



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114231471 A

(43) 申请公布日 2022.03.25

(21) 申请号 202210154660.X

(22) 申请日 2022.02.21

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.24039 2021.12.06

(71) 申请人 江苏朴厚环境工程有限公司

地址 210000 江苏省南京市玄武区童卫路5号南理工科技创新园区4号楼三层

(72) 发明人 邱沪生 杨倩 刘珍珍

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237

代理人 仲凌霞 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

C02F 101/34 (2006.01)

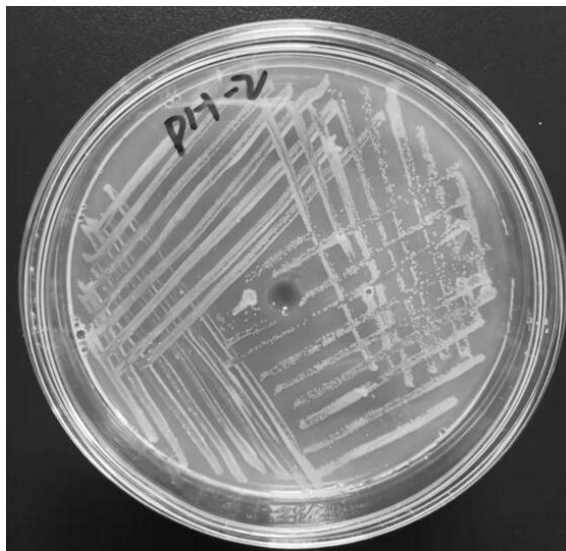
权利要求书1页 说明书4页  
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用

(57) 摘要

本发明属于化工废水生物处理领域,具体公开了一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用。所述株弯曲假单胞菌,其分类命名为弯曲假单胞菌(*Pseudomonas geniculata*),菌株名为PH-2,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2021年12月6日,保藏编号为CGMCC No.24039。本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2可以应用于高盐化工废水中且耐受低温条件。本发明所制备的菌剂具有生产使用成本低,使用方便,去除效果好的优点,适合在全国的化工废水处理中降解甲基异丁酮。本发明利用微生物的方法降解有机污染物,对化工园区废水处理提标具有重要意义。



1. 一株弯曲假单胞菌,其分类命名为弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas geniculata*),菌株名为PH-2,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2021年12月6日,保藏编号为CGMCC No.24039。

2. 一种微生物菌剂,其特征在于,由权利要求1所述弯曲假单胞菌制得。

3. 权利要求2所述微生物菌剂的制备方法,其特征在于,将权利要求1所述弯曲假单胞菌的种子液接种到发酵培养基中培养,即得所述微生物菌剂。

4. 根据权利要求3所述微生物菌剂的制备方法,其特征在于,所述发酵培养基的组成为甲基异丁酮2g/L,葡萄糖8g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5g/L,  $\text{NaCl}$  1g/L,  $\text{CaCO}_3$  0.5g/L,酵母膏2g/L,pH值为7.2~7.5。

5. 根据权利要求3所述微生物菌剂的制备方法,其特征在于,所述发酵的过程中,空气的通气量与发酵培养基的体积比为1:0.6~1.2,搅拌速度为180~240转/分,培养温度为30~35℃。

6. 权利要求1所述弯曲假单胞菌,或权利要求2所述微生物菌剂,或权利要求3~5中任意一项所述微生物菌剂的制备方法制备得到的微生物菌剂在降解甲基异丁酮中的应用。

7. 根据权利要求6所述应用,其特征在于,所述应用为在处理含甲基异丁酮的化工废水中的应用。

8. 根据权利要求6所述应用,其特征在于,所述降解的温度为5~35℃。

9. 根据权利要求6所述应用,其特征在于,待降解物中,氯化钠的浓度为0.1~10.5g/L。

10. 根据权利要求6所述应用,其特征在于,所述降解的时间为4~72h。

## 一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于化工废水生物处理领域,具体涉及一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着化工行业的不断发展,化工生产中所产生的废水量大幅增加,化工废水对于环境的污染不断加剧。化工生产过程中排放的废水具有结构复杂、难以降解、有毒等特点,为此其处理过程非常复杂,处理投入的资本也很高。由于在化工生产过程中,经常涉及调酸、调碱或酸碱中和等操作,所以化工生产废水往往存在高盐的特点,有些废水中的氯化钠含量会高达10%-20%,对生化处理过程造成严重抑制。

[0003] 生化处理技术作为治理水环境污染公认的最经济、最有效的方法,其最核心的技术在于高效的微生物菌剂。目前常规的微生物菌剂的获得方式有通过所需要种类微生物的定向纯化培养或者富集筛选培养以及从活性污泥法中定向培养获得。针对污水中特定污染物降解的纯化培养的微生物,虽然培养纯度、浓度较高,培养速度较快,但是投放至被处理污水中,但实际废水(尤其是化工废水)中的高盐、高毒等环境会对这类菌株有一定程度毒害作用,从而使得该纯化菌种很难适应,甚至死亡。同时,受季节和地域影响,很多污水处理装置在运行过程中会出现温度较低(甚至低于15℃),虽然可以通过保温加温等处理提高运行温度,但往往还是会对一些特定驯化的菌株有明显的抑制作用。

[0004] 甲基异丁酮(MIBK)是一种性能优良的中沸点溶剂和化工中间体,广泛用于化工合成过程,水中溶解度约17000mg/L,应用过程中难以回收,基本随废水排放。由于其性质稳定,一般生化处理难以降解。随着环保形势的严峻化,全国范围化工园区都在整治提标,COD等污染指标的排放浓度也将会逐渐降低,以提高排放标准。目前关于MIBK的降解菌株还鲜有报道,因此本发明以MIBK为目标污染物,在高盐和低温环境进行菌株驯化,获得一株耐低温高盐的MIBK高效菌株,并应用于化工废水处理中,为MIBK高效降解微生物的应用提供理论和技术支持,为MIBK环境污染的生物修复提供一种新的微生物资源。

### 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,提供一株弯曲假单胞菌。

[0006] 本发明还要解决的技术问题是提供一种微生物菌剂。

[0007] 本发明还要解决的技术问题是提供上述微生物菌剂的制备方法。

[0008] 本发明进一步要解决的技术问题是提供上述弯曲假单胞菌以及上述微生物菌剂的应用。

[0009] 为了解决上述第一个技术问题,本发明公开了一株弯曲假单胞菌,其分类命名为弯曲假单胞菌(*Pseudomonas geniculata*),菌株名为PH-2,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2021年12月6日,保藏地址为北京市朝阳区,保藏编号为CGMCC No.24039。

[0010] 为了解决上述第二个技术问题,本发明公开了一种微生物菌剂,其由上述弯曲假单胞菌制得。

[0011] 为了解决上述第三个技术问题,本发明公开了上述微生物菌剂的制备方法,即将上述弯曲假单胞菌的种子液接种到发酵培养基中培养,即得所述微生物菌剂。

[0012] 其中,所述种子液的制备方法包括:斜面种—摇瓶种—种子罐,具体为将上述弯曲假单胞菌接种于添加甲基异丁酮的LB培养基(NaCl 10.00g/L,蛋白胨10.00g/L,酵母粉5.00g/L,甲基异丁酮2g/L,pH7.0)中,振荡培养至对数期;所得菌种按10%的接种量接种入种子罐(所述种子罐的培养基与上述发酵培养基相同),培养至对数生长期(相应的培养参数与上述发酵培养基中培养的参数相同),即种子液。

[0013] 其中,所述培养基的组成为甲基异丁酮2g/L,葡萄糖8g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/L,MgSO<sub>4</sub> 0.5g/L,NaCl 1g/L,CaCO<sub>3</sub> 0.5g/L,酵母膏2g/L,pH值为7.2~7.5。

[0014] 其中,所述发酵过程中,空气的通气量与发酵培养基的体积比为1:0.6~1.2,搅拌速度为180~240转/分,培养温度为30~35℃。

[0015] 其中,所述菌剂可以是发酵完成后的发酵液;所述微生物菌剂为直接用塑料包装桶或包装瓶分装成液体剂型,或采用泥炭吸附用包装袋分装成固体菌剂剂型。

[0016] 为了解决上述第四个技术问题,本发明公开了上述弯曲假单胞菌,或上述微生物菌剂,或上述方法制备得到的微生物菌剂在降解甲基异丁酮中的应用。

[0017] 其中,所述应用为在处理含甲基异丁酮的化工废水中的应用。

[0018] 其中,所述降解的温度为5~35℃,优选为10~25℃。

[0019] 其中,待降解物中,氯化钠的浓度为0.1~10.5g/L,优选为0.5~10g/L。

[0020] 其中,所述降解的时间为4~72h。

有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优势:

本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2可以应用于高盐化工废水中且耐受低温条件。所制备的菌剂具有生产使用成本低,使用方便,去除效果好的优点,适合在全国的化工废水处理中降解甲基异丁酮(MIBK)。本发明是利用微生物的方法降解有机污染物,化工园区废水处理提标具有重要意义。

## 附图说明

[0021] 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。

[0022] 图1为本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2在LB固体培养基的菌落形态。

[0023] 图2为本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2对盐度的耐受性。

[0024] 图3为温度对本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2降解效果的影响。

[0025] 图4为弯曲假单胞菌PH-2在化工废水处理中的应用。

## 具体实施方式

[0026] 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。

[0027] 下述实施例中所述接种量均为按照相应体积比进行接种。

[0028] 实施例1:弯曲假单胞菌PH-2的分离筛选

取从江苏的某农药企业(该企业部分产品生产过程中利用MIBK作为原料溶剂)生产车间的废水处理池中得到的活性污泥3.0ml加入100ml甲基异丁酮浓度为200mg/L的含有甲基异丁酮的无机盐配培养基中,其配方为:NaCl 5.0g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.96g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g,去离子水补足至1000 mL, pH 7.0~7.2,在121℃下灭菌20 min,10℃条件下振荡培养,每隔10天按3%的接种量转接到新鲜的无机盐培养基中,连续转接5次。

[0029] 取上面得到的富集菌液1.0ml,加入9.0ml无菌水中,配成 $10^{-1}$ 的富集液,再吸取1.0ml配好的 $10^{-1}$ 的富集液加入9.0ml无菌水中,充分混匀配成 $10^{-2}$ 的富集液,以此类推,对富集液进行梯度稀释。吸取各梯度的稀释液0.1ml涂布于含MIBK的浓度200mg/L无机盐固体培养基(配方如上),30℃培养10天。10天后从以上的无机盐固体培养基上挑取单菌落,于3.0ml的LB液体培养基中培养24小时后,LB液体培养基配方为:甲基异丁酮2g/L,NaCl 10.00g/L,蛋白胨10.00g/L,酵母粉5.00g/L,pH7.0;于8000r/min的条件下离心2min,倒去上清液,加入3.0ml的无菌水摇匀,仍于8000r/min的条件下离心2min,按此方法用无菌水洗两遍后,加入3.0ml无菌水重悬该菌。吸取1.0ml该菌液加入100ml甲基异丁酮浓度为200mg/L的无机盐液体培养基中(配方为:每升含200mg甲基异丁酮,1.50g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.50g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.20g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.00g NaCl、1.00g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,20.00g 琼脂, pH 7.0),于160r/min,30℃条件下振荡培养96h后,用气相色谱测其降解效果。将降解效率较高的一株菌株保存即弯曲假单胞菌PH-2(保藏号为CGMCC No.24039),其在LB固体培养基的菌落形态如图1所示,进行后续实验。

[0030] 实施例2:本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2对盐度的耐受性

分别配置含有不同NaCl浓度的无机盐液体培养基(配方为:每升含200mg甲基异丁酮,1.50g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.50g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.20g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.00g NaCl、1.00g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,20.00g 琼脂,pH 7.0),121℃灭菌20min冷却后,按照1%的比例加入实施例1中弯曲假单胞菌PH-2的菌液(即3.0ml无菌水重悬该菌),于160r/min,30℃培养96h,分别检测无机盐液体培养基中MIBK的浓度以及LB液体培养基中菌液浓度。结果如图2所示,在0.5~10g/L氯化钠的浓度下,弯曲假单胞菌PH-2均能有效降解MIBK。

[0031] 实施例3:温度对本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2降解效果的影响

配置甲基异丁酮浓度为200mg/L的无机盐液体培养基中(配方为:每升含200mg甲基异丁酮,1.50g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.50g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.20g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.00g NaCl、1.00g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,20.00g 琼脂,pH 7.0),121℃灭菌20min冷却后,按照1%的比例加入实施例1中弯曲假单胞菌PH-2的菌液(即3.0ml无菌水重悬该菌),设置转速160r/min,分别至于10℃、15℃、20℃、25℃和30℃条件下振荡培养96h后,用气相色谱测其降解效果。结果如图3所示,在10~30℃下,弯曲假单胞菌PH-2均能有效降解MIBK。

[0032] 实施例4:本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2对化工废水中MIBK的处理效果

将本发明所述的弯曲假单胞菌PH-2菌液(即3.0ml无菌水重悬该菌)按照0.5%的接种量接种于江苏某农药企业生产废水中(经测定,该废水中甲基异丁酮浓度为252mg/L,氯

化钠浓度7528mg/L),该企业在生产过程中利用甲基异丁酮作为原料溶剂,使用后不回收。将接种后的废水分别至于10℃和25℃条件下,测定废水中甲基异丁酮浓度。结果如图4所示,在一定时间后弯曲假单胞菌PH-2在10℃和25℃均能有效降解MIBK。

[0033] 实施例5:PH-2菌剂的制备:

1)将弯曲假单胞菌PH-2菌液接种于添加甲基异丁酮的LB培养基(NaCl 10.00g/L,蛋白胨10.00g/L,酵母粉5.00g/L,甲基异丁酮2g/L)中,30℃振荡培养至对数期;

2)将步骤1)培养好的菌种按10%的接种量接种入种子罐(甲基异丁酮2g/L,葡萄糖8g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g/L,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g/L,MgSO<sub>4</sub> 0.5g/L,NaCl 1g/L%,CaCO<sub>3</sub> 0.5g/L,酵母膏2g/L,pH值为7.2~7.5),培养至对数生长期,即种子液;

3)将步骤2)所述种子液按10%的接种量接入生产罐进行发酵培养,生产罐所用培养基与种子罐培养基相同,无菌空气的通气量为1:0.8,搅拌速度为240转/分,培养温度为30℃,步骤2)和步骤3)的整个工艺流程培养时间为60小时,发酵完成后的培养液即为菌剂;所述菌剂直接分装成液体剂型,或采用泥炭吸附用包装袋分装成固体菌剂剂型。

[0034] 综上,本发明分离到一株可以在低温高盐条件下降解甲基异丁酮的高效菌株PH-2,该菌株在氯化钠含量10g/L以及最低10℃条件下96h内降解200mg/L甲基异丁酮,降解率达到80%以上,以解决高盐化工废水中低温条件下甲基异丁酮的处理问题。

[0035] 本发明提供了一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用的思路及方法,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。

## 序列表

|       |  |      |
|-------|--|------|
| <110> | 江苏朴厚环境工程有限公司   |      |
| <120> | 一株化工溶剂降解菌弯曲假单胞菌PH-2及其在化工废水处理中的应用                                   |      |
| <160> | 1  |      |
| <170> | SIPOSequenceListing 1.0  |      |
| <210> | 1  |      |
| <211> | 1445   |      |
| <212> | DNA  |      |
| <213> | 弯曲假单胞菌 ( <i>Pseudomonas geniculata</i> )                           |      |
| <400> | 1  |      |
|       | gcggggcggt agctacacat gcagtcgaac ggcagcacag gagagcttgc tcctctgggt  | 60   |
|       | ggcgagtggc ggacgggtga ggaatacatc ggaatctact ctgtcgtggg ggataacgta  | 120  |
|       | gggaaactta cgctaatacc gcatacgacc tacgggtgaa agcaggggat cttecgacct  | 180  |
|       | tgcgcgattg aatgagccga tgtcggatta gctagttggc ggggtaaagg cccaccaagg  | 240  |
|       | cgacgatccg tagctggtct gagaggatga tcagccacac tggaactgag acacggtcca  | 300  |
|       | gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttggacaatg ggcgcaagcc tgatccagcc  | 360  |
|       | ataccgcgtg ggtgaagaag gccttcgggt tgtaaagccc ttttgttggg aaagaaatcc  | 420  |
|       | agctggctaa tacccggttg ggatgacggt acccaaagaa taagcaccgg ctaacttcgt  | 480  |
|       | gccagcagcc gcgtaatac gaagggtgca agcgttactc ggaattactg ggcgtaaagc   | 540  |
|       | gtgcgtaggt ggtcgtttaa gtccgttgtg aaagccctgg gctcaacctg ggaactgcag  | 600  |
|       | tggatactgg gcgactagag tgtggtagag ggtagcggaa ttcttggtgt agcagtgaaa  | 660  |
|       | tgcgtagaga tcaggaggaa catccatggc gaaggcagct acctggacca aactgacac   | 720  |
|       | tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa  | 780  |
|       | cgatgcgaac tggatgttgg gtgcaatttg gcacgcagta tcgaagctaa cgcgttaagt  | 840  |
|       | tcgccgcctg gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaa ggaattgacg ggggccgca    | 900  |
|       | caagcgggtg agtatgtggt ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc tggccttgac  | 960  |
|       | atgtcgagaa ctttccagag atggatcggg gccttcggga actcgaacac aggtgctgca  | 1020 |
|       | tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct  | 1080 |
|       | tgctccttagt tgccagcacg taatggtggg aactctaagg agaccgccgg tgacaaaccg | 1140 |
|       | gaggaagggtg gggatgacgt caagtcatca tggcccttac ggccagggt acacacgtac  | 1200 |
|       | tacaatggta gggacagagg gctgcaagcc ggcgacggta agccaatccc agaaacccta  | 1260 |
|       | tctcagtccg gattggagtc tgcaactcga ctccatgaag tcggaatcgc tagtaatcgc  | 1320 |
|       | agatcagcat tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca  | 1380 |
|       | tgggagtttg ttgcaccaga agcaggtagc ttaaccttcg ggagggcgct gccacgtgac  | 1440 |
|       | cggtg  | 1445 |

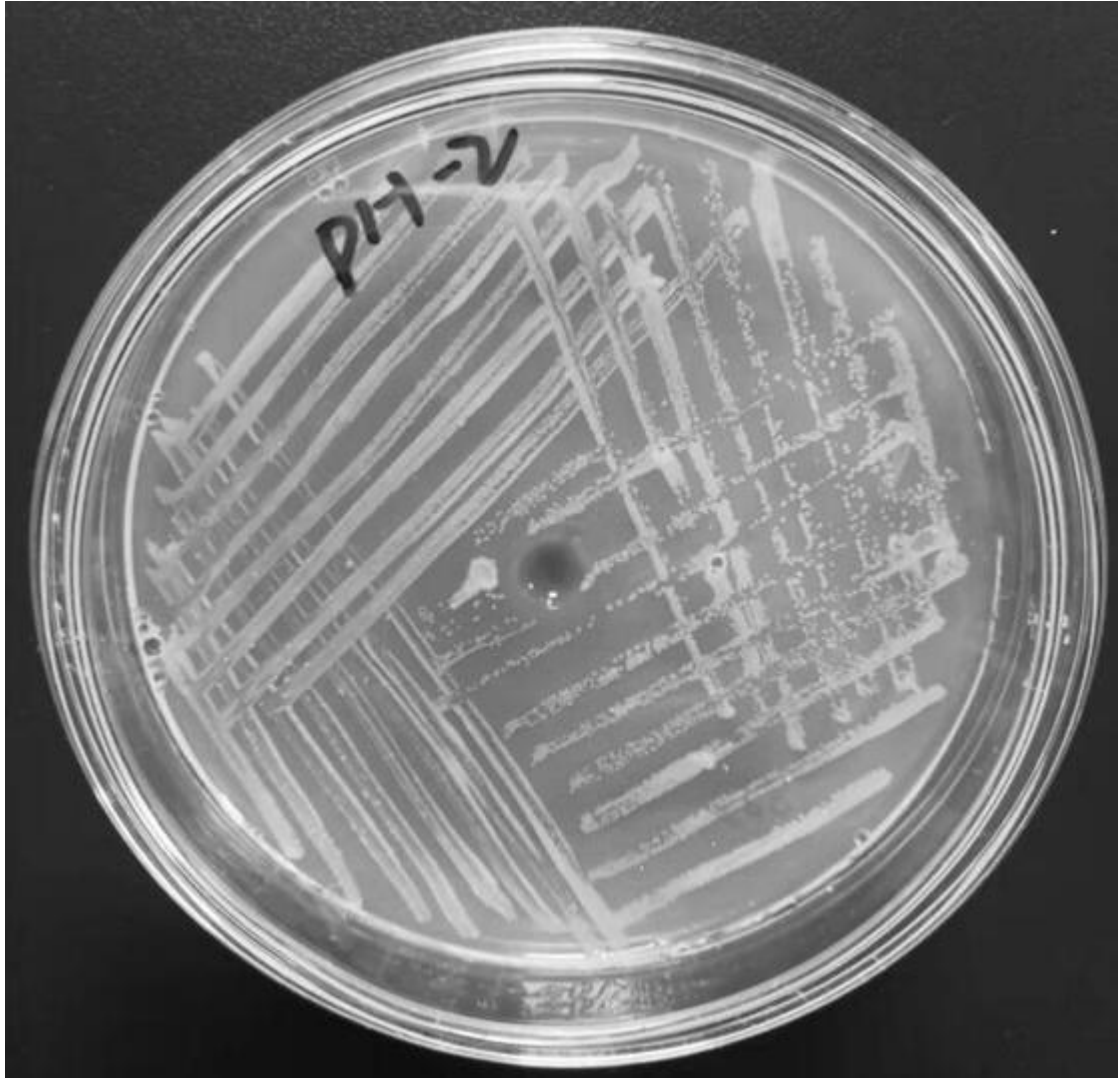


图1



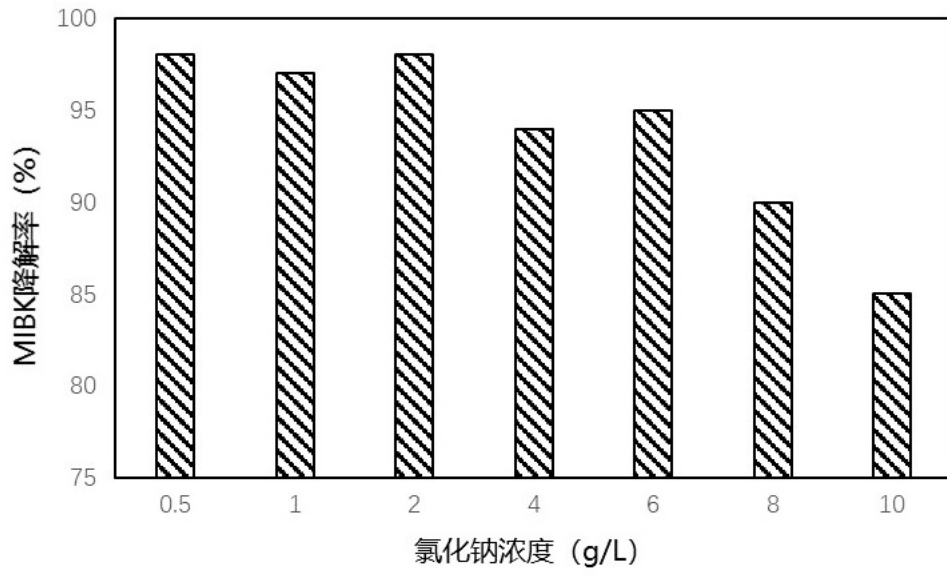


图2

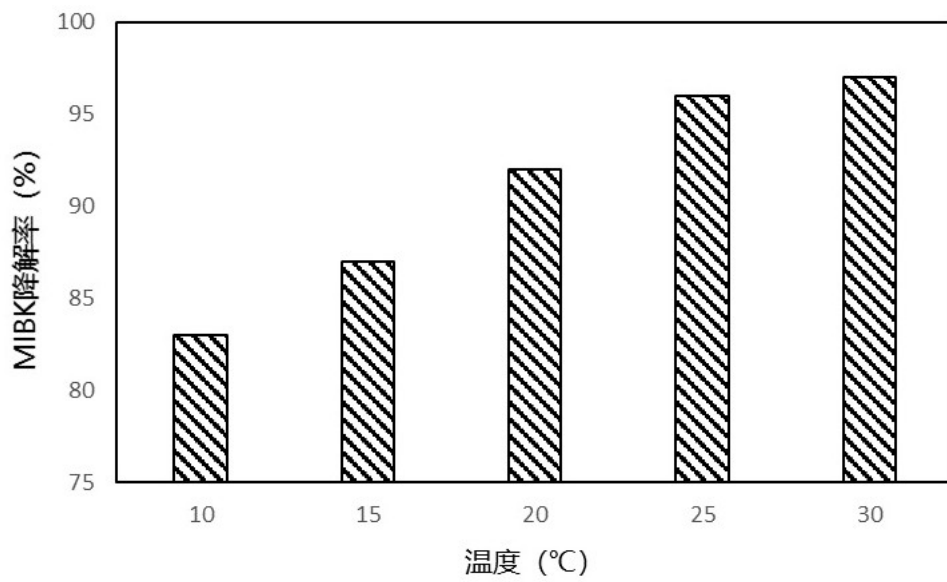


图3

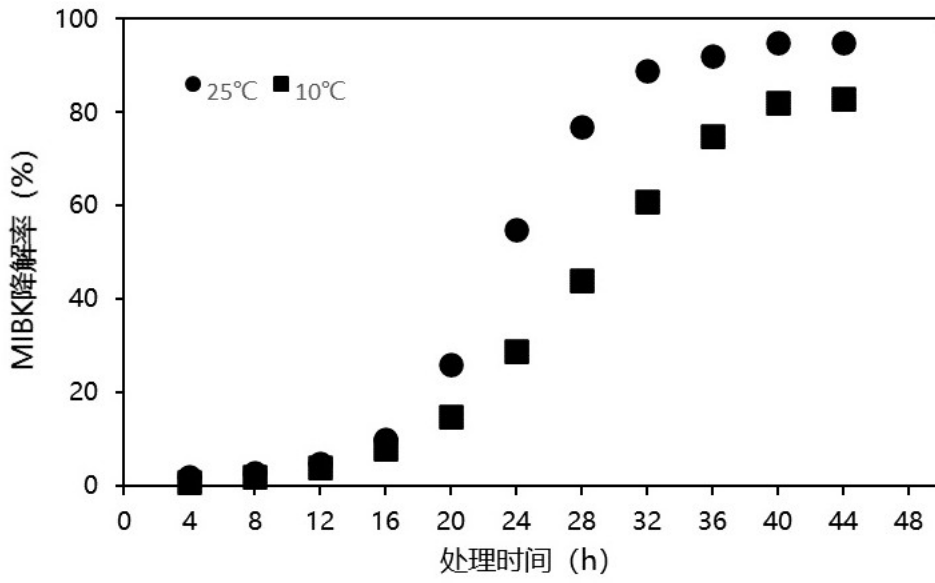


图4