



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107151663 B

(45) 授权公告日 2020.12.04

(21) 申请号 201710520470.4

C12N 11/14 (2006.01)

(22) 申请日 2017.06.30

C12N 11/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C02F 3/34 (2006.01)

申请公布号 CN 107151663 A

C02F 103/08 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.09.12

审查员 侯玮婷

(73) 专利权人 自然资源部第一海洋研究所

地址 266100 山东省青岛市崂山区高科技
工业园仙霞岭路

(72) 发明人 郑立 张毅然 高伟 李倩 韩彬

崔志松 何昌飞 高详兴 栾晓

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有

限公司 37201

代理人 曾庆国

(51) Int. Cl.

C12N 11/02 (2006.01)

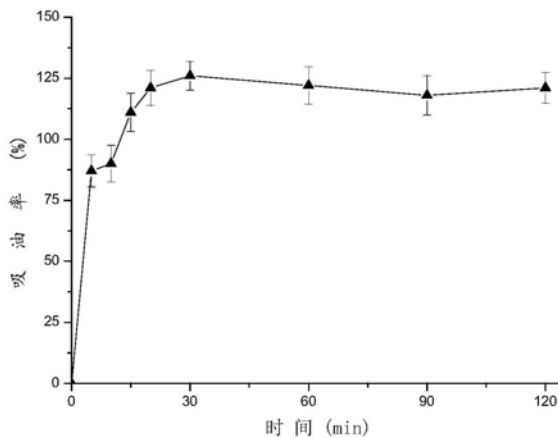
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种利用海带渣制备的用于石油污染修复的固定化菌剂

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种用于海洋溢油污染沉积物的生物修复固定化菌剂,所使用的固定化材料包含有海带渣、高岭土和胶黏剂。本发明提供的海带渣材料既可以吸附石油烃,又可以作为固定化材料包埋石油降解菌,这样一方面海带渣通过主动吸附石油烃,将其作为碳源供石油降解菌利用,另一方面,固定化的石油降解菌在海带渣基质内受到保护,能长期定殖于受污染的区域,并加快石油污染的生物降解。



1. 一种固定化菌剂,所述的固定化菌剂用于处理海洋近岸溢油污染的沉积物;其特征在于,所述的固定化菌剂是使用固定化材料制备的,其中所固定的菌株为能降解石油烃的降解菌;

所述的固定化材料是海带渣、高岭土和胶黏剂,

所述的海带渣与高岭土的质量比为7:3;

所述的胶黏剂为褐藻酸钠,其含量为固定化材料总质量的0.5%~1.5%;

所述的固定化菌剂的制备方法如下:

向海带渣中添加海洋石油烃降解菌的发酵菌液,搅拌均匀后,在30~45℃烘培干燥,再加入高岭土搅拌均匀;加入海藻酸钠溶液搅拌均匀,将搅拌好的全部样品缓慢投入制粒机,将制得的颗粒收集,于30~45℃低温烘干制得固定化菌剂;

所述的海洋石油烃降解菌是保藏编号为CGMCC NO.1.16125的石油烃降解菌*Bacillus* sp.E3。

2. 权利要求1所述的固定化菌剂在处理海洋溢油污染的沉积物中的应用。

一种利用海带渣制备的用于石油污染修复的固定化菌剂

技术领域

[0001] 本发明属于石油及石油产品污染环境的生物修复技术领域,具体涉及一种利用海带渣制备的用于石油污染修复的固定化菌剂。

背景技术

[0002] 近年来,随着人类对海洋石油资源的开采和海上石油产品的运输,海洋溢油事故频繁发生,造成了严重的生态环境破坏和经济损失。因此,寻找一种友好且低成本的溢油清除策略是当前海洋环境治理急需解决的问题。目前,已有众多不同方式用于缓解和清除溢油污染。其中传统的物理化学方法主要针对海面溢油的快速处置,但在实际应用中,常常清理不完全或引起污染物形式的转化,特别是消油剂的使用,容易产生次生污染,所以只能用于海面溢油的早期处置。而对于沉入海底和漂移至岸滩的溢油污染,通过物理和化学的方式根本无法有效处理。生物修复技术是利用环境中本身存在的具有石油降解能力的微生物,通过生物刺激或增强的方式对油污进行降解,达到修复环境的目的。生物修复不仅对油污清除彻底,环保性也高于物理化学方法,所以越来越多的学者倾向于采用微生物修复的方法进行油污处理。特别是当溢油污染物沉积在海底或岸滩,生物修复技术显得更为重要。然而直接添加石油降解微生物的方式,在风、浪、流的作用下,很难让这些细菌定殖在石油污染区,无法持续发挥生物降解作用。

[0003] 微生物固定化技术是从20世纪60年代开始迅速发展起来的一项新技术,自从70年代起,该技术就已开始应用于水处理行业,它可将高密度的细胞定位于限定的区域,避免菌体流失,提高细菌环境适应性,使其保持活性并可反复利用,可以优化生物修复的效果。应用固定化菌剂修复石油污染的近岸底质,能够克服海水冲刷、营养盐水平、溶解氧、温度等自然环境因素的影响,并且一次施用固定化菌剂,菌体利用污染物作为能源和结构物质,通过生理代谢,持续降解污染物,相比液体菌剂需多次施用更具有成本优势。

[0004] 传统的固定化载体材料分为无机材料、高分子合成材料、天然有机材料等。其中无机材料无污染,但获取成本高;高分子合成材料,机械强度高,但不易降解,成本高;天然有机材料成本低,易降解。因此,选择一种易获取、可降解、成本低的固定化载体材料,是石油降解微生物固定化技术广泛应用于海洋底质溢油污染生物修复的技术前提。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种用于海洋溢油污染沉积物的生物修复固定化菌剂,有效解决生物修复中施加的液体菌剂易受海流、温度、营养盐等环境条件影响的问题。

[0006] 本发明首先提供海带渣材料在制备固定化菌剂中的应用,所述的固定化菌剂用于处理海洋近岸溢油污染的沉积物;

[0007] 本发明再一个方面提供一种用于制备固定化菌剂的固定化材料,包含有海带渣、高岭土和胶黏剂;

[0008] 所述的胶黏剂为褐藻酸钠、卡拉胶、明胶、羟甲基纤维素钠中的任一种,优选为褐

藻酸钠;

[0009] 其中海带渣、高岭土的质量比为9~5:1~5;

[0010] 作为实施例的优选,其中海带渣与高岭土的质量比为7:3;

[0011] 作为实施例的优选,其中海藻酸钠的含量为固定化材料总质量的 0.5%~1.5%;

[0012] 本发明所提供的固定化材料用于制备固定化菌剂;

[0013] 所述的固定化菌剂用于处理海洋近岸溢油污染沉积物;

[0014] 上述的固定化菌剂的一种具体制备方法如下:

[0015] 向海带渣中添加能降解石油烃降解菌的发酵菌液,搅拌均匀后,在30~45℃ 烘培干燥,再加入高岭土搅拌均匀;加入海藻酸钠溶液搅拌均匀,将搅拌好的 全部样品缓慢投入制粒机,将制得的颗粒收集,于30~45℃低温烘干制得固定化 菌剂。

[0016] 本发明提供的海带渣材料既可以吸附石油烃,又可以作为固定化材料包埋 石油降解菌,这样一方面海带渣通过主动吸附石油烃,将其作为碳源供石油降 解菌利用,另一方面,固定化的石油降解菌在海带渣基质内受到保护,能长期 定殖于受污染的区域,并加快石油污染的生物降解。

附图说明

[0017] 图1海带渣对柴油吸附率图;

[0018] 图2:不同高岭土配比的原料制粒的物理特性图;

[0019] 图3:不同胶黏剂的处理条件下溶失率比较图;

[0020] 图4:海藻酸钠固定化颗粒海水浸泡溶失率图;

[0021] 图5:固定化菌剂样品照片图;

[0022] 图6:固定化菌剂石油降解率图,其中a,b,c:当字母不相同,表示两两相 比,石油降解率数值差异极显著, $P<0.01$ 。

具体实施方式

[0023] 在对岸滩溢油的生物修复实际应用中,目前主要采用喷洒液体石油降解菌 剂来促进石油污染物的降解,而在海洋环境中,这种方式往往造成石油降解菌 的流失,大大降低降解效果;利用固定化技术对细菌进行固定,可以避免菌体 流失,提高降解效果,然而现有的固定化材料一方面不具有价格优势,一方面 环境友好性差。申请人选择将海带渣来制备固定化菌剂,不仅变废为宝,还能 提高溢油生物修复的效果。但在使用过程中发现,海带渣制备的固定化颗粒密 度轻,固型性不好,水溶失率高,申请人对固定化材料进行了复配,通过配比 的优选组合,最终获得了本发明。

[0024] 实施例1固定化材料的筛选及制备方法的优化

[0025] 对固定化菌剂的密度、固型性、吸附率及溶失率指标进行筛选,最终确定 最佳的固定化颗粒的组分及制备方法。

[0026] 其中使用的仪器如下:恒温培养摇床:THZ-100型,上海一恒科学仪器公 司;电热恒温鼓风干燥箱:上海一恒科学仪器公司;电子天平:BSA224S-CW, Sartorius公司;大型微生物发酵罐:30L,120L,上海国强;120A型两相3kw制 粒机:领航农业机械公司;气相色谱质谱仪(GC/MS):6890N-5973N型,Agilent 公司;

[0027] 海带渣是海带工业,特别是褐藻酸钠生产过程中产生的比例最大的固体废料。使用时将海带渣经水洗后,200~400℃高温烘干,粉碎机磨碎,过50目筛并收集。其主要成分中粗纤维含量为10%左右,蛋白质8%左右,多糖6%左右,含钙2%左右,其次还含有少量脂肪、碘和无机盐。

[0028] 申请人筛选后使用高岭土与海带渣一起来制备固定化材料,并通过筛选高岭土、海带渣与胶黏剂的具体组分配比来获得最佳的溶失率。

[0029] 本发明的固定化菌的具体制备方法如下:

[0030] 一、降解菌及培养基

[0031] 本实施所使用的石油烃降解菌为Bacillus sp.E3,购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心,菌种保藏号为CGMCC NO.1.16125

[0032] ONR7a培养基配方如下:一种模拟天然海水的培养基,主要用于石油培养基配制。主要成分如下:每L含22.79g NaCl、11.18g MgCl₂·6H₂O、3.98g Na₂SO₄、1.46g CaCl₂·2H₂O、1.30g TAPSO、0.72g KCl,灭菌前添加2mL溶液I,之后121℃,灭菌15min;使用时按浓度比例添加溶液II和溶液III。

[0033] 溶液I (500x,培养基配制时加入):

组分	容量 (g/L)
NH ₄ Cl	135.0
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	44.5
NaBr	41.5
NaHCO ₃	15.5
H ₃ BO ₃	13.5
NaF	1.3

[0034] NaBr 41.5

[0035] 溶液II (50x,高压灭菌后加入):

组分	容量 (g/L)
SrCl ₂ ·6H ₂ O	1.2
MgCl ₂ ·6H ₂ O	559.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	73.0

[0036] MgCl₂·6H₂O 559.0

[0037] 溶液III (1000x,0.22μm滤膜过滤除菌):

组分	容量 (g/L)
FeSO ₄ ·2H ₂ O	2.8

[0040] 溶液I、溶液II均需要121℃高压蒸汽灭菌15min;溶液III则需要用0.22μm滤膜除菌。

[0041] 石油培养基:100mL ONR7a中添加1g原油(1%)。

[0042] 2216E培养基:每L含蛋白胨5g,酵母膏1g,磷酸高铁0.01g,陈海水1L,调节pH7.6-7.8,之后121℃,灭菌15min,用于扩大培养菌液。

[0043] 二、固定化菌剂的包埋制粒条件优化

[0044] 采用制粒机加工方法,将石油降解菌液、海带渣、配重剂、胶黏剂等混合均匀后压制成包埋固定化石油降解菌剂。为了满足海洋沉积物石油污染处理的要求,我们对固定化菌剂的密度、固型性及溶失率指标进行考察,以确定最佳的固定化颗粒的制备技术。

[0045] (1) 固定化菌剂配重比例的研究

[0046] 为了让微生物固定化菌剂能在海水介质中下沉,需增加固定化菌剂的密度,本专利选取了高岭土作为固定化菌剂的配重剂,选择了不同配比的海带渣来制粒,制粒过程中添加30~50%的液体培养基作为固定化菌液。之后将制得的颗粒放入含有海水的三角瓶中,在摇床上150rpm摇动处理24h,通过计算不同颗粒的密度及溶失率(公式2)来评价颗粒的成型效果。配比实验设计表如下表所示。

[0047] 表1配重剂配比测试设计表

组号	海带渣 (g)	高岭土 (g)
A	900	100
B	800	200
C	700	300
D	600	400
E	500	500

[0049] 溶失率测定公式:

[0050]
$$\text{溶失率} = \frac{m - m_d}{m} \times 100\% \quad (\text{公式2})$$

[0051] 式中,m为随机挑选颗粒的总质量,m_d为浸泡处理d天后收集的成型颗粒烘干后的质量。

[0052] (2) 胶黏剂及浓度的选择

[0053] 在上述实验基础上,选择最合适海带渣与高岭土的配比,为了进一步增强固定化颗粒的成型稳定性,在制粒过程中分别添加褐藻酸钠、卡拉胶、明胶、羟甲基纤维素钠四种胶黏剂水溶液,胶黏剂的添加量为原料总质量的0.5%~1.5%。随机挑取制得的10粒固定化菌剂分别浸泡在数只盛有50ml海水的锥形瓶中,并在放入后1-12天区间取出每个锥形瓶中的颗粒,烘干挑选出成型颗粒称重并按公式(2)测定固定化菌剂的溶失率。通过比较四种胶黏剂制备的固定化菌剂的溶失率,选取最合适的胶黏剂制备固定化颗粒,放入海水中,延长浸泡时间至90天,按上述方法测定其不同时间段的溶失率。

[0054] 3) 固定化菌剂的制备工艺

[0055] 步骤一:菌液制备

[0056] 取-80℃甘油管藏的上述菌株E3于2216E培养基中活化并扩大培养至OD₆₃₀≈(1.2~2.3)×10⁹CFU/mL;接种于30L发酵罐中,25℃恒温培养,2-3d后制得所需菌液。

[0057] 步骤二:固定化过程

[0058] 以质量比1:1的比例向海带渣中添加菌液,充分搅匀,在30~45℃烘培至干。加入适量高岭土,使之与海带渣质量比为3:7,搅拌均匀;加入上述原料总质量0.5%~1.5%的海藻酸钠溶液搅拌均匀,使其水含量为50%~70%。

[0059] 步骤三:制粒与烘干

[0060] 将搅拌好的全部样品缓慢投入制粒机,待出粒均匀后,可加大原料添加量。将制得的颗粒收集,于烘箱中30~45℃低温烘干制得固定化菌剂,密封后低温 4℃保存。

[0061] 石油降解实验:将上述所制得的固定化菌剂接入石油培养基中,研究其石油降解特性。以添加含等量菌体的菌液为阳性对照,以未添加固定化菌剂和菌液的石油培养基为空白对照。上述每种处理设3个平行,在150r/min,20℃,避光的条件下分别培养21d。

[0062] 石油降解率测定方法:降解21d后,用50mL CH₂Cl₂分三次倒入三角瓶中萃取培养液中残余石油。取20mL CH₂Cl₂相萃取液转移到尖底烧瓶中,40℃减压浓缩,氮气吹干,按照公式(3)计算降解率。

$$[0063] \quad \text{石油降解率} = \frac{m_0 - 2.5m_1}{m_0} \times 100\% \quad (3)$$

[0064] 式中, m_0 为最初加入培养基中的石油重量; m_1 为石油培养基萃取后残留油样重量。

[0065] 海带渣柴油吸附能力测试:

[0066] 取数个100ml锥形瓶,分别加入50ml过滤海水和1ml柴油(0.85g),取0.3g 海带渣于锥形瓶内后将锥形瓶放置于摇床上,分别在0min、5min、10min、15min、20min、30min、60min、120min时取出,用塞住脱脂棉(0.03g)的漏斗过滤并获得滤液。使用20ml正己烷分两次萃取滤液,氮吹,定量剩余柴油质量,按照公式(1)计算海带渣的柴油吸附率。以上实验每组做三个平行。

$$[0067] \quad \text{柴油吸附率} = \frac{(m_0 - m_b - m_c)}{m_a} \times 100\% \quad (1)$$

[0068] m_0 为模拟体系中添加的柴油含量, m_a 为模拟体系中海带渣的质量, m_b 为经萃取后剩余柴油的质量, m_c 为阴性对照实验中脱脂棉的吸油量。

[0069] 在本实施例中通过向装有50ml灭菌海水的三角瓶中加入1ml柴油,来模拟海上浮油污染环境。在加入海带渣材料后,我们从不同时间点取出材料,对柴油吸附量进行检测,研究海带渣的动态柴油吸附过程,并分析海带渣的最大柴油吸附能力。

[0070] 海带渣的吸油率在0-20min时间段内缓慢上升,并于30min左右达到最大,吸油率为128%,随着时间延长,吸油率基本稳定在该水平不变,这说明海带渣中的纤维素成分可在短时间内吸附超过自身重量的柴油。

[0071] 三、固定化颗粒植物载体的特性改良

[0072] 1) 配重剂添加比例

[0073] 为了增强制得颗粒的密度和降低颗粒的溶失率,选取了高岭土来配合海带渣。从图2中可以看到,当高岭土含量从10%增加到30%时,制备得到的海带渣-高岭土复合颗粒的密度也迅速增加到1.47g/cm³,而颗粒的海水溶失率则迅速下降至8%左右。而当高岭土的含量继续增加,颗粒密度的增加幅度和海水溶失率的下降幅度都很小。所以,综合考虑颗粒的固定化效果和其下沉性能,当添加的海带渣与高岭土的质量比7:3时,所制得的颗粒具有较大的密度和较低的溶失率,也保证足够大的海带渣添加量,以获得较好的油污吸附性能和菌体吸附率。

[0074] 2) 胶黏剂选择结果

[0075] 为了进一步降低海带渣-高岭土复合颗粒在海水介质中长时间浸泡的溶失率,考

察了四种有机高分子材料：褐藻酸钠、卡拉胶、明胶、羟甲基纤维素钠 作为胶黏剂制备的颗粒，在12天海水浸泡实验中的溶失率。实验结果如图3所示，相同的含量条件下，以海藻酸钠为胶黏剂制备的固定化颗粒，其海水浸泡 12天的溶失率小于15%，而其他三种则均高于15%。

[0076] 以上结果表明，海藻酸钠作为胶黏剂所制得颗粒的耐水性较好，初步满足了在海水中长期浸泡的要求。以海藻酸钠为胶黏剂制备固定化颗粒，在进行为期90天的海水浸泡实验中，也表现出较好的实验结果(图4)，整个海水浸泡期间，固定化颗粒的溶失率不超过23%，证实海藻酸钠作为胶黏剂制备的固定化颗粒可以满足在海水环境中长期存在的

要求。

[0077] 实施例2

[0078] 以最优原料配比条件来固定石油降解细菌，首先将700g海带渣和700ml菌液，充分搅匀，在30~45℃烘培至干；然后加入300g高岭土，搅拌均匀；将5~15g 海藻酸钠溶解于500~700ml水中，与上述原料混合，搅拌均匀，缓慢投入制粒机，将制得的颗粒收集，于烘箱中30~45℃低温烘干制得固定化菌剂，成品如图5所示，菌剂为直径为1cm，高为2~3cm的白褐色圆柱形颗粒。

[0079] 将含等量石油降解菌的液体菌剂和固定化菌剂添加至石油培养基中，经过 21d的降解实验，通过重量法测定固定化菌剂、液体菌剂和自然风化(阴性对照)的石油降解率。结果如图6所示，与自然风化(11.0%)和液体菌剂(31.0%) 相比，固定化菌剂的石油降解率有了显著提高($P < 0.01$)，分别提高了接近40% 和18%，而液体菌液相对于自然风化，石油降解率仅提高近20%。这说明采用海带渣的细菌固定化技术可为细菌降解提供合适的生存空间，减弱外界复杂环境对菌体的干扰，保持菌体的活性，使得石油降解能力明显提高。

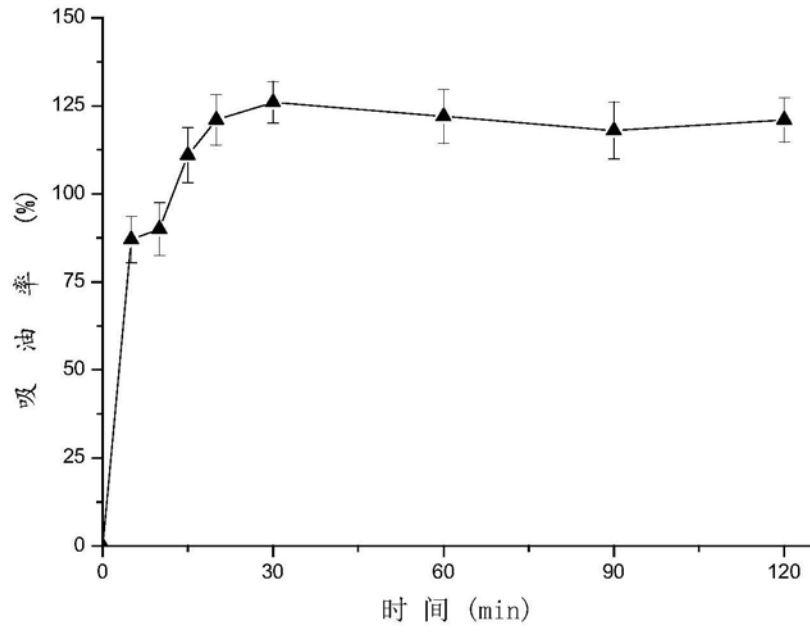


图1

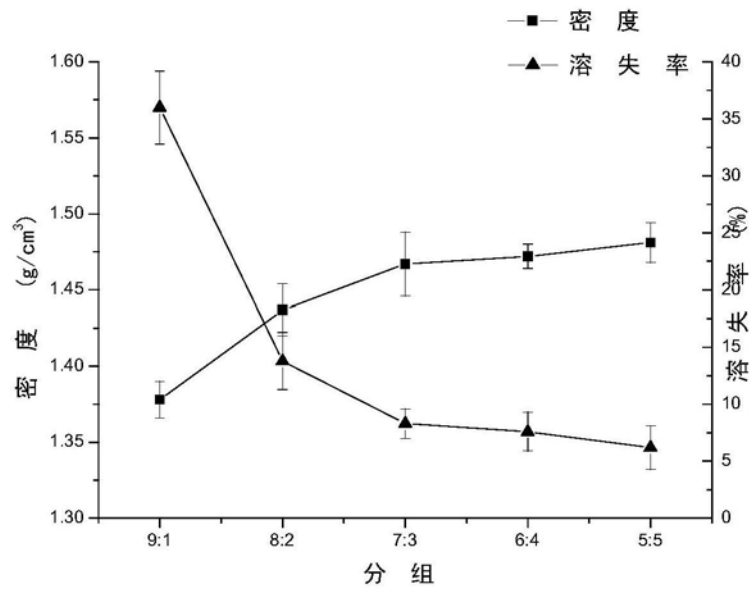


图2

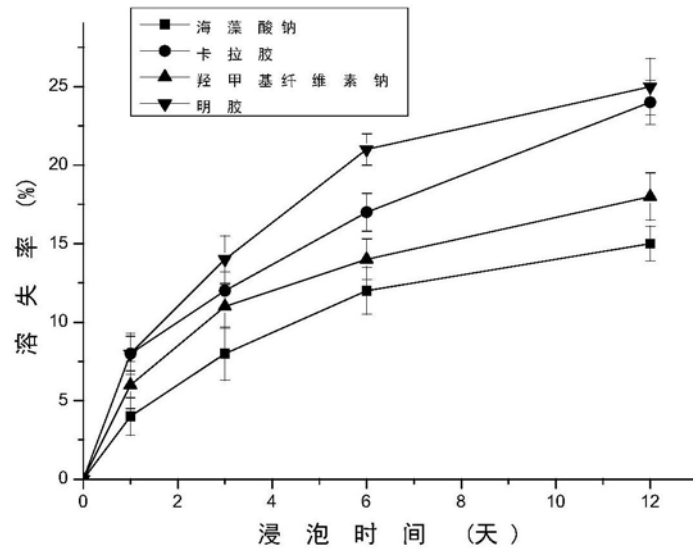


图3

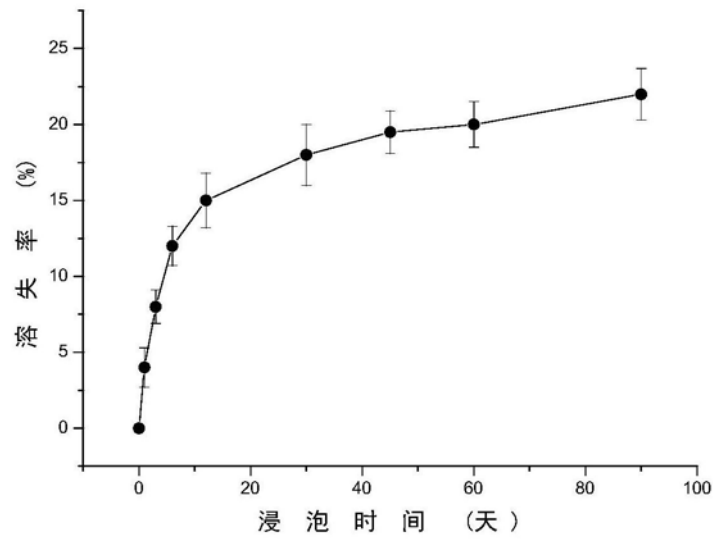


图4

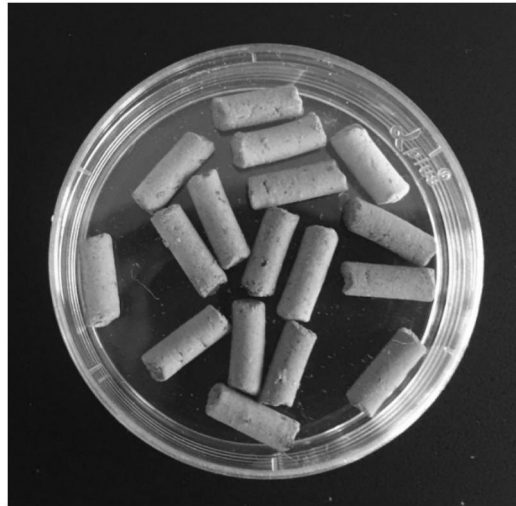


图5

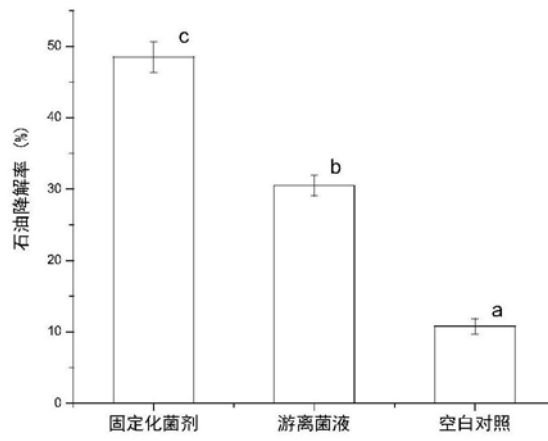


图6