



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106635867 B

(45)授权公告日 2019.07.30

(21)申请号 201610838210.7

(22)申请日 2016.09.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106635867 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(83)生物保藏信息
GDMCC No.60055 2016.07.08

(73)专利权人 山西宁邦生物科技有限公司
地址 044000 山西省运城市盐湖工业园区
纵7路路口

(72)发明人 李波 周顺贵

(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
C02F 3/34(2006.01)
C12R 1/07(2006.01)

(56)对比文件

候晓翠.青藏高原冻土区微生物的研究及菌株D40P~T新种分类鉴定.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2015,(第06期),第D043-6页.

许姗姗.黄渤海放线菌多样性的研究及一株南极放线菌新种的分类鉴定.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2015,(第01期),第D052-23页.

Watanabe M等.Proposal of *Effusibacillus lacus* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Alicyclobacillus pohliae* as *Effusibacillus pohliae* comb. nov. and *Alicyclobacillus consociatus* as *Effusibacillus consociatus* comb. nov..《Int J Syst Evol Microbiol》.2014,第64卷第2770-2774页.

审查员 润顺琪

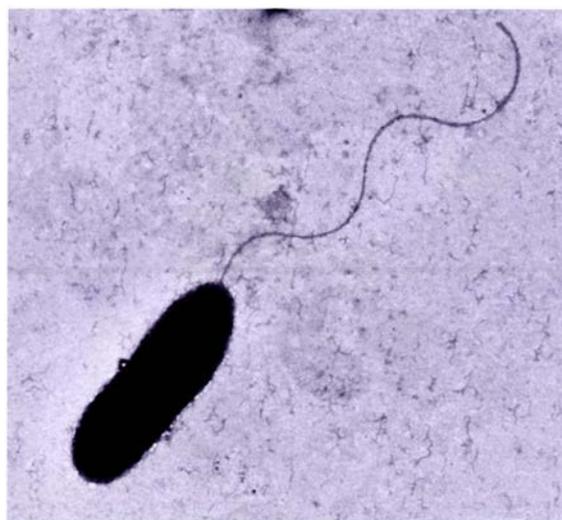
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

嗜盐芽孢杆菌及其应用

(57)摘要

一种嗜盐芽孢杆菌(*B.lacus* ZQ1),保藏号为GDMCC No.60055;本发明还提供了嗜盐芽孢杆菌微生物制剂及其制备方法:嗜盐芽孢杆菌及其微生物制剂,可以广泛地应用于高盐废水的水质净化;与现有技术相比具有如下优点与积极效果:可以在25%以下的高盐浓度中生长与增殖;使用本嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,不再需要通过稀释、反渗透、离子交换、或者电渗透等方法降低高盐废水的盐度,可以直接应用于高盐废水净化,具有操作简单和成本低廉等优点。



1. 一种嗜盐芽孢杆菌 (*Bacillus lacus*) ZQ1, 其菌株保藏号为GDMCC No.60055。
2. 一种嗜盐芽孢杆菌微生物制剂, 其特征在于: 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂是用权利要求1所述的嗜盐芽孢杆菌 (*Bacillus lacus*) ZQ1通过发酵制备的。
3. 一种嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的制备方法: 其特征在于: 权利要求2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的发酵步骤如下:
 - (1) 摇瓶培养: 从 (*Bacillus lacus*) ZQ1斜面上挑取菌苔一环接入装有100-500mL的LB液体培养基的锥形瓶中, 30-37°C、150-240rpm/min摇床震荡发酵培养12-36h; 所述的LB液体培养基配方为: 酵母浸膏5g; 胰蛋白胨10g; NaCl 200g; 水1000mL; pH 7.2;
 - (2) 种子罐发酵: 将步骤(1)培养好的 (*Bacillus lacus*) ZQ1发酵液按2%-5%的接种量接入10L发酵培养基的发酵罐中, 30-37°C、150-200rpm/min发酵培养12-36h; 所用发酵培养基配方为上述LB液体培养基;
 - (3) 发酵罐发酵: 将步骤(2)培养好的 (*Bacillus lacus*) ZQ1发酵液按2%-10%接种量接入100L发酵培养基的发酵罐中, 30-37°C、150-200rpm/min发酵培养24-72h; 所用发酵培养基配方为上述LB液体培养基;
 - (4) 菌剂制备: 将步骤(3)发酵液加入固体辅料中, 固体辅料与发酵液的质量比为1-3:1-5, 搅拌均匀, 20-37°C烘干, 粉碎, 经40目过筛, 包装装袋; 所述固体辅料为活性碳30-60%、硅藻土40-70%; 制得嗜盐芽孢杆菌微生物制剂, 总菌数达到5亿/克以上。
4. 权利要求2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂在高盐废水净化方面的应用。
5. 权利要求2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂在城市污水处理中的应用。

