



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105087429 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510421488. X

(22) 申请日 2015. 07. 17

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M2015415 2015. 06. 29

(71) 申请人 武汉科技大学

地址 430081 湖北省武汉市青山区和平大道  
建设一路 947 号

(72) 发明人 颜家保 陈佩 武文丽

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

C12R 1/38(2006. 01)

C02F 101/34(2006. 01)

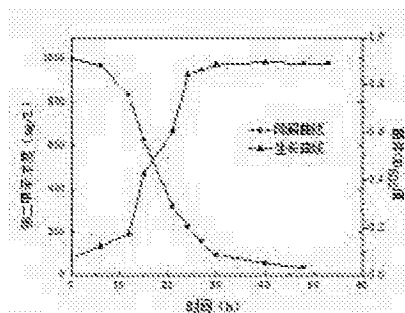
权利要求书1页 说明书4页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一株邻二甲苯降解菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株邻二甲苯降解菌及其应用。本发明所提供的邻二甲苯降解菌 OX5 属于假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)，保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏日期为 2015 年 6 月 29 日，保藏编号为 CCTCC NO:M2015415。该菌为革兰氏阴性菌，菌落呈圆形，微凸，菌落四周为乳白色，中间为黄色，表面湿润光滑。该菌能利用邻二甲苯作为唯一碳源进行生长繁殖，纯培养时，48h 对 1500mg/L 的邻二甲苯的降解率高达 98%，对邻二甲苯的耐受浓度达到 2500mg/L。该菌不仅能降解焦化废水中的邻二甲苯和其他苯系物，而且还能降低焦化生化出水中的 COD，用于焦化废水的生物强化处理，应用前景广阔。



1. 一株邻二甲苯降解菌,经鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.),编号为 0X5,保藏编号为 CCTCC NO:M2015415。
2. 如权利要求 1 所述邻二甲苯降解菌 0X5 的应用,其特征在于所述的 0X5 用于降解焦化废水中的邻二甲苯和其他苯系物。
3. 如权利要求 2 所述邻二甲苯降解菌的应用,其特征在于将所述的 0X5 用于降低焦化生化出水中的 COD。

## 一株邻二甲苯降解菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于环境污染物生物强化技术领域,具体涉及一株邻二甲苯降解菌及其应用。

### 背景技术

[0002] 邻二甲苯是一种重要的有机化工原料,主要用于生产苯酐、染料、杀虫剂、涂料溶剂以及药物等,其中 90% 左右用于生产苯酐,2% 用于生产溶剂,而仅 1% 用来生产染料中间体。邻二甲苯具有较强的毒性,低浓度时能刺激皮肤、粘膜,可以经皮肤渗透入体内;高浓度时,可以麻醉中枢神经系统,使人神志不清。长期接触可影响肝、肾功能,会引起神经衰弱综合症。利用物理和化学方法处理邻二甲苯可以达到较好的效果,但其成本高,易造成二次污染。生物处理法具有处理效果好、费用低、对环境影响小、无二次污染及应用范围广泛的优点。因此,采用生物强化的方法,从环境中筛选高效邻二甲苯降解菌,提高原有生物处理系统对目标污染物的去除效果是消除苯系污染物的重要方法和发展趋势。目前,国内外学者陆续筛选出一些能够降解苯系物的微生物,包括红球菌(*Rhodococcus* sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)和动胶菌(*Zoogloea* sp.)等。CN 103451127 B 申请了一株具有邻二甲苯降解能力的动胶菌及其应用的专利,该专利从制药废水中分离纯化得到的动胶菌对邻二甲苯具有较好降解能力,并且能在无机盐培养基中较好降解苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯等苯系污染物,但未发现该菌在实际废水环境中对其中的邻二甲苯和其他苯系物具有降解能力。本发明的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 0X5 对邻二甲苯的降解速度快,并且其耐受浓度高达 2500mg/L。本发明的 0X5 不仅能降解焦化废水中的邻二甲苯和其他苯系物,而且还能降低焦化生化出水中的 COD。

### 发明内容

[0003] 本发明旨在解决普通微生物对邻二甲苯降解效率低的问题,目的是提供一株邻二甲苯降解菌,高效降解邻二甲苯、苯和甲苯等苯系物,实现其对焦化废水的生物强化处理。

[0004] 本发明所述的邻二甲苯降解菌 0X5 源于武汉平煤武钢联合焦化有限责任公司污水处理场内长期受污染的土壤。该菌是以邻二甲苯作为唯一碳源进行生长繁殖,在无机盐培养基中对土壤中的菌群进行驯化培养,并通过平板划线分离纯化得到。

[0005] 其中,无机盐培养基成分为:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02 g, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g, 微量元素储备液 2 mL, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH 约为 7。所述微量元素储备液的组分为:MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.12g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.07g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.04g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.02g, CoCl<sub>2</sub> 0.04g, 蒸馏水定容至 1000mL。

[0006] 该菌为革兰氏阴性菌,经 16S rDNA 鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 编号为 0X5, 于 2015 年 6 月 29 日保藏于中国典型培养物保藏中心(武汉大学), 保藏编号为 CCTCC NO:M2015415。该菌菌落呈圆形,微凸,菌落四周为乳白色,中间为黄色,表面湿润光滑。生理

生化特性鉴定显示该菌的硝酸盐实验、明胶液化实验和淀粉水解实验为阳性,吡啉实验、产硫化氢实验、甲基红实验和 V-P 实验为阴性,能利用邻二甲苯作为唯一碳源进行生长繁殖。

[0007] 该菌较优的培养条件为:温度为 35℃,初始 pH 为 7 ~ 8,摇床转速为 150r/min。

[0008] 本发明还涉及所述假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 用于降解焦化废水中的邻二甲苯和其他苯系物,降低焦化生化出水中的 COD。

[0009] 与现有技术相比,本发明所述的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 对邻二甲苯的降解速度快,耐受浓度高,不仅能高效降解培养基中的邻二甲苯,而且还能有效降解焦化废水中的邻二甲苯和其他苯系物,对焦化生化出水中的 COD 也有较好的去除效果。

## 附图说明

[0010]

图 1 为本发明的菌株 OX5 的生长与邻二甲苯降解效果关系图;

图 2 为培养温度对本发明的菌株 OX5 降解邻二甲苯的影响图;

图 3 为初始 pH 值对本发明的菌株 OX5 降解邻二甲苯的影响图;

图 4 为摇床转速对本发明的菌株 OX5 降解邻二甲苯的影响图;

图 5 为邻二甲苯初始浓度对本发明的菌株 OX5 降解邻二甲苯的影响图;

图 6 为本发明的菌株 OX5 对焦化生化出水中 COD 的去除效果图。

## 具体实施方式

[0011] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做进一步描述,并非对其保护范围的限制。

[0012] 实施例 1 :假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 的分离、鉴定及其对邻二甲苯的降解性能

### 1、菌株的分离、纯化

#### (1) 菌种来源

菌源取自武汉平煤武钢联合焦化有限责任公司污水处理厂内长期受污染的土壤,呈黑色,在不同地点共采集土壤样品 3 份。

#### [0013] (2) 菌株的分离纯化

将采集的土壤样品加入蒸馏水振荡 24h,静置离心后取 5 ml 上清液接种于 LB 培养基(蛋白胨 1wt%,氯化钠 1wt%,酵母抽提物 0.5wt%)中,置于 30℃、150 r/min 的恒温摇床富集培养 24 h。吸取 2 mL 富集的菌液,离心,弃上清,将菌体接至含有 100 mg/L 邻二甲苯的无机盐培养基中,于 30℃、150 r/min 下培养,待培养基由澄清变浑浊后,再吸取 2 mL 菌液转入新鲜的底物浓度更高的无机盐培养基中相同条件下培养,以此来驯化邻二甲苯降解菌,无机盐培养基中的邻二甲苯的浓度分别为 100,200,400,600,800,1000,2000 mg/L。将底物浓度为 2000 mg/L 时的驯化液按  $10^3 \sim 10^7$  体积比稀释,取各梯度稀释液分别均匀涂布于 LB 平板上,30℃培养 24h。挑取长势良好的菌落反复划线纯化,得到单一菌落。对各个单菌进行邻二甲苯降解实验,确定各菌株的降解能力,将对邻二甲苯降解效果最好的一株菌编号为 OX5,以斜面和甘油保藏菌株。

#### [0014] 2、菌株的鉴定

### (1) 邻二甲苯降解菌株 OX5 的菌落形态特征及生理生化特性

邻二甲苯降解菌株 OX5 菌落呈圆形,微凸,菌落四周为乳白色,中间为黄色,表面湿润光滑。生理生化特性鉴定显示该菌的硝酸盐实验、明胶液化实验和淀粉水解实验为阳性,吡啶实验、产硫化氢实验、甲基红实验和 V-P 实验为阴性。

### [0015] (2) 邻二甲苯降解菌株 OX5 的 16S rDNA 鉴定

对邻二甲苯降解菌株 OX5 的 16S rDNA 基因进行克隆、测序,然后在 GenBank 中进行 Blast 比对。结果显示,与其序列相似性达到 99% 的均为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 其 16S rDNA 序列如列表所示。结合菌株的生理生化特性,将其归属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

### [0016] 3、菌株 OX5 的生长及其对邻二甲苯的降解效果

#### (1) 菌悬液的制备

用接种环从试管斜面挑取一环 OX5 接种于 LB 培养基,35℃、150 r/min 培养 24h,取 2 mL 转接于新鲜 LB 培养基,35℃培养 12 h(细菌处于对数生长期),取菌液于 4000 r/min 条件下离心 5 min 收集菌体,再用已灭菌的含邻二甲苯的无机盐培养基(pH 7.0)洗涤 2 次,然后采用含邻二甲苯的无机盐培养基重悬菌体,调节细胞密度至  $OD_{600} \approx 1$ ,4℃保存备用。

#### [0017] (2) 菌株 OX5 的生长与降解曲线

将菌株 OX5 接种于含 1000 mg/L 邻二甲苯的无机盐培养基中,于 35℃、150 r/min 和初始 pH=7.0 的条件下培养,测定细菌的菌密度( $OD_{600}$ )和邻二甲苯的残留浓度,结果如图 1 所示:菌株 OX5 对邻二甲苯的降解与其生长趋势相一致,表明该菌能利用邻二甲苯作为唯一碳源进行生长繁殖,并对邻二甲苯有良好的降解效果。0~12 h 内,菌株 OX5 生长速度缓慢,主要是因为邻二甲苯具有一定的毒性,细菌需要一定时间适应环境;12 h 后细菌进入对数生长期, $OD_{600}$ 值呈线性增长;30 h 时,由于大部分邻二甲苯已经被降解,细菌生长所需的碳源减少,因此开始进入稳定期。

### [0018] 实施例 2 :环境条件对假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) OX5 降解能力的影响

#### 1、培养温度的影响

在邻二甲苯浓度为 1000mg/L, pH 为 7.0、摇床转速为 150 r/min 和接种量为 2 vol % 时,温度对邻二甲苯降解的影响如图 2 所示:在 25~40℃ 范围内,菌株 OX5 对邻二甲苯均具有较好的降解效果,表明该菌对温度有较宽的适应范围。在 25~35℃ 之间时,随着温度的升高,底物的降解率随之增大;但当温度达到 40℃ 时,菌株 OX5 对底物的降解率反而低于 35℃ 时的降解率。表明假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) OX5 的最适温度为 35℃。

#### [0019] 2、初始 pH 值的影响

在邻二甲苯浓度为 1000mg/L,温度为 35℃、摇床转速为 150 r/min 和接种量为 2 vol% 时,初始 pH 值对邻二甲苯降解的影响如图 3 所示:pH=5 时,48 h 后,菌株 OX5 对邻二甲苯的降解率仅为 25.2%,说明该株菌在酸性条件下很难生长;当 pH=7~8 时,30 h 后其降解率均可达到 90% 以上,然而随着 pH 的继续增大其降解率又有所下降,表明菌株 OX5 对环境 pH 值比较敏感,其适宜的 pH 范围为 7~8。

#### [0020] 3、摇床转速的影响

在邻二甲苯浓度为 1000mg/L, pH 为 7.0、温度为 35℃ 和接种量为 2 vol% 时,摇床转速对邻二甲苯降解的影响如图 4 所示:摇床转速为 100 r/min 时,菌株 OX5 对邻二甲苯的降

解率很低,当转速在 150~250 r/min 时,48 h 后邻二甲苯的降解率达到了 90% 以上,表明在摇床转速为 150 ~ 250r/min 时已能满足假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 对溶氧的需求,结合实际生产中的可行性和成本考虑,确定菌株 OX5 的最佳摇床转速为 150 r/min。

#### [0021] 4、邻二甲苯初始浓度的影响

在 pH 为 7.0、培养温度 35℃、摇床转速 150 r/min 和接种量为 2 vol% 时,邻二甲苯初始浓度对邻二甲苯降解的影响如图 5 所示:菌株 OX5 在 36h 内对 1500mg/L 的邻二甲苯的降解率可达到 90%,随着邻二甲苯浓度的增大,其降解率逐渐减小,且细菌到达稳定期的时间延迟,说明说明菌株 OX5 对邻二甲苯具有良好的降解性能,但过高的邻二甲苯会抑制 OX5 的生长。

#### [0022] 实施例 3 :假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 对焦化废水中苯系物的降解

将菌株 OX5 的菌悬液以 2vol% 的接种量投加至稀释的焦化废水(COD=604mg/L)中,并分别外加一定浓度的苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯,于 35℃、150r/min 摇床培养,48h 后测定培养液中残留的各苯系物的浓度,计算得出相应苯系物的降解率如表 1 所示:菌株 OX5 在 48h 内可将废水中的三种二甲苯完全降解,并且对苯和甲苯的降解率也都达到了 95% 以上,说明菌株 OX5 可较好地适应焦化废水中的环境,并能将废水中的苯系物很好降解。

#### [0023]

表 1 本发明的菌株 OX5 对焦化废水中苯系物的降解效果

底物名称	底物浓度(mg/L)	降解率(%)
苯	185	95
甲苯	193	98
邻二甲苯	212	100
间二甲苯	197	100
对二甲苯	206	100

#### 实施例 4 :假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)OX5 对某焦化厂生化出水 COD 的去除

以 2vol% 的接种量将菌株 OX5 接种至 100mL 已灭菌的某焦化厂生化出水中,置于 35℃、150r/min 摇床培养,间隔一定时间取样检测废水中的 COD,结果如图 6 所示:菌株 OX5 经 72h 将废水的 COD 从 153.2mg/L 降低至 95.2mg/L,表明 OX5 能利用生化出水中的苯系物和难降解有机物为碳源来进行生长繁殖,为利用邻二甲苯降解菌强化处理焦化废水中的 COD 提供了依据。

[0024] 上述具体实施方式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。

1 GGTGAGGAGC TACCATGCAG TCGAGCGGAT GAAGGGAGCT TGCTCCTGGA  
51 TTCAGCGGCG GACGGGTGAG TAATGCCTAG GAATCTGCCT GGTAGTGGGG  
101 GATAACGTCC GGAAACGGGC GCTAATACCG CATACTCCT GAGGGAGAAA  
151 GTGGGGGATC TTCGGACCTC ACGCTATCAG ATGAGCCTAG GTCGGATTAG  
201 CTAGTTGGTG GGGTAAAGGC CTACCAAGGC GACGATCCGT AACTGGTCTG  
251 AGAGGATGAT CAGTCACACT GGAACTGAGA CACGGTCCAG ACTCCTACGG  
301 GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGAAAAGCCT GATCCAGCCA  
351 TGCCGCGTGT GTGAAGAAGG TCTTCGGATT GTAAAGCACT TTAAGTTGGG  
401 AGGAAGGGCA GTAAGTTAAT ACCTTGCTGT TTTGACGTTA CCAACAGAAT  
451 AAGCACCGGC TAACCTCGTG CCAGCAGCCG CCGTAATACG AAGGGTGCAA  
501 GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG CGCGTAGGTG GTTCAGCAAG  
551 TTGGATGTGA AATCCCCGGG CTCAACCTGG GAACTGCATC CAAAACACT  
601 GAGCTAGAGT ACGGTAGAGG GTGGTGGAAT TTCCTGTGTA GCGGTGAAAT  
651 GCGTAGATAT AGGAAGGAAC ACCAGTGGCG AAGGCGACCA CCTGGACTGA  
701 TACTGACACT GAGGTGCGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC  
751 TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGTGCGACT AGCCGTTGGG ATCCTTGAGA  
801 TCTTAGTGGC GCAGCTAACG CGATAAGTCG ACCGCCTGGG GAGTACGGCC  
851 GCAAGGTAA AACTCAAATG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG  
901 CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACCGAAGA ACCTTACCTG GCCTTGACAT  
951 GCTGAGAACT TTCCAGAGAT GGATTGGTGC CTTCCGGAAC TCAGACACAG  
1001 GTGCTGCATG GCTGTGTCGCA GCTCGTGTG TGAGATGTTG GGTAAAGTCC  
1051 CGTAACGAGC GCAACCCCTG TCCTTAGTTA CCAGCACCTC GGGTGGGCAC  
1101 TCTAAGGAGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA  
1151 GTCATCATGG CCCTTACGGC CAGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTCGGT  
1201 ACAAAGGGTT GCCAAGCCGC GAGGTGGAGC TAATCCCATA AAACCGATCG  
1251 TAGTCCGGAT CGCAGTCTGC AACTCGACTG CGTGAAGTCG GAATCGCTAG  
1301 TAATCGTGAA TCAGAATGTC ACGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTTGTACAC  
1351 ACCGCCCCGTC ACACCATGGG AGTGGGTTGC TCCAGAAGTA GCTAGTCTAA  
1401 CCGCAAGGGG GACGGT

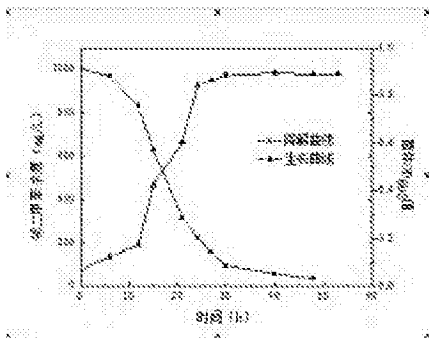


图 1

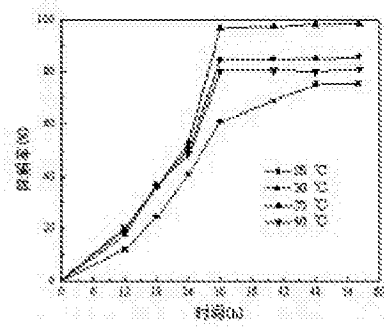


图 2

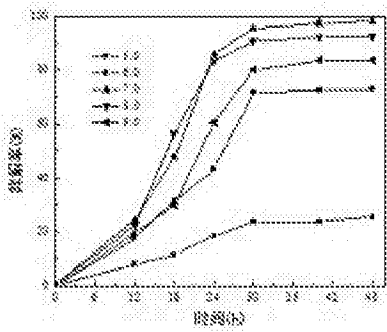


图 3

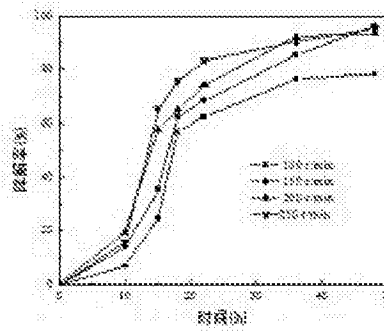


图 4

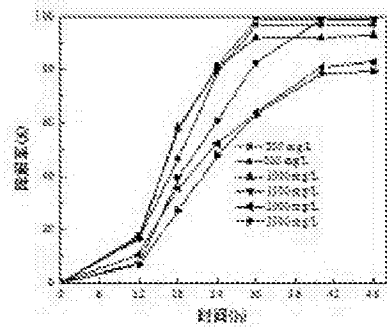


图 5

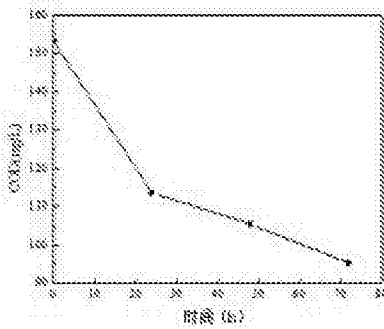


图 6