



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116925949 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 24

(21) 申请号 202211602647.2

C12R 1/01 (2006.01)

(22) 申请日 2022.12.13

C02F 101/20 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M 20221613 2022.10.20

(71) 申请人 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 张华 吴青青 王宝林 胡海燕

(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)

B09C 1/10 (2006.01)

C02F 3/34 (2023.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图3页

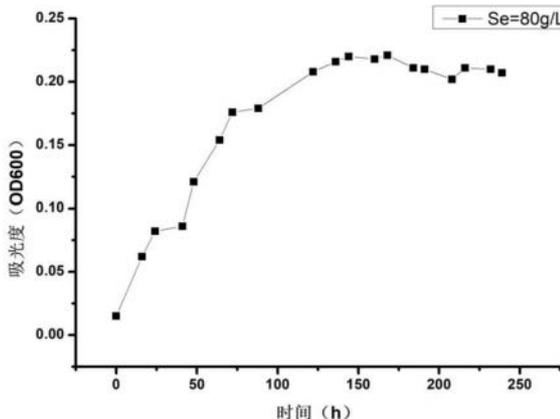
(54) 发明名称

一种产碱普罗威登斯菌、菌剂、及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种产碱普罗威登斯菌、菌剂、及其应用,属于生物工程技术领域,其中产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7)) 命名为H7,分类命名为*Providencia alcalifaciens* SK-R-073(H7),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 20221613。本发明提供的产碱普罗威登斯菌能够降解重金属,治理环境中重金属污染,并且不产生次生污染。

H7耐Se生长曲线



1. 一种产碱普罗威登斯菌 (*Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7)), 其特征在于, 所述产碱普罗威登斯菌分类命名为 *Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7), 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 20221613。

2. 一种菌剂, 其特征在于, 所述菌剂包括权利要求 1 所述的产碱普罗威登斯菌。

3. 权利要求 1 所述的产碱普罗威登斯菌, 或权利要求 2 所述的菌剂在对环境中重金属脱毒中的应用。

4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述重金属包括 Hg、Se、Sb 和 As 中的至少一种。

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

一种产碱普罗威登斯菌、菌剂、及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种产碱普罗威登斯菌、菌剂、及其应用。

背景技术

[0002] 产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)属于肠杆菌科普罗威登斯菌属,为革兰氏阴性,兼性厌氧,不出现集群,以周生鞭毛运动、氧化酶阴性、接触酶阳性的细菌。它广泛分布于自然界的水体和土壤中,也常见于水生动物、哺乳动物和人类肠道。通常通过水、鱼及贝类感染人类,可产生热稳定及不耐热肠毒素、细胞毒素、溶血素和血凝素等毒力因子。研究认为,该菌为条件致病菌,主要引起人类感染性腹泻、食物中毒及败血症等。

[0003] 环境重金属污染随着工业化发展日益严重。重金属不仅对生态系统和农业生产有害,还会通过食物链传递在动植物中逐级富集,从而危害人类健康。重金属难以从环境中去除,重金属的毒性与其化学形态密切相关,因此改变重金属化学形态从而降低重金属毒性是重金属污染治理的重要手段。环境中微生物在多种重金属的形态转化过程中具有重要作用。

发明内容

[0004] 本发明提供一种产碱普罗威登斯菌、菌剂、及其应用。

[0005] 为了达到上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0006] 第一方面,提供一种产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7)),其命名为H7,分类命名为*Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7),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 20221613。

[0007] 第二方面,提供一种包括上述产碱普罗威登斯菌的菌剂。

[0008] 第三方面,提供一种产碱普罗威登斯菌或菌剂在对环境(土壤和/或污水)中重金属脱毒中的应用。

[0009] 进一步地,重金属包括Hg、Se、Sb和As中的至少一种。

[0010] 本发明的有益效果为:

[0011] 本发明提供的产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens* SK-R-073 (H7))能够耐受高浓度的重金属,尤其是Se、Sb、Hg、As,能够在重金属污染严重的环境,如土壤或污水中生存,移除环境,如土壤或污水中重金属,修复环境,并且不产生次生污染。其对促进人体健康、环境保护及农业可持续发展具有重要意义。

附图说明

[0012] 图1实施例2提供的菌株H7在不同浓度Se胁迫下的生长曲线示意图;

[0013] 图2实施例2提供的菌株H7在不同浓度Sb胁迫下的生长曲线示意图;

- [0014] 图3实施例2提供的菌株H7在不同浓度Hg胁迫下的生长曲线示意图；
[0015] 图4实施例2提供的菌株H7在不同浓度As胁迫下的生长曲线示意图。
图5为实施例2提供的菌株H7在不同时间点下的Hg挥发量曲线示意图。

具体实施方式

[0016] 下面对本发明的具体实施方式进行了描述,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。

[0017] 实施例1

[0018] 一、分离及培养条件

[0019] 培养基:LB肉汤培养基和LB琼脂培养基

[0020] 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℃)

[0021] 分离培养基:含汞的LB琼脂培养基(汞浓度=100mg/L)

[0022] 培养条件:厌氧、25℃

[0023] 二、稻田土壤耐Hg厌氧微生物分离

[0024] 1. 制作厌氧液体培养基:称取适量LB培养基,用无氧水溶解,再加入0.1%刃天青溶液。取干净的30mL血清瓶,在氮气条件下往瓶中分装10mL LB培养基,再套上胶塞和铝盖封口,之后121℃,30min灭菌处理备用。

[0025] 2. 配置重金属耐受培养基:称取适量氯化汞粉末(HgCl_2),用无氧水溶解,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. 除氧:将实验所需物品灭菌后放置厌氧手套箱中。

[0027] 4. 稀释:将贵州省万山汞矿区四坑稻田中采集的1g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,之后放入厌氧手套箱中静置20分钟,土壤沉淀,得到上清液。

[0028] 5. 接种:用无菌注射器取100μL步骤4中上清液加入步骤2中含Hg培养基中,每组2个平行+一对照组(不接种上清液)(3×3=9瓶);之后25℃培养3天之后,培养液浑浊(对照组不浑浊)。

[0029] 6. 再接种:用无菌注射器取100μL步骤5中浑浊液接种到新的含Hg培养基(确认菌对汞的耐性),25℃培养。

[0030] 7. 稀释:将步骤6中第二次接种的菌液进行稀释,用取100μL菌液到900μL无菌水中,混匀(10^{-1}),再逐级稀释,直到 10^{-6} 。

[0031] 8. 涂布:用镊子夹小玻璃珠放置在LB琼脂平板上,取200μL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℃培养,每个浓度做两个平行(6×2=36个)。

[0032] 9. 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(1μL)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。

[0033] 10. 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。

[0034] 11. 富集:确定菌落纯净后(即没有杂菌生长在一起),用1 μ L的接种环挑取一点纯净菌落接种到液体LB中富集(2mL离心管装),再用注射器取菌液注射到血清瓶中,于25 $^{\circ}$ C培养。

[0035] 12. 保种: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 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 三、产碱普罗威登斯菌的鉴定

[0037] 鉴定:16S rDNA序列如SEQ ID NO.1所示:

[0038] GTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGG
AAGCTTGCTTCTCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTAC
TGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAATCTCTAAGGAGCAAAGCAGGGGAACTTCGGTCCTTGCCTATCGGATGAA
CCCATATGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTTGGGAGGAAGGCGTTGA
TGCTAATATCATCAACGATTGACGTTACCAACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCC
CCGGGCTTAACCTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGC
GAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTTCC
CTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAT
GAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTT
GACATCCAGAGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACATTATGGTGG
GAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTACGT
CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAA
CCTTCGG。

[0039] 经过16S rDNA序列测序分析后,该菌株被鉴定为*Providencia*,推测为*Providencia alcalifaciens* H7。

[0040] 实施例2

[0041] 一、菌株H7对Se的耐受性实验:

[0042] 1. 实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0043] Se:0、100、500、1000、2000、4000、6000、8000、10000、80000、120000mg/L。

[0044] 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 μ m滤膜过滤待用。

[0045] 3. 培养:取无菌96孔板,总体系为200 μ L体系,180 μ L培养基+20 μ L菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示,接种结束后,在每个孔上面加入50 μ L无菌石蜡油(密封隔绝氧气)。

[0046] 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℃培养,每隔一定时间测定 OD_{600} 值,绘制菌株H1在不同浓度Se胁迫下的生长曲线,如图1所示。产碱普罗威登斯菌在Se浓度0~80000mg/L条件下仍然可以生长,随着浓度增高,生长变得缓慢,最高耐受剂量为Se浓度80000mg/L。

[0047] 二、菌株H7对Sb的耐受性实验:

[0048] 1.实验设计:设计11种耐受液浓度梯度:

[0049] Sb:0、100、400、800、1000、2000、4000、6000、8000、10000、18000mg/L。

[0050] 2.耐受液原液配制:称取适量酒石酸锑钾($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22 μ m滤膜过滤待用。

[0051] 3.培养:取无菌96孔板,总体系为200 μ L体系,180 μ L培养基+20 μ L菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示,接种结束后,在每个孔上面加入50 μ L无菌石蜡油(密封隔绝氧气)。

[0052] 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℃培养,每隔一定时间测定 OD_{600} 值,绘制菌株H1在不同浓度Sb胁迫下的生长曲线,如图2所示。产碱普罗威登斯菌在Sb浓度0~18000g/L条件下仍然可以生长,随着浓度增高,生长变得缓慢,最高耐受剂量为Sb浓度17500g/L。

[0053] 三、菌株H7对Hg的耐受性实验:

[0054] 1.实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0055] Hg:0、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300mg/L。

[0056] 2.耐受液原液配制: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 μ m滤膜过滤待用。

[0057] 3.培养:取无菌96孔板,总体系为200 μ L体系,180 μ L培养基+20 μ L菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示,接种结束后,在每个孔上面加入50 μ L无菌石蜡油(密封隔绝氧气)。

[0058] 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℃培养,每隔一定时间测定 OD_{600} 值,绘制菌株H1在不同浓度Hg胁迫下的生长曲线,如图3所示。产碱普罗威登斯菌在Hg浓度0~300mg/L条件下仍然可以生长,随着浓度增高,生长变得缓慢,最高耐受剂量为Hg浓度300mg/L。

[0059] 四、菌株H7对As的耐受性实验:

[0060] 1.实验设计:设计12种耐受液浓度梯度:

[0061] As:0、100、500、1000、2000、40000、6000、8000、10000、30000、50000、80000mg/L。

[0062] 2.耐受液原液配制:称取适量亚砷酸钠($NaAsO_2$)粉末,用LB液体培养基配制,充分溶解后用0.22 μ m滤膜过滤待用。

[0063] 3.培养:取无菌96孔板,总体系为200 μ L体系,180 μ L培养基+20 μ L菌液,使得体系重金属浓度如步骤1所示,接种结束后,在每个孔上面加入50 μ L无菌石蜡油(密封隔绝氧气)。

[0064] 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℃培养,每隔一定时间测定 OD_{600} 值,绘制菌株H1在不同浓度As胁迫下的生长曲线,如图4所示。产碱普罗威登斯菌在Hg浓度0~30000mg/L条件下仍然可以生长,随着浓度增高,生长变得缓慢,

最高耐受剂量为As浓度30000mg/L。

[0065] 五、菌株H7对Hg的挥发实验：

[0066] 1. 实验设计：测定5个时间点的汞挥发量

[0067] 时间点：0h、9h、24h、48h、58h

[0068] 2. 汞挥发培养基配置：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。

[0069] 3. 培养：取无菌的厌氧硼硅玻璃瓶，加入1.8mL培养基和200 μL 菌液，汞的浓度为10ng/mL，接种结束后，25 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧黑暗条件下培养。

[0070] 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)。

[0071] 本发明提供的产碱普罗威登斯菌 (*Providencia alcalifaciens*) 能够耐受高浓度的重金属，尤其是Se、Sb、Hg、As，能够在重金属污染严重的环境，如土壤或污水中生存，移除环境，如土壤或污水中重金属，修复环境，并且不产生次生污染。其对促进人体健康、环境保护及农业可持续发展具有重要意义。

[0072] 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。

[0073] 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。

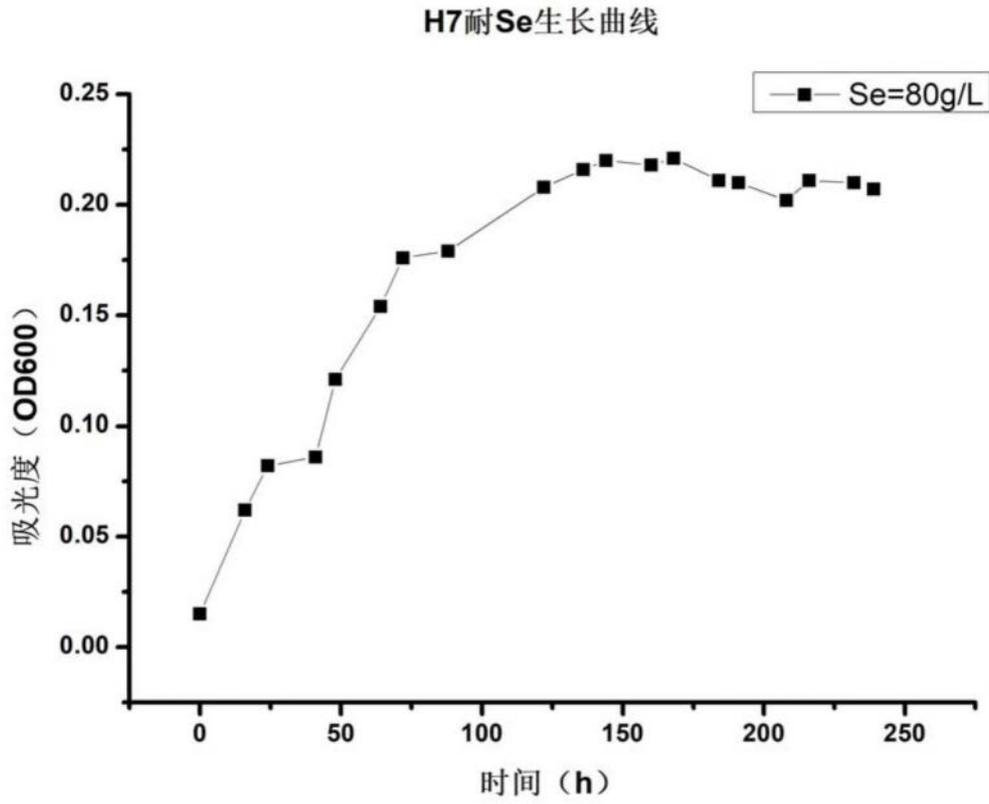


图1

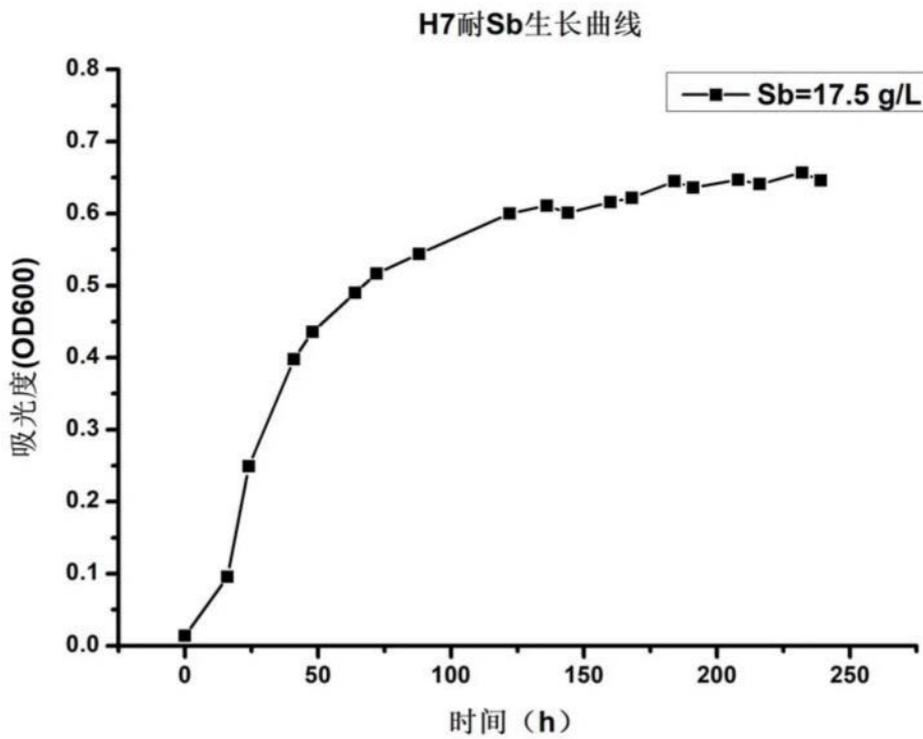


图2

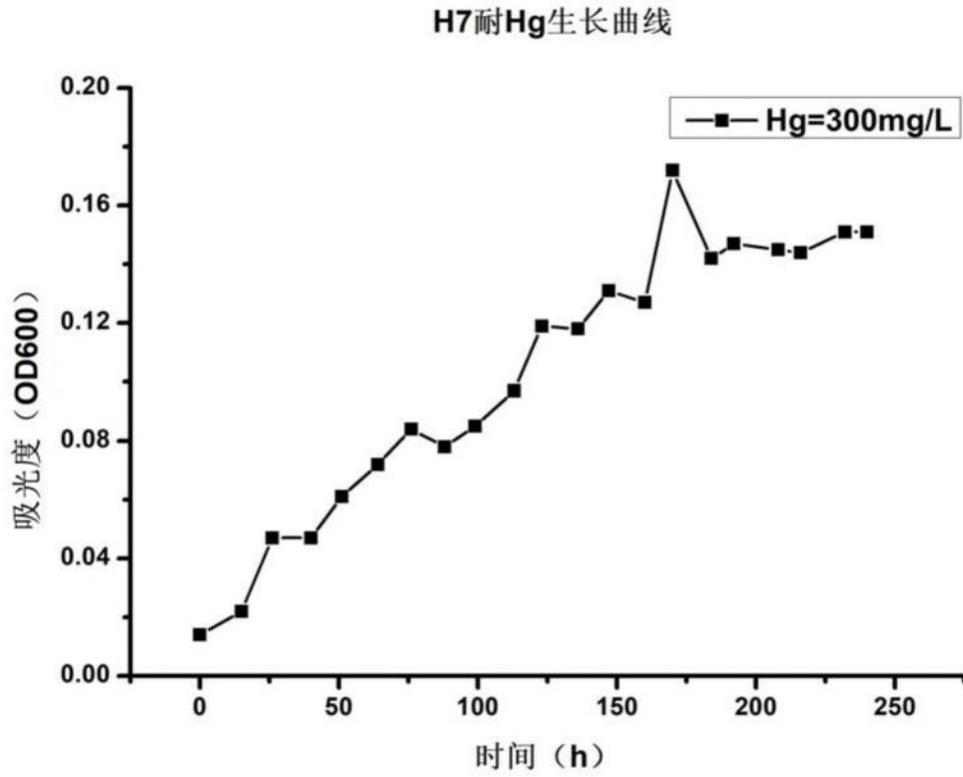


图3

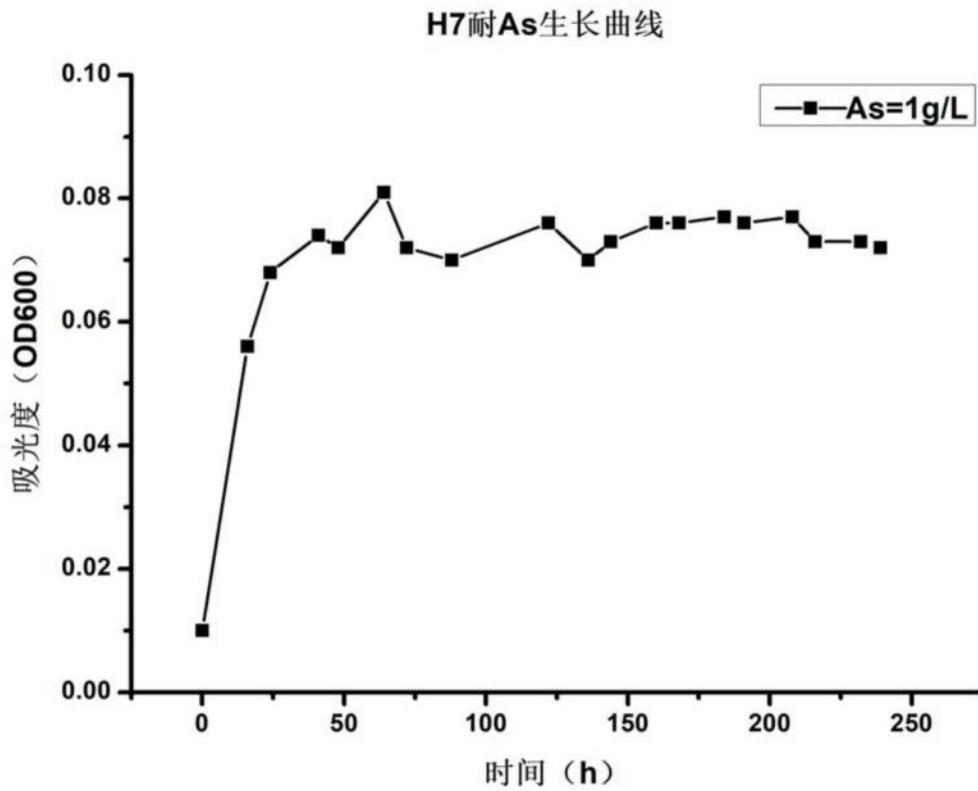


图4

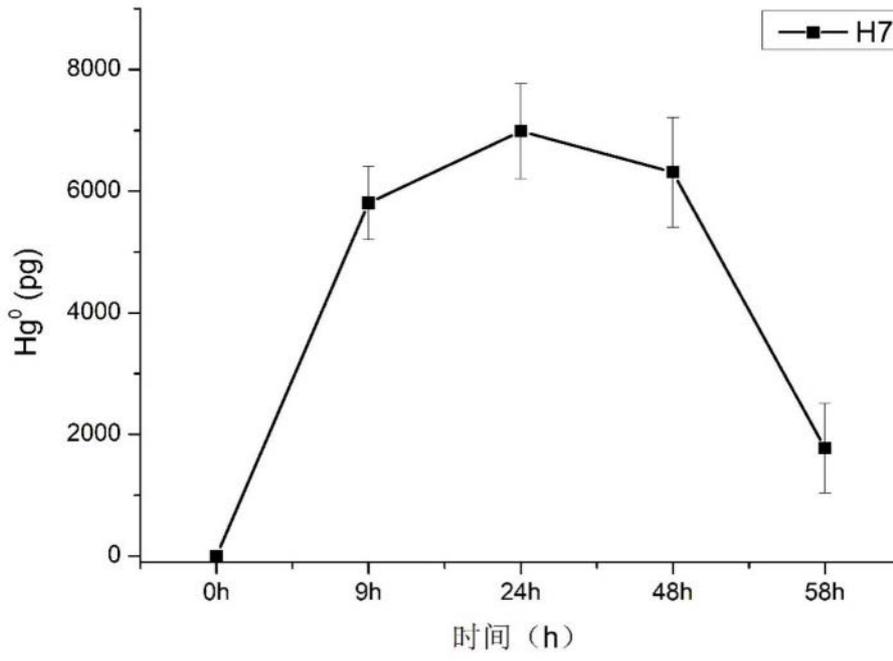


图5