嗜盐芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境微生物领域,具体涉及一种嗜盐芽孢杆菌及其应用。

背景技术

[0002] 随着经济与社会发展,人类活动产生的污染物,使一些天然盐环境遭受不同程度的污染,或者使环境受到污染物与高盐的双重污染。例如,由于事故、泄露和排放等,每年数亿加仑石油及其工业废水(盐度 $>3.5\%W/V$)污染江口、海滩和炼油厂附近等盐度较高的地区。城市生活污水、生产杀虫剂和除草剂的制药厂等释放的工业废水,也含较高浓度的盐和有毒的污染物。利用微生物降解环境中的污染物具有成本低、效率高、以及不易造成二次污染等优点,一直受到广泛关注。但是,高盐条件下微生物既要忍受长期的高渗透压胁迫,又要承受短期的渗透冲击。当盐度 $>3\%$ 时,非嗜盐微生物的代谢会受到抑制,使其生物修复效率明显降低,甚至丧失修复。

[0003] 嗜盐微生物属于极端微生物范畴,能够在高盐环境中栖息繁殖。因此,利用嗜盐微生物修复污染的天然盐环境或处理排放的高盐度有机污染物废水,不需要通过稀释、反渗透、离子交换、或者电渗透等方法降低待处理样品的盐度,具有操作简单和成本低廉等诸多优点。如Kubo构建了由葡萄球菌及腊质芽孢杆菌组成的COD微生物处理系统,在15%条件下能削减COD 70-90%。Kulichevskaya等从石油盐矿中分离得到1株属于盐杆菌属(Halobacterium)的极端嗜盐古菌,在30%NaCl条件下,该菌仍然能够降解C10~C30直链烷烃。因此,开发嗜盐微生物种质资源对于高盐废水及环境修复等方面具有重要的理论研究和广阔的应用前景。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于弥补现有嗜盐微生物资源的不足,而提供一株新的嗜盐芽孢杆菌。本发明的另一个目的在于提供一种利用嗜盐芽孢杆菌制备的微生物制剂及其在高盐废水净化方面的应用。

[0005] 本发明所采取的技术方案是:

[0006] 一、本发明嗜盐芽孢杆菌(Bacillus lacus ZQ1),简称B.lacus ZQ1,系从山西省运城市的盐湖底泥中分离筛选的芽孢杆菌,其菌株2016年7月8日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏号为GDMCC No.60055。

[0007] 本发明的发明内容如下:

[0008] 本发明菌株从山西省运城市的盐湖底泥中进行分离、纯化所得,其分离纯化方法如下:

[0009] (1)取5.0g山西省运城市的盐湖底泥接种于pH值为7.2的富集分离培养基中,30℃、200rpm/min震荡培养;当培养3d后,以10%的接种量将培养液转接至另一新鲜的富集分离培养基,30℃、200rpm/min震荡培养。如此富集培养四代。

[0010] (2)将第四代反应后的培养液采用稀释平板法稀释到 10^{-5} - 10^{-6} ,将稀释后的培养

液0.1mL均匀涂布于琼脂固体培养基上,置于30℃培养48h,挑取单菌落进行分离与纯化。

[0011] 所述富集分离培养基组成是:蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl为200g/L,pH值为7.2。所述固体分离培养基组成是:蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl为200g/L,琼脂粉20g/L,pH值为7.2。

[0012] 该菌株具有下述性质:

