



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103205379 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201310099327. 4

(22) 申请日 2013. 03. 26

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6675 2012. 10. 15

(73) 专利权人 新疆农业科学院微生物应用研究所

地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市南昌路 403 号农科院微生物所

(72) 发明人 张志东 王玮 朱静 王成  
顾美英 王浩 陈一峰 宋素琴  
唐琦勇 张丽娟 高升旗 乔坤云

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

C02F 1/58(2006. 01)

C12R 1/01(2006. 01)

C02F 101/20(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102229896 A, 2010. 05. 10, 全文.

CN 101864379 B, 2012. 02. 22, 全文.

CN 101591630 A, 2009. 12. 02, 全文.

张志东. 耐辐射黑色酵母状真菌的筛选和特性研究. 《微生物学通报》. 2012, 724-731.

审查员 孙婷婷

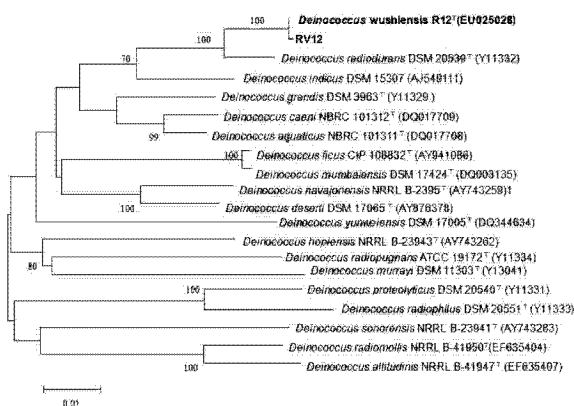
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种耐辐射菌及其在吸附钴离子生物处理中的应用

(57) 摘要

本发明公开乌鲁木齐市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12CGMCCNo. 6675 及其在吸附钴离子生物处理中的应用。通过将菌种接种于装有 5ml TGY 液体培养基中, 于 30℃ 培养, 200rpm 振荡培养 36h 后, 按 2% 接种培养, 对 Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup> 五种离子均具有耐受特性, 其中对 Pb<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup> 的耐受性分别可达 150mg/L 和 100mg/L; 对 Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 的耐受性可达 80mg/L。本发明广泛应用于对含重金属废液的环保处理领域, 特别是在吸附钴离子生物处理中的应用, 具有重要的作用。



CN 103205379 B

1. 一种乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675。
2. 如权利要求1所述的乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 在  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  重金属离子吸附中的应用。
3. 如权利要求1所述的乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 在吸附钴离子中的应用。

## 一种耐辐射菌及其在吸附钴离子生物处理中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及重金属生物吸附技术领域,具体的,本发明涉及一种耐辐射细菌在重金属离子吸附中应用的技术领域。

### 背景技术

[0002] 重金属是指比重大于  $4\text{g}/\text{cm}^3$  或  $5\text{g}/\text{cm}^3$  的金属,约有如铜、锌、铅、钴、锰、镉、汞等 45 种;由于人类对重金属的开采、冶炼、加工及商业制造活动日益增多,造成多种重金属如铅、汞、镉、铜、钴等进入大气、水、土壤中,随着重金属离子在环境或生态系统中存留、积累和迁移,造成严重的环境污染和生态危害。

[0003] 传统处理含重金属废水的物理化学方法包括化学沉淀法、离子交换法、电解法、凝聚法和氧化还原法等,这些方法耗资大而且可能造成二次污染;近年来,生物吸附法以其高效、廉价的优点逐渐引起了环境工作者的重视;与传统的处理方法相比,生物吸附法是通过生物体,主要包括细菌、真菌、藻类和农林废弃物及其衍生物对水中重金属离子的吸附作用,达到去除和回收重金属的目的,与传统的吸附剂相比,它们具有适应性广,能在不同 pH、温度及加工过程下操作;金属离子浓度影响小,在低浓度 ( $<10\text{ mg}/\text{L}$ ) 和高浓度 ( $>100\text{ mg}/\text{L}$ ) 下都有良好的金属吸附能力;再生能力强、步骤简单,再生后吸附能力无明显降低等优点;目前国内外已对多种重金属的生物吸附进行了研究,均收到良好的效果。

