



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116144552 A

(43) 申请公布日 2023.05.23

(21) 申请号 202310132421.9

C02F 101/32 (2006.01)

(22) 申请日 2023.02.20

C02F 101/20 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.25958 2022.10.24

(71) 申请人 中国环境科学研究院

地址 100012 北京市朝阳区安外大羊坊8号

(72) 发明人 黄彩红 陈浩敏 李伟 李玉倩

(74) 专利代理机构 北京知文通达知识产权代理
事务所(普通合伙) 16051

专利代理师 欧阳石文

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

C02F 3/34 (2023.01)

C12R 1/01 (2006.01)

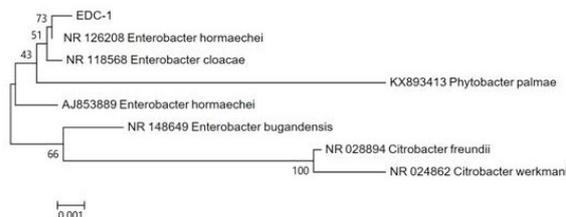
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

微生物菌EDC-1及其原位修复矿区复合污染土壤的应用

(57) 摘要

本发明公开一种微生物菌EDC-1及其原位修复矿区复合污染土壤的应用。本发明从山东某煤矿煤矸石堆场土壤中筛选和分离得到EDC-1菌株,该菌株可利用萘、菲、蒽或芘为唯一碳源,并对重金属具有一定耐受性。本发明筛选的菌株具有重金属背景下多种PAHs的降解能力,且培养简单,成本较低,在多环芳烃及重金属复合污染场地生物修复具有较好应用前景。



1. 一种微生物菌EDC-1,其属于Enterobacter hormaechei,保藏编号为CGMCC NO.25958,保藏于中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

2. 根据权利要求1所述的微生物菌EDC-1在多环芳烃污染和/或重金属污染水体或土壤修复中的应用;所述多环芳烃选自萘、菲、蒽和/或芘。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述多环芳烃选自NAP、PHE、ANT、PYR、BaP、BghiP中的一种或多种;所述重金属是镉、铬、铈重金属。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,是将所述微生物菌EDC-1的菌悬液施于多环芳烃污染和/或重金属污染水体或土壤中。

5. 含有权利要求1所述的微生物菌EDC-1的降解多环芳烃的降解菌剂。

6. 根据权利要求5所述的降解多环芳烃的降解菌剂,其特征在于,所述微生物菌EDC-1的以菌悬液形式存在。

7. 根据权利要求6所述的降解多环芳烃的降解菌剂,其特征在于,所述的菌悬液制备方法如下:

S1. 含多环芳烃母液的固体无机盐培养基涂布所述微生物菌EDC-1后,35-40 °C培养,培养48-72h,待看到有完整的单菌落;

S2. 挑取单菌落接种至胰蛋白胨大豆肉汤TSB液体培养基中,再在35-40°C下,150-180 rpm振荡培养后,制成 $OD_{600}=0.5-1.5$ 的菌悬液;

S3. 接种至新的发酵培养基内,再在35-40°C下,150-180 rpm振荡发酵48-96h,得到培养液即为降解多环芳烃的降解菌剂。

8. 根据权利要求7所述的降解多环芳烃的降解菌剂,其特征在于,所述胰蛋白胨大豆肉汤TSB液体培养基配方为胰蛋白胨15.0g/L,大豆胨5.0g/L,氯化钠5.0g/L, K_2HPO_4 2.5g/L,蒸馏水1.0L,pH7.3±0.2;所述发酵培养基配方为葡萄糖 10g/L,酵母粉15g/L,蛋白胨10g/L, K_2HPO_4 15g/L,蒸馏水1L,pH 7.2±0.2。

9. 根据权利要求8所述的降解多环芳烃的降解菌剂,其特征在于,所述降解菌剂中菌体数量不低于 1.0×10^{10} CFU/ml。

10. 根据权利要求9所述的降解多环芳烃的降解菌剂,其特征在于,所述降解菌剂中菌体数量为 1.0×10^{10} CFU/ml至 1.0×10^{12} CFU/ml。

微生物菌EDC-1及其原位修复矿区复合污染土壤的应用

技术领域

[0001] 本发明属于环保领域,具体涉及有机污染物降解领域,更具体涉及一种矿区土壤复合污染修复菌霍氏肠杆菌EDC-1的筛选培养及其应用。

背景技术

[0002] 芳香族化合物是环境中普遍且持久的污染物之一,是广泛存在的疏水性有机污染物。在煤矿、火电厂等周边的土壤中通常会出现复杂的多环芳烃(PAHs)及其衍生物的积累和共存。一般情况下,多环芳烃在土壤中相对稳定,并且比许多其他有机化合物难降解。多环芳烃的来源主要分为人为源和自然源两大类,自然界中的森林火灾、动植物和微生物代谢是多环芳烃的重要来源。人类活动过程中的工业生产、垃圾焚烧、以及各类煤炭、石油和天然气等矿物燃料的不完全燃烧均会向环境中释放大量多环芳烃。由于其致癌性、致畸性、致突变性的特点,对人体健康构成较大的潜在风险。

[0003] 工业生产所需煤矿资源的开采,是多环芳烃土壤污染的主要传播途径。在矿区开采、运输、加工和堆放过程中都会土壤表层造成污染,煤矸石作为煤炭开采的副产物,是矿区多环芳烃污染治理的重点,大量有机污染物与重金属污染物由此排放到环境中。