[0013] *B.lacus* ZQ1菌株为革兰氏阳性菌,杆状,菌体大小为1.5-2.0 μm ×0.6-0.9 μm ,极生鞭毛,具运动性。在琼脂固体培养基平板上好氧培养3d后,菌落圆形,乳白色,中央突起,不透明,菌落直径为2-3mm。在盐浓度范围为0-25%条件下能生长与增殖。

[0014] 二、本发明还提供了一种嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,嗜盐芽孢杆菌微生物制剂是用上述的嗜盐芽孢杆菌(*B.lacus* ZQ1)通过发酵制备的。

[0015] 三、本发明还提供了一种嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的制备方法:上述嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的发酵步骤如下:

[0016] (1) 摇瓶培养:从*B.lacus* ZQ1斜面上挑取菌苔一环接入装有100-500mL的LB液体培养基的锥形瓶中,30-37℃、150-240rpm/min摇床震荡发酵培养12-36h;所述的LB液体培养基配方为:酵母浸膏5g;胰蛋白胨10g;NaCl 200g;水1000mL;pH 7.2;

[0017] (2) 种子罐发酵:将步骤(1)培养好的*B.lacus* ZQ1发酵液按2%-5%的接种量接入10L发酵培养基的发酵罐中,30-37℃、150-200rpm/min发酵培养12-36h;所用发酵培养基配方为上述LB液体培养基;

[0018] (3) 发酵罐发酵:将步骤(2)培养好的*B.lacus* ZQ1发酵液按2%-10%接种量接入10L发酵培养基的发酵罐中,30-37℃、150-200rpm/min发酵培养24-72h;所用发酵培养基配方为上述LB液体培养基;

[0019] (4) 菌剂制备:将步骤(3)发酵液加入固体辅料中,固体辅料与发酵液的质量比为1-3:1-5,搅拌均匀,20-37℃烘干,粉碎,经40目过筛,包装装袋;所述固体辅料为活性碳30-60%、硅藻土40-70%;制得嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,总菌数达到5亿/克以上。

[0020] 四、嗜盐芽孢杆菌微生物制剂在高盐废水净化方面的应用:

[0021] 在高盐废水中按2-15%比例接种嗜盐芽孢杆菌微生物制,经序批式活性污泥法处理后,测定出水中COD及总氮含量。以常规污水处理工艺、不添加嗜盐微生物制剂作为对照。取样测定COD、总氮浓度。

[0022] 本发明提供了一种嗜盐芽孢杆菌及其微生物制剂,可以广泛地应用于高盐废水的水质净化。本发明与现有技术相比具有如下优点与积极效果:可以在25%以下的高盐浓度中生长与增殖。使用本嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,不需要通过稀释、反渗透、离子交换、或者电渗透等方法降低高盐废水的盐度,可以直接应用于高盐废水净化,具有操作简单和成本低廉等优点。

附图说明

[0023] 图1本发明*B.lacus* ZQ1在20000倍下的扫描电镜照片。

[0024] 图2本发明*B.lacus*ZQ1的系统发育树。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0026] 实施例1

[0027] 嗜盐芽孢杆菌(*B.lacus* ZQ1)的培养、分离、筛选、鉴定及保存:

[0028] 1.1菌株的培养、分离

[0029] 本发明的芽孢杆菌*B.lacus* ZQ1是通过对山西运城盐湖底泥富集培养进行分离纯化得到的。

[0030] 具体分离纯化方法包括以下步骤:

[0031] (1)取5.0g山西运城盐湖底泥接种于pH值为7.2的富集集分离培养基中,30℃、200rpm/min震荡培养;当培养3d后,以10%的接种量将培养液转接至另一新鲜的富集分离培养基,30℃、200rpm/min震荡培养。如此富集培养四代。

[0032] (2)将第四代反应后的培养液采用稀释平板法稀释到 10^{-5} - 10^{-6} ,将稀释后的培养液0.1mL均匀涂布于琼脂固体培养基上,置于30℃培养48h,挑取单菌落进行分离与纯化。所述富集集分离培养基组成是:蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl为200g/L,pH值为7.2。所述固体分离培养基组成是:蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,NaCl为200g/L,琼脂粉20g/L,pH值为7.2。

[0033] 1.2菌体形态特性

[0034] 采用常规的细菌电子显微镜观察,该菌株为革兰氏阳性菌,杆状,菌体大小为1.5-2.0 μm ×0.6-0.9 μm ,极生鞭毛,具运动性。

[0035] 1.3菌落形态特性

[0036] 在琼脂固体培养基平板上好氧培养3d后,菌落圆形,乳白色,中央突起,不透明,菌落直径为2-3mm。

[0037] 1.4生理生化特征

[0038] 对菌株*B.lacus* ZQ1进行生理生化特征的鉴定,其结果见表1。

[0039] 表1. 菌株生理生化鉴定结果

[0040]

特性	<i>B. lacus</i> ZQ1	<i>B. qingdaonensis</i> CGMCC 1.6134 ^T	<i>B. halochares</i> DSM 21373	<i>B. salarius</i> DSM 16461	<i>B. iranensis</i> DSM 23995
菌体形状	棒状	棒状	棒状	棒状	棒状
菌落形态	乳白色	乳白色	奶油色	奶油色	奶油色
内生孢子	+	-	+	-	+
内生孢子位置		-	端生	-	中央端生, 椭圆
革兰氏反应	+	+	+	+	+
培养最佳温度(℃)	30	37	37	30	35
盐度(NaCl, %)	0-25%	2.5-20	6-23	3-20	2.5-15
最佳盐度(NaCl, %)	1	12	15	12-15	5-7.5
厌氧	-	-	-	+	-
氧化酶反应	-	-	+	+	+
接触酶反应		+	+	+	+
七叶甙水解	+	ND	+	+	+
明胶水解	+	-	-	ND	ND
硝酸盐还原	+	-	-	-	+
己二酸	+	-	-	-	-
水杨酸	-	+	+	-	-
L-海藻糖	+	-	+	-	-
L-阿拉伯糖	+	-	-	+	+
D-甘露糖	+	-	-	+	-
D-葡萄糖产酸	+	-	+	+	-
D-甘露醇	+	-	-	+	-
DNA G+C* (mol%)	52.1	48	47.2	43	42.4

[0041] (表中:+表示为阳性,W表示为弱阳性,-表示为阴性)

[0042] 由鉴定结果(表1)可知:菌株*B. lacus* ZQ1好氧,能在0-25%NaCl的培养液中生长,而最适NaCl为1%;生长温度为25-45℃,最适生长温度为37℃;pH值为6.5-9.5,最适pH为7.5;接触酶阳性,氧化酶阴性;具有七叶甙水解活性、明胶水解活性。菌株*B. lacus* ZQ1能够利用鼠李糖、己二酸、L-海藻糖、D-甘露糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖、D-甘露醇作为碳源;G+C含量为52.1%。

[0043] 1.5分子生物学特征

[0044] 采用SDS-蛋白酶K,氯仿-异戊醇(体积比24:1)抽提,0.6体积异丙醇沉淀的方法提取细菌总DNA。采用16S rRNA通用引物F27和R1492扩增细菌的16S rRNA,将PCR扩增产物回收后进行测序。再将得到的碱基序列在GenBank等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索(Blast search),找出该菌株与数据库中同源性最高的模式菌株或保藏于ATCC或DSM等国际菌种保藏中心的菌株。*B. lacus* ZQ1的系统发育树见图2。

[0045] 根据比对结果发现,该菌株与芽孢杆菌*B. Qingdaonensis* DSM 16318的16S rRNA序列具最高同源性,相似度为97.1%;分子杂交结果显示,该菌株与芽孢杆菌*B. Qingdaonensis* DSM16318DNA-DNA相关性为45.12%。

[0046] 综上所述,16S rRNA同源序列比对可以确定本发明菌株*B. lacus* ZQ1属于芽孢杆菌属。但是由于本发明菌株*B. lacus* ZQ1具有许多与现有芽孢杆菌显著不同的表型特征,加上DNA-DNA杂交和分子生物学分析结果表明本发明菌株不属于芽孢杆菌属的已有任何种。因此,根据现有数据,可以判定本发明菌株为芽孢杆菌属的一个新种。分类学名称:芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。本发明将其称为*Bacillus lacus* ZQ1,简写为*B. lacus* ZQ1,于2016年7月8日在广东省微生物菌种保藏中心保藏(地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼),编号为:GDMCC No.60055。

[0047] 实施例2

[0048] 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,嗜盐芽孢杆菌微生物制剂是用实施例1所述的嗜盐芽孢杆菌(*B. lacus* ZQ1)通过发酵制备的。

[0049] 实施例3

[0050] 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的制备方法一:实施例2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的发酵步骤如下:

[0051] (1) 摇瓶培养:从*B. lacus* ZQ1斜面上挑取菌苔一环接入装有LB液体培养基的锥形瓶中,37℃、200rpm/min摇床震荡培养24h。所述的LB液体培养基配方为:酵母浸膏5g;胰蛋白胨10g;NaCl 200g;水1000mL;pH 7.2。

[0052] (2) 种子罐发酵:将上述培养好的*B. lacus* ZQ1发酵液接入10L发酵罐中,37℃、200rpm/min发酵培养36h;所用发酵培养基配方为上述液体培养基。

[0053] (3) 发酵罐发酵:将上述培养好的*B. lacus* ZQ1发酵液接入100L发酵罐中,37℃、200rpm/min发酵培养48h;所用发酵培养基配方为上述液体培养基。

[0054] (4) 菌剂制备:将上述发酵液加入固体辅料中,固体辅料与发酵液的质量比为1.5:1,搅拌均匀,28℃烘干,粉碎,经40目过筛,包装装袋。固体辅料含有活性碳60%,硅藻土40%。制得的脱氮微生物菌剂成品经活菌计数,总菌数达到5亿/克以上。

[0055] 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的制备方法二:实施例2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂的发酵步骤如下:

[0056] 具体方法为:

[0057] (1) 摇瓶培养:从*B. lacus* ZQ1斜面上挑取菌苔一环接入装有LB液体培养基的锥形瓶中,30℃、200rpm/min摇床震荡培养24h。所述的LB液体培养基配方为:酵母浸膏5g;胰蛋白胨10g;NaCl 150g;水1000mL;pH 7.2。

[0058] (2) 种子罐发酵:将上述培养好的*B. lacus* ZQ1发酵液接入10L发酵罐中,30℃、200rpm/min发酵培养24h;所用发酵培养基配方为上述液体培养基。

[0059] (3) 发酵罐发酵:将上述培养好的*B. lacus* ZQ1发酵液接入100L发酵罐中,30℃、200rpm/min发酵培养48h;所用发酵培养基配方为上述液体培养基。

[0060] (4) 菌剂制备:将上述发酵液加入固体辅料中,固体辅料与发酵液的质量比为2:1,搅拌均匀,28℃烘干,粉碎,经40目过筛,包装装袋。固体辅料含有活性碳40%,硅藻土60%。制得的脱氮微生物菌剂成品经活菌计数,总菌数达到5亿/克以上。

[0061] 实施例4

[0062] 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂在高盐废水净化方面的应用:

[0063] 在城市生活污水工艺中,按2%比例投入实施例2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂,经序批式活性污泥法处理后,测定出水中COD含量。以常规污水处理工艺、不添加嗜盐微生物制剂作为对照。结果表明,在处理前,添加嗜盐微生物制剂后,7.5%盐浓度的城市生活污水COD平均去除率为87.5%,总氮去除率为89.8%,而对照COD去除率为78%,总氮去除率为82.4%,说明嗜盐微生物制剂能够促进高盐废水中COD及总氮去除。

[0064] 实施例5

[0065] 嗜盐芽孢杆菌微生物制剂在城市污水处理中的应用:

[0066] 选用经活性污泥厌氧与爆气处理后的城市生活污水,其盐浓度调节为15%,处理前COD为156mg/L,氨氮为55mg/L,总氮85mg/L。试验使用二级沉降池的有效容积为50L,温度25℃,投入实施例2所述的嗜盐芽孢杆菌微生物制剂3.0g,连续运行6h,测定COD、氨氮、总氮浓度。以不添加微生物制剂的处理作为对照。结果见表明,添加实施例4的微生物菌剂后,COD平均去除率为21.5%,氨氮去除率为70.8%,总氮去除率为60%,而对照处理COD平均去除率仅为6.8%,氨氮去除率为12.5%,总氮去除率为15.2%。结果表明嗜盐微生物制剂能够加快高盐浓度废水的净化。

[0067] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。



图1

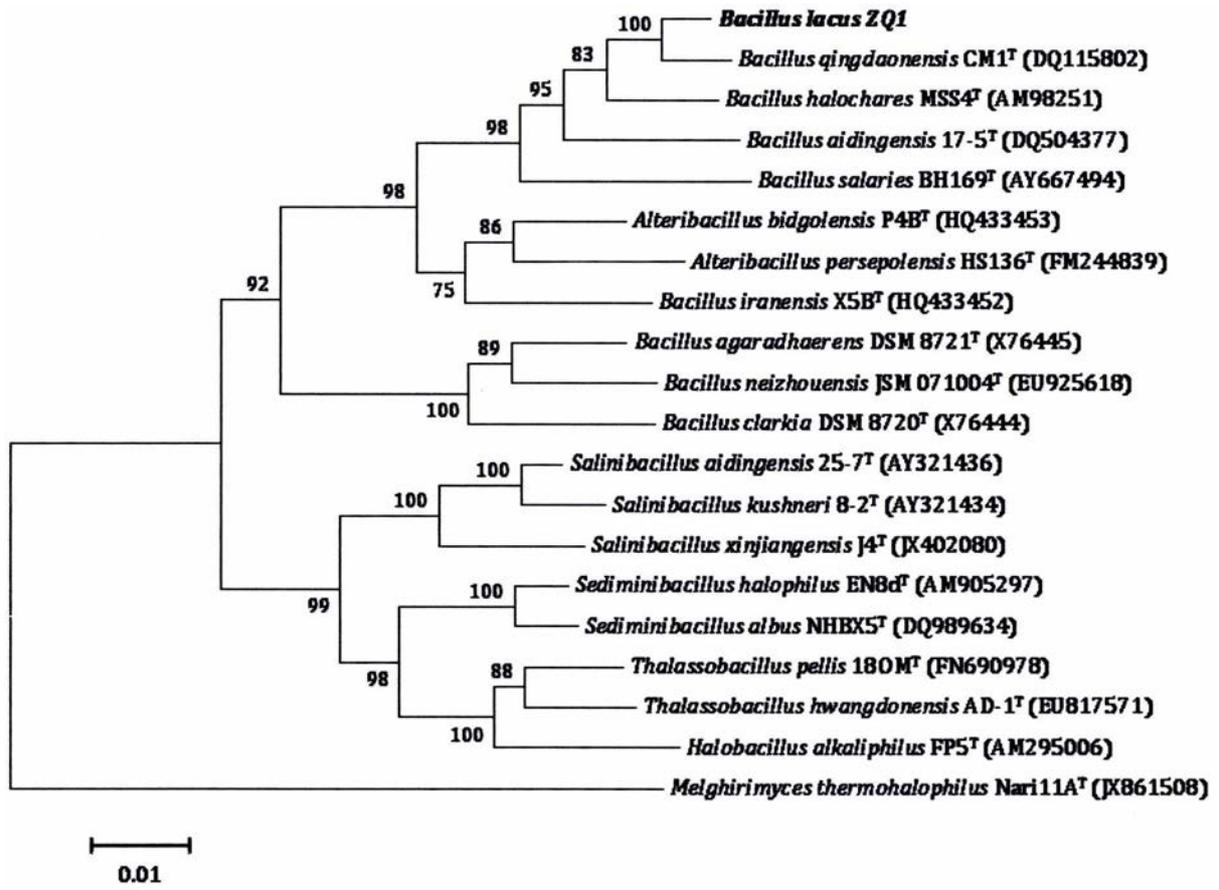


图2