[0004] 在重重金属中,金属钴(Co)作为一种重要的战略金属,是制造高温合金、硬质合金、磁性合金、精密合金和含钴化合物的重要原料,广泛用于航空航天、电机电气、机械、化工、陶瓷、通讯和电池等行业;钴元素一般以天然浓度广泛存在于自然界中,由于近年来人类对其开采、冶炼、加工及商业制造活动日益增多,特别是含钴蓄电池的随意丢弃,以及作为辐射消毒的同位素  $\text{Co}^{60}$  使用不当和泄漏,造成钴元素以各种化学状态或化学形态进入大气、水、土壤中,通过存留、积累和迁移,不但引起了严重的环境污染,同时也造成贵重金属钴的流失。

[0005] 目前处理含钴废液主要方法有采用硫化沉淀法 [陈卫平,杨庆山,何碧宁,等. NdFeB 废料中钴的回收研究. 稀有金属与硬质合金, 2006, 34: 55-57]、草酸铵沉淀法 [谭海翔,胡启阳,李新海,等. 钴酸锂废极片中钴回收新工艺. 电源技术,2007, 31:288-230]、盐酸反相萃取法 [帅国权. 金川公司钴的回收. 有色冶炼,1995(3):15-18] 等方法,这些处理方法在一定程度上取得了良好的效果,但普遍存在二次污染,特别是当水中的重金属浓度较低 ( $<100\text{ mg}/\text{L}$ ) 时,不仅去除率较低,而且运行费用较高;目前,尚无吸附钴离子的相关报道。

### 发明内容

[0006] 针对目前尚无吸附钴离子的生物菌种相关报道,特别是没有乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) 在重金属离子生物处理中的应用。本发明的目的在于提供一种利用耐辐射菌进行重金属离子生物处理中的应用,特别是本发明提供一种利用耐辐射菌乌

市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 在吸附钴离子生物处理中的应用。

[0007] 本发明具体提供一种利用耐辐射菌乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 进行重金属离子生物处理中应用技术方案;本发明所用的菌株对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  五种离子均具有耐受特性,其中对  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  的耐受浓度最大,分别可达 150 mg/L 和 100 mg/L;对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  的耐受性次之,可达 80 mg/L;对  $\text{Hg}^{2+}$  的耐受性最低,在 30 mg/L。

[0008] 本发明所使用的微生物菌株乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*),由新疆农业科学院微生物应用研究所分离,菌种编号为 RV12,保藏于布达佩斯条约微生物国际保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)。地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编:100101,保藏日期为 2012 年 10 月 15 日,菌种保藏号为 CGMCC No. 6675,该菌株培养温度 20-35℃,最适培养温度 30℃左右;该菌种生长于 TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼脂 15g、蒸馏水 1L, pH7.5,经 30℃、48h 培养,菌落呈橙红色、小、圆形、边缘整齐、表面光滑、不透明;细胞圆形、呈二联或四联状;按照该菌种的菌落形态、生理生化特性,结合该菌种的分类进化分析,生物学分类名称为乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*),其为典型的抗  $\gamma$  辐射菌种。

[0009] 将增殖培养的菌株接种于细菌培养基中,优选 TGY 液体培养基,180 ~ 200rpm、30℃、培养 24 ~ 48h;发酵培养所获得的培养物经 4000rpm 离心收集菌体。通过 50℃烘干的方法获得干菌体;将 0.1g 干菌体加入 pH 5.0、浓度 50mg/L 的钴离子溶液中,适当搅拌,室温吸附 30min,可以达到吸附溶液中钴的目的,最大吸附率达到 84.5%。

[0010] 通过实施本发明具体的技术指标,可以达到以下有益效果。

[0011] 本发明提供的乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 在重金属离子吸附中的应用,乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  五种离子均具有耐受特性,其中对  $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{2+}$  的耐受浓度最大,分别可达 150 mg/L 和 100 mg/L;对  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  的耐受性次之,可达 80 mg/L;对  $\text{Hg}^{2+}$  的耐受性最低,在 30 mg/L;通过本法可以利用菌体的生长吸附钴离子,也可以直接使用干菌体吸附,最大吸附能力可达 44.5mg/g 干菌体。

[0012] 附图说明:

[0013] 图 1 为乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 的分类进化树图。

[0014] 图 2 为乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 对不同金属离子耐受性的图。

[0015] 图 3 为乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 在 50mg/L  $\text{Co}^{2+}$  压力下生长曲线及吸附特性图。

[0016] 图 4 为不同溶液 pH 对乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附的影响图。

[0017] 图 5 为不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  对乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附的影响图。

[0018] 图 6 为不同吸附时间对乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC

No. 6675 干菌体吸附的影响图。

[0019] 具体实施方式：

[0020] 以下是本发明的具体实施例，但本发明并不局限于此。

[0021] 实施例一：乌市异常球菌(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 的筛选、分类及鉴定

[0022] 通过从新疆干旱荒漠地区某辐射污染环境分离筛选的一株耐重金属菌株 RV12；经形态学和生理生化鉴定发现，其在 TGY 培养基培养 5d 后，其菌落呈橙红色、小、圆形、边缘整齐、表面光滑、不透明；细胞圆形、呈二联或四联状；细胞革兰氏阳性、无运动性，好氧，最适生长温度为 30℃，最适生长 pH 为 7.0，可以蔗糖、山梨醇、麦芽糖果糖、甘露糖、松三糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、糊精、甘露醇、胱氨酸、脯氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸作为唯一碳源，主要脂肪酸为 C16:1 $\omega$ 7c (53.2%)，C16:0 (20.0%)，C16:1 $\omega$ 9c (6.0%)，主要醌为 MK-8；基于 16S rDNA 序列扩增和 PCR 产物测序，获得 1459bp 的 rDNA 序列，经 GenBank \ Blast 同源序列比对分析，其与现有技术所报道的奇异球菌 (*Deinococcus*) 同源性较高；从 GenBank 中获取奇异球菌属标准菌株 16S rRNA 基因序列，进行同源进化分析，构建系统进化树，结果参见附图 1；结果显示，RV12 菌株隶属于奇异球菌属，与乌市异常球菌 *Deinococcus wushiensis* 亲源关系最近，同源相似性为 99.7%，确定菌株 RV12 为奇异球菌属菌株，暂命名为 *Deinococcus wushiensis* RV12，即规范称呼为乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12。

[0023] 该菌株已于申请日前保藏于布达佩斯条约微生物国际保藏单位：中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心 (CGMCC)。地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编：100101，保藏日期是 2012 年 10 月 15 日，保藏号是 CGMCC No. 6675。

[0024] 实施例二：乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 的液体培养

[0025] 将经活化的本发明菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 接种于装有 5ml TGY 液体培养基的种子试管中，于 30℃ 培养，200rpm 振荡培养 36h 后，按 2% 接种量接种于 TGY 液体发酵瓶中，装添量为 500ml 三角瓶装 80ml TGY 液体培养基，于 30℃ 培养，220rpm 振荡培养 60h；TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼脂 15g、蒸馏水 1L，pH7.5，经 30℃、48h 培养。

[0026] 经上述培养后，菌体最大浓度可达到 4.51 OD/ml (600nm)；培养物经 8000 rpm、3min 离心，弃上清，收集菌体，菌体湿重可达 5.2g/L。

[0027] 实施例三：乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 耐重金属特性

[0028] 将经活化的本发明菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 接种于装有 5ml TGY 液体培养基的种子试管中，于 30℃ 培养，200rpm 振荡培养 36h 后，按 2% 接种量接种于分别含有不同浓度的 Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup> TGY 液体发酵瓶中，装添量为 500ml 三角瓶装 80ml TGY 液体培养基，于 30℃ 培养，220rpm 振荡培养 72h，观察菌种的生长情况；结果参见附图 2，由附图 2 可以得出本申请菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 对多种金属具有耐受性，其中 Pb<sup>2+</sup>、Cr<sup>2+</sup> 的耐受浓度最大 (100mg/L)；Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 次之 (80mg/L)；TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼

脂 15g、蒸馏水 1L, pH7.5, 经 30℃、48h 培养。

[0029] 实施例四:乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 在不同  $\text{Co}^{2+}$  浓度下的生长特性

[0030] 将经活化的本发明菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) 接种于装有 5ml TGY 液体培养基的种子试管中, 于 30℃ 培养, 200rpm 振荡培养 36h 后, 按 2% 接种量接种于分别含有 0、20、50、80 mg/L  $\text{Co}^{2+}$  的 TGY 液体发酵瓶中, 装添量为 500ml 三角瓶装 80ml TGY 液体培养基, 于 30℃ 培养, 220rpm 振荡培养 120h, 并每 12h 定时取样测定菌体 OD 值, 观察菌种的生长情况; TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼脂 15g、蒸馏水 1L, pH7.5, 经 30℃、48h 培养。结果表明, 低浓度的  $\text{Co}^{2+}$  (<20 mg/L) 对菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) 生长无明显的抑制, 当浓度大于 50 mg/L 后, 菌株生长明显受到抑制, 见表 1,

[0031] 表 1: 不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  对乌市异常球菌 RV12 生长的影响

[0032]

浓度 (mg/L)	0	20	50	80
最大 OD (600nm)	4.51	4.50	3.16	0.51
生长时间 (h)	48	48	72	120

[0033] 实施例五:乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 生长吸附  $\text{Co}^{2+}$  的特性和效果

[0034] 将经活化的本发明菌株接种于装有 5ml TGY 液体培养基的种子试管中, 于 30℃ 培养, 200rpm 振荡培养 36h 后, 按 2% 接种量接种于分别含有 50 mg/L  $\text{Co}^{2+}$  的 TGY 液体发酵瓶中, 装添量为 500ml 三角瓶装 80ml TGY 液体培养基, 于 30℃ 培养, 220rpm 振荡培养 120h, 并每 12h 定时取样测定菌体 OD 值和发酵液中  $\text{Co}^{2+}$  含量, 结果参见附图 3; TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼脂 15g、蒸馏水 1L, pH7.5, 经 30℃、48h 培养; 由附图 3 可以看出菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 能在自身生长中有效吸附  $\text{Co}^{2+}$ , 其吸附率为 85.3%。

[0035] 实施例六:乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 干菌体的制备

[0036] 将经活化的本发明菌株乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 接种于装有 5ml TGY 液体培养基的种子试管中, 于 30℃ 培养, 200rpm 振荡培养 36h 后, 按 2% 接种量接种于 TGY 液体发酵瓶中, 装添量为 500ml 三角瓶装 80ml TGY 液体培养基, 于 30℃ 培养, 220rpm 振荡培养 48h; TGY 培养基表面为蛋白陈 5g、酵母膏 3g、葡萄糖 2g、琼脂 15g、蒸馏水 1L, pH7.5, 经 30℃、48h 培养。

[0037] 培养物经 8000 rpm、3 min 离心, 弃上清, 收集菌体; 菌体经去离子水洗涤 3 次后, 离心收集菌体, 置于 60℃ 烘箱烘至恒重后, 放入干燥釜中保存待用。

[0038] 实施例七:不同溶液 pH 对乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*)RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附的影响

[0039] 精确量取浓度为 50mg/L 的  $\text{Co}^{2+}$  溶液 50 ml 中, 分别使用 HCl、NaOH 调至 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 后, 加入去离子水定容至 100ml, 并使用酸度计校正后, 分别加入干菌体 0.1g 并打散至均匀, 室温振荡吸附 1h 后, 取样离心取上清, 并用 45um 的滤膜抽滤, 分析滤液中  $\text{Co}^{2+}$  浓度, 并计算各自的吸附率, 参见附图 4; 由附图 4 可以得出乌市异常球菌

(*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体在 pH5.0 时吸附量最大。

[0040] 实施例八：不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  对乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附的影响

[0041] 分别量取 100mL 浓度为 25、50、75、100mg/L 的  $\text{Co}^{2+}$  溶液 (pH 5.0)，准确加入乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体 0.10g 并打散至均匀，室温振荡吸附 1h 后，取样离心取上清，并用 45  $\mu\text{m}$  的滤膜抽滤，分析滤液中  $\text{Co}^{2+}$  浓度，并计算各自的吸附率及单位吸附量，结果参见附图 5；由附图 5 可以得出乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附率随着浓度的增加而下降，但单位吸附量在浓度大于等于 50mg/L 时趋于稳定，说明在上述条件下，最佳浓度为 50mg/L。

[0042] 实施例九：不同吸附时间对乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体吸附  $\text{Co}^{2+}$  的影响

[0043] 分别准确称取乌市异常球菌 (*Deinococcus wushiensis*) RV12 CGMCC No. 6675 干菌体 0.10g，置于浓度为 50mg/L 的  $\text{Co}^{2+}$  溶液 (pH 6.5) 100 ml 中，分别室温振荡 0、10、20、30、40 分钟后取样离心，取上清并用 45  $\mu\text{m}$  的滤膜抽滤，分析滤液中  $\text{Co}^{2+}$  浓度，并计算各自的吸附率，参见附图 6；由附图 6 可以得出，在上述条件下吸附 30min，吸附基本达到平衡，最大吸附率为 84.5%，最大吸附能力为 44.5mg/g 干菌体，测定结果如表 2 所示。

[0044] 表 2：乌市异常球菌 RV12 干菌体对  $\text{Co}^{2+}$  金属离子的吸附效果

[0045]

离子	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Cr}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$
吸附率 (%)	75.2	89.7	82.1	80.1
吸附量 (mg/g)	37.6	44.85	41.05	40.05

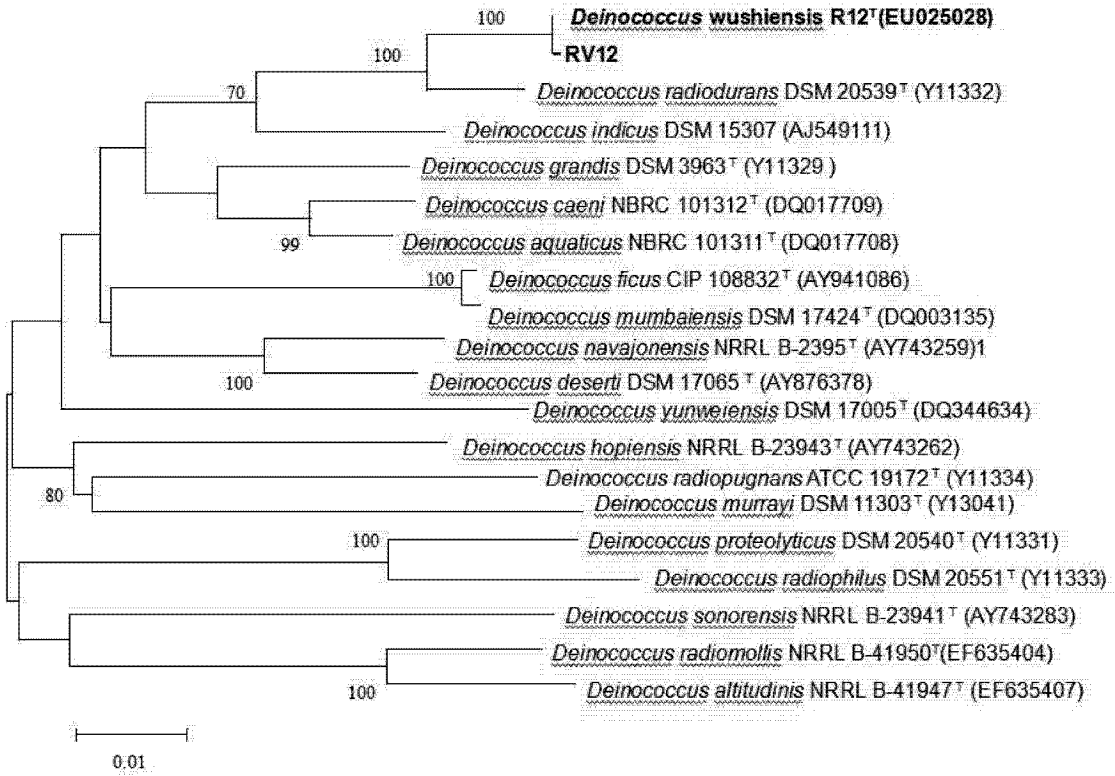


图 1

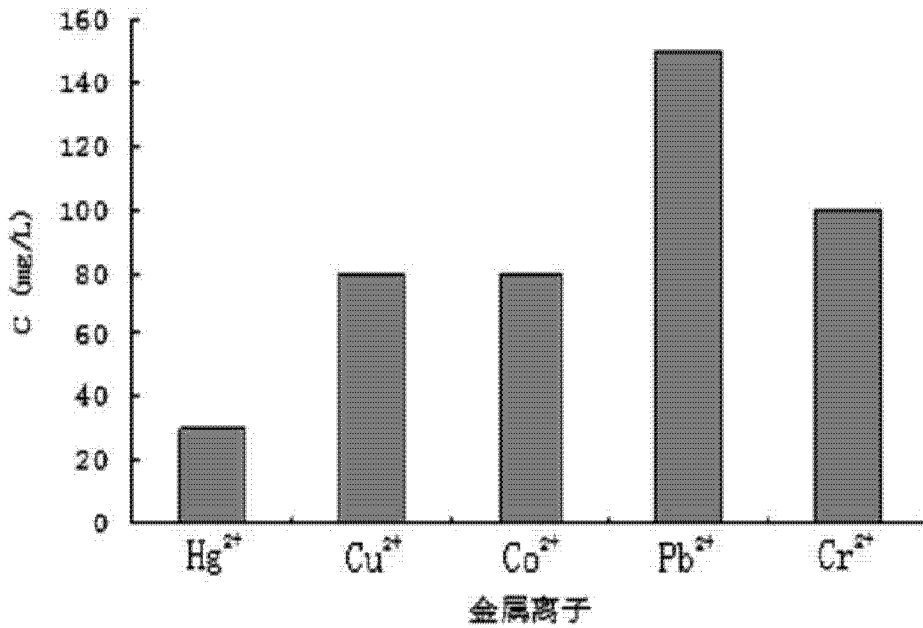


图 2