[0004] 微生物降解是一种公认的绿色修复方法,在有机污染修复中,已经有较完善的研究基础。作为一种减少污染物浓度和毒性的宝贵工具,生物修复技术同时具有低成本、高效、污染物针对性强、环境影响小,并且比目前用于去除污染物的其他方法持续效果更长。但由于矿区土壤属于复合污染体系,常规的生物修复方法在实地应用中有较大的局限性,且重金属也具有毒性,影响降解菌的活性。因此,在进行生物修复时,除了微生物自身多环芳烃的耐受和降解能力外,重金属耐受性也是一个重要的考量标准。

发明内容

[0005] 针对现有技术的需求,本发明寻找用于可有效降解芳香族化合物这种有机污染物的降解菌。

[0006] 因此,本发明的第一目的在于提供一种微生物菌EDC-1,所述菌株为霍氏肠杆菌 *Enterobacter hormaechei*,保藏编号为CGMCC NO.25958,2022年10月24日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC)。

[0007] 该菌株分离自山东省新泰市某煤矿煤矸石堆场土壤。菌株EDC-1为革兰氏阴性细菌,在LB固体平板上菌落呈圆形、乳白色,表面隆起、光滑、整齐且不透明。所述霍氏肠杆菌EDC-1在最优生长温度在35-40℃,最适pH值为7-7.5。

[0008] 所述霍氏肠杆菌菌株(*Enterobacter hormaechei*)EDC-1是首次在煤矿区煤矸石堆场中富集并筛选出来。

[0009] 本发明提供所述的微生物菌EDC-1在多环芳烃污染和/或重金属污染水体或土壤修复中的应用。

[0010] 具体地,所述多环芳烃选自萘、菲、蒽和/或芘;所述多环芳烃选自NAP、PHE、ANT、

PYR、BaP、BghiP中的一种或多种；所述重金属是镉、铬、锑等重金属。更优选地，所述复合污染修复菌的菌悬液施于土壤中。

[0011] 优选地，当污染物PHE浓度为50mg/L时，降解效率最高；在液体培养基体系中，重金属 Cd^{2+} 浓度 ≤ 10 mg/L时降解率维持在30%以上；在土壤体系中，重金属 Cd^{2+} 浓度 ≤ 20 mg/L时代谢能力未受明显抑制，可实现40%以上降解率。

[0012] 进一步地，降解情况使用高效液相色谱(HPLC)检测；检测的色谱条件为使用C18分析柱，流动相为超纯水：色谱级甲醇，超纯水：色谱级甲醇的比例为20:80；流速为1mL/min，柱温30℃；检测波长为254nm。进一步地，使用高效液相色谱(HPLC)检测污染物的降解情况。

[0013] 本发明还提供含有所述的微生物菌EDC-1的降解多环芳烃的降解菌剂。优选地，所述微生物菌EDC-1以菌悬液形式存在。

[0014] 其中，所述的菌悬液制备方法如下：

S1. 含多环芳烃母液的固体无机盐培养基涂布后，35-40℃培养，培养约48-72h，待看到有完整的单菌落；

S2. 挑取单菌落接种至TSB液体培养基中，再在35-40℃下，150-180 rpm振荡培养后，制成 $OD_{600}=0.5-1.5$ 的培养液；

S3. 接种至新的发酵培养基内，再在35-40℃下，150-180 rpm振荡发酵48-96h，得到培养液即为降解多环芳烃的降解菌剂。

[0015] 具体实施方式中，所述发酵培养基配方为葡萄糖 10g/L，酵母粉15g/L，蛋白胨10g/L， K_2HPO_4 15g/L，蒸馏水1L。

[0016] 优选地，所述菌悬液中菌体数量不低于 1.0×10^{10} CFU/ml，优选为 1.0×10^{10} CFU/ml至 1.0×10^{12} CFU/ml。

[0017] 本发明也提供一种菌株EDC-1的多环芳烃降解菌剂的制备方法：

(1) 含多环芳烃母液的固体无机盐培养基涂布后，35-40℃培养，培养48-72 h后，待看到有完整(例如直径1-3mm)的单菌落；

(2) 挑取单菌落接种至TSB液体培养基中，再在35-40℃下，150-180 rpm振荡培养后，装入无菌离心管，4000-5000rpm离心10-15min，而后去除上清液，并倒入灭菌后的生理盐水，制成 $OD_{600}=0.5-1.5$ (优选为1)的菌悬液；

(3) 按接种量10%，接种至新的发酵培养基内，再在35-40℃下，150-180 rpm振荡发酵48-96h(例如72h)，得到培养液即为降解多环芳烃的降解菌剂。

[0018] 具体地，所述无机盐培养基为 Na_2HPO_4 2800mg， $(NH_4)_2SO_4$ 500mg， $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.001mg， H_3BO_3 0.03mg， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2mg， $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.003mg， $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.002mg， KH_2PO_4 1000mg， Na_2EDTA 0.5mg， $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02mg， $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01mg， $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.003mg，蒸馏水 1L。

[0019] 所述TSB培养基为胰蛋白胨15.0g，大豆胨5.0g，氯化钠5.0g， K_2HPO_4 2.5g，蒸馏水1.0L，pH7.1-7.5。

[0020] 所述生理盐水为NaCl 9.0g，蒸馏水1L，pH 7.0-7.5。

[0021] 所述发酵培养基为葡萄糖 10.0g，酵母粉15.0g，蛋白胨10g.0， K_2HPO_4 15.0g，蒸馏水1.0L，pH 7.2 \pm 0.2。

