著降低,表面菌群可以耐受1%盐度的影响。。

培养条件	NaCl		
	0.5%	1.0%	2.0%
[0266] 降解率	84.97%±0.6%	82.57%±1.2%	26.24%±1.1%

[0267] 5. 不同天然有机质对苯酚降解的影响

[0268] 天然有机质(NOM)主要来源于动植物分解的残体,广泛地存在于水体、土壤、大气和岩层,对全球碳氮循环都具有重要的生态与环境意义,前人研究了天然有机质对菌群的影响,发现NOM可以在短时间内提高菌内酶的活性,且这一促进作用与NOM的种类和浓度有关。本研究中,降解菌对苯酚的降解效率与相关酶及其活性相关性较大,由于国际腐植酸协会提供的Suwannee River natural organic matter在天然有机质的相关研究中较为常用,故本文选择SRNOM(中国腐殖质协会,2R101N)代表天然有机质进行实验,并设置浓度梯度为2.5,5.0,10.0mgC/L。

[0269] 1. 制备不同天然有机质含量的苯酚培养基:

[0270] 0mgC/L天然有机质苯酚培养基的制备:

[0271] 向容器中加入NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121

℃高压灭菌20min,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得0mg C/L天然有机质苯酚培养基,重复上述操作获得多个0mgC/L天然有机质苯酚培养基,用于后续实验。

[0272] 2.5mgC/L天然有机质苯酚培养基的制备:

[0273] 向容器中加入天然有机质SRNOM4.5mg、NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得2.5mgC/L天然有机质苯酚培养基,重复上述操作获得多个2.5mgC/L天然有机质苯酚培养基,用于后续实验。

[0274] 5.0mgC/L天然有机质苯酚培养基的制备:

[0275] 向容器中加入天然有机质SRNOM9.0mg、NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得5.0mgC/L天然有机质苯酚培养基,重复上述操作获得多个5mgC/L天然有机质苯酚培养基,用于后续实验。

[0276] 10mgC/L天然有机质苯酚培养基的制备:

[0277] 向容器中加入天然有机质SRNOM18mg、NaCl1.0g、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.79g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g、 $NH_4NO_3$ 1g、微量元素1mL,ddH<sub>2</sub>O添加到至1000ml,使用1mol/L盐酸或1mol/L氢氧化钠溶液调节pH为7.0,于121℃高压灭菌20min,加入无菌膜过滤的苯酚,使其终浓度为500mg/L,获得10mg C/L天然有机质苯酚培养基,重复上述操作获得多个10mg C/L天然有机质苯酚培养基,用于后续实验。

[0278] 将上述1菌、上述2菌、上述3菌和上述4菌剂分别接入装有100mL上述0mg C/L天然有机质苯酚培养基、2.5mg C/L天然有机质苯酚培养基、5.0mg C/L天然有机质苯酚培养基、或10mg C/L天然有机质苯酚培养基的500mL锥形瓶中,使锥形瓶中1菌剂的含量以法鲁氏不动杆菌CGMCC No.25399的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中2菌剂的含量以法氏柠檬酸杆菌CGMCC No.25400的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL、锥形瓶中3菌剂的含量以Acidovorax soli CGMCC No.25478的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL和锥形瓶中4菌剂的含量以Diaphorobacter nitroreducens CGMCC No.25438的含量计为 $0.04 \times 10^8$ cfu/mL,获得不同天然有机质含量的4联菌剂降解苯酚发酵瓶(具体如表9所述),30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到样品苯酚浓度。同时设置不接种菌剂的对照(空白样),即将装有100mL培养基的500mL锥形瓶30℃150rpm分别振荡培养10天,收集发酵液,对发酵液进行离心,取上清液进行上述高效液相色谱分析苯酚的含量,得到空白样苯酚浓度。实验重复三次,每次重复每个时间点设10个锥形瓶。

[0279] 表9

[0280]	菌株种类	含量
--------	------	----

[0281]

