



(21) 申请号 202311296684.X

(22) 申请日 2023.10.09

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 26067 2022.11.07

(71) 申请人 江苏聚庚科技股份有限公司

地址 211132 江苏省南京市江宁区汤山街  
道宁峰路18号

(72) 发明人 蔡天明 陈立伟 邱沪生

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237

专利代理师 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54) 发明名称

一株用于土壤修复的菌株、菌剂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株用于土壤修复的菌株、菌剂及其应用。本发明的菌株为鲁氏不动杆菌，保藏编号为CGMCC No.26067，其能以1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯为唯一碳源进行生长，24h能将500mg/L的1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯降解99%以上。在实际污染土壤修复的应用中，该菌株可以降解95%的高浓度的1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯，在实际土壤修复的应用上具有较好的前景。



1. 一株用于土壤修复的菌株,所述菌株为鲁氏不动杆菌,其分类命名为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*),菌株名为G3,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2022年11月7日,保藏编号为CGMCC No. 26067。

2. 一种菌剂,其特征在于,包含权利要求1所述的鲁氏不动杆菌。

3. 权利要求2所述菌剂的制备方法,其特征在于,所述菌剂为液体菌剂,其通过如下方法制备得到:

步骤(1)挑选鲁氏不动杆菌G3单菌落接种于LB培养基摇瓶中,振荡培养至对数期;

步骤(2)将步骤(1)得到的菌种按体积比为5%-10%的接种量接种入种子罐,培养至对数生长期,得到种子液;

步骤(3)将种子液按体积比1%-5%的接种量接入生产罐培养,发酵完成后即得液体菌剂。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,生产罐所用培养基和种子罐培养基相同,培养基配方为:葡萄糖7.5-8.0g/L、酵母膏4.0-5.0g/L、 $K_2HPO_4$  0.8-1.0g/L、NaCl 4.0-5.0g/L、 $CaCO_3$  1.5-2.0g/L、 $MgSO_4$  0.15-0.20g/L和大豆油0.1-0.15% (v/v),pH值7.0-7.5。

5. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,在种子罐和生产罐的培养过程中无菌空气的通气量为1:0.6-1.2,搅拌速度为180-240 rpm,培养温度为32-35℃,全流程培养时间为48-96小时。

6. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤(3)中,发酵完成后菌体数量达到 $10^8$ 个/mL以上。

7. 权利要求1所述的鲁氏不动杆菌或权利要求2所述的菌剂在土壤修复中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述土壤修复为降解土壤中的1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯中的任意一种或几种。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,修复方法为:将菌剂喷洒至土壤中混合均匀。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,将菌剂按照质量体积比为20-50kg/m<sup>3</sup>的投加量喷洒至土壤中混合均匀,土壤修复温度为20~35℃,pH为6.0~9.0。

## 一株用于土壤修复的菌株、菌剂及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及环境微生物领域,具体涉及一株鲁氏不动杆菌、菌剂及其在土壤修复中的应用。

### 背景技术

[0002] 石化行业场地一般涉及的化学品种类较多、场地面积大、生产装置和地面管线密集,有着较高的土壤和地下水污染风险。研究显示,石化场地中以有机污染物为主,主要有石油烃(TPHs)、苯系物和卤代烃等VOCs、PAHs 和硝基苯等半挥发性有机物(SVOCs)以及酚类化合物等。苯系物作为 VOCs 污染物的典型代表,在环境中的迁移性强,且具有较高的生物毒性,可通过多种途径进入生态环境,严重危害人体健康。

[0003] 苯系物在土壤中的降解方式主要有生物降解和非生物降解两种过程。生物降解是土壤动物、植物及微生物的生长代谢过程对苯系物的降解转化作用,其中微生物降解是苯系物在土壤中的最重要的降解方式,细菌可以通过有氧途径或厌氧途径降解苯系物。苯系物作为低环芳香烃在有氧条件下的微生物降解过程是相对容易的,但地下环境中的有氧生物降解极易受到氧气的限制,在缺氧条件下的微生物降解速度和程度明显要低,导致降解不完全生成一些中间产物。

[0004] 微生物修复技术可以应用于土壤、地下水原位修复,也可与多相抽提等技术进行耦合修复抽提出的三废,因此微生物修复技术备受关注。在过去的研究中,从自然环境中分离并鉴定具有降解苯类化合物能力的微生物对环境保护具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足,提供一株能够实现土壤中1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯中的一种或几种同时降解的高效菌株。

[0006] 本发明另一个发明目的为提出包含上述菌株的菌剂及其制备方法。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明公开了一株鲁氏不动杆菌,其分类命名为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*),菌株名为G3,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2022年11月7日,保藏编号为CGMCC No. 26067,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

[0008] 本发明进一步提出了一种菌剂,其包含上述鲁氏不动杆菌。

[0009] 进一步地,本发明提供了上述菌剂的制备方法,所述菌剂为液体菌剂,其通过如下方法制备得到:

- (1) 挑选鲁氏不动杆菌G3单菌落接种于LB培养基摇瓶中,振荡培养至对数期;
- (2) 将步骤(1)得到的菌种按体积比为5%-10%的接种量接种入种子罐,培养至对数生长期,得到种子液;
- (3) 将种子液按体积比1%-5%的接种量接入生产罐培养,发酵完成后即得液体菌

剂。

[0010] 具体地,生产罐所用培养基和种子罐培养基相同,培养基配方为:

葡萄糖7.5-8.0g/L、酵母膏4.0-5.0g/L、 $K_2HPO_4$ 0.8-1.0g/L、NaCl 4.0-5.0g/L、 $CaCO_3$ 1.5-2.0g/L、 $MgSO_4$ 0.15-0.20g/L和大豆油0.1-0.15% (v/v), pH值7.0-7.5。

[0011] 优选地,培养基配方为:葡萄糖8g/L、酵母膏5g/L、 $K_2HPO_4$ 1g/L、NaCl 5g/L、 $CaCO_3$ 2g/L、 $MgSO_4$ 0.2g/L和大豆油0.1% (v/v), pH值7.0-7.5。

[0012] 具体地,在种子罐和生产罐的培养过程中无菌空气的通气量为1: 0.6-1.2,搅拌速度为180-240 rpm,培养温度为32-35℃,全流程培养时间为48-96小时。

[0013] 具体地,发酵结束后菌体数量达到 $10^8$ 个/mL以上。

[0014] 进一步地,本发明所述的鲁氏不动杆菌或其菌剂在土壤修复中的应用。

[0015] 其中,土壤修复为含有1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯中的任意一种或几种的土壤。

[0016] 具体地,修复方法为:将菌剂按照质量体积比为20-50kg/m<sup>3</sup>的投加量喷洒至土壤中混合均匀,土壤修复温度为20~35℃, pH为6.0~9.0。

[0017] 有益效果:本发明筛选得到了一株可实现污染土壤修复的鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)G3,菌株G3在以1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯为唯一碳源的基础盐培养基中培养后,对500mg/L苯类污染物的降解率可达到99%;将该菌株制备的菌剂投入实际高浓度污染土壤体系24h后,体系中1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的残留量可降低95%以上,表明菌株G3对污染土壤具有较好的修复效果,为工业应用低成本生物技术治理土壤污染提供机遇。

## 附图说明

[0018] 图1为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)菌体的菌落形态图;

图2为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)的系统发育树;

图3为鲁氏不动杆菌对1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率图;

图4为含盐量对鲁氏不动杆菌降解效率的影响;

图5为pH对鲁氏不动杆菌降解效率的影响;

图6为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)在处理实际污染土壤的实验中,1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯降解率随时间变化的曲线。

[0019] 生物保藏信息:鲁氏不动杆菌,分类命名为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*),菌株名为G3,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期为2022年11月7日,保藏编号为CGMCC No. 26067,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

## 实施方式

[0020] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做更进一步的具体说明,本发明的上述和/或其他方面的优点将会变得更加清楚。

[0021] 下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0022] 下述实施例中所述接种量,如无特殊说明,均为按照体积比接种。

[0023] 实施例1 土壤修复菌株的制备。

[0024] 取南京某化工厂的生化池中得到的活性污泥5.0mL加入1,3-二氯苯为500 mg/L的100mL无机盐液体培养中,在32℃、150r/min条件下进行富集培养。每隔5天以体积比5%的接种量转入到新的含1,3-二氯苯的无机盐液体培养基中,连续转接3次,获得富集液。所述的无机盐培养基配方为: $K_2HPO_4$  1.0 g/L, $NH_4Cl$  1.0 g/L, $KH_2PO_4$  0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L, $NaCl$  0.5 g/L,pH 7.2,溶剂为水。

[0025] 取富集液进行梯度稀释,取 $10^{-5}$ 稀释后的液体0.5mL涂布于含1,3-二氯苯的无机固体盐培养基,挑取单菌落分离纯化,得到纯菌,再接种至液体培养中验证其降解含氮化合物能力。最后得到一株能够高效降解1,3-二氯苯的菌株,菌落图如图1所示。

[0026] 所述的无机盐固体培养基组分为: $K_2HPO_4$  1.0 g/L, $KH_2PO_4$  0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L, $NaCl$  1.0 g/L,琼脂20 g/L,pH 7.2。

[0027] 将菌株的16S rRNA 基因序列通过GenBank数据库中Blasting程序与NCBI中的核酸数据进行比对分析,结合16S rRNA基因系统发育分析(图2)所示,经鉴定,该菌属于鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*),命名菌株名为G3。形态学特征:革兰氏阴性,菌落为乳白色、边缘整齐、表面光滑、隆起、湿润、菌落直径约为1mm左右,见图1,在显微镜下菌体为短杆状。能够以1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯作为唯一碳源进行生长。

[0028] 上述菌株于2022年11月7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,其分类命名为鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*),菌株名为G3,保藏地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,菌种保藏号为:CGMCC NO.26067。

[0029] 实施例2 菌株G3对1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解实验。

[0030] 将在培养基中培养到对数期的鲁氏不动杆菌的菌株G3,以体积比5%的接种量分别接种至含1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的培养基中,所述培养基中,1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的初始浓度均为500 mg/L,培养基组成为: $K_2HPO_4$  1.0 g/L, $NH_4Cl$  1.0 g/L, $KH_2PO_4$  0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L, $NaCl$  0.5 g/L,pH 7.2,在32℃、150r/min条件下摇床中培养。24h后测定1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯含量,如图3所示。鲁氏不动杆菌对1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率均达到99%以上。

[0031] 实施例3 含盐量对降解效率的影响。

[0032] 将在培养基中培养到对数期的鲁氏不动杆菌的菌株G3,以体积比5%的接种量接到含有1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的培养基中,所述培养基中,1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的初始浓度均为500 mg/L,培养基组成为: $K_2HPO_4$  1.0 g/L, $NH_4Cl$  1.0 g/L, $KH_2PO_4$  0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L,pH 7.2,调节培养基中氯化钠浓度分别至0.5%、1.5%、3%、6%,在32℃、150r/min摇床中培养,24h后测定1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯含量,如图4所示。盐浓度在0.5%-10%范围内鲁氏不动杆菌对1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率都在99%以上,表明改菌株对环境盐浓度具有高耐受性。

[0033] 实施例4 pH对降解效率的影响。

[0034] 将在培养基中培养到对数期的鲁氏不动杆菌的菌株G3,以体积比5%的接种量接到

含有1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的培养基中,所述培养基中,1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的初始浓度均为500 mg/L,培养基组成为: $K_2HPO_4$  1.0 g/L, $NH_4Cl$  1.0 g/L, $KH_2PO_4$  0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 g/L, $NaCl$  0.5 g/L,调节培养基中pH分别为4、6、8、10,在32℃、150r/min摇床中培养,24h后测定1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯含量,如图4所示。pH在4-10范围内鲁氏不动杆菌对1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率都在95%以上,表明改菌株对环境pH具有高耐受性。

[0035] 实施例5 菌剂的制备。

[0036] 挑选鲁氏不动杆菌G3单菌落接种于LB培养基摇瓶中,振荡培养至对数期;将得到的菌种按体积比为5%-10%的接种量接种入种子罐,培养至对数生长期,得到种子液;将种子液按体积比1%-5%的接种量接入生产罐培养,发酵完成后即得液体菌剂,发酵结束后菌体数量达到 $10^8$ 个/mL左右。

[0037] 生产罐所用培养基和种子罐培养基相同,培养基配方为:葡萄糖8g/L,酵母膏5g/L, $KH_2PO_4$  1.0g/L, $NaCl$  5.0g/L, $CaCO_3$  2.0g/L, $MgSO_4$  0.2g/L,大豆油0.1% (v/v),pH值7.0-7.5。

[0038] 在种子罐和生产罐的培养过程中无菌空气的通气量为1:0.8,搅拌速度为18rpm,培养温度为35℃,全流程培养时间为48小时。

[0039] 实施例6 菌剂在土壤修复中的应用。

[0040] 处理土壤取自某废弃化工厂原址,处理量为 $10m^3$ ,其中1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的浓度分别为2.2g/L、1.5g/L、4.3g/L和3.1g/L,将500kg菌剂均匀喷洒至污染土壤表面,并搅拌均匀。作为第一组对照,相同的土壤投加等量的普通活性污泥,第二组对照,相同的土壤投加等量的由普通活性污泥与鲁氏不动杆菌菌剂1:1(质量比)混合制剂,修复24h后效果如图6所示。

[0041] 由图6可知,经普通活性污泥修复24h后土壤中1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率均低于20%;混合等质量的鲁氏不动杆菌菌剂后,土壤中的1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率分别增加至55.69%、59.64%、58.42%、56.97%;而直接投加纯鲁氏不动杆菌菌剂后,土壤中的1,3-二氯苯、2-甲基苯酚、4-氯苯胺、2-氟联苯的降解率分别达到95.87%、96.54%、95.49%、96.46%。以上实验数据表明,G3菌剂切实提高了对土壤中有机的降解效果,在修复实际污染土壤方面具有良好的应用前景。

[0042] 本发明提供了一种可实现污染土壤修复的鲁氏不动杆菌的思路及方法,具体实现该技术方案的方法和途径很多,以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。本实施例中未明确的各组成部分均可用现有技术加以实现。

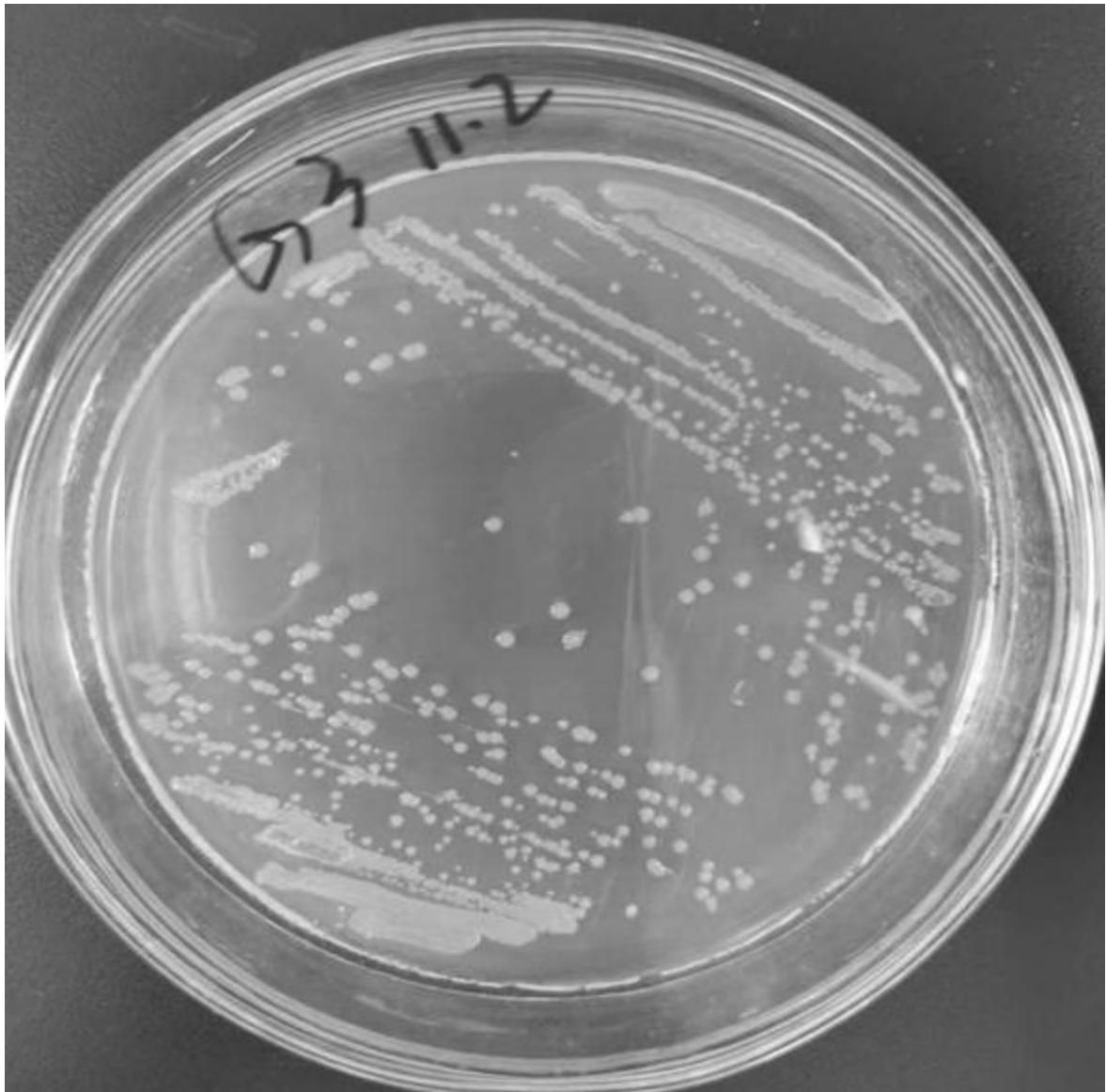


图 1

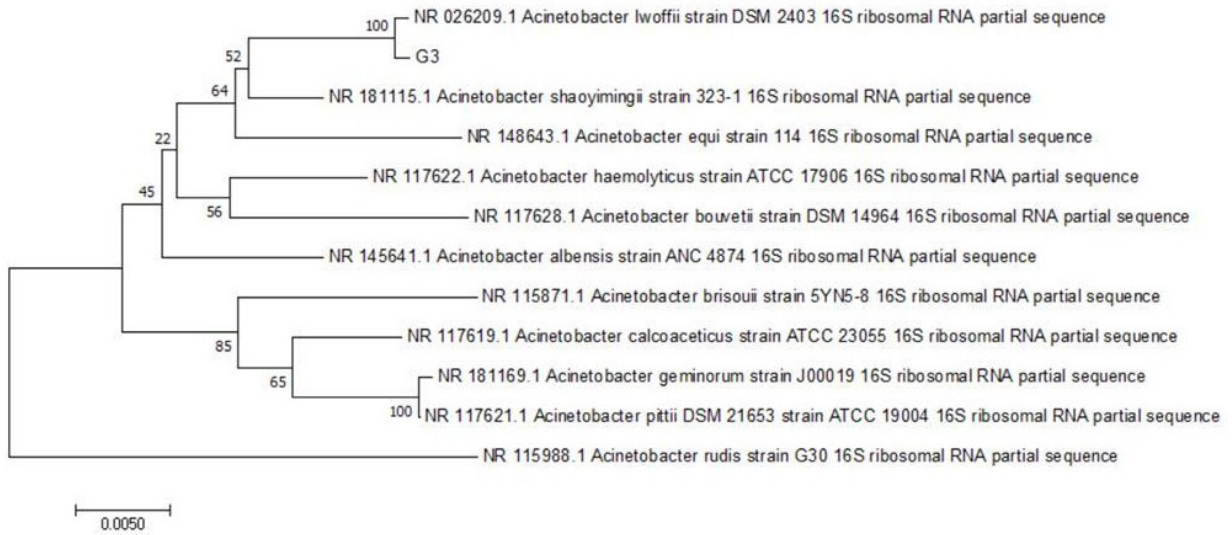


图 2

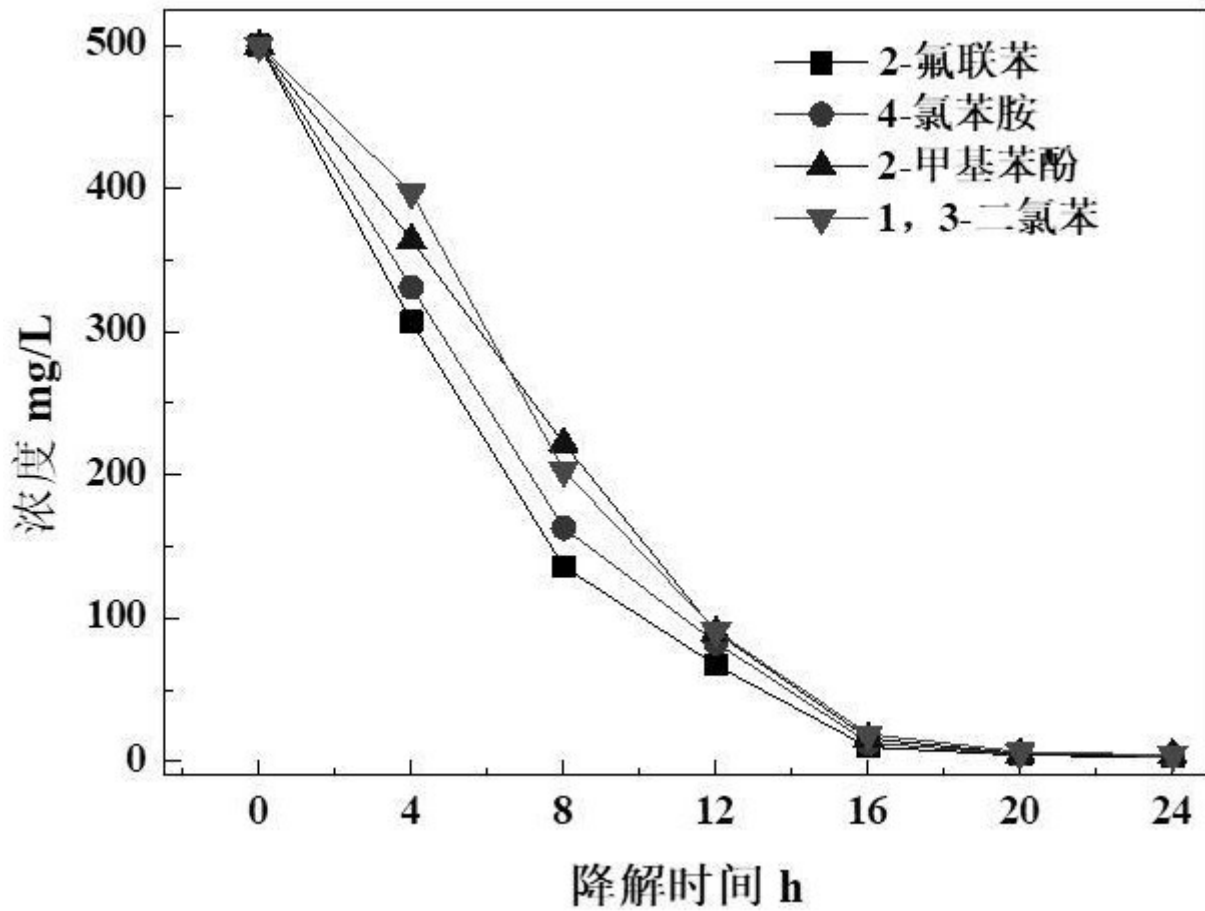


图 3



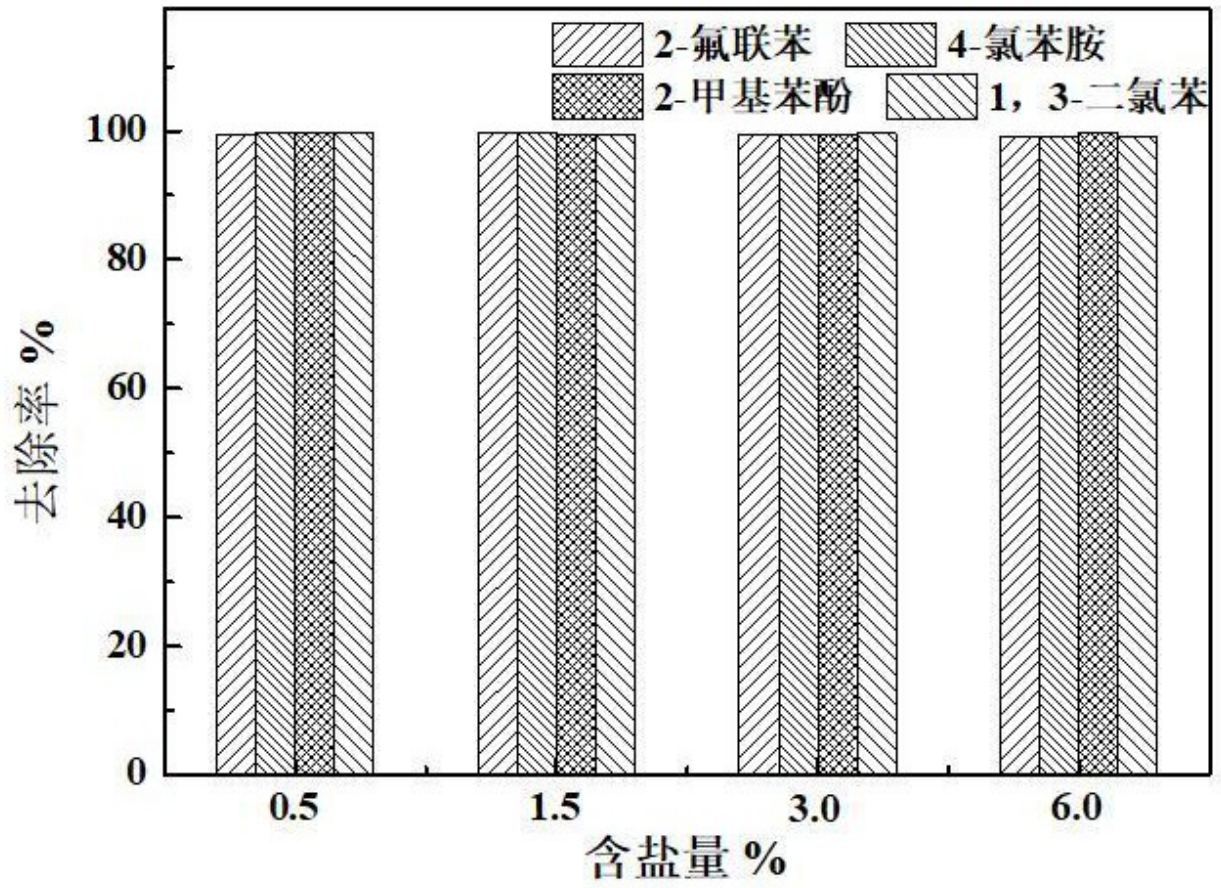


图 4

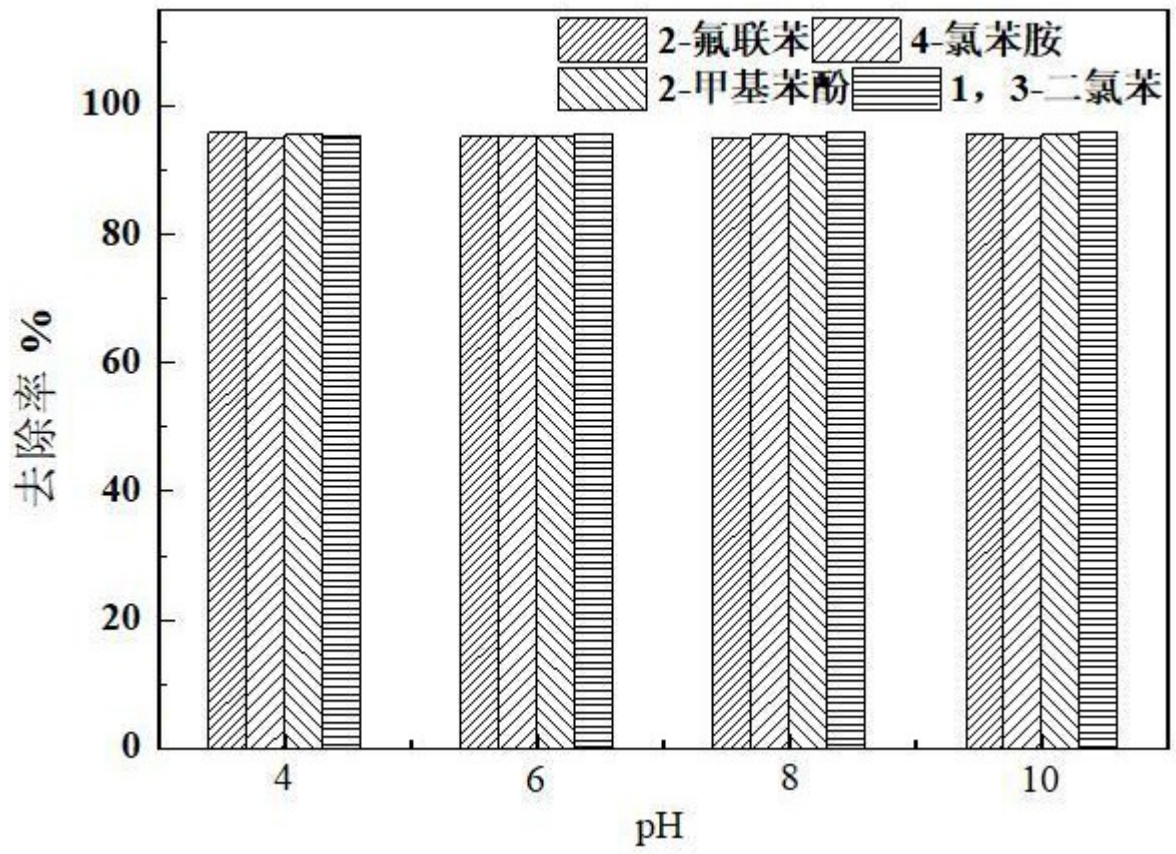


图 5

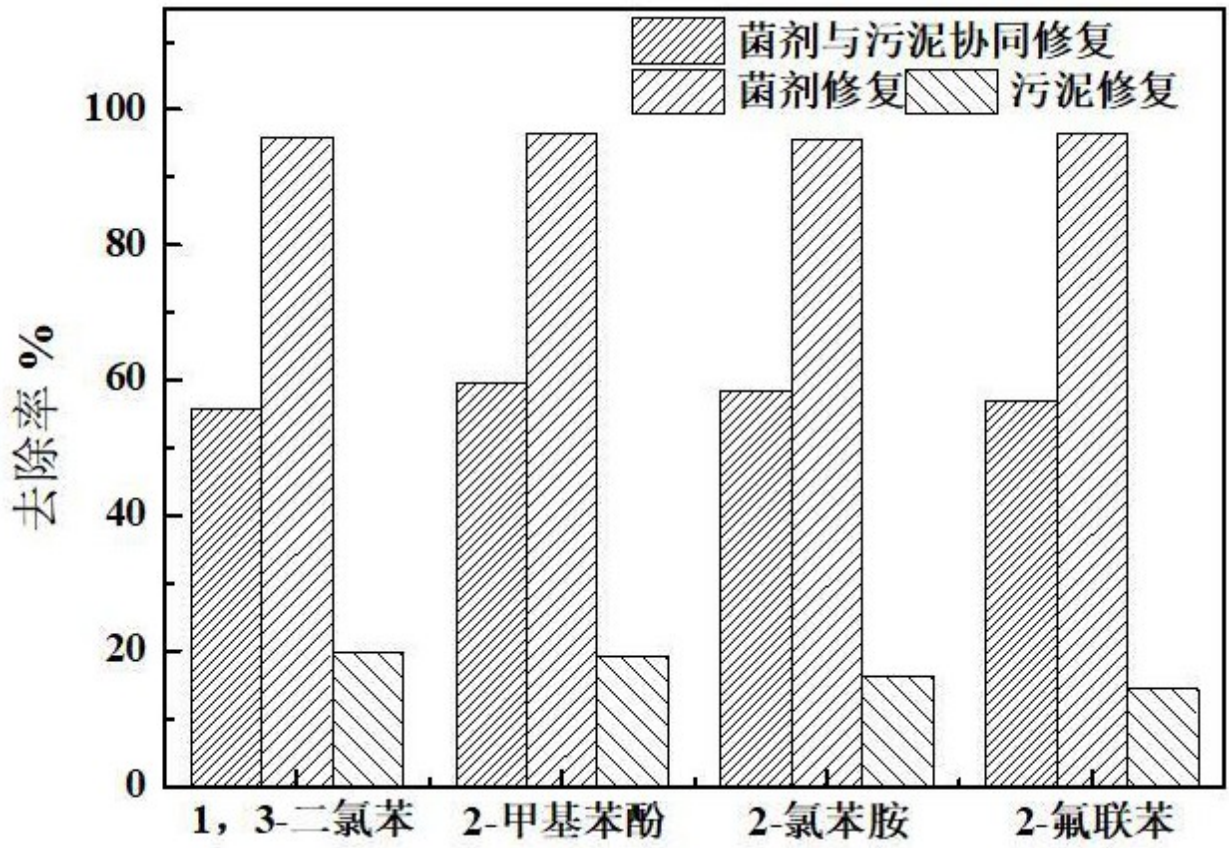


图 6