[0022] 本发明首次从煤矿厂区的煤矸石堆场土壤样品中富集并筛选出霍氏肠杆菌菌株，

该菌株在中性和弱碱环境下均有较好的代谢能力,并且对典型多环芳烃NAP、PHE、ANT、PYR、BaP、BghiP等都有不错的降解能力,同时对重金属 Cd^{2+} 有较好的耐受能力,在 Cd^{2+} 浓度20mg/kg土壤中,实现45%的降解率,表明菌株EDC-1不仅能修复多环芳烃污染水体,还能用于重金属和多环芳烃复合污染的土壤中,实现不同环境下对多环芳烃的降解。

附图说明

- [0023] 图1为本发明EDC-1平板菌落形态;
图2为基于16S rRNA基因序列同源性的EDC-1系统发育树;
图3为本发明EDC-1对菲的降解动力学曲线;
图4为本发明EDC-1对不同浓度菲的降解能力;
图5为本发明EDC-1在不同温度对菲的降解能力;
图6为本发明EDC-1在不同pH值对菲的降解能力;
图7为本发明EDC-1对不同6种典型多环芳烃的降解能力;
图8为本发明EDC-1在不同 Cd^{2+} 浓度对菲的降解能力。
[0024] 图9为本发明EDC-1在不同 Cd^{2+} 浓度土壤中菲的降解能力。

生物材料保藏信息

[0025] 微生物菌EDC-1,其保藏编号为CGMCC NO.25958,分类命名为霍氏肠杆菌 *Enterobacter hormaechei*,于2022年10月24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),保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

实施方式

[0026] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明。

[0027] 实施例1:EDC-1的分离和鉴定

1、样品来源

从山东煤矿煤矸石堆场污染场地中采集土壤,以高浓度菲为碳源进行长期驯化,通过多次筛选和分离纯化得到高效的菲降解菌。

[0028] 2、培养基

2.1无机盐培养基

无机盐培养基用于样品微生物培养,纯菌以及菌剂条件下多环芳烃降解实验。该培养基配方见表1。配制方法为将各成分加入到蒸馏水中,搅拌混匀,调节pH至7.2-7.5,灭菌制得。

[0029] 表1无机盐培养基配方

试剂名称	浓度(mg/L)
Na_2HPO_4	2800
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.001
H_3BO_3	0.03
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.003
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002
KH_2PO_4	1000
Na_2EDTA	0.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.003

[0030] 2.2营养培养基

本实验所用的液体营养培养基种类及成分见表2和3。相应固体培养基为原有培养基配方添加12-15g/L的琼脂粉。若菌株的培养条件无特别说明,培养基pH均调节至7.1-7.5。其配制方法是将各成分加入到水中,搅拌混匀,高温湿热灭菌121℃15分钟灭菌制得。

[0031] 表2 TSB培养基成分

试剂名称	浓度(g/L)
胰蛋白胨	15
大豆胨	5
K_2HPO_4	2.5
NaCl	5

[0032] 表3 发酵培养基成分

试剂名称	浓度(g/L)
葡萄糖	10
酵母粉	15
蛋白胨	10
K ₂ HPO ₄	15

[0033] 3、菌株的驯化、筛选和分离

将采集的污染土壤加入到灭菌后的无机盐培养基中,两者质量比为1:10,在150-180rpm、35-40℃下培养5d。而后将其依次接种于浓度为10mg·L⁻¹、50mg·L⁻¹、100mg·L⁻¹菲的无机盐培养基中,接种比例为10%,每次接种后放置于35℃培养箱中避光震荡培养。

[0034] 菌株驯化是以菲为无机盐培养基中的唯一碳源,5d为一个驯化周期。周期结束后取10%的接种量转接到相对更高浓度体系的新鲜培养基中并重复上述过程三次。

[0035] 将上述获得的培养样品稀释后进行涂布分离,样品用含有100mg/L菲的无机盐培养基分离。将涂布好的样品置于35℃下避光培养,培养2-4d,根据菌落的形态大小、颜色、透明度等特征挑取不相同的若干单菌落,并在营养培养基平板上进行划线纯化,培养。挑取纯化后的单菌落进行保存。

[0036] 4、菌株鉴定

根据菌株的革兰氏染色反应结果、形态特性对菌株进行初步鉴定。菌株EDC-1的平板菌落形态如图1所示。其主要生物学特性:在LB固体平板上菌落呈圆形、乳白色,表面隆起、光滑、整齐且不透明,革兰氏阴性,过氧化氢酶反应阳性、氧化酶反应阴性、淀粉酶水解阴性。

[0037] 菌株16S rDNA鉴定:取单菌落裂解为模板进行PCR,引物选择27F primer: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 1492R: TACGGYTACCTGTTACGACTT。PCR反应条件为:94℃预变5min,94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸1min30s,24次循环,最后72℃延伸10min。其16S rRNA基因序列如SEQ ID NO: 1。将序列与NCBI库进行比对,显示菌株EDC-1与霍氏肠杆菌的同源性达99.15%,确定该菌株为肠杆菌属。构建系统发育树如图2所示。

[0038] 实施例2:EDC-1多环芳烃降解实验

1、菌剂的制备

(1)挑取平板中纯化的单菌落接种至TSB液体培养基中,在35℃下,180 rpm振荡培养后,制成OD₆₀₀=1的菌悬液;

(2)菌悬液按接种量10%,接种至新的发酵培养基内,在35℃下,180 rpm振荡发酵72h,检测发酵液的浓度为10⁹⁻¹¹ CFU/ml,所得发酵液即为EDC-1液体菌剂。

[0039] 2、菌剂降解PHE

取2mL制得的EDC-1液体菌剂接种到50mL含有50mg/L菲的无机盐培养基中,以菲为唯一碳源,将培养基放置于35℃的恒温摇床中进行培养,对照组不接种菌剂,共设置3组重复实验,每天测定培养基中的PHE浓度和OD₆₀₀。

[0040] 将20mL色谱纯正己烷加入培养基的锥形瓶中,密封后200rpm震荡30min,而后通过

分液漏斗进行液液萃取,将正己烷分离收集,重复两次。将收集到的所有正己烷萃取液通过氮吹仪进行氮吹浓缩,定容至10mL后,取1mL氮吹至近干后用色谱纯甲醇定容至1mL过0.22 μ m滤膜,装入棕色液相小瓶,采用高效液相色谱仪的方法(HJ 478-2009)测定多环芳烃浓度。 OD_{600} 的测定是取1mL溶液在紫外分光光度计调至600nm时,以初始含菲无机盐培养基进行调零,而后测定样品。菌剂添加后菲的降解动力学曲线和生长曲线如图3所示,培养基在3d时菌密度达到最高,7d后降解至25mg/L以下。

[0041] 3、液体培养基中不同条件下PHE降解

取2mL制得的EDC-1液体菌剂分别接种到50mL含有25mg/L、50mg/L、100mg/L和150mg/L菲的无机盐培养基中,将培养基放置于35 $^{\circ}$ C的恒温摇床中180rpm进行培养,7天后测定培养基中的PHE浓度,重复测定3次。不同PHE浓度下的降解率如图4所示,EDC-1菌剂在PHE浓度为50mg/L时降解率最高,达51%。

[0042] 取2mL制得的EDC-1液体菌剂接种到50mL含有50mg/L菲的无机盐培养基中,将培养基分别放置于20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C和40 $^{\circ}$ C的恒温摇床中180rpm进行培养,7天后测定培养基中的PHE浓度,重复测定3次。不同温度下PHE的降解率如图5所示,35-40 $^{\circ}$ C时菌剂的降解效果较好,降解率维持在43%-51%。而后进一步对菌剂在36 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、38 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C下进行摇床培养,7d后37 $^{\circ}$ C时降解效果最好,达到54%。

[0043] 将50mL含有50mg/L菲的无机盐培养基pH值分别调至为5、6、7、8、9,取2mL制得的EDC-1液体菌剂接种到这些培养基中,放置于35 $^{\circ}$ C的恒温摇床中180rpm进行培养,7天后测定培养基中的PHE浓度,重复测定3次。不同pH值条件下菲的降解率如图6所示,当培养基pH值在7-8之间,菌剂降解率最高,保持在33%-51%。

[0044] 配制50mL含有NAP 50mg/L、PHE 50mg/L、ANT 50mg/L、PYR 20mg/L、BaP 20mg/L、BghiP 20mg/L的无机盐培养基,取2mLEDC-1菌剂接种至培养基放置于35 $^{\circ}$ C的恒温摇床中180rpm进行培养,7天后测定培养基中的多环芳烃浓度,重复测定3次。EDC-1对六种多环芳烃的降解率如图7所示,六种多环芳烃的降解率分别为NAP 86.7%、PHE 50.6%、ANT 35.7%、PYR 37.1%、BaP45.9%、BghiP53.6%。

[0045] 配制50mL含有50mg/L菲的无机盐培养基,在每个培养基内分别加入0.8mL、1.6mL、3.2mL、4.8mL浓度为10g/L的CdCl₂溶液,将其制成Cd²⁺浓度为5mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L,而后将2mLEDC-1菌剂加入到各个培养基中,放置于35 $^{\circ}$ C的恒温摇床中180rpm进行培养,7天后测定培养基中的PHE浓度,重复测定3次。EDC-1在不同Cd²⁺浓度下的降解率如图8所示,在Cd²⁺浓度 \leq 5mg/L时,菌剂的多环芳烃降解效率略有提升,降解率最高达到56.7%,当Cd²⁺浓度达到40mg/L时,PHE降解率仍能维持在20%以上。

[0046] 4、污染土壤中不同条件下PHE的降解

实验设置:土壤经过挑选后过10目筛后混合均匀。将20mgPHE溶解于10mL丙酮后加入到100g土壤中制备200mg/kg的PHE污染土壤亚样,将1.6mL浓度为10g/L的CdCl₂溶液加入到10g土壤中制备1g/kg的Cd²⁺污染土壤亚样。在烧杯中加入86-90g土壤、10gPHE污染土壤亚样和1-4gCd²⁺污染土壤亚样,混合均匀制备成PHE浓度20mg/kg、Cd²⁺浓度为10mg/kg、20mg/kg、40mg/kg的污染土壤。取5mLEDC-1菌剂加入到100g污染土壤中混合均匀,使含水率保持在20%作用,并将其放置于恒温培养箱中35 $^{\circ}$ C避光培养20天,间隔10天取一次土壤样品测定其PHE的浓度。

[0047] 土壤中PHE浓度的测定:参照中华人民共和国国家环境保护标准《土壤和沉积物多环芳烃的测定高效液相色谱法》提取土壤中的PAHs。称取5g土壤样品进行冷冻干燥,研磨过60目筛后加入15mL丙酮-正己烷(1:1)混合溶液,密封避光浸泡8小时后超声处理30min,而后离心倒出溶液,重复提取3次。将提取液混合后氮吹浓缩至约1mL,利用硅胶镁固相萃取柱净化。将净化后的洗脱液再次氮吹浓缩至近干,加入约3mL甲醇,重复三次,最终定容至1mL。利用高效液相色谱仪进行测定,进样量为10 μ L,柱温35 $^{\circ}$ C,流动相选择A甲醇: B水(80:20),检测波长选择252nm。

[0048] 不同Cd²⁺浓度土壤中菲的降解率如图9所示,在土壤Cd²⁺浓度 \leq 20mg/kg时,菌剂活性未受到明显抑制,土壤中PHE的降解率维持在45-63%;当土壤Cd²⁺浓度达到40mg/kg时,代谢活性受到抑制,降解率为29%左右。

[0049] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围。



图 1

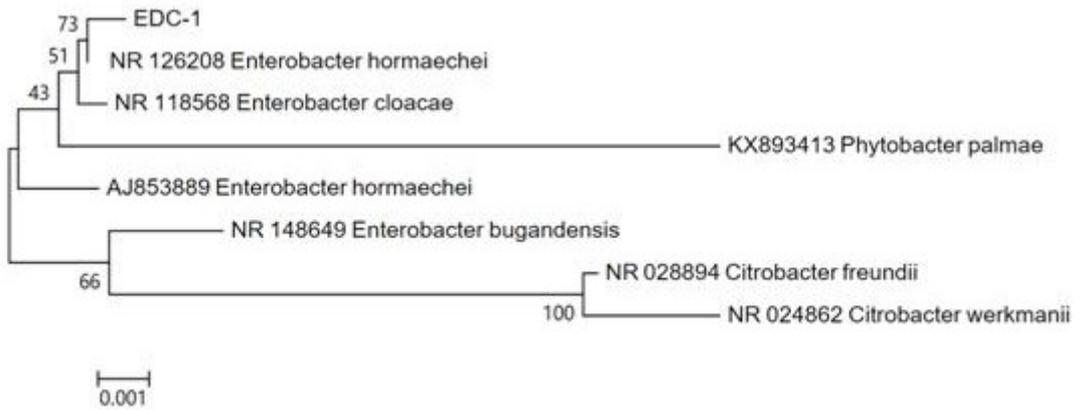


图 2

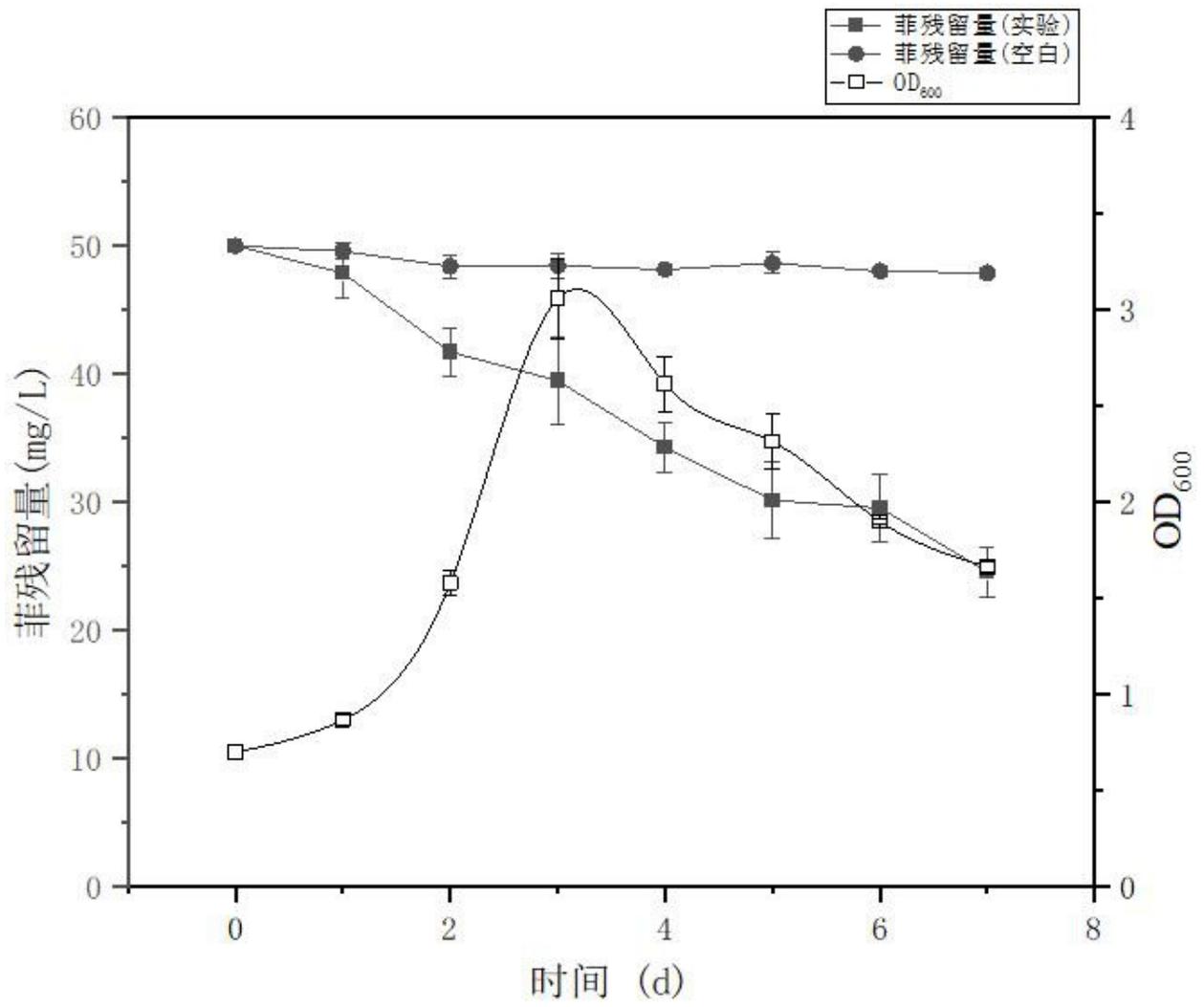


图 3

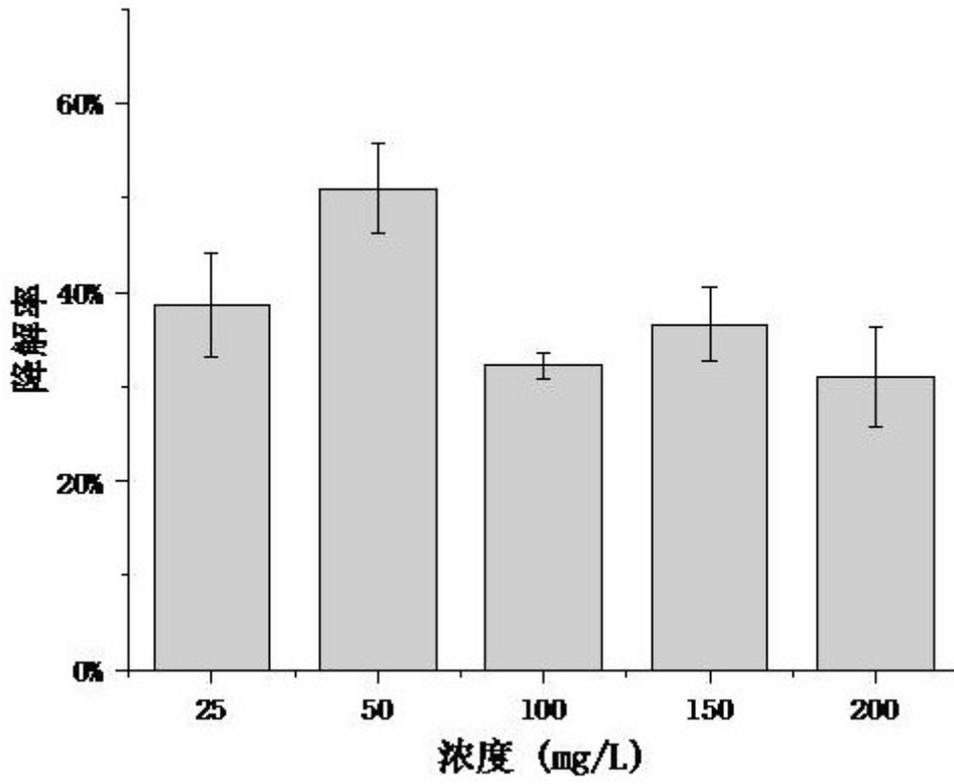


图 4

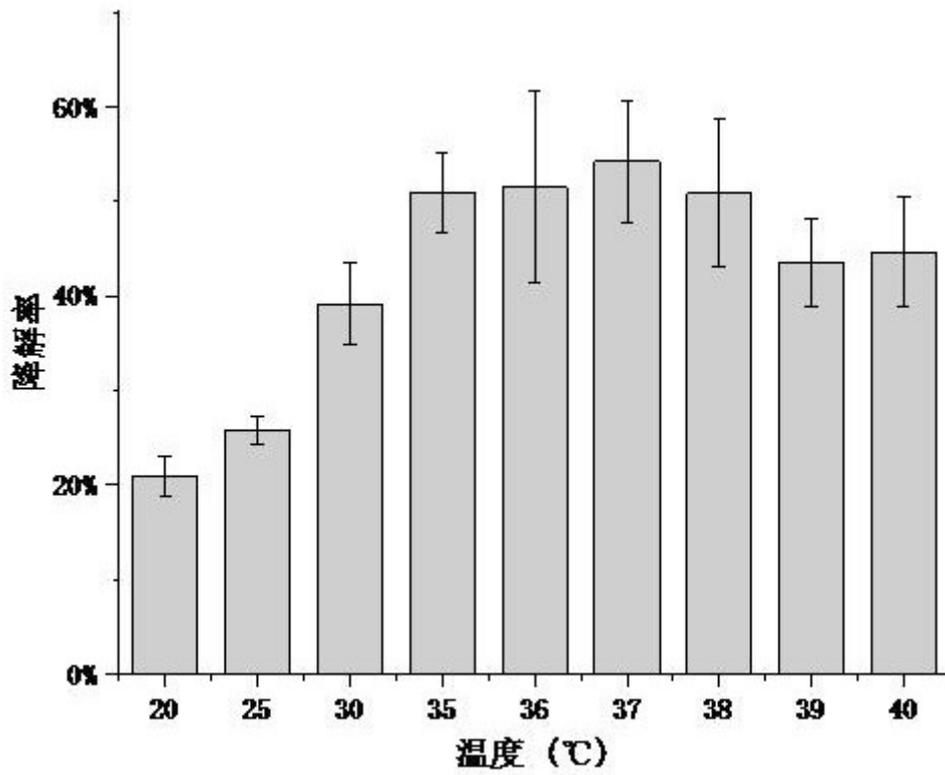


图 5

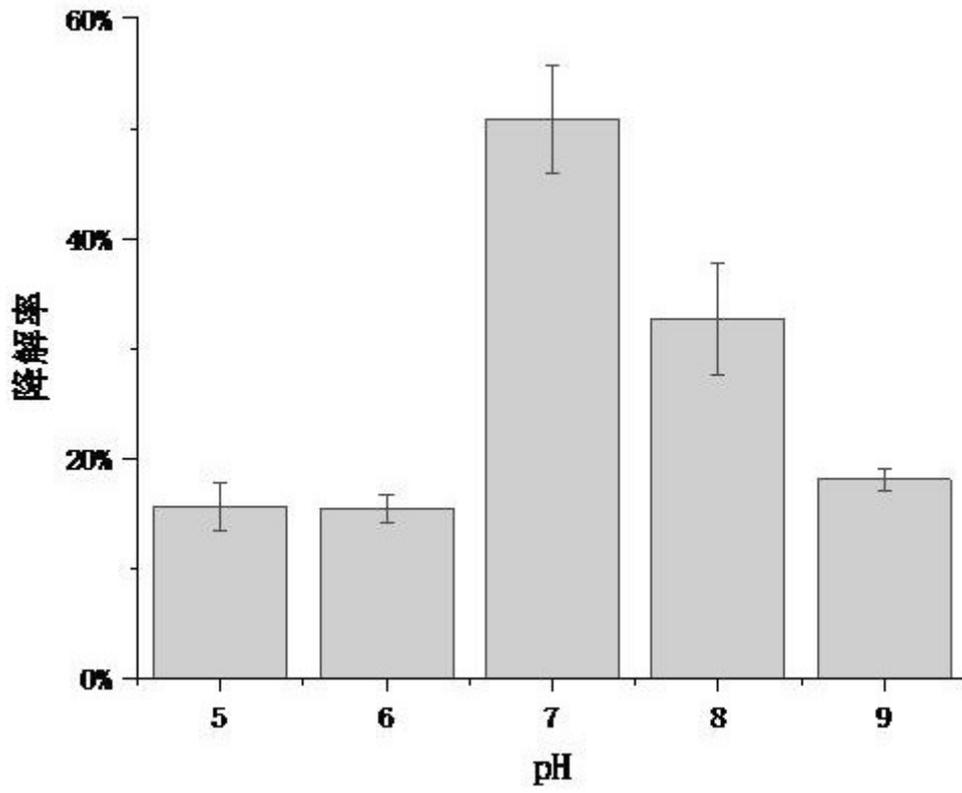


图 6

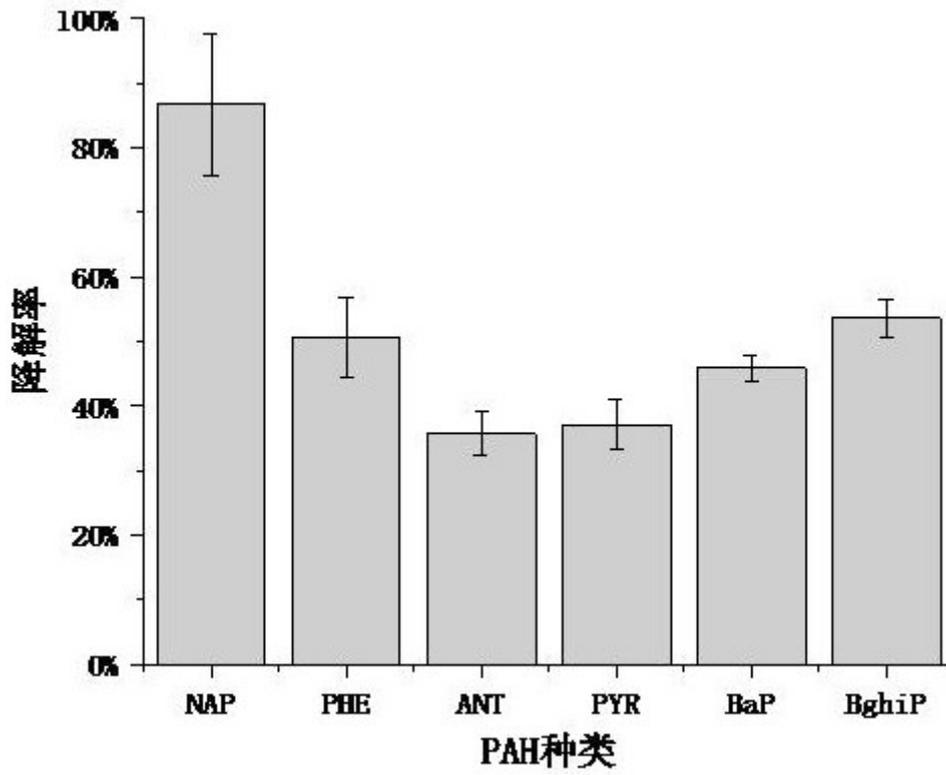


图 7

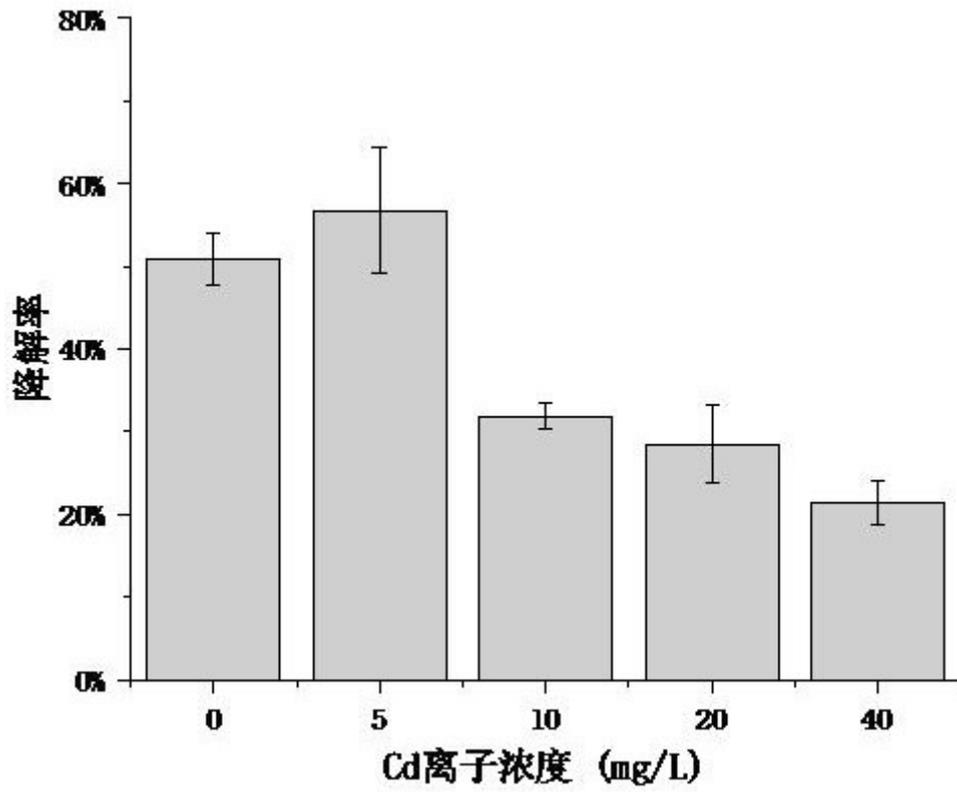


图 8

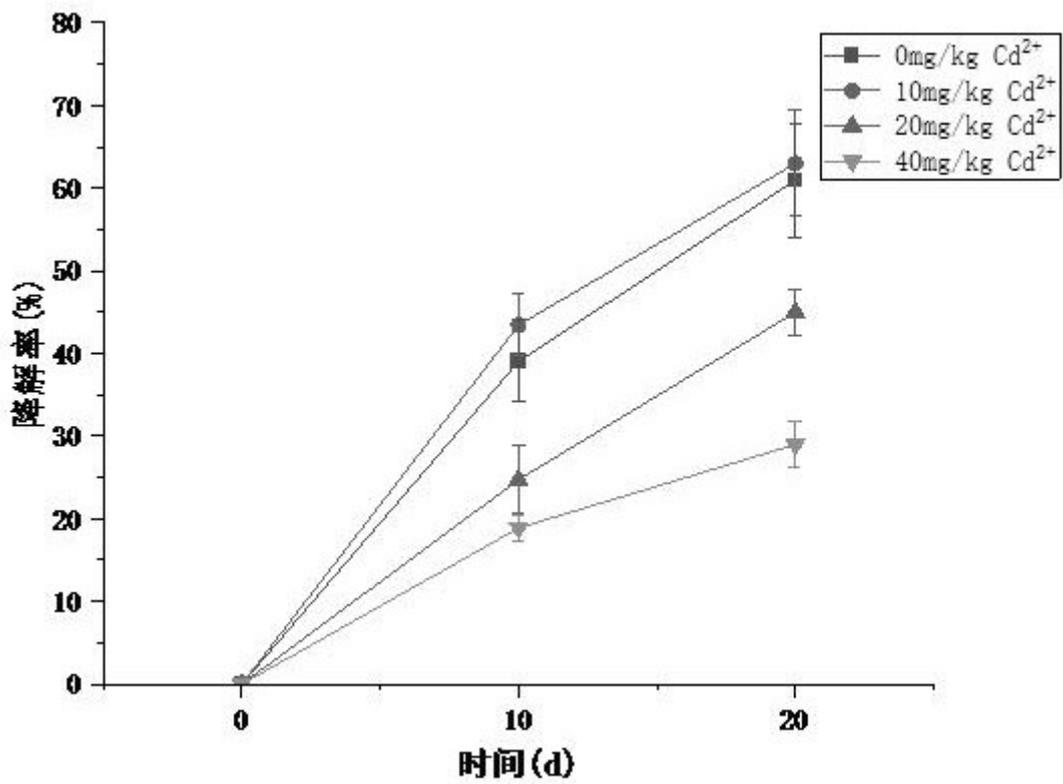


图 9