0mg C/L 天然有机质 4 联菌 剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
2.5mg C/L 天然有机质 4 联 菌剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
5mg C/L 天然有机质 4 联菌 剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
10mg C/L 天然有机质 4 联菌 剂降解苯酚发酵瓶	鲁氏不动杆菌 CGMCC No. 25399	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	法氏柠檬酸杆菌 CGMCC No. 25400	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Acidovorax soli</i> CGMCC No. 25478	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL
	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> CGMCC No. 25438	$0.04 \times 10^8$ cfu/mL

[0282] 结果如表4所述,表明随着天然有机质浓度增加,混合菌剂对其降解效果有略微升高,表明水体中天然有机质的存在并不会降低污染物的降解。

[0283] 表4

[0284]

培养条件	SRNOM (mg C/L)			
	0.0	2.5	5.0	10.0
降解率	82.46%±3.1%	83.55%±2.1%	83.41%±0.6%	85.03%±1.6%

[0285] 以上对本发明进行了详述。对于本领域技术人员来说,在不脱离本发明的宗旨和范围,以及无需进行不必要的实验情况下,可在等同参数、浓度和条件下,在较宽范围内实施本发明。虽然本发明给出了特殊的实施例,应该理解为,可以对本发明作进一步的改进。总之,按本发明的原理,本申请欲包括任何变更、用途或对本发明的改进,包括脱离了本申请中已公开范围,而用本领域已知的常规技术进行的改变。按以下附带的权利要求的范围,可以进行一些基本特征的应用。

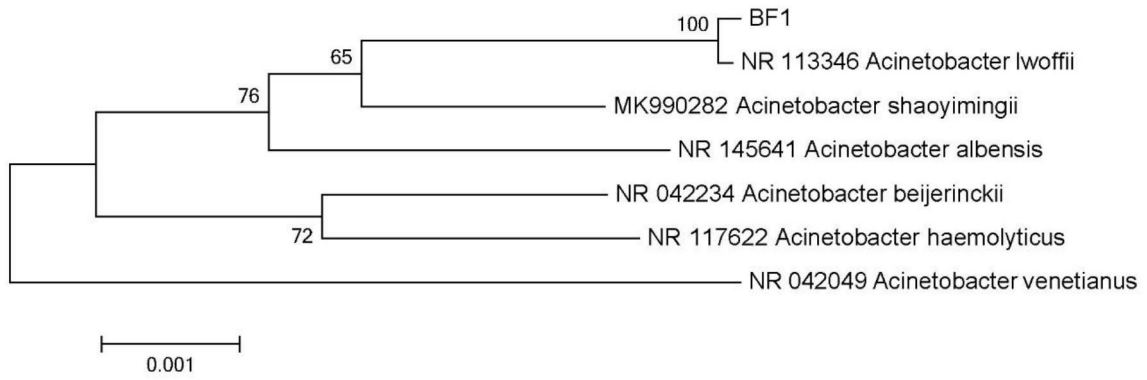


图1

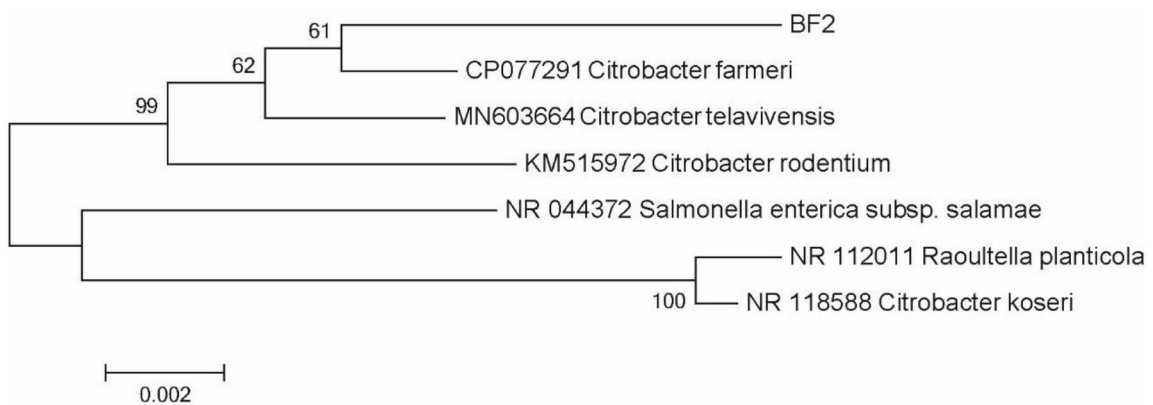


图2

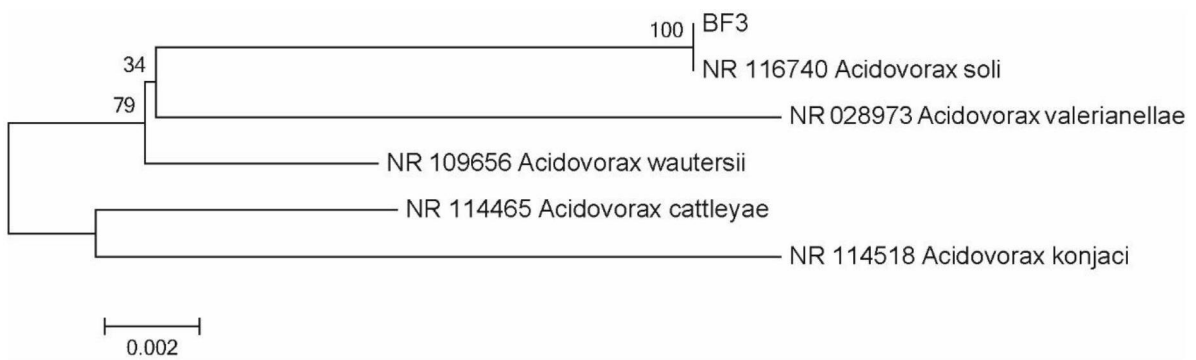


图3

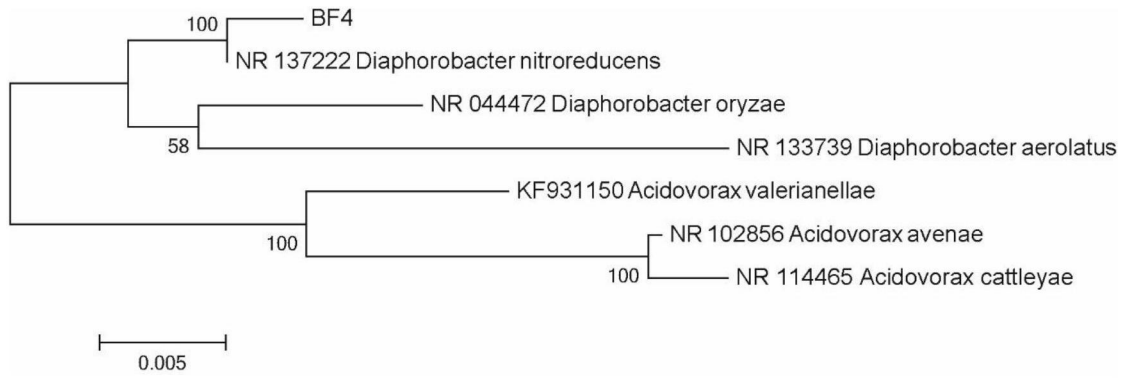


图4

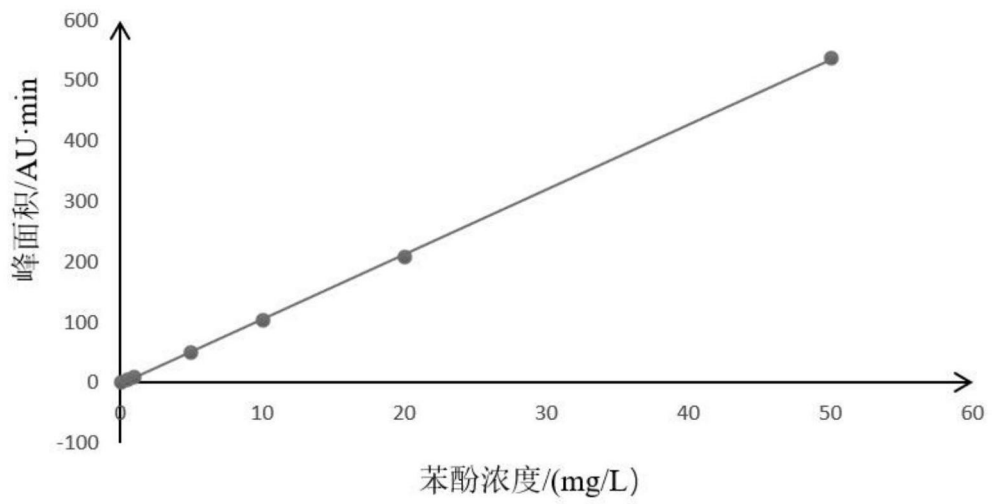


图5

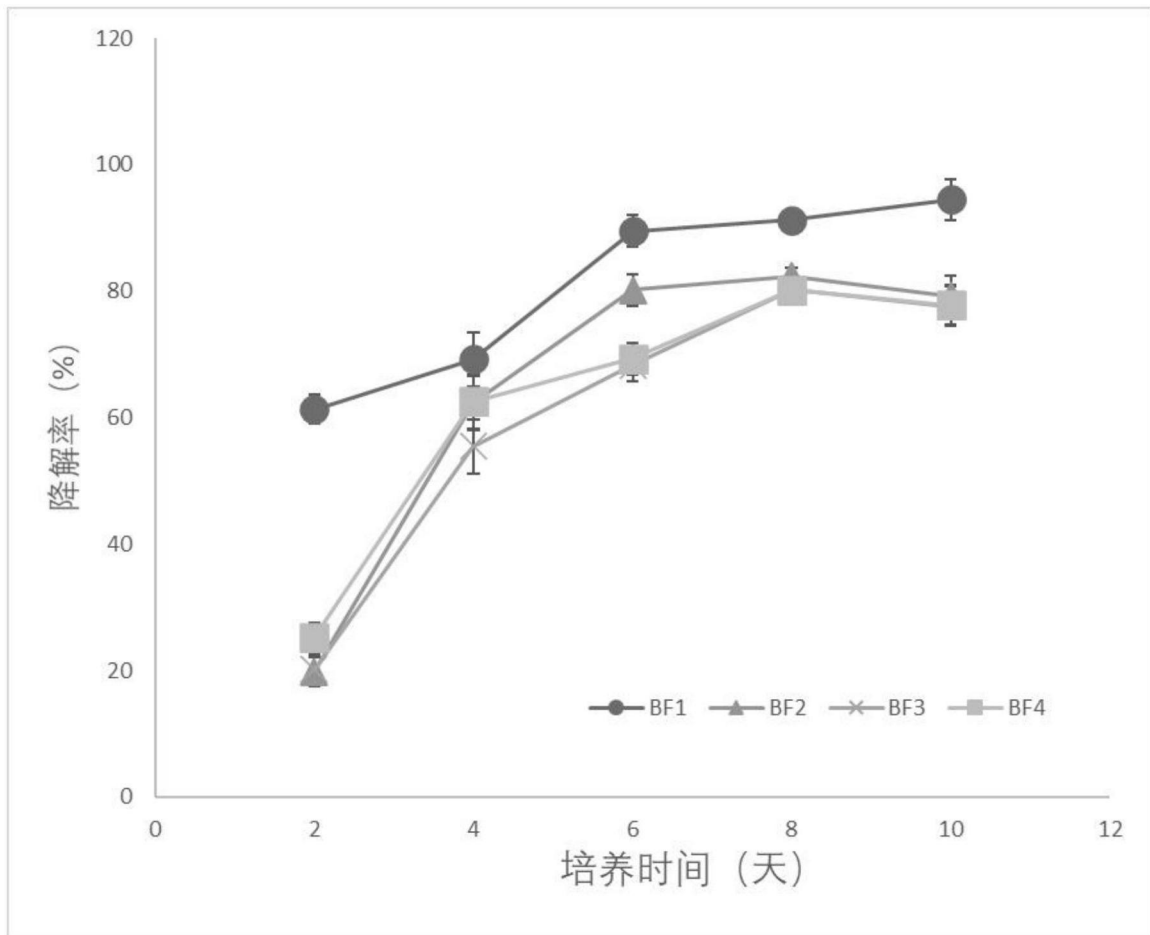


图6

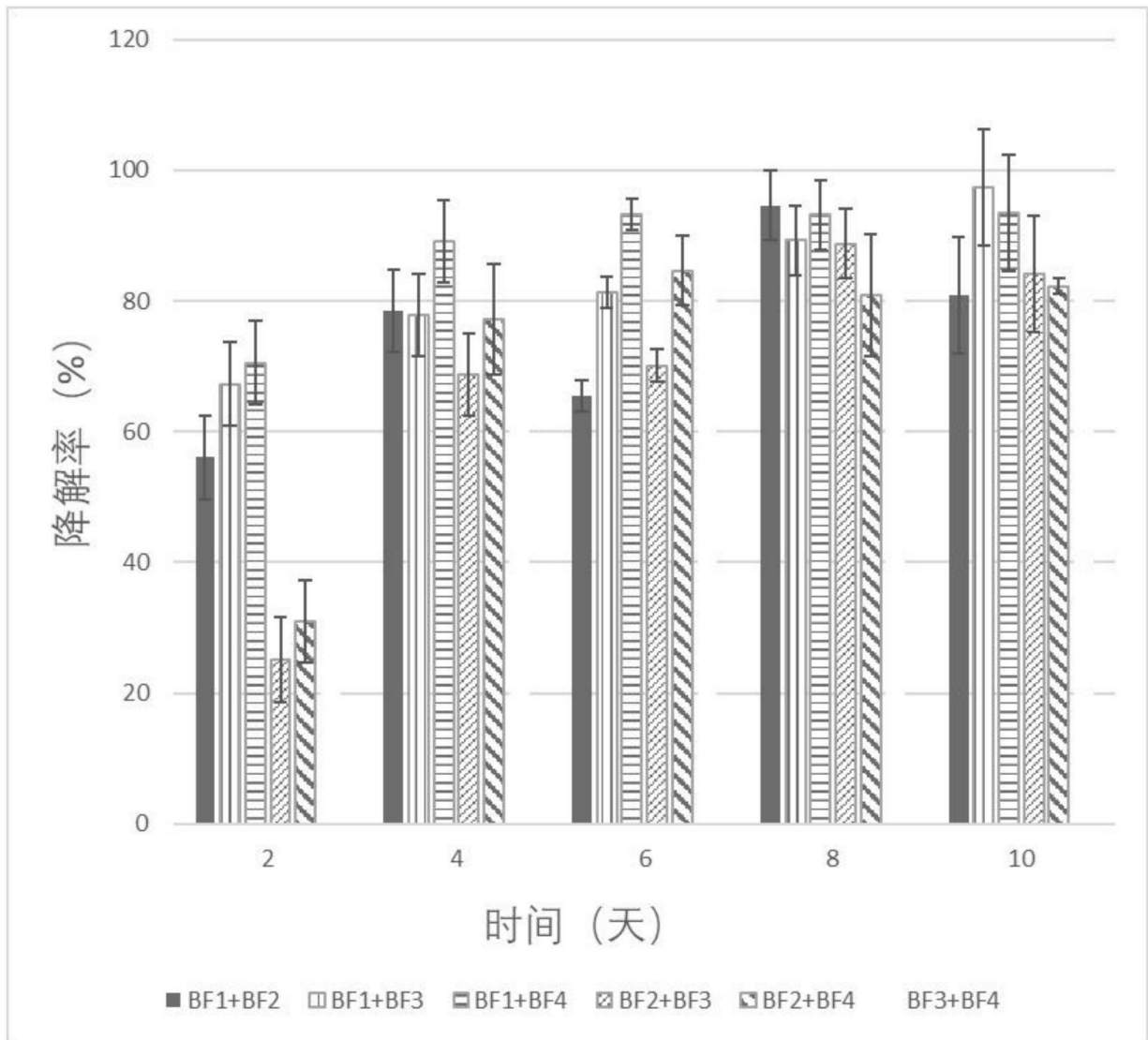


图7



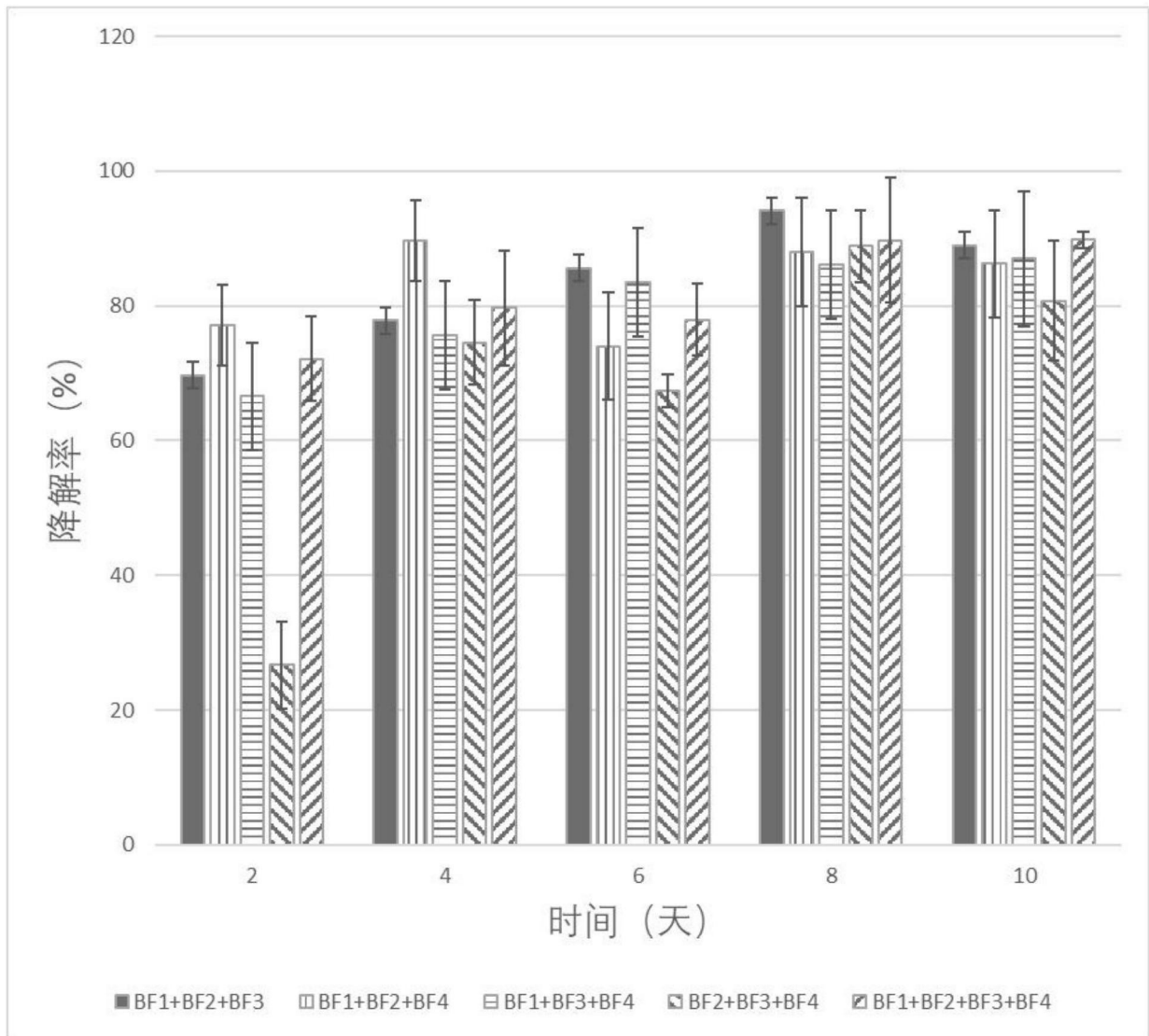


图8