



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116144535 B

(45) 授权公告日 2023.09.26

(21) 申请号 202211602666.5
 (22) 申请日 2022.12.13
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 116144535 A
 (43) 申请公布日 2023.05.23
 (83) 生物保藏信息
 CCTCC NO:M 20221614 2022.10.20
 (73) 专利权人 中国科学院地球化学研究所
 地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号
 (72) 发明人 胡海燕 吴青青 王宝林 张华
 (74) 专利代理机构 成都宏田知识产权代理事务所(普通合伙) 51337
 专利代理师 钟隆辉
 (51) Int. Cl.
 C12N 1/20 (2006.01)
 C02F 3/34 (2023.01)
 B09C 1/10 (2006.01)
 C12R 1/07 (2006.01)
 C02F 101/20 (2006.01)

CN 110079487 A, 2019.08.02
 CN 113862178 A, 2021.12.31
 CN 107043713 A, 2017.08.15
 CN 114703088 A, 2022.07.05
 CN 103275891 A, 2013.09.04
 JP 2001225095 A, 2001.08.21
 WO 2004089831 A2, 2004.10.21
 JP H09248595 A, 1997.09.22
 WO 9214848 A1, 1992.09.03
 朱建明等. 地衣芽孢杆菌对亚硒酸盐的还原.《矿物岩石地球化学通报》.2021,第30卷(第3期),第245-250页.
 郭同同.耐汞微生物的分离及其对汞污染土壤的修复.《中国硕士论文全文库》.2020,全文.
 Shang et al..Reducing mercury accumulation in common carp using selenium-enriched Bacillus subtilis.《Aquaculture Reports》.2021,第1-7页. (续)

审查员 郝永利

(56) 对比文件
 CN 104673709 A, 2015.06.03

权利要求书1页 说明书5页
 序列表(电子公布) 附图3页

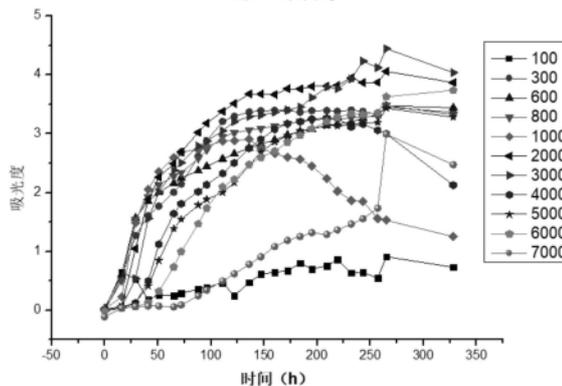
(54) 发明名称
 一种芽孢杆菌、菌剂、及其应用

境保护及农业可持续发展有着重要意义。

(57) 摘要

本发明公开了一种芽孢杆菌、菌剂、及其应用,属于生物工程技术领域,其中芽孢杆菌(Bacillus sp.SK-0-061(E9)),命名为E9,分类命名为Bacillus sp.SK-0-061(E9),于2022年10月20日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为湖北省武汉市武昌区八一路珞珈山,武汉大学,邮政编码为430072,保藏编号为CCTCC NO:M 20221614.该菌株在重金属污染严重的环境,如土壤或污水中生存,可对重金属进行脱毒,修复环境,并且不产生次生污染,对促进人体健康、环

E9耐Se生长曲线



CN 116144535 B

[接上页]

(56) 对比文件

Ali Fakhar et al..Heavy metal remediation and resistancemechanism of Aeromonas, Bacillus, andPseudomonas: A review.《Full Terms & Conditions of access

and use can be found at<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=best20>Critical Reviews in Environmental Science andTechnology》.2020,第1-47页.

1. 一种芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) SK-0-061 (E9), 其特征在于, 所述芽孢杆菌分类命名为 *Bacillus* sp. SK-0-061 (E9), 于2022年10月20日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏地址为湖北省武汉市武昌区八一路珞珈山, 武汉大学, 邮政编码为430072, 保藏编号为 CCTCC NO:M 20221614。

2. 一种菌剂, 其特征在于, 所述菌剂包括权利要求1所述的芽孢杆菌。

3. 权利要求1所述的芽孢杆菌, 或权利要求2所述的菌剂在对环境中重金属Hg、Se脱毒中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述环境包括土壤和/或污水。

一种芽孢杆菌、菌剂、及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种芽孢杆菌、菌剂、及其应用。

背景技术

[0002] 随着现代工业的发展,重金属污染日益严重,而且普遍存在多元复合重金属污染,给当地生态环境和居民健康造成极大危害。由于环境中重金属难以移除,常规的物理、化学修复技术不仅成本高、效果差,而且容易造成二次污染,因此开发高效、安全、低成本生物修复技术具有重要的意义。土壤微生物作为元素地球化学的驱动者,参与重金属的多种形态转化过程,调节重金属毒性和生物可利用性。因此,深入了解微生物对重金属的形态转化和迁移过程,寻找高效的微生物菌株及其潜在应用价值具有重要的现实意义。

发明内容

[0003] 本发明提供一种降解重金属的芽孢杆菌、菌剂、及其应用。

[0004] 为了达到上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0005] 第一方面,提供一种芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. SK-0-061 (E9)),命名为E9,分类命名为*Bacillus* sp. SK-0-061 (E9),于2022年10月20日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为湖北省武汉市武昌区八一路珞珈山,武汉大学,邮政编码为430072,保藏编号为CCTCCNO:M20221614。

[0006] 第二方面,提供一种包括上述芽孢杆菌的菌剂。

[0007] 第三方面,提供一种上述芽孢杆菌或包含芽孢杆菌的菌剂在对环境(土壤和/或污水)中重金属脱毒中的应用。

[0008] 进一步地,重金属包括Hg、Se、Sb和As中的至少一种。

[0009] 本发明的有益效果为:

[0010] 本发明提供的芽孢杆菌在重金属污染严重的环境,如土壤或污水中生存,可对重金属进行脱毒,修复环境,并且不产生次生污染,对促进人体健康、环境保护及农业可持续发展有着重要意义。

附图说明

[0011] 图1为实施例2提供的菌株E9在不同浓度Se胁迫下的生长曲线示意图;

[0012] 图2为实施例2提供的菌株E9在不同浓度Sb胁迫下的生长曲线示意图;

[0013] 图3为实施例2提供的菌株E9在不同浓度Hg胁迫下的生长曲线示意图;

[0014] 图4为实施例2提供的菌株E9在不同浓度As胁迫下的生长曲线示意图;

[0015] 图5为实施例3提供的菌株E9在不同时间点对Hg的挥发量示意图;

[0016] 图6为实施例3提供的菌株E9在Se的挥发实验中,生成的挥发性二甲基二硒醚氧化产物的DMS_{EA}色谱分析图(LC-ICP-MS)。

具体实施方式

[0017] 下面对本发明的具体实施方式进行描述,以便于本技术领域的技术人员理解本发明,但应该清楚,本发明不限于具体实施方式的范围,对本技术领域的普通技术人员来讲,只要各种变化在所附的权利要求限定和确定的本发明的精神和范围内,这些变化是显而易见的,一切利用本发明构思的发明创造均在保护之列。

[0018] 实施例1

[0019] 一、分离及培养条件

[0020] 培养基:LB肉汤培养基和LB琼脂培养基

[0021] 培养基成分:胰蛋白胨(10g/L)、酵母浸粉(5g/L)、氯化钠(10g/L), pH=7.0±0.1 (25℃)

[0022] 培养条件:25℃。

[0023] 二、稻田土壤耐Hg微生物分离

[0024] 1. 制作液体培养基:称取适量LB培养基粉末,用去离子水溶解,121℃,30min灭菌备用。

[0025] 2. 配制重金属耐受培养基:称取适量氯化汞粉末(HgCl_2),用超纯水溶解,加入步骤1中的培养基中,使得培养基中的Hg浓度为100mg/L,即含Hg培养基。

[0026] 3. 稀释:将贵州省万山区四坑废弃汞矿区稻田中采集的1g新鲜稻田土加入9mL(涡旋时加入几颗玻璃珠)LB液体培养基中,用涡旋混匀15分钟,静置20分钟,土壤沉淀,得到上清液。

[0027] 4. 接种:用移液枪取100 μL 步骤3中上清液加入步骤2中含Hg培养基中。

[0028] 5. 再接种:用移液枪取100 μL 步骤4中浑浊液接种到新的含Hg培养基(确认菌对汞的耐性),25℃,黑暗条件下培养。

[0029] 6. 稀释:将步骤5中第二次接种的菌液进行稀释,取100 μL 菌液到900 μL 无菌水中,混匀(10^{-1}),再逐级稀释,直到 10^{-6} 。

[0030] 7. 涂布:用镊子夹小玻璃珠放置在LB琼脂平板上,取200 μL 稀释液加入平板后轻轻摇晃平板,让玻璃珠将稀释液均匀涂到平板的每一个角落,涂布完毕,用封口膜将平板封好(保证平板水分不流失),25℃黑暗条件下培养。

[0031] 8. 第一次划线:培养2-3天后,微生物开始生长成肉眼可识别的菌落,即可挑选单菌落划线。用一次性接种环(1 μL)挑菌落划线(三区划线法),尽量不要选重复的菌落,记录菌落的特征。

[0032] 9. 第二次划线:等第一次划线的菌落生长好(2天后),进行第二次划线。

[0033] 10. 菌株保存:向2mL冻存管中加0.3mL-0.5mL无菌甘油,加入1mL菌液混匀,在室温下存放30min后(确保甘油进入细胞中)放入-80℃保存。

[0034] 三、芽孢杆菌的鉴定

[0035] 鉴定:16SrDNA序列如SEQ ID NO.1所示:

[0036] ATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGC
TCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATG
GACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA

TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG
CTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA
GGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAAGTT
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCG
TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGGGT
AACCTTTTTGGAG。

[0037] 通过16S rRNA序列比对分析,该芽孢杆菌与(*Bacillus* sp.)具有极高的同源性,同源性为100%。结合菌体的形态特征,生长条件和生理生化鉴定结果,确定芽孢杆菌*Bacillus* sp.属于芽孢杆菌(*Bacillus* sp.E9)。

[0038] 实施例2

[0039] 一、菌株E9对Se的耐受性实验:

[0040] 1.实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0041] Se:0、100、300、600、800、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000mg/L。

[0042] 2.耐受液原液配制:称取适量亚硒酸钠(Na_2SeO_3)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22 μm 滤膜过滤待用。

[0043] 3.培养:取无菌96孔板,总体系为200 μL 体系,180 μL 培养基+20 μL 菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示。

[0044] 4.测定生长曲线:菌液接种结束后,用封板膜将96孔板封好(防止异物掉进体系中),用酶标仪(型号Thermo Scientific MuLtiskan FC,测定0时刻的 OD_{600} 的值)25 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每隔一定时间测定 OD_{600} 值,绘制菌株E9在不同浓度Se胁迫下的生长曲线,如图1所示。芽孢杆菌在Se浓度0~7000mg/L条件下仍然可以生长,未见明显抑制抑制现象,可见该菌株对Se耐受高于7000mg/L。

[0045] 二、菌株E9对Sb的耐受性实验:

[0046] 1.实验设计:设计11种耐受液浓度梯度:

[0047] Sb:0、50、100、300、600、800、1000、2000、3000、4000、5000、6000mg/L。

[0048] 2.耐受液原液配制:称取适量酒石酸锑钾($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22 μm 滤膜过滤待用。

[0049] 3.培养:取无菌96孔板,总体系为200 μL 体系,180 μL 培养基+20 μL 菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示。

[0050] 4. 测定生长曲线:菌液接种结束后,用封板膜将96孔板封好(防止异物掉进体系中),用酶标仪(型号Thermo Scientific MuLtiskan FC,测定0时刻的OD₆₀₀的值)25℃培养,每隔一定时间测定OD₆₀₀值,绘制菌株E9在不同浓度Sb胁迫下的生长曲线,如图2所示。芽孢杆菌在Sb浓度0~300mg/L条件下仍然可以快速生长,随着浓度增高,菌株生长变得缓慢。

[0051] 三、菌株E9对Hg的耐受性实验:

[0052] 1. 实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0053] Hg:0、1、5、10、20、30、40、50、60、80、100、200mg/L。

[0054] 2. 耐受液原液配制:称取适量氯化汞(HgCl₂)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22μm滤膜过滤待用。

[0055] 3. 培养:取无菌96孔板,总体系为200μL体系,180μL培养基+20μL菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示。

[0056] 4. 测定生长曲线:菌液接种结束后,用封板膜将96孔板封好(防止异物掉进体系中),用酶标仪(型号Thermo Scientific MuLtiskan FC,测定0时刻的OD₆₀₀的值)25℃培养,每隔一定时间测定OD₆₀₀值,绘制菌株E9在不同浓度Hg胁迫下的生长曲线,如图3所示。芽孢杆菌在Hg浓度0~50mg/L条件下生长为受到明显抑制,当汞浓度大于60mg/L时菌株生长受到抑制,但是仍然可以缓慢生长。

[0057] 四、菌株E9对As的耐受性实验:

[0058] 1. 实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0059] As:0、100、300、600、800、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000mg/L。

[0060] 2. 耐受液原液配制:称取适量亚砷酸钠(NaAsO₂)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22μm滤膜过滤待用。

[0061] 3. 培养:取无菌96孔板,总体系为200μL体系,180μL培养基+20μL菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示。

[0062] 4. 测定生长曲线:菌液接种结束后,用封板膜将96孔板封好(防止异物掉进体系中),用酶标仪(型号Thermo Scientific MuLtiskan FC,测定0时刻的OD₆₀₀的值)25℃培养,每隔一定时间测定OD₆₀₀值,绘制菌株E9在不同浓度As胁迫下的生长曲线,如图4所示。芽孢杆菌在Hg浓度0~7000mg/L条件下仍然可以生长,随着浓度增高,生长变得缓慢。

[0063] 实施例3

[0064] 一、菌株E9对Hg的挥发实验:

[0065] 1. 实验设计:测定5个时间点的汞挥发量

[0066] 时间点:0h、6h、18h、27h、53h

[0067] 2. 汞挥发培养基配制:称取适量氯化汞(HgCl₂)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22μm滤膜过滤除菌待用。

[0068] 3. 培养:取无菌的硼硅玻璃瓶,加入1.8mL培养基和200μL菌液,汞的浓度为10mg/L,接种结束后,25℃厌氧黑暗条件下培养。

[0069] 4. 测定Hg挥发率:在步骤1中的培养时间点,用无菌氮气把厌氧瓶上方气相中的汞捕集到对汞具有极强吸附能力的金管中,然后测定捕集到的汞浓度,即为汞的挥发量(如图5)。反应时间0-6h内,汞挥发量约6ng(初始汞量为14.82ng,因此汞挥发率=42.8%),随着反应时间延长,汞挥发量逐渐减少。

[0070] 二、菌株E9对Se的挥发实验：

[0071] 1. 硒挥发培养基配制：称取适量氯化汞 (HgCl_2) 粉末，用LB液体培养基配制，充分溶解后用0.22 μm 滤膜过滤除菌待用。

[0072] 3. 培养：取无菌的硼硅玻璃瓶，加入39mL培养基和1mL菌液，硒的浓度为60mg/L，接种结束后，25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养。

[0073] 4. 测定Se挥发率：培养7天后，用无菌高纯氮气把培养瓶上方气相中的挥发性硒形态从培养瓶中吹出，并用硝酸和过氧化氢(体积比为1:1)溶液捕集，利用LC-ICP-MS测定捕集液中的氧化产物为DMS₂SeA，为二甲基二硒醚氧化产物(图6)。经过计算之后，菌株产生挥发态的二甲基二硒醚的总量为191.8ng(挥发率=0.01%)。

[0074] 可见，本发明提供的芽孢杆菌*Bacillus* sp.能够耐受高浓度的重金属，尤其是Se、Sb、Hg和As。重要的是，该菌株能把毒性较高的二价离子汞还原成挥发性的、毒性较低的零价汞，还原率达到42%，此外也能甲基化硒，生成挥发性的二甲基二硒醚。因此，该菌株在重金属污染严重的环境，如土壤或污水中生存，对重金属进行脱毒，修复环境，并且不产生次生污染，对促进人体健康、环境保护及农业可持续发展有着重要意义。

[0075] 于本领域技术人员而言，显然本发明不限于上述示范性实施例的细节，而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下，能够以其他的具体形式实现本发明。因此，无论从哪一点来看，均应将实施例看作是示范性的，而且是非限制性的，本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定，因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0076] 此外，应当理解，虽然本说明书按照实施方式加以描述，但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案，说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见，本领域技术人员应当将说明书作为一个整体，各实施例中的技术方案也可以经适当组合，形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

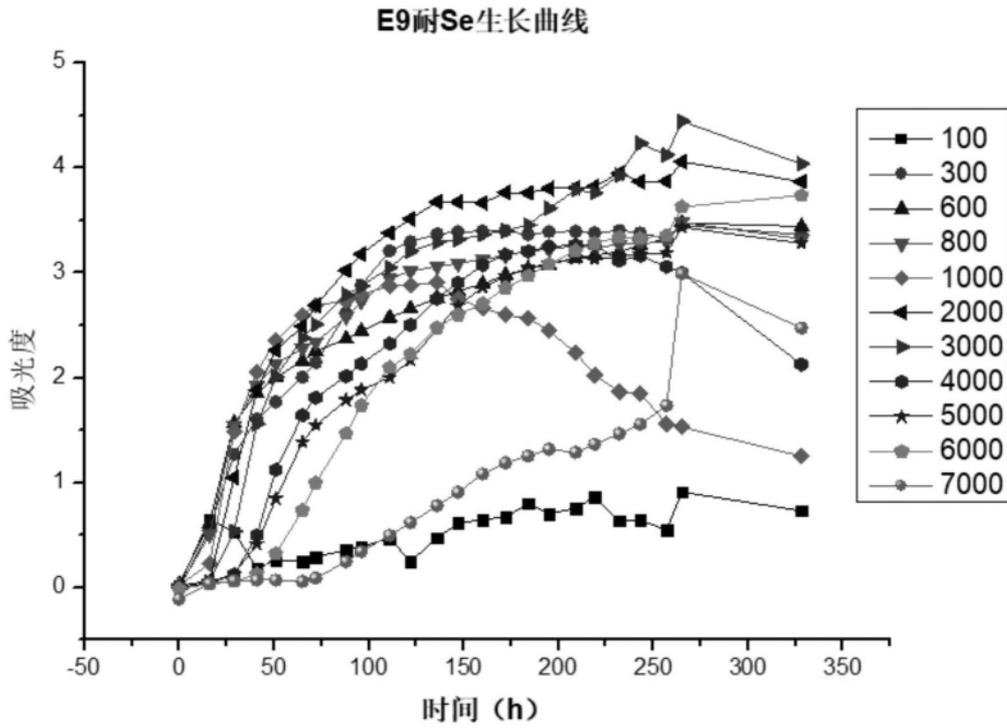


图1

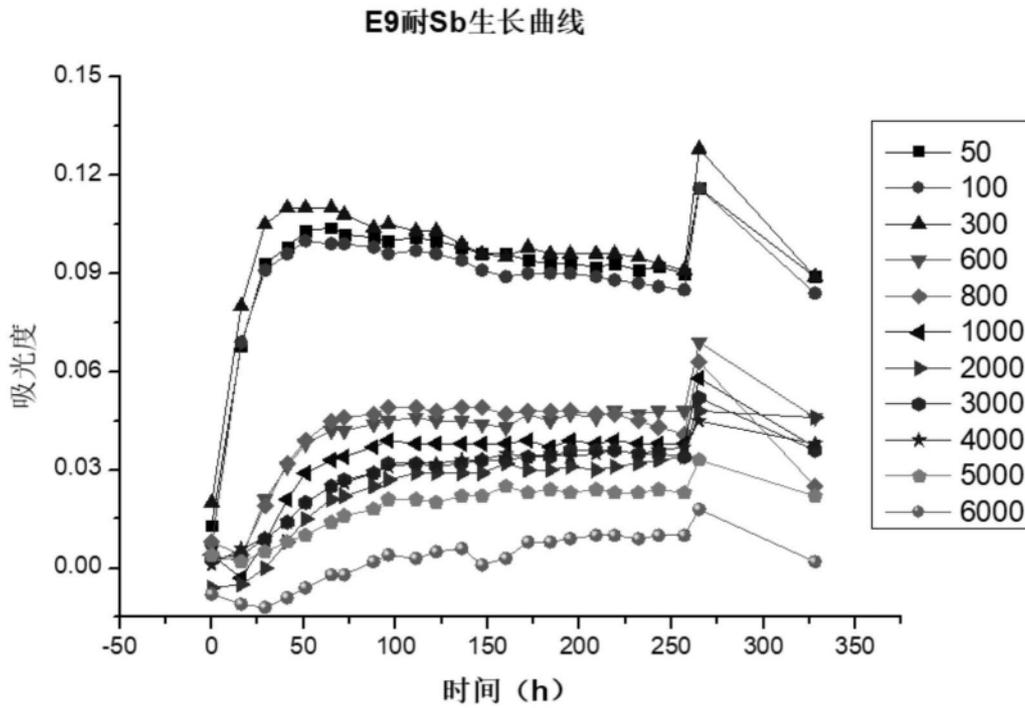


图2

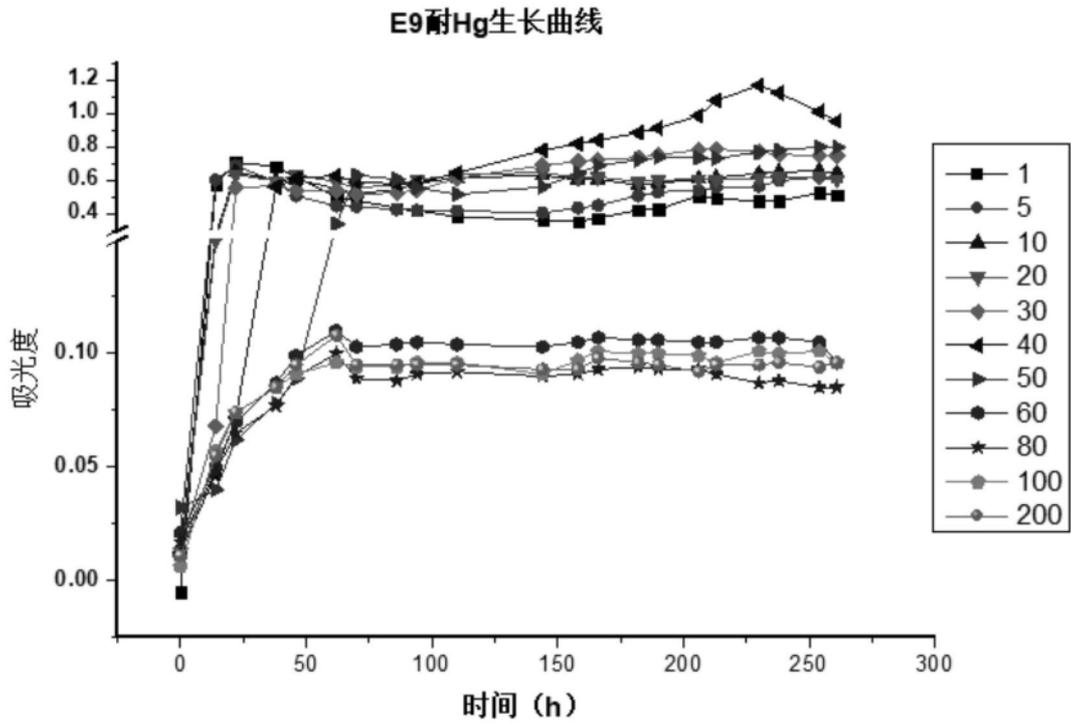


图3

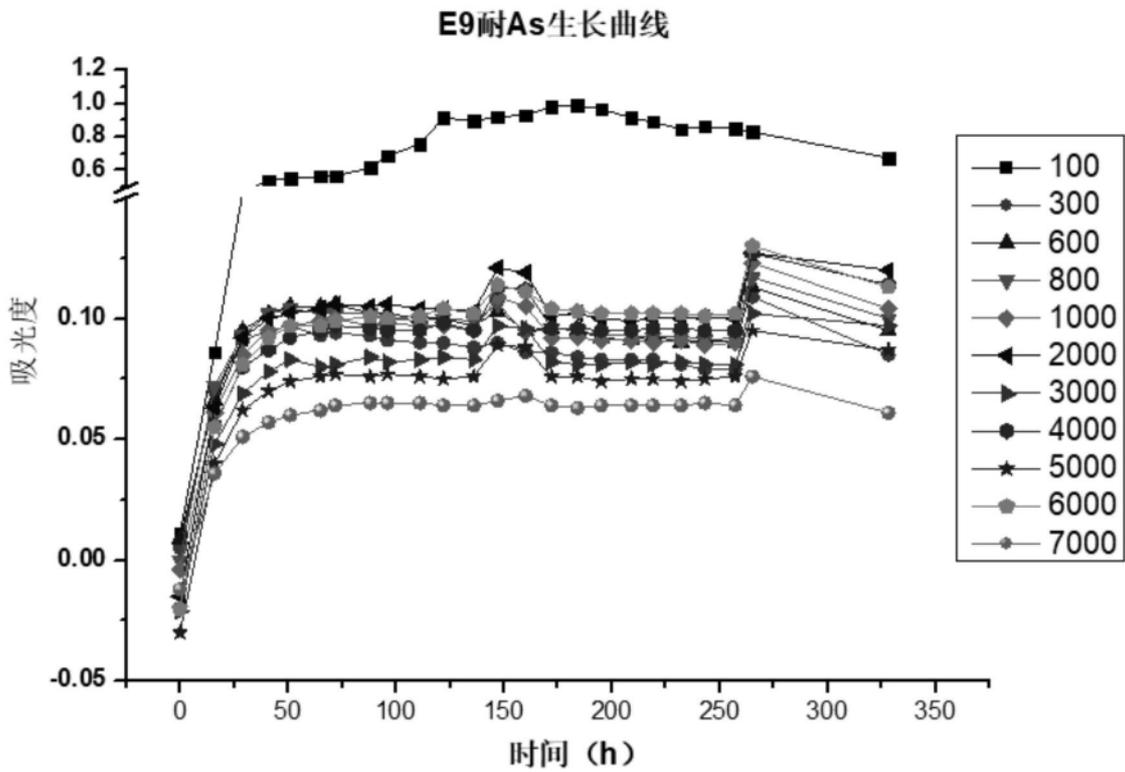


图4

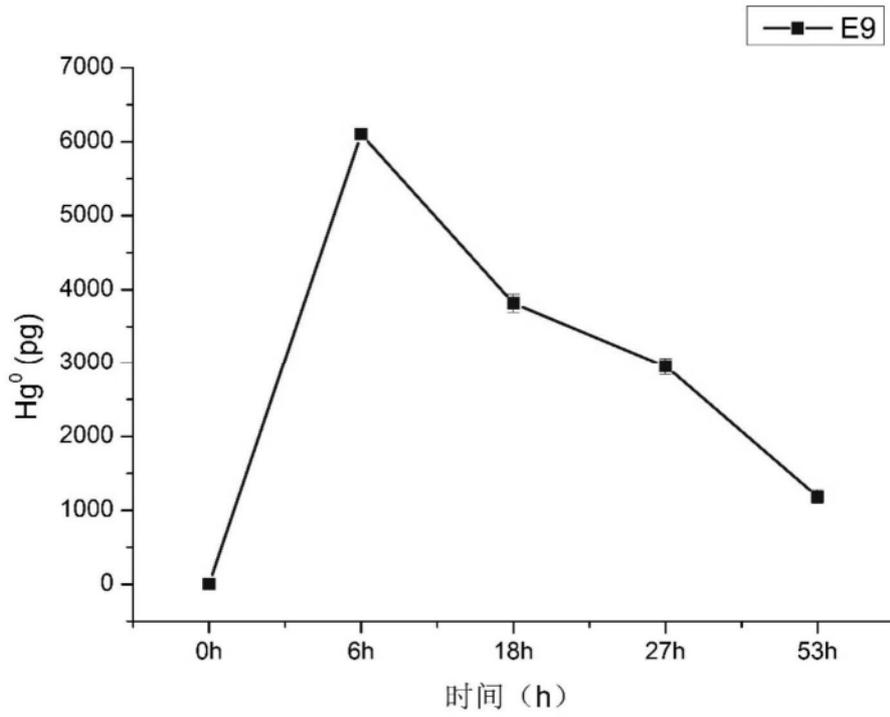


图5

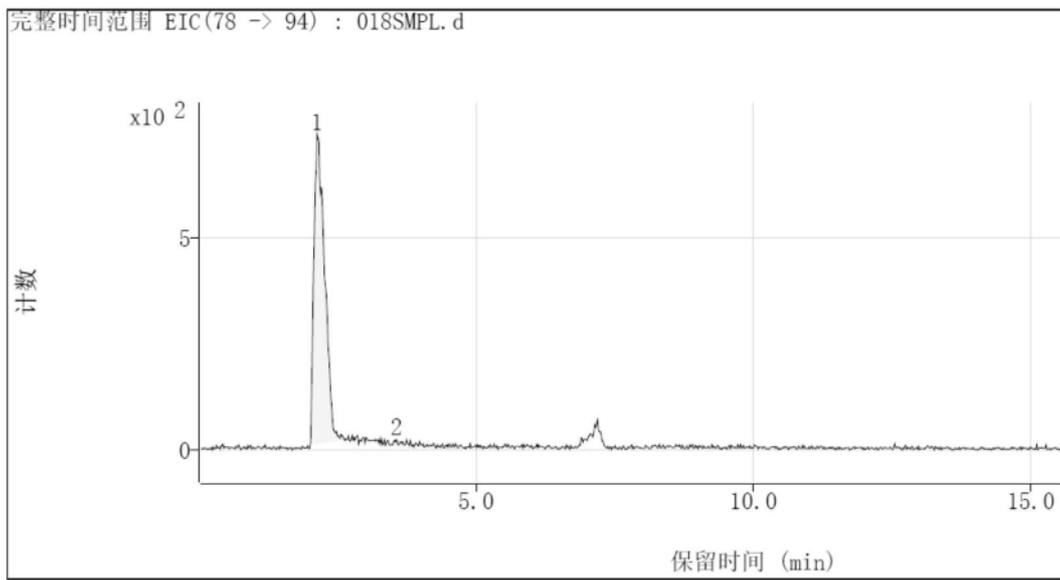


图6