



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104450552 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410402653. 2

(22) 申请日 2014. 08. 17

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8801 2014. 01. 20

CGMCC No. 8749 2014. 01. 20

(71) 申请人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

(72) 发明人 朱晓丽 梁丽华 李贺 马俊杰

(74) 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任  
公司 61202

代理人 谢钢

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

B09C 1/10(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页

序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

一种硫酸盐还原菌-解磷菌及其在联合修复  
镉污染土壤中的应用

(57) 摘要

本发明公开了具有抗重金属 Cd 生长和硫酸盐还原活性的菌株 b 和具有抗重金属 Cd 生长和解磷能力的菌株, 其分类命名分别为: 路德维希杆菌 (*Enterbacter ludwigii*) SRB-2-5u-2 和解糖假苍白杆菌 (*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) LB-4-4-1c, 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。本发明能够同时修复土壤表层、较深层和植物根际土壤, 降低 Cd 对地表水和地下水的污染, 同时还能够提高土壤的活性和肥力。

1. 具有抗重金属 Cd 生长和硫酸盐还原活性的菌株 SRB-2-5u-2b 和具有抗重金属 Cd 生长和解磷能力的菌株 LB-4-4-1c, 其分类命名分别为: 路德维希肠杆菌 (*Enterbacter ludwigii*) SRB-2-5u-2b, 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, 保藏编号为 CGMCC No. 8801; 解糖假苍白杆菌 (*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) LB-4-4-1c, 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, 保藏编号为 CGMCC No. 8749。

2. 含有权利要求 1 所述菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的微生物菌剂。

3. 权利要求 2 所述微生物菌剂的制备方法, 其特征在于包括:

1) 含菌株 SRB-2-5u-2b 微生物菌剂的制备方法

①菌种活化

将冻存的 SRB-2-5u-2b 在 37℃ 条件下快速解冻, 按照 0.5-1% 的接种量接入装有 10-15ml 液体培养基 A 的试管中, 30-35℃, 静置培养 8-12 小时, 得到 SRB-2-5u-2b 的一级种子液;

所述的液体培养基 A 的组成为:  $K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 蒸馏水 1000ml; pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 20min; L-半胱氨酸分别用无菌蒸馏水配制为 50 mg/ml, 用 0.25 $\mu$ m 的无菌过滤器过滤后, 临用前以 1-2ml/100ml 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀;

②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照 3-5% 的接种量接入装有 100-200 ml 液体培养基 A 的厌氧培养瓶中, 28-32℃, 静置培养 8-12 小时得到二级培养液;

③发酵罐发酵

将 SRB-2-5u-2b 的二级培养液按照 5-10% 的接种量分别接入装有液体培养基 A 的发酵罐中, 进行发酵培养, 罐温 30-35℃, 培养 pH7.0-7.5, 通氮气培养 35-40 小时, 得菌悬液, 有效活菌数不低于  $10^9$  CFU/ml, 即得 SRB-2-5u-2b 液体菌剂;

④含菌株 SRB-2-5u-2b 的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎, 过 60 目筛, 按照质量百分比为 20-30:20-30:5-10:30-50 的比例均匀混合, 再按照 300-500ml/Kg 的比例加入液体培养基 B, 混合均匀后用耐高温塑料袋装, 1-1.5Kg/袋, 121℃ 灭菌 2-3 小时; L-半胱氨酸盐用无菌蒸馏水配制为 50mg/ml, 用 0.25 $\mu$ m 的无菌过滤器过滤后, 临用前以 10-20ml/Kg 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀, 即得 SRB-2-5u-2b 发酵固态基质;

所述的液培养基 B 组成为:  $K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 琼脂粉 15-20g, 蒸馏水 1000ml; pH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 20min;

将步骤③得到的 SRB-2-5u-2b 液体菌剂按照 50-100ml/kg 的剂量与上述所得的 SRB-2-5u-2b 发酵固态基质混匀, 30-35℃ 培养 5-7 天, 即得 SRB-2-5u-2b 固体菌剂, 有效活菌数不低于  $10^9$  CFU/g;

2) 含菌株 LB-4-4-1c 微生物菌剂的制备方法

①菌种活化

将冻存的 LB-4-4-1c 在 37℃ 条件下快速解冻,按照 0.5-1% 的接种量接入装有 10-15ml 液体培养基 C 的试管中,28-32℃,静置培养 8-12 小时,得到 LB-4-4-1c 的一级种子液;

所述的液体培养基 C 的组成为:胰蛋白胨 5-10 g,酵母粉 3-5 g,NaCl 5-10 g,蒸馏水 1000 ml,pH 值 6.8-7.5,121℃ 灭菌 20min;

#### ②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照 3-5% 的接种量接入装有 50-100ml 液体培养基 C 的三角瓶中,28-32℃,150-200rpm 培养 8-12 小时得 LB-4-4-1c 的二级培养液;

#### ③发酵罐发酵

将 LB-4-4-1c 的二级培养液按照 5-10% 的接种量分别接入装有发酵培养基 D 的发酵罐中,进行发酵培养,罐温 28-32℃,培养 pH 6.8-7.5,通空气培养 30-48 小时,得菌悬液,有效活菌数不低于  $10^9$  CFU/ml,即为 LB-4-4-1c 液体菌剂;

所述的发酵培养基 D 组成为:葡萄糖 10-15g,麸皮 5-10g,豆粕 30-50g,玉米粉 3-5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5-10g/ml,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1-0.2g/ml,  $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$  5-13 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5-10 g, 水 1000ml, pH 6.8-7.5,121℃ 灭菌 30min;

#### ④含 LB-4-4-1c 菌株的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,按照质量百分比为 20-30:20-30:5-10:30-50 的比例混合均匀,用耐高温塑料袋装,1-1.5Kg/袋,121℃ 灭菌 2-3 小时,即得 LB-4-4-1c 发酵固态基质;

将上述步骤③所得的 LB-4-4-1c 液体菌剂按照 50-100ml/kg 的剂量与上述所得的 LB-4-4-1c 发酵固态基质混匀,28-32℃ 发酵 5-7 天,有效活菌数达到不低于  $10^9$  CFU/g,即得到固体菌剂;

#### 3) 含菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂的制备

将上述所得的 SRB-2-5u-2b 液体菌剂和 LB-4-4-1c 液体菌剂按照质量百分比为 30-50:50-70 的比例混合均匀即得 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂;

#### 4) 含菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂的制备

将 SRB-2-5u-2b 固体菌剂和 LB-4-4-1c 固体菌剂按照质量百分比为 30-50:50-70 的比例混合均匀即得 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂。

4. 权利要求 1 所述菌株在土壤重金属 Cd 污染环境治理和生态修复中的应用。

5. 权利要求 2 所述微生物菌剂的使用方法,其特征在于:在植物浸种或植物移栽时,用 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂浸泡种子或植物根部 1-3 小时;育苗期或生长期灌根时,将上述所得的 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂用液体菌剂稀释液稀释 500-1000 倍,10-40ml/Kg 土壤剂量浇灌稀释液,整个生长期灌根 1-2 次;SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂可作为基肥和追肥使用,使用剂量为 5-20g/Kg 土壤;

所述的液体菌剂稀释液组成为:葡萄糖 10-15 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5-13 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 g, KCl 0.2-0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5-0.8g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5-3.0g,  $\text{NaHCO}_3$  0.3-0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.2-0.3g,  $\text{MgSO}_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, L-半胱氨酸 0.5-1g, 蒸馏水 1000ml。

## 一种硫酸盐还原菌-解磷菌及其在联合修复镉污染土壤中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种硫酸盐还原菌-解磷菌及其在联合修复镉污染土壤中的应用,属于环境微生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 镉是环境中迁移性和毒性最强的重金属元素之一。目前,全球每年排放约  $3.0 \times 10^4$  t 镉,过去 50 年间,排放到全球环境中的 Cd 约有  $2.20 \times 10^4$  t,其中 94% 进入土壤,致使世界各国的土壤出现不同程度的 Cd 污染。据统计,目前我国 Cd 污染的农田已超过  $20 \times 10^4$  hm<sup>2</sup>,涉及 11 个省市 25 个地区,每年生产 Cd 含量超标农产品  $14.6 \times 10^8$  kg。湖南省污染稻田镉含量为 2.8-51.3 mg/kg,为土壤环境质量标准值(二级)的 9.3-171 倍。沈阳张土污灌区严重污染区大米中含 Cd 含量达 1-2 mg/kg。保定市污灌区土壤中 Cd 的检出超标率为 87.5%,蔬菜中 Cd 的检出超标率为 89.3%。

[0003] 镉是蓄积性毒物,其毒性是潜在的,且治疗极为困难。土壤中过量的 Cd 易被植物吸收和积累,影响植物的生长、细胞分裂及代谢活动,造成农作物产量和品质下降。长期食用高 Cd 含量的食物,可以引起肾脏、肺、胎盘、心血管系统、免疫系统、生殖系统和骨矿密度降低等多种疾病。1992 年,镉的化合物被国际癌症研究中心(IARC)确认为 IA 级致癌物,美国毒性物质管理委员会(ATSDR)列为第 6 位危害人体健康的有毒物质,联合国环境规划署(UNEP)提出 12 种具有全球性意义的危险化学物质,镉被列为首位。

[0004] 目前对于镉污染土壤的治理,主要是通过物理、化学、生物等方法。物理法工程量大,费用高。化学法操作简便,但费用较高,易导致土壤二次污染。生物修复法是一种很有前景的修复方法,目前研究较多的是超富集植物提取修复技术。但是,由于已发现的 Cd 超富集植物生物量小,修复周期长,目前仍难以用于实际的 Cd 污染土壤的修复。此外,我国人口众多,已查明受污染或污染情况不明的农田面积很大,现实情况是不得不在受重金属污染或污染情况不明的农田进行农作物生产。但是,利用超富集植物修复技术历时长且占用大量的农田,不适宜在污染农田大面积推广应用。

[0005] 微生物修复技术主要包括微生物固定和微生物转化。微生物能够通过吸附和富集作用或产生某些代谢产物如草酸、磷酸盐和 S<sup>2-</sup>等物质与重金属形成沉淀,固定土壤中的重金属,降低重金属的生物可利用性,使其转变为潜在的生物可利用态或残渣态。

[0006] 硫酸盐还原菌(Sulfate-Reducing Bacteria,简称 SRB)能够将环境中的 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 转化为 S<sup>2-</sup>,S<sup>2-</sup> 能够与金属离子反应生成硫化物沉淀,达到固定重金属的目的。目前 SRB 广泛应用于重金属污染废水的处理,而用于土壤修复的报道甚少。在 Cd 的化合物中,CdS 的溶解度最低,其次是磷酸镉。采用 SRB 修复土壤 Cd 污染,由于 Cd<sup>2+</sup> 在土壤中具有强烈的亲硫性,S<sup>2-</sup> 与土壤中的 Cd<sup>2+</sup> 快速反应生成溶解度很低的 CdS 沉淀,同时,SRB 还原 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 的过程中还能够生成碱性物质,提高土壤的 pH,有利于酸性土壤的修复。研究表明:SRB 在土壤的表层、较深层和植物根际都能够大量生长。但是,在镉污染的土壤中野生型 SRB 的生长受到

抑制,另外,形成的 CdS 在有氧条件下易被氧化为  $\text{CdSO}_4$ ,使 Cd 的移动性增加。据报道,在植物根际和土壤表层,CdS 易被氧化为  $\text{CdSO}_4$ 。因此,在水田晒田期间或旱田中,土壤表层和植物根际的 Cd 由于氧化作用而导致移动性增加。

## 发明内容

[0007] 本发明目的之一是针对现有技术存在的问题,从 Cd 污染矿区土壤中分别筛选出一株具有较高抗镉生长能力的 SRB 和解磷菌,通过紫外线-等离子体复合诱变进一步提高 SRB 的抗镉生长能力和硫酸盐还原活性,获得一株具有高抗镉生长能力和在有氧和缺氧条件下均具有高效硫酸盐还原能力的 SRB,通过紫外线-等离子体复合诱变获得具有高抗镉生长能力和解磷能力的解磷菌,该菌株还具有一定的解有机磷能力,能够产生一定量的吡啶乙酸等植物生长刺激因子,促进植物生长;

本发明的目的之二是提供含有上述 SRB 和解磷菌的微生物菌剂及其制备方法;

本发明的目的之三是提供上述 SRB 和解磷菌在联合修复土壤 Cd 污染中的应用。

[0008] 具有抗重金属 Cd 生长和硫酸盐还原活性的菌株 SRB-2-5u-2b 和具有抗重金属 Cd 生长和解磷能力的菌株 LB-4-4-1c,其分类命名分别为:

路德维希肠杆菌(*Enterbacter ludwigii*) SRB-2-5u-2b,已于 2014 年 1 月 20 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所),保藏编号为 CGMCC No. 8801;

解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) LB-4-4-1c,已于 2014 年 1 月 20 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所),保藏编号为 CGMCC No. 8749。

[0009] 含有上述菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的微生物菌剂,其制备方法包括:

1) 含菌株 SRB-2-5u-2b 微生物菌剂的制备方法

### ①菌种活化

将冻存的 SRB-2-5u-2b 在 37℃ 条件下快速解冻,按照 0.5-1% 的接种量接入装有 10-15ml 液体培养基 A 的试管中,30-35℃,静置培养 8-12 小时,得到 SRB-2-5u-2b 的一级种子液;

所述的液体培养基 A 的组成为: $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5-0.8g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5-3.0g,  $\text{NaHCO}_3$  0.3-0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.2-0.3g,  $\text{MgSO}_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 蒸馏水 1000ml; pH 7.0-7.2, 121℃ 灭菌 20min; L-半胱氨酸分别用无菌蒸馏水配制为 50 mg/ml, 用 0.25 $\mu\text{m}$  的无菌过滤器过滤后,临用前以 1-2ml/100ml 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀;

### ②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照 3-5% 的接种量接入装有 100-200 ml 液体培养基 A 的厌氧培养瓶中, 28-32℃, 静置培养 8-12 小时得到二级培养液;

### ③发酵罐发酵

将 SRB-2-5u-2b 的二级培养液按照 5-10% 的接种量分别接入装有液体培养基 A 的发酵罐中,进行发酵培养,罐温 30-35℃,培养 pH7.0-7.5,通氮气培养 35-40 小时,得菌悬液,有效活菌数不低于  $10^9$  CFU/ml,即得 SRB-2-5u-2b 液体菌剂;

#### ④含菌株 SRB-2-5u-2b 的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,按照质量百分比为 20-30 :20-30 :5-10 :30-50 的比例均匀混合,再按照 300-500ml/Kg 的比例加入液体培养基 B,混合均匀后用耐高温塑料袋装,1-1.5Kg/袋,121℃灭菌 2-3 小时;L-半胱氨酸盐用无菌蒸馏水配制为 50mg/ml,用 0.25 $\mu$ m 的无菌过滤器过滤后,临用前以 10-20ml/Kg 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀,即得 SRB-2-5u-2b 发酵固态基质;

所述的液培养基 B 组成为:K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5-0.8g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5-3.0g, NaHCO<sub>3</sub> 0.3-0.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.2-0.3g, MgSO<sub>4</sub> 1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 琼脂粉 15-20g, 蒸馏水 1000ml; pH 7.0~7.2, 121℃灭菌 20min;

将步骤③得到的 SRB-2-5u-2b 液体菌剂按照 50-100ml/kg 的剂量与上述所得的 SRB-2-5u-2b 发酵固态基质混匀,30-35℃培养 5-7 天,即得 SRB-2-5u-2b 固体菌剂,有效活菌数不低于 10<sup>9</sup> CFU/g;

#### 2) 含菌株 LB-4-4-1c 微生物菌剂的制备方法

##### ①菌种活化

将冻存的 LB-4-4-1c 在 37℃条件下快速解冻,按照 0.5-1%的接种量接入装有 10-15ml 液体培养基 C 的试管中,28-32℃,静置培养 8-12 小时,得到 LB-4-4-1c 的一级种子液;

所述的液体培养基 C 的组成为:胰蛋白胨 5-10 g, 酵母粉 3-5 g, NaCl 5-10 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 值 6.8-7.5, 121℃灭菌 20min;

##### ②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照 3-5%的接种量接入装有 50-100ml 液体培养基 C 的三角瓶中,28-32℃,150-200rpm 培养 8-12 小时得 LB-4-4-1c 的二级培养液;

##### ③发酵罐发酵

将 LB-4-4-1c 的二级培养液按照 5-10%的接种量分别接入装有发酵培养基 D 的发酵罐中,进行发酵培养,罐温 28-32℃,培养 pH 6.8-7.5,通空气培养 30-48 小时,得菌悬液,有效活菌数不低于 10<sup>9</sup> CFU/ml,即为 LB-4-4-1c 液体菌剂;

所述的发酵培养基 D 组成为:葡萄糖 10-15g, 麸皮 5-10g, 豆粕 30-50g, 玉米粉 3-5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5-10g/ml, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1-0.2g/ml, Ca<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 5-13 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5-10 g, 水 1000ml, pH 6.8~7.5, 121℃灭菌 30min;

##### ④含 LB-4-4-1c 菌株的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎,过 60 目筛,按照质量百分比为 20-30 :20-30 :5-10 :30-50 的比例混合均匀,用耐高温塑料袋装,1-1.5Kg/袋,121℃灭菌 2-3 小时,即得 LB-4-4-1c 发酵固态基质;

将上述步骤③所得的 LB-4-4-1c 液体菌剂按照 50-100ml/kg 的剂量与上述所得的 LB-4-4-1c 发酵固态基质混匀,28-32℃发酵 5-7 天,有效活菌数达到不低于 10<sup>9</sup> CFU/g,即得到固体菌剂;

#### 3) 含菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂的制备

将上述所得的 SRB-2-5u-2b 液体菌剂和 LB-4-4-1c 液体菌剂按照质量百分比为 30-50:50-70 的比例混合均匀即得 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂;

#### 4) 含菌株 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂的制备

将 SRB-2-5u-2b 固体菌剂和 LB-4-4-1c 固体菌剂按照质量百分比为 30-50:50-70 的比例混合均匀即得 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂。

[0010] 上述菌株可应用在土壤重金属 Cd 污染环境治理和生态修复,具体使用方法如下:在植物浸种或植物移栽时,用 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂浸泡种子或植物根部 1-3 小时;育苗期或生长期灌根时,将上述所得的 SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合液体菌剂用液体菌剂稀释液稀释 500-1000 倍,10-40ml/Kg 土壤剂量浇灌稀释液,整个生长期灌根 1-2 次;SRB-2-5u-2b 和 LB-4-4-1c 的混合固体菌剂可作为基肥和追肥使用,使用剂量为 5-20g/Kg 土壤;

所述的液体菌剂稀释液组成为:葡萄糖 10-15 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5-13 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{KCl}$  0.2-0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5-0.8g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5-3.0g,  $\text{NaHCO}_3$  0.3-0.5g,  $\text{CaCl}_2$  0.2-0.3g,  $\text{MgSO}_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, L-半胱氨酸 0.5-1g, 蒸馏水 1000ml。

[0011] 本发明采用硫酸盐还原菌-解磷菌联合修复土壤中的 Cd 污染能够克服现有技术的缺点。解磷菌能将土壤中植物难以吸收利用的固定态磷转化为可溶性的磷酸根离子,当土壤表层或植物根际的硫化镉被氧化时,可溶性的磷酸根离子与  $\text{Cd}^{2+}$  形成磷酸镉沉淀,降低植物对 Cd 的吸收。另外,部分解磷菌除具有解磷能力外还可产生铁载体、吡啶乙酸、具有 ACC 脱胺酶活性等促进植物生长,提高作物的产量。

[0012] 本发明的有益效果:1)与目前的 Cd 污染修复方法相比,本发明能够实现边修复边进行农业生产的目的,在修复的同时提高农作物的产量和安全性;2)本发明能够同时修复土壤表层、较深层和植物根际土壤,降低 Cd 对地表水和地下水的污染,同时还能够提高土壤的活性和肥力;3)本发明既能够修复 Cd 污染的水田土壤又能够用于旱田土壤的修复。

## 附图说明

[0013] 图 1 为 1A 为 SRB-2-5u-2b 在固体培养基上 E 的菌落形态;1B 为革兰氏染色照片;

图 2 为 SRB-2-5u-2b 耐 Cd 生长能力;

图 3 为 SRB-2-5u-2b 系统发育树;

图 4 为 4A 为 LB-4-4-1c 在固体培养基上 C 的菌落形态,4B 为 LB-4-4-1c 在培养基上 F 的菌落形态,4C 为 LB-4-4-1c 革兰氏染色照片;

图 5 为 LB-4-4-1c 耐 Cd 生长能力;

图 6 为 LB-4-4-1c 系统发育树;

图 7 为 SRB、解磷菌及 SRB-解磷菌联合修复 Cd 污染土壤效果比较;

图 8 为 SRB、解磷菌及 SRB-解磷菌联合修复对油菜干重及镉含量的影响,其中 8A 为施用供试菌剂后,油菜地上部分干重的比较;8B 为油菜地下部分干重的比较;8C 为油菜地上部分含 Cd 量的比较;8D 为油菜地下部分含 Cd 量的比较;

图 9 为 SRB、解磷菌及 SRB-解磷菌联合修复对稻米产量及镉含量的影响,其中 9A 为施用供试菌剂后,糙米产量的比较;9B 为糙米 Cd 含量的比较;9C 为稻米秸秆 Cd 含量的比较。

## 具体实施方式

[0014] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的保护范围。

[0015] 实施例 1 高效耐镉硫酸盐还原菌株的诱变选育

(一) 本发明提供的 SRB 菌株的诱变选育方法, 包括以下步骤:

- 1) 本实验室从 Cd 污染土壤中筛选的一株兼性厌氧菌 SRB-2 作为出发菌株;
- 2) 诱变选育

(1) 制备出发菌株 SRB-2 的单细胞悬液

将出发菌株 SRB-2 接种于液体培养基 A 中, 28-32°C, 无菌液体石蜡封面, 静置培养 36 小时, 离心, 用无菌生理盐水洗涤, 置于装有玻璃珠的三角瓶内, 振荡, 使其分散成单细胞的菌悬液;

所述的液体培养基 A 组成为:  $K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 蒸馏水 1000ml, pH 7.0~7.2, 121°C 灭菌 20min。用无菌蒸馏水配制 50 mg/ml 的 L-半胱氨酸盐, 用 0.25 $\mu$ m 的无菌过滤器过滤后, 临用前以 1-2ml/100ml 的比例加入已灭菌的上述培养基中。

[0016] (2) 紫外线诱变

将步骤(1)所得的菌悬液调节浓度至  $10^5$ - $10^7$  个/ml, 取 0.1-0.2ml 分别涂布于含 80, 120 或 200mg/l  $Cd^{2+}$  的固体培养基 A 上, 进行紫外诱变, 紫外诱变的频率为 10-18W, 照射距离为 25-50cm, 照射时间 5-10min; 处理后的平皿在厌氧手套箱中 32-35°C 静置培养 6-7 天, 各挑选 15-20 个较大的单菌落, 进行厌氧和有氧培养复筛, 用硫酸钡沉淀法测定各菌株在厌氧和有氧条件下还原硫酸根离子活性, 选出一株在厌氧和有氧条件下硫酸盐还原能力高且耐受  $Cd^{2+}$  能力强的菌株 SRB-2-5, 制成菌悬液用于下一步等离子体的诱变;

所述的厌氧条件为: 向厌氧培养瓶中加入 200ml 液体培养基 A, 将所选菌株分别接入厌氧培养瓶中, 且在液面加入 10-20ml 的液体石蜡封住液面, 在厌氧手套箱中 32-35°C 静置培养 6-7 天;

所述的有氧条件为: 向三角瓶中加入 200ml 液体培养基 A, 在有氧条件下, 将所选菌株分别接入三角瓶中, 32-35°C 在生化培养箱中静置培养 6-7 天。

[0017] 所述的含 Cd 固体培养基 A 组成为: 上述液体培养基 A 中加入  $CdCl_2$  0.033-0.392g/1000ml, 15-20g 琼脂粉/1000ml。

[0018] (3) 等离子体诱变

将步骤(2)所得的 SRB-2-5 菌株, 制成  $10^5$ - $10^7$  个/ml 的菌悬液, 取 0.1-0.2ml 分别均匀涂布于无菌培养皿中, 涂布面积大小近似于电极板, 将培养皿放到等离子体下面的电极上, 调节上电极的位置, 使上下电极之间的距离为 3-8mm, 调节电压为 3-5V, 电流为 0.5-0.8A, 使空气或氩气放电, 得到均匀的空气或氩气介质阻挡放电等离子体, 放电时间为 2-7min。诱变后立即用无菌生理盐水或磷酸盐洗脱, 涂布于含 Cd 固体培养基 A 上, 各挑选 15-20 个较大的单菌落, 进行厌氧和有氧培养复筛, 用硫酸钡沉淀法测定各菌株在厌氧和有氧条件下还原硫酸根离子活性, 选出一株在厌氧和有氧条件下硫酸盐还原能力高且耐受  $Cd^{2+}$  能力强的菌株 SRB-2-5u。

[0019] (4) 将步骤(3)所得的 SRB-2-5u 菌悬液活菌数调至  $10^5$ - $10^7$  个/ml, 循环重复紫外线诱变→等离子体诱变 1-2 次, 最后得到一株在厌氧和有氧条件下硫酸盐还原能力高且耐受  $Cd^{2+}$  能力强的菌株 SRB-2-5u-2b。

[0020] SRB-2-5u-2b 与 SRB-2 相比其在含 Cd 的液体培养基 A 中耐受 Cd 的生长能力和在有氧条件下硫酸盐还原活性均明显提高, 其结果见表 1。



表 1 SRB-2 和 SRB-2-5u-2b 的性质比较

菌株编号	耐 Cd 生长能力 (mg/l)	有氧条件下硫酸盐还原活性 (%)
SRB-2	40	34.23±6.35
SRB-2-5u-2b	120	68.47±10.85

[0021] (二)、SRB-2-5u-2b 的生理特性

1) 形态特征

本菌株在固体培养基 E 上菌落呈黑色, 圆形, 其菌落形态如图 1A 所示。

[0022] 所述的固体培养基 E 组成为:

$K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 琼脂粉 15-20g, 蒸馏水 1000ml。PH 7.0~7.2, 121℃ 灭菌 20min。 $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ , L-半胱氨酸分别用无菌蒸馏水配制为 10mg/ml 和 50 mg/ml, 用 0.25 $\mu$ m 的无菌过滤器过滤后, 临用前分别以 5-8ml/100ml 和 1-2ml/100ml 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀。

[0023] 2) 培养特征

最适生长条件为: 最适的生长温度 28-35℃, 最适的 pH 值为 7.0-7.2。

[0024] 3) 生理特性

G<sup>-</sup>, 兼性厌氧, 其革兰氏染色结果如附图 1B 所示。

[0025] 4) 功能特性

在厌氧条件下, 硫酸盐还原率为 97.71-100%, 在有氧条件下, 硫酸盐还原率为 57.62-79.32%;

5) 耐镉生长能力

在含 Cd 的液体培养基 A 中能够耐受 120mg/l 的  $Cd^{2+}$  生长, SRB-2-5u-2b 在含 120mg/l 的  $Cd^{2+}$  的液体培养基 B 中的生长情况如图 2 所示。

[0026] (三)、SRB-2-5u-2b 的 16Sr RNA 序列测定

采用通用引物 27FP1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) 和 1429R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为: 10mMol 的 dNTP 0.5  $\mu$ l, 模板 DNA 1  $\mu$ l, 10×PCR buffer 5  $\mu$ l, 25mMol  $MgCl_2$  3  $\mu$ l, 引物各 1  $\mu$ l, TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 37.5  $\mu$ l; 预变性: 95℃ 3 分钟, 循环一次; 变性: 95℃ 1 分钟, 退火 55℃ 1 分钟, 延伸 72℃ 2 分钟, 循环 35 次; 终延伸: 72℃ 5 分钟。1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离、提取目标条带, 送北京三博远志公司测序。测序结果如 SEQ ID No:1 所示。

[0027] *CACCATGCAGTCGACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG*

CGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGT  
AGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC  
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
CGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTAATTCGATGCA  
ACGCGGAAGAACCCTTACCTACT

选取以上部分序列输入 NCBI 数据库进行序列比对,利用 MEGA 4.1 处理比对结果并建立系统发育树(图 3)。该菌株与 *Enterbacter ludwigii strain EN-119* 同源性达到 99%,因此鉴定 SRB-2-5u-2b 属于路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。

#### [0028] 实施例 2 耐镉解磷菌株的诱变选育

(一) 本发明提供的 LB4-4-1c 菌株的诱变选育方法,包括以下步骤:

- 1) 以实验室从 Cd 污染土壤植物根际筛选的具有较高解磷能力的 LB-4 作为出发菌株;
- 2) 诱变选育

(1) 制备出发菌株 LB-4 的单细胞悬液

将出发菌株 LB-4 接种于液体培养基 C 中,28-32℃,150-180rpm 培养 8-12 小时,离心,用无菌生理盐水洗涤,置于装有玻璃珠的三角瓶内,振荡,使其分散成单细胞的菌悬液;

所述的液体培养基 C 组成为:胰蛋白胨 5-10 g,酵母粉 3-5 g,NaCl 5-10 g,,蒸馏水 1000 ml,pH 值 6.8-7.5,121℃灭菌 20min。

#### [0029] (2) 紫外线诱变

将步骤(1)所得的菌悬液分别调节浓度至  $10^5$ - $10^7$ CFU/ml,取 0.1ml 涂布于含 80, 120 或 200mg/l  $Cd^{2+}$  固体培养基 C 上,进行紫外诱变,紫外诱变的频率为 10-18W,照射距离为 25-50cm,照射时间 5-10min;28-30℃静置培养 5-7 天,挑选 20-30 个较大的单菌落,进行摇瓶复筛,用钼蓝比色法测定各菌株的解磷能力,选择 5-8 株解磷活性最高的菌株,再分别作摇瓶复筛,选出一株解磷活性高且稳定性好的菌株 LB-4-4,制成菌悬液用于下一步等离子体的诱变;

所述的摇瓶复筛的步骤是:首先对上述分离得到的 20-30 个较大的菌株接种到 100ml 上述的液体培养基 C 中,培养 8-12 小时。取 5ml 菌液接种到装有 100ml 液体培养基 F 的 250ml 的锥形瓶中,28-32℃,150rpm 摇床振荡培养 5-7 天;

所述的含镉固体培养基 C 组成为:胰蛋白胨 5-10 g,酵母粉 3-5 g,NaCl 5-10 g, $CdCl_2$  0.033-0.392g,蒸馏水 1000 mL,琼脂粉 15-20 g,pH 值 6.8-7.5,121℃灭菌 20min。

[0030] 所述的液体培养基 F 组成为:葡萄糖 10-15 g, $Ca_3(PO_4)_2$  5-13 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25 g,KCl 0.2-0.5 g, $(NH_4)_2SO_4$  0.1-0.2g,琼脂粉 15-20 g,蒸馏水 1000 ml,pH 6.8-7.5,121℃灭菌 20min。。

#### [0031] (3) 等离子体诱变

将步骤(2)所得的 LB-4-4 菌株,制成  $10^5$ - $10^7$ CFU/ml 的菌悬液,取 0.1-0.2ml 均匀涂布于无菌培养皿中,将培养皿放到等离子体下面的电极上,调节上电极的位置,使得上下电极之间的距离控制在 3-8mm 左右,调节电压为 3-5V,电流为 0.5-0.8A,使空气或氩气放电,得到均匀的空气或氩气介质阻挡放电等离子体,放电时间为 2-7min。诱变后立即用无菌生理盐水或磷酸盐洗脱,涂布于含 80, 120 或 200mg/l  $Cd^{2+}$  的固体培养基 C 上,再进行摇瓶复筛,

挑出解磷活性最高的一株菌 LB-4-4-1,制成菌悬液用于下一步的诱变;所述的摇瓶复筛的方法同步步骤(2);

(4) 将步骤(3)所得的菌悬液活菌数调至  $10^5-10^7$ CFU/ml,循环重复紫外线诱变→等离子体诱变 1-2 次,最后筛选出一株耐受重金属 Cd 且解磷活性最高的菌株 LB-4-4-1c。

[0032] LB-4-4-1c 与 LB-4 相比其在含 Cd 的液体培养基 D 中耐受 Cd 的生长能力与解无机磷能力均明显提高,其结果见表 2。

表 2 LB-4 与 LB-4-4-1c 的性质比较

菌株编号	耐 Cd 生长能力(mg/l)	可溶性磷含量 (mg/l)
LB-4	80	501.1±7.3
LB-4-4-1c	120	1100±10.4 mg/l

[0033] (二)、LB-4-4-1c 的生理特性

1) 形态特征

本菌株在固体培养基 C 上菌落呈乳白色或淡黄色,圆形,其菌落形态如附图 4A 所示,在固体培养基 F 上菌落呈乳白色,圆形,其菌落形态如附图 4B 所示。

[0034] 2) 培养特征

最适生长条件为:最适的生长温度 28-32℃,最适的 pH 值为 6.8-7.5。

[0035] 3) 生理特性

G<sup>-</sup>,好氧或兼性厌氧,其革兰氏染色结果如图 4C 所示。

[0036] 4) 功能特性

在液体培养基 F 中解无机磷能力为 1100±10.4 mg/l,能够使液体培养基 F 的 pH 从初始的 6.8-7.5 降至 4.03-4.42;在液体培养基 G 中解卵磷脂能力为 95±2.6mg/l,在液体培养基 H 中解植酸钙能力为 460±8.4mg/l;产吡啶乙酸的能力为 32.7±1.2mg/l;

所述的液体培养基 F 组成为:葡萄糖 10g, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g, KCl 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0。

[0037] 所述的液体培养基 G 组成为:蛋白胨:10g, 牛肉膏:3g, NaCl: 5g, 大豆卵磷脂 2g, 蒸馏水 1000 ml, pH 6.8-7.0。

[0038] 所述的液体培养基 H 组成为:葡萄糖:10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl:0.3g, KCl 0.3g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O:0.3g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.03g, 植酸钙 5g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0-7.5。

[0039] 5) 耐镉生长能力

在含 Cd 的液体培养基 B 中能够耐受 120mg/l 的 Cd<sup>2+</sup>生长, LB-4-4-1c 在含 120mg/l 的 Cd<sup>2+</sup>的液体培养基 C 中的生长情况如附图 5 所示。

[0040] (三)、LB-4-4-1c 的 16Sr RNA 序列测定

所用引物、PCR 方法等均与 SRB-2-5u-2b 的测定方法相同,测序结果如 SEQ ID No:2 所示。

[0041] CATGCAGTCGACGGTCTCTTCGGAGGCAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTACCGTTC TCTACGGAATAACTCAGGAACTTGTGCTAATACCGTATAACGCCCTTTGGGGAAAGATTTATCGGAGAATGAT

GAGCCCATGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC  
GCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAA  
TGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGT  
TCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGA  
ACTGCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGA  
TATTCGCAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGGTGTTTACTTTCGGTGGC  
GCAGCTAACGCATTAACATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGC  
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCTCTTGACATGCCTATGAATGTTA  
GTGGAGACACTTTCAGCCTTTCGGGGCGTAGGACACAGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG  
GGTTAAGTC

选取以上部分序列输入 NCBI 数据库进行序列比对,利用 MEGA 4.1 处理比对结果并建立系统发育树(图 6)。该菌株与解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) 同源性达到 99%,因此鉴定 LB-4-4-1c 属于解糖假苍白杆菌。

#### [0042] 实施例 3 SRB-2-5u-2b 还原硫酸根活性测定

将 SRB-2-5u-2b 接种到装有 10ml 液体培养基 A 的试管中,液体石蜡封面,35℃ 静置培养 20 小时,取 100  $\mu$  l(用液体培养基 A 稀释菌液,使其 OD600 为 0.3)菌液接种于液体培养基 A 中,35℃,分别在厌氧或有氧条件下,静置培养 7 天,采用硫酸钡沉淀法进行测定其硫酸盐还原活性。所述的厌氧条件为:向厌氧培养瓶中加入 200ml 液体培养基 A,将 SRB-2-5u-2b 分别接入厌氧培养瓶中,且在液面加入 20ml 的液体石蜡封住液面,在厌氧手套箱中 35℃ 静置培养 7 天;所述的有氧条件为:向三角瓶中加入 200ml 液体培养基 A,在有氧条件下将 SRB-2-5u-2b 接入三角瓶中,35℃ 在生化培养箱中静置培养 7 天。

[0043] 结果表明:在厌氧条件下,SRB-2-5u-2b 还原硫酸盐活性为 100%,在有氧条件下,其还原硫酸盐活性为 79.32%。

#### [0044] 实施例 4 LB-4-4-1c 解磷菌解无机磷、植酸钙、卵磷脂能力测定

将液体培养基 F、G 或 H 按每瓶 100ml 分装到 250ml 的三角瓶中,灭菌备用。将 LB-4-4-1c 分别接种于 50ml 液体培养基 C 中,28℃,静置培养 36 小时后,取 100  $\mu$  l(用液体培养基 C 稀释菌液,使其 OD600 为 0.7)菌液接种于上述的液体培养基 F、G 或 H 中,28℃,150rpm 培养 7 天,取上述摇床培养的菌液,10000rpm 离心 10 分钟,取上清液,用钼锑抗法测定上清液中磷含量。实验结果表明:LB-4-4-1c 解无机磷(磷酸钙)能力为 1110.4 mg/l,解卵磷脂能力为 97.6mg/l,解植酸钙能高达 468.4mg/l。

[0045] 所述的液体培养基 C 组成为:胰蛋白胨 5 g,酵母粉 5 g,NaCl 10 g,,蒸馏水 1000 ml, pH 值 6.8-7.5。

[0046] 所述的液体培养基 F 组成为:葡萄糖 10g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, KCl 0.2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 g,蒸馏水 1000 ml, pH 7.0。

[0047] 所述的液体培养基 G 组成为:蛋白胨:10g, 牛肉膏:3g, NaCl: 5g,大豆卵磷脂 2g, 蒸馏水 1000 ml, pH 6.8-7.0。

[0048] 所述的液体培养基 H 组成为:葡萄糖:10g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g, NaCl:0.3g, KCl

0.3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ :0.3g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.03g, 植酸钙 5g, 蒸馏水 1000 ml, pH 7.0-7.5。

#### [0049] 实施例 5 SRB-2-5u-2b耐镉生长能力测定

将 SRB-2-5u-2b 接种于液体培养基 A 中富集培养, 生长至指数期, 8000 rpm 离心 10 min, 用 0.85% 的无菌 NaCl 溶液洗涤三次后, 再用 0.85% 的无菌 NaCl 溶液调整菌液浓度为  $10^7$  CFU/ml, 吸取 1 ml 加入含有 100 ml 添加不同浓度  $Cd^{2+}$  (0、20、40、80、120 或 200mg/l) 的液体培养基 A 的 250 ml 三角瓶中,  $Cd^{2+}$  以  $CdCl_2$  的形式加入,  $35^\circ C$ , 培养 6 天后测定  $OD_{600}$ 。结果表明: 在  $Cd^{2+}$  浓度达到 120mg/l 时, SRB-2-5u-2b 仍能够生长, 说明能够耐受较高浓度的  $Cd^{2+}$ , 在污染较为严重的 Cd 污染土壤中能够生长, 具有修复 Cd 污染土壤的潜力。其结果如附图 2 所示。

#### [0050] 实施例 6 解磷菌耐镉生长能力测定

将 LB-4-4-1c 接种于液体培养基 C 中富集培养, 生长至指数期, 8000 rpm 离心 10 min, 用 0.85% 的无菌 NaCl 溶液洗涤三次后, 再用 0.85% 的无菌 NaCl 溶液调整菌液浓度为  $10^7$  CFU/ml, 吸取 1 ml 加入含有 100 ml 添加不同浓度  $Cd^{2+}$  (0、20、40、80、120 或 200mg/l) 的液体培养基 C 的 250 ml 三角瓶中,  $Cd^{2+}$  以  $CdCl_2$  的形式加入,  $28^\circ C$ , 150rpm 培养, 培养 6 天后测定  $OD_{600}$ 。结果表明: 在  $Cd^{2+}$  浓度达到 120mg/l 时, LB-4-4-1c 仍能够生长, 说明能够耐受较高浓度的  $Cd^{2+}$ , 在污染较为严重的 Cd 污染土壤中能够生长, 具有修复 Cd 污染土壤的潜力。其结果如附图 5 所示。

#### [0051] 实施例 7 SRB菌剂的制备

SRB-2-5u-2b 微生物菌剂的制备方法, 包括以下步骤:

##### ①菌种活化

将冻存的 SRB-2-5u-2b 在  $37^\circ C$  条件下快速解冻, 按照 0.5-1% 的接种量接入装有 10-15ml 液体培养基 A 的试管中,  $30-35^\circ C$ , 静置培养 8-12 小时, 得到 SRB-2-5u-2b 的一级种子液;

所述的液体培养基 A 的组成为:  $K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 蒸馏水 1000ml。PH 7.0~7.2,  $121^\circ C$  灭菌 20min。L- 半胱氨酸分别用无菌蒸馏水配制为 50 mg/ml, 用 0.25 $\mu m$  的无菌过滤器过滤后, 临用前以 1-2ml/100ml 的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀。

##### [0052] ②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照 3-5% 的接种量接入装有 100-200 ml 液体培养基 A 的厌氧培养瓶中,  $28-32^\circ C$ , 静置培养 8-12 小时;

##### ③发酵罐发酵

将 SRB-2-5u-2b 的二级培养液按照 5-10% 的接种量分别接入装有液体培养基 A 的发酵罐中, 进行发酵培养, 罐温  $30-35^\circ C$ , 培养 pH7.0-7.5, 通氮气培养 35-40 小时, 得菌悬液, 有效活菌数不低于  $10^9$  CFU/ml, 即为 SRB-2-5u-2b 液体菌剂;

##### ④含菌株 SRB-2-5u-2b 的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎, 过 60 目筛, 按照质量百分比为 20-30 : 20-30 : 5-10 : 30-50 的比例均匀混合, 再按照 300-500ml/Kg 的比例加入液体培养基

B,混合均匀后用耐高温塑料袋装,1-1.5Kg/袋,121℃灭菌2-3小时。L-半胱氨酸盐用无菌蒸馏水配制为50mg/ml,用0.25μm的无菌过滤器过滤后,临用前以10-20ml/Kg的比例加入已灭菌的培养基中并充分混合均匀,即得SRB-2-5u-2b发酵固态基质。

[0053] 所述的液培养基B组成为: $K_2HPO_4$  0.5-0.8g,  $(NH_4)_2SO_4$  2.5-3.0g,  $NaHCO_3$  0.3-0.5g,  $CaCl_2$  0.2-0.3g,  $MgSO_4$  1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, 琼脂粉 15-20g, 蒸馏水 1000ml。PH 7.0~7.2, 121℃灭菌 20min。

[0054] 将步骤③得到的SRB-2-5u-2b液体菌剂按照50-100ml/kg的剂量与上述所得的SRB-2-5u-2b发酵固态基质混匀,30-35℃培养5-7天,即得SRB-2-5u-2b固体菌剂,有效活菌数不低于 $10^9$  CFU/g。

[0055] 实施例8 解磷菌菌剂的制备

含菌株LB-4-4-1c微生物菌剂的制备方法,包括以下步骤:

①菌种活化

将冻存的LB-4-4-1c在37℃条件下快速解冻,按照0.5-1%的接种量接入装有10-15ml液体培养基C的试管中,28-32℃,静置培养8-12小时,得到LB-4-4-1c的一级种子液;

所述的液体培养基C的组成为:胰蛋白胨 5-10 g, 酵母粉 3-5 g, NaCl 5-10 g, 蒸馏水 1000 ml, pH值 6.8-7.5, 121℃灭菌 20min。

[0056] ②二级三角瓶液体培养

将一级种子液按照3-5%的接种量接入装有50-100ml液体培养基C的三角瓶中,28-32℃,150-200rpm培养8-12小时;

③发酵罐发酵

将LB-4-4-1c的一级培养液按照5-10%的接种量分别接入装有发酵培养基D的发酵罐中,进行发酵培养,罐温28-32℃,培养pH6.8-7.5,通空气培养30-48小时,得菌悬液,有效活菌数不低于 $10^9$  CFU/ml,即为LB-4-4-1c液体菌剂;

所述的发酵培养基D组成为:葡萄糖 10-15g, 麸皮 5-10g, 豆粕 30-50g, 玉米粉 3-5g,  $KH_2PO_4$  5-10g/ml,  $K_2HPO_4$  0.1-0.2g/ml,  $Ca_2(PO_4)_3$  5-13 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5-10 g, 水 1000ml, pH 6.8~7.5, 121℃灭菌 30min。

[0057] ④含LB-4-4-1c菌株的固体菌剂的制备

将秸秆粉、草炭土、麸皮和豆粕用高速粉碎机粉碎,过60目筛,按照质量百分比为20-30:20-30:5-10:30-50的比例混合均匀,用耐高温塑料袋装,1-1.5Kg/袋,121℃灭菌2-3小时,即得LB-4-4-1c发酵固态基质。

[0058] 将上述步骤③所得的LB-4-4-1c液体菌剂按照50-100ml/kg的剂量与上述所得的LB-4-4-1c发酵固态基质混匀,28-32℃发酵5-7天,有效活菌数达到不低于 $10^9$  CFU/g,即得到固体菌剂。

[0059] 实施例9 SRB-2-5u-2b和LB-4-4-1c的混合液体菌剂的制备

将实施例7和实施例8所得的SRB-2-5u-2b液体菌剂和LB-4-4-1c液体菌剂按照质量百分比为30-50:50-70的比例混合均匀即得SRB-2-5u-2b和LB-4-4-1c的混合液体菌剂。

[0060] 将实施例7和实施例8所得的SRB-2-5u-2b固体菌剂和LB-4-4-1c固体菌剂按照质量百分比为30-50:50-70的比例混合均匀即得SRB-2-5u-2b和LB-4-4-1c的混合固体菌剂。

**[0061] 实施例 10 SRB-解磷菌联合修复土壤 Cd 污染**

具体步骤为：

1) 供试土壤 Cd 含量为 1.62mg/kg, 供试土壤的 pH 为 8.37, 有机质含量为 2.36mg/kg, 全氮含量为 5.78mg/kg, 速效磷含量为 20.35mg/kg, 速效钾含量为 3.75mg/kg。土壤经风干后过 3mm 筛, 充分混匀后装入直径为 14 cm、高 24 cm 的花盆, 每盆装土 1.5 kg。分别按照 0、20、40、80、120 或 200mg Cd<sup>2+</sup> /kg 土壤的剂量加入 CdCl<sub>2</sub>溶液, 每个剂量组设 12 个平行, 充分混匀后每隔 5 天浇一次去离子水, 室温平衡 30 天；

2) 将上述制备的每盆土壤分别取出 100g 加入 100ml 塑料离心管中, 每个剂量组分为 A、B、C、D 4 组, 每组 3 个平行, 其中 A 组为对照组, 每管加入 20ml 液体菌剂稀释液 C, B 组每管加入 20ml LB-4-4-1c 液体菌剂、C 组每管加入 20ml SRB-2-5u-2b 液体菌剂, D 组每管加入 10ml LB-4-4-1c 液体菌剂和 10ml SRB-2-5u-2b 液体菌剂, 各组充分混匀后, 每隔 1 周各组均加入 10ml 蒸馏水, 搅拌均匀, 室温培养 30 天后, 直接取湿润的土壤加入 1M 的 MgCl<sub>2</sub>溶液 (按照每克干土加入 8 ml 浓度为 1M 的 MgCl<sub>2</sub>溶液), pH 7.0, 25±1℃, 150rpm 振荡提取 1 小时, 8000rpm 离心 15 分钟, 取上清液用火焰原子吸收光谱法测定土壤中水溶-可交换态 Cd 的含量。结果表明: 加入菌剂组与对照组相比均能够明显降低土壤中水溶-可交换态 Cd 的含量, 其中 D 组土壤中水溶-可交换态 Cd 的含量最低, 对水溶-可交换态 Cd 的固定效率为 45.5%-91.7%, A 组和 B 组的固定效率分别为 39.5%-71.0% 和 30.1%-55%。因此, SRB 和解磷菌联合修复 Cd 污染土壤效果最佳。结果见附图 7。

**[0062] 实施例 11 SRB-解磷菌联合修复对减少油菜中镉含量的作用**

将实施例 7、8、9 所得的 SRB-2-5u-2b、LB-4-4-1c 及 LB-4-4-1c 和 SRB-2-5u-2b 混合液体菌剂分别用液体菌剂稀释液稀释 10 倍, 将实施例 9 步骤 1) 制备的盆栽土壤每个剂量组分为 A、B、C、D 4 组, 每组 3 个平行, 其中 A 组为对照组, 每盆土壤中加入 150ml 液体菌剂稀释液, B 组每盆加入 150ml 稀释后的 LB-4-4-1c 液体菌剂、C 组每盆加入 150ml 稀释后的 SRB-2-5u-2b 液体菌剂, D 组每盆加入 150ml 稀释后的 LB-4-4-1c 和 SRB-2-5u-2b 混合液体菌剂, 各组充分混匀后, 25℃ 静置一周。

[0063] 选取大小均匀的油菜种子 (四月慢) 放入灭菌小三角瓶中, 用 95% 酒精浸 5 分钟, 倒去酒精, 加入 3% NaClO 溶液表面灭菌 2 分钟, 倒去次氯酸钠, 用无菌水洗 6~8 次。盆栽育苗, 待苗长出四个子叶, 选取长势良好, 大小均一的油菜苗移栽到上述四组花盆内, 每盆定苗 5 株。每隔 2 周浇 Hongland 无磷植物营养液一次, 每盆浇 50ml, 植株生长 45 天后收获, 分别测定植株地上和地下部分干重, 石墨炉原子分光光度计法测定植物地上和地下部分 Cd 含量。

[0064] 所述的液体菌剂稀释液组成为: 葡萄糖 10-15 g, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5-13 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5 g, KCl 0.2-0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5-0.8g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5-3.0g, NaHCO<sub>3</sub> 0.3-0.5g, CaCl<sub>2</sub> 0.2-0.3g, MgSO<sub>4</sub> 1.0-1.5g, 酵母膏 1.0-1.5g, 乳酸钠 1.0-2.0ml, L-半胱氨酸 0.5-1g, 蒸馏水 1000ml。

[0065] 所述的 Hongland 无磷植物营养液的组成为: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1.18 g, KNO<sub>3</sub> 0.51 g, KCl 1.4g, FeCl<sub>3</sub> 0.005 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.49g, Gibson 微量元素液 1ml, 蒸馏水 1000ml, pH 6.8~7.0。

[0066] Gibson 微量元素液: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.28g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.08g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22g,

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.126g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2.03g, 蒸馏水 1000 ml。

[0067] 实验结果表明:加入菌剂组(B、C、D组)油菜地上部分和地下部分干重均高于对照组(A组),其中D组油菜地上部分和地下部分干重分别比对照组高出5.8-57.3%和0.8-38.9%,说明SRB和解磷菌联合修复能够提高油菜的产量。加入菌剂组(B、C、D组)油菜地上部分和地下部分Cd含量均低于对照组(A组),且D组油菜地上部分和地下部分Cd含量最低。因此,SRB和解磷菌联合修复能够同时提高作物的产量和其安全性。结果见附图8。

[0068] 实施例12 SRB-解磷菌联合修复对减少水稻种Cd含量的作用

采集陕南地区稻田土样,均采自耕层0~20cm,供试土壤为潜育性黄褐土,pH 6.3,有机质含量为25.6mg/kg,全氮含量为5.78mg/kg,速效磷含量为8.62mg/kg,速效钾含量为4.31mg/kg,全Cd含量为0.28 mg/kg。经风干后过3 mm筛,充分混匀后装入直径24 cm,高35cm的塑料水桶中,每盆装土8kg。分别按照0、5、10或15mg  $\text{Cd}^{2+}$  /kg土壤的剂量加入 $\text{CdCl}_2$ 溶液,每个剂量组设12个平行,充分混匀后每隔5天浇一次去离子水,室温平衡30天;

将上述制备的盆栽土壤每个剂量组分为A、B、C、D4组,每组3个平行,其中A组为对照组,每盆土壤按照10g/Kg土壤的比例分别加入经过高温灭菌的SRB-2-5u-2b固体发酵菌剂基质和LB-4-4-1c固体菌剂发酵基质,B组按照20g/Kg土壤的比例加入SRB-2-5u-2b固体菌剂、C组按照20g/Kg土壤的比例加入LB-4-4-1c固体菌剂,D组按照20g/Kg土壤的比例分别加入SRB-2-5u-2b和LB-4-4-1c混合固体菌剂,各组充分混匀后泡水,一周后移栽水稻,水稻品名为金优725,每盆6株。在生长期,采用分蘖期和灌浆期烤田,其余时间均保持2-3cm水层。成熟后收割,计算糙米产量、石墨炉原子分光光度计法测定糙米和秸秆Cd含量。

[0069] 实验结果表明:加入菌剂组(D组)糙米的产量均高于对照组(A组),其中D组糙米的产量分别比A、B、C组高出16-60.8%、5.2-29.8%和6.9-41%,说明SRB和解磷菌联合修复能够提高水稻的产量。另外,加入菌剂组(B、C、D组)糙米和秸秆Cd含量均低于对照组(A组),且D组糙米和秸秆Cd含量最低。因此,SRB和解磷菌联合修复能够提高水稻的产量,降低大米中Cd的含量,提高其安全性。结果见附图9。



SRB-2-5u-2b 的 16Sr RNA 序列测定

<110> 西北大学

<120> 一种硫酸盐还原菌 - 解磷菌及其在联合修复镉污染土壤中的应用

<160> 2

<170> PatentIn Version 2.1

<210> 1

<211> 939

<212> DNA

<213> 路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) SRB-2-5u-2b

<220>

<400> 1

CACCATGCAG TCGACGGTAG CACAGAGAGC TTGCTCTCGG GTGACGAGTG GCGGACGGGT 60  
 GAGTAATGTC TGGGAAACTG CCTGATGGAG GGGGATAACT ACTGAAAACG GTAGCTAATA 120  
 CCGCATAACG TCGCAAGACC AAAGAGGGGG ACCTTCGGGC CTCTTGCCAT CAGATGTGCC 180  
 CAGATGGGAT TAGCTAGTAG GTGGGGTAAC GGCTCACCTA GGCACGATC CCTAGCTGGT 240  
 CTGAGAGGAT GACCAGCCAC ACTGGAAGT AGACACGGTC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG 300  
 CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG CCTGATGCAG CCATGCCGCG TGTATGAAGA 360  
 AGGCCTTCGG GTTGTAAAGT ACTTTCAGCG GGGAGGAAGG TGTGTGGTT AATAACCGCA 420  
 GCAATTGACG TTACCCGCAG AAGAAGCACC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT 480  
 ACGGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGCAG GCGGTCTGTC 540  
 AAGTCGGATG TGAAATCCCC GGGCTCAACC TGGGAACTGC ATTCGAAACT GGCAGGCTAG 600  
 AGTCTTGTAG AGGGGGTAG AATTCCAGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATCTGGAGG 660  
 AATACCGGTG GCGAAGGCGG CCCCTGGAC AAAGACTGAC GCTCAGGTGC GAAAGCGTGG 720  
 GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGTCG ACTTGGAGGT 780  
 TGTGCCCTTG AGGCGTGGCT TCCGGAGCTA ACGCGTTAAG TCGACCGCCT GGGGAGTACG 840  
 GCCGCAAGGT TAAAAC TCAA ATGAATTTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGT GGAGCATGGT 900  
 GGTTTAATTC GATGCAACGC GGAAGAACCC TTACCTACT 939

<210> 2

<211> 389

<212> DNA

<213> 解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) LB-4-4-1c

<220>

<400> 2

CATGCAGTCG ACGGTCTCTT CGGAGGCAGT GGCAGACGGG TGAGTAATGC ATGGGAATCT 60  
 ACCGTTCTCT ACGGAATAAC TCAGGGAAAC TTGTGCTAAT ACCGTATACG CCCTTTGGG 120

GAAAGATTTA TCGGAGAATG ATGAGCCCAT GTTGGATTAG CTAGTTGGTG GGGTAAAGGC 180  
CTACCAAGGC GACGATCCAT AGCTGGTCTG AGAGGATGAT CAGCCACACT GGGACTGAGA 240  
CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGGACAATGG GCGCAAGCCT 300  
GATCCAGCCA TGCCGCGTGA GTGATGAAGG CCCTAGGGTT GTAAAGCTCT TTCACCGGTG 360  
AAGATAATGA CGGTAACCGG AGAAGAAGCC CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA 420  
ATACGAAGGG GGCTAGCGTT GTTCGGATTT ACTGGGCGTA AAGCGCACGT AGGCGGACTT 480  
TTAAGTCAGG GGTGAAATCC CGGGGCTCAA CCCCAGAACT GCCTTTGATA CTGGAAGTCT 540  
TGAGTATGGA AGAGGTAAGT GGAATTGCGA GTGTAGAGGT GAAATTCGTA GATATTCGCA 600  
GGAACACCAG TGGCGAAGGC GGCTTACTGG TCCATTACTG ACGCTGAGGT GCGAAAGCGT 660  
GGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG AATGTTAGCC 720  
GTCGGGGTGT TTACACTTCG GTGGCGCAGC TAACGCATTA AACATTCCGC CTGGGGAGTA 780  
CGGTGCAAG ATTA AAACTC AAAGGAATTG ACGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT 840  
GGTTTAATTC GAAGCAACGC GCAGAACCTT ACCAGCTCTT GACATGCCTA TGAATGTTAG 900  
TGGAGACACT TTCAGCCTTT CGGGGCGTAG GACACAGTGC TGCATGGCTG TCGTCAGCTC 960  
GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTC 985

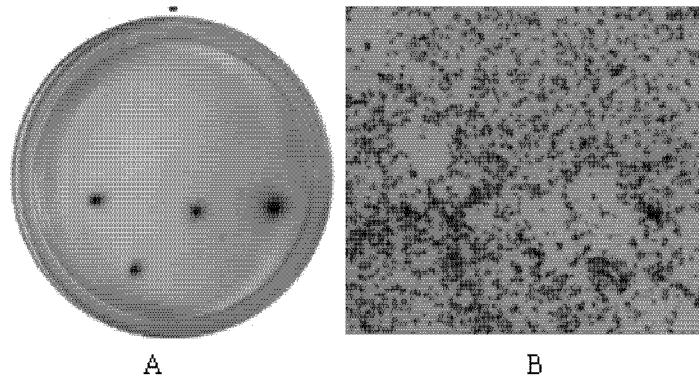


图 1

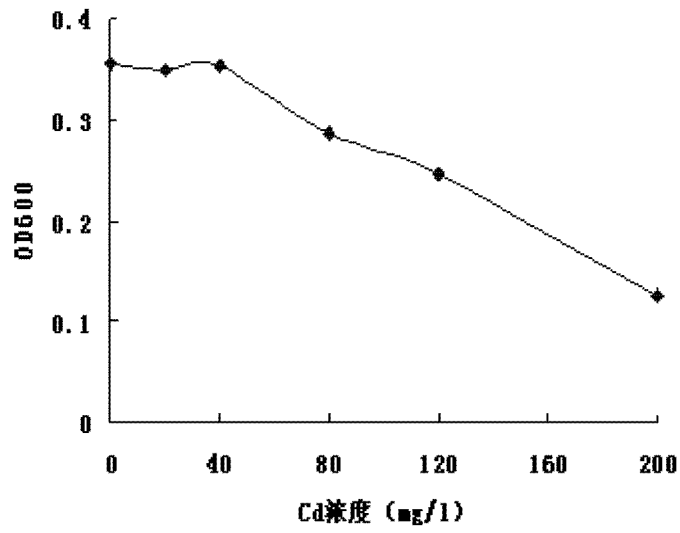


图 2

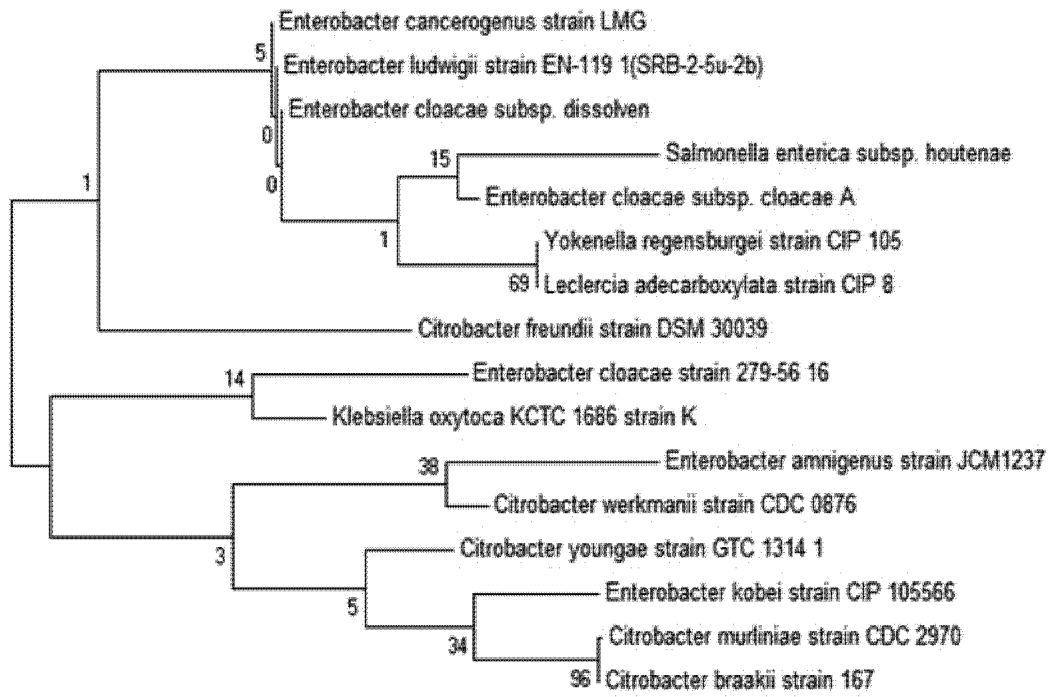
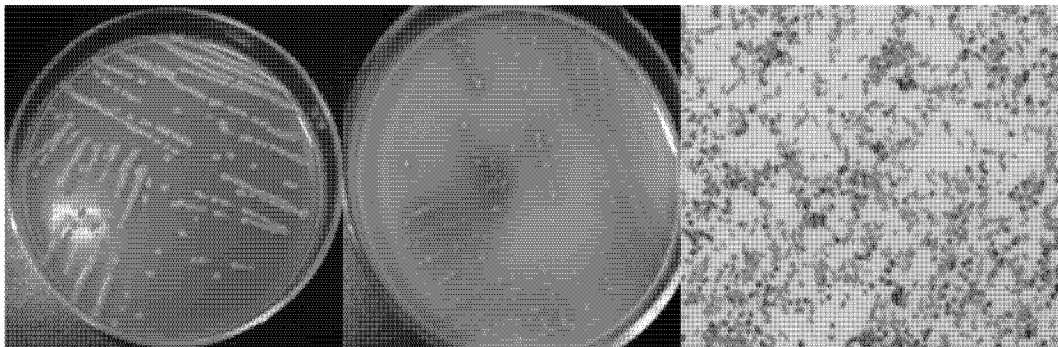


图 3



A

B

C

图 4

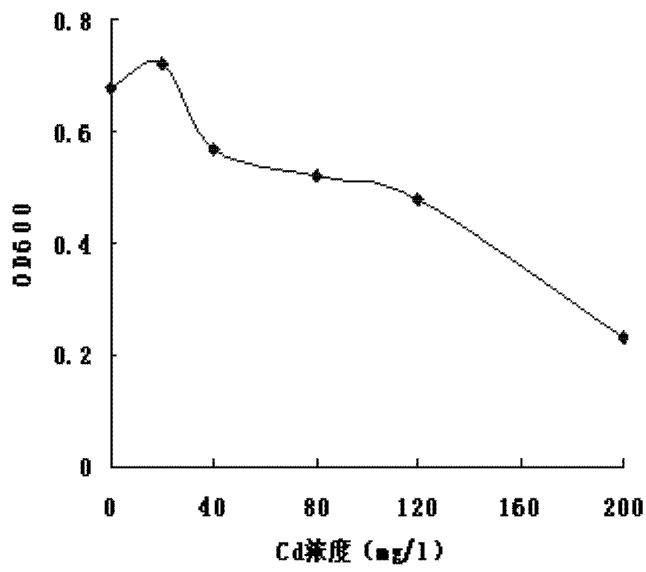


图 5

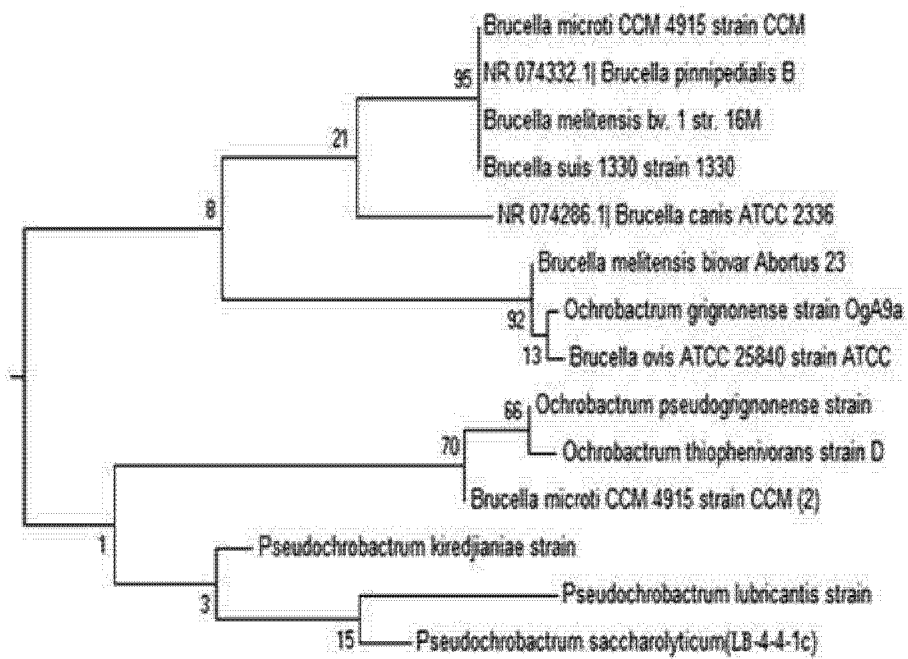


图 6

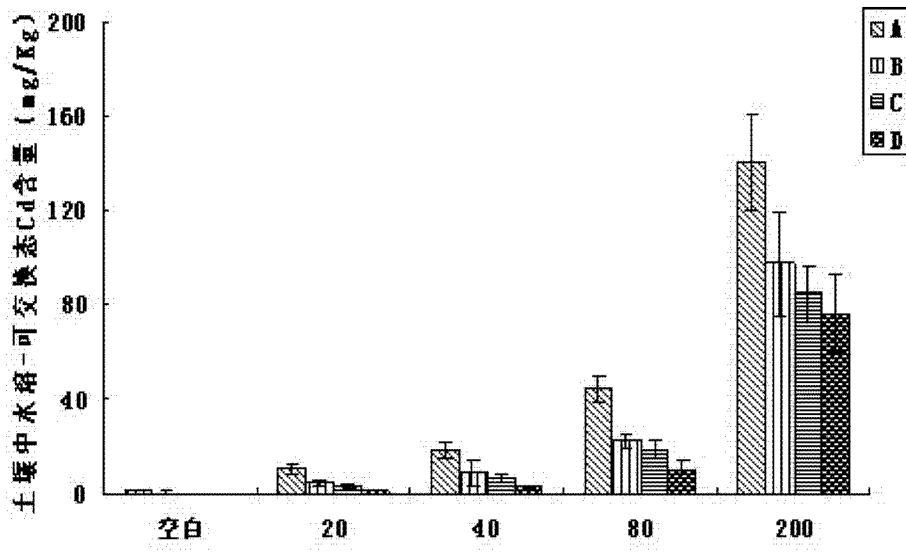


图 7

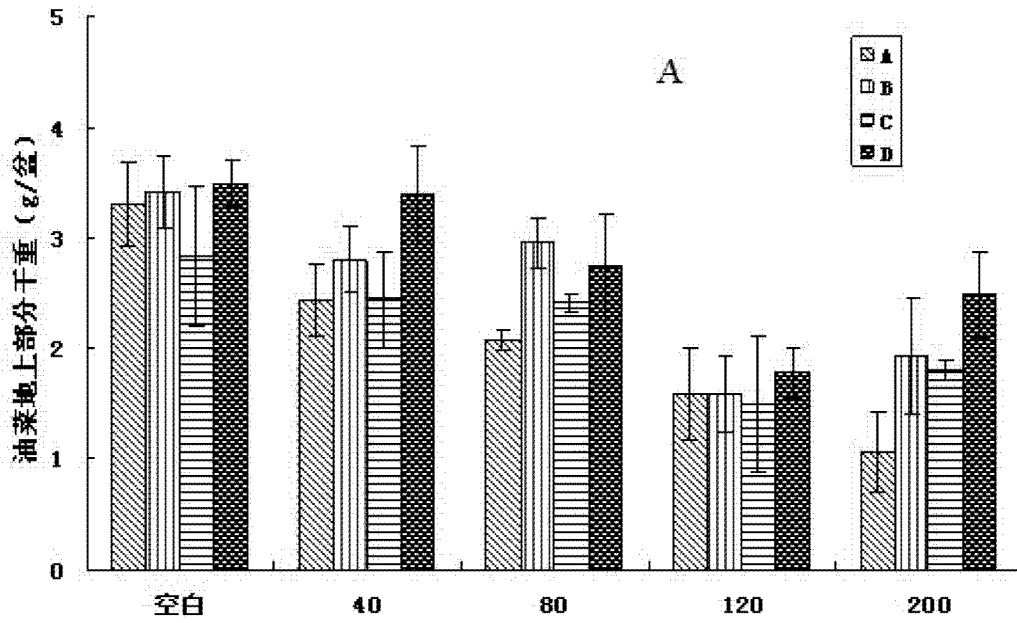


图 8A

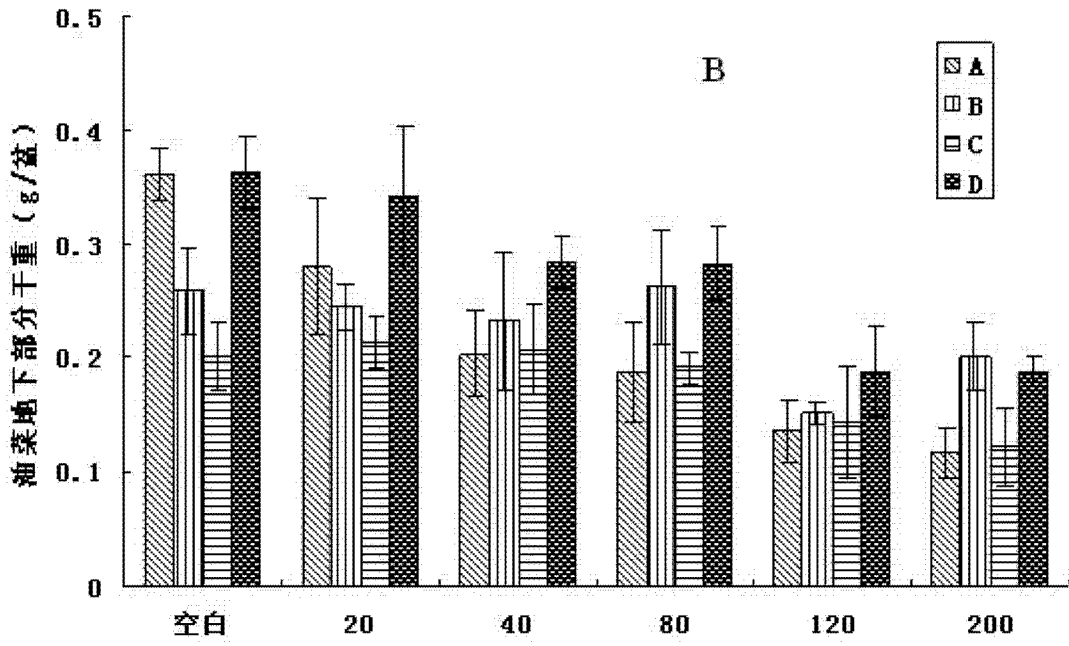


图 8B

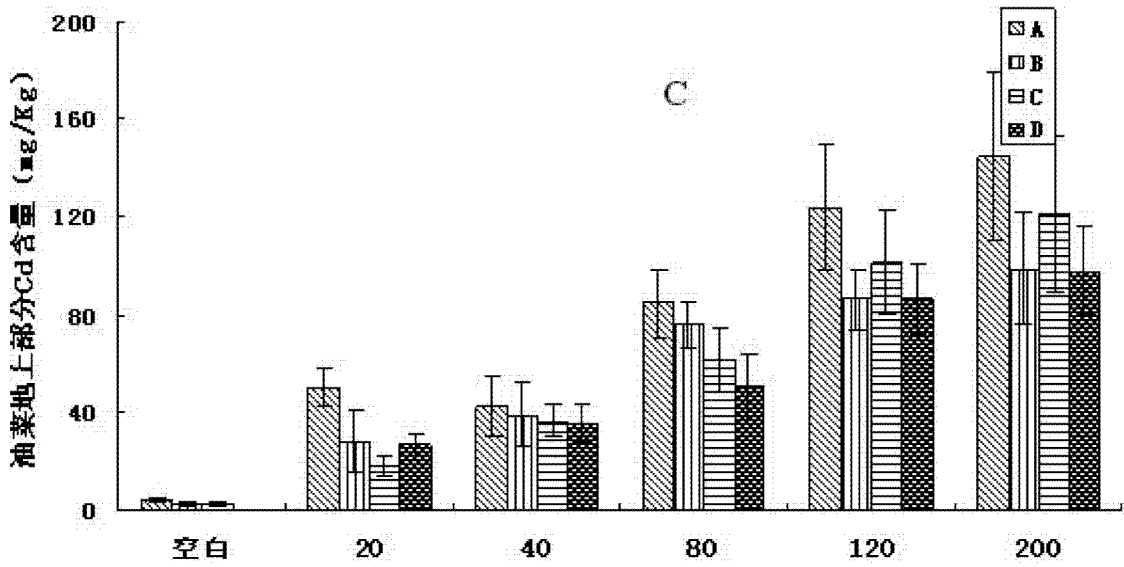


图 8C

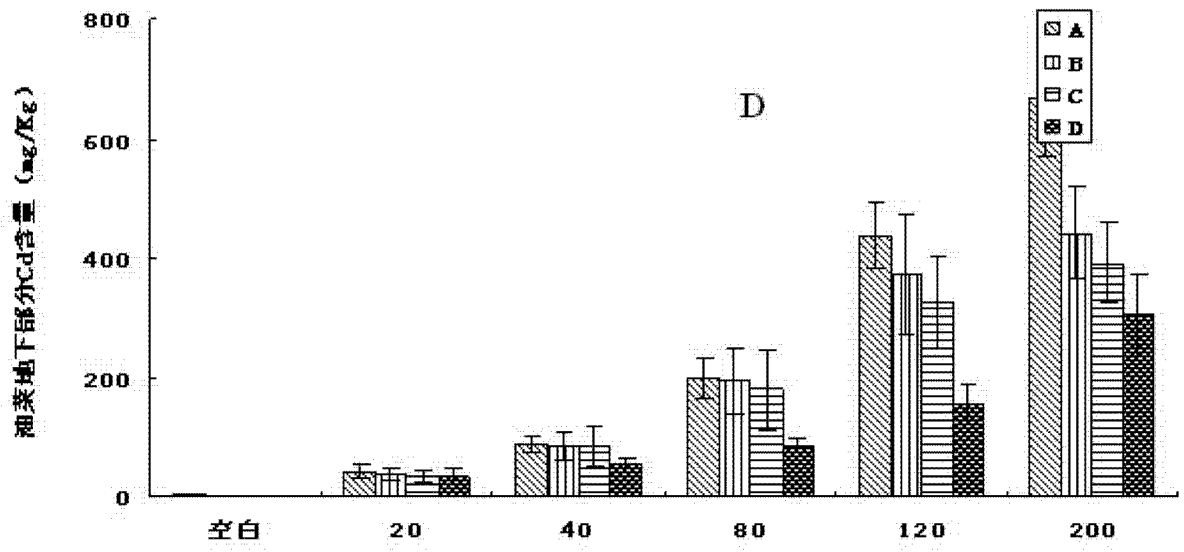


图 8D

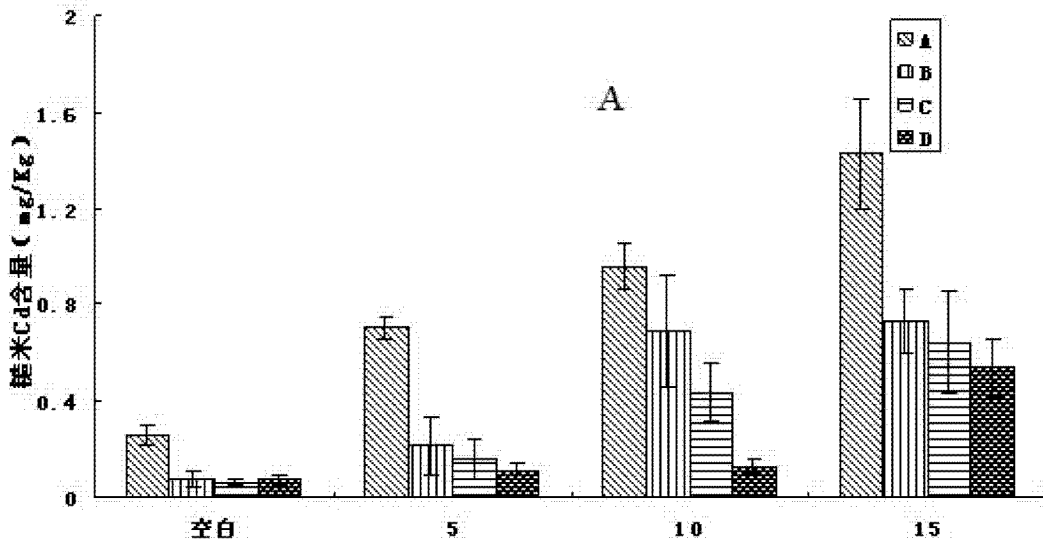


图 9A



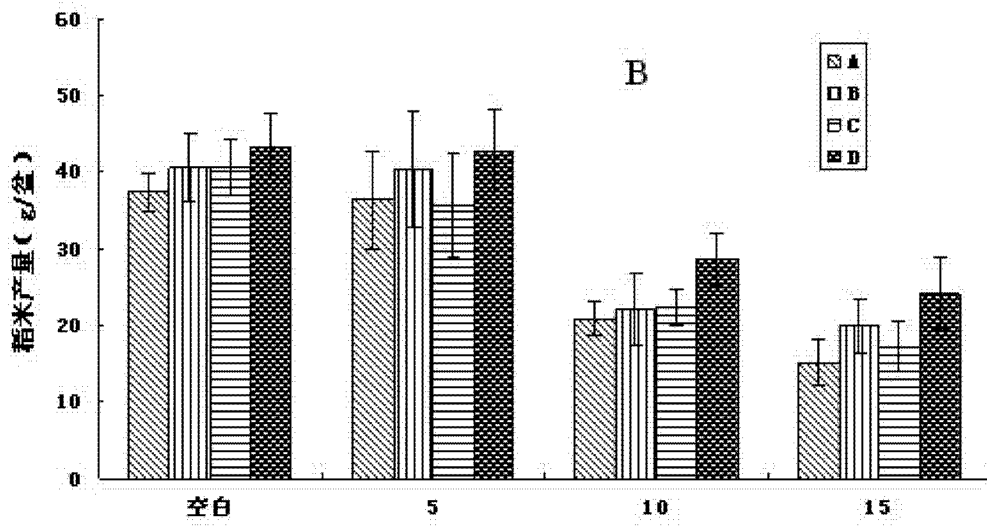


图 9B

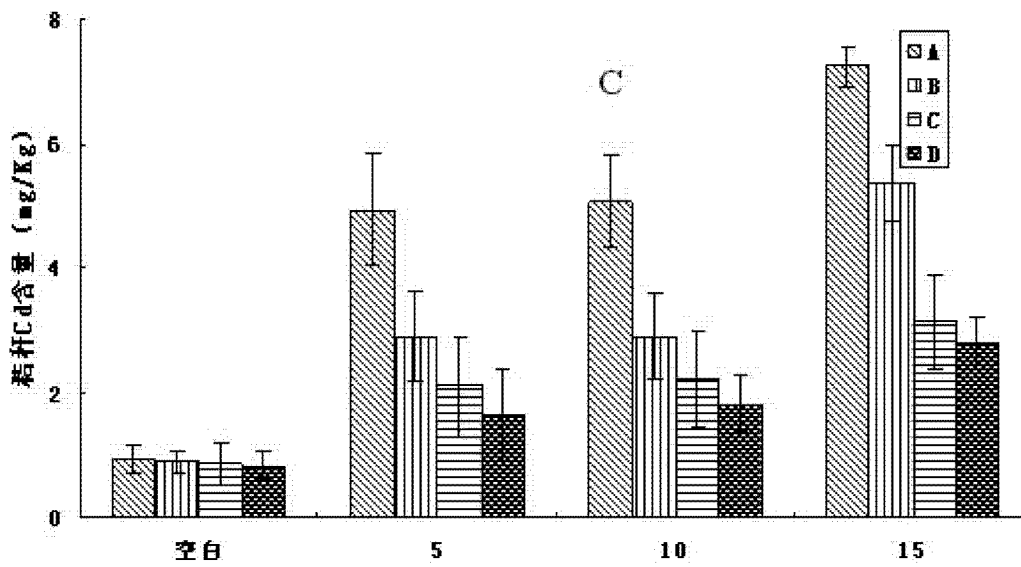


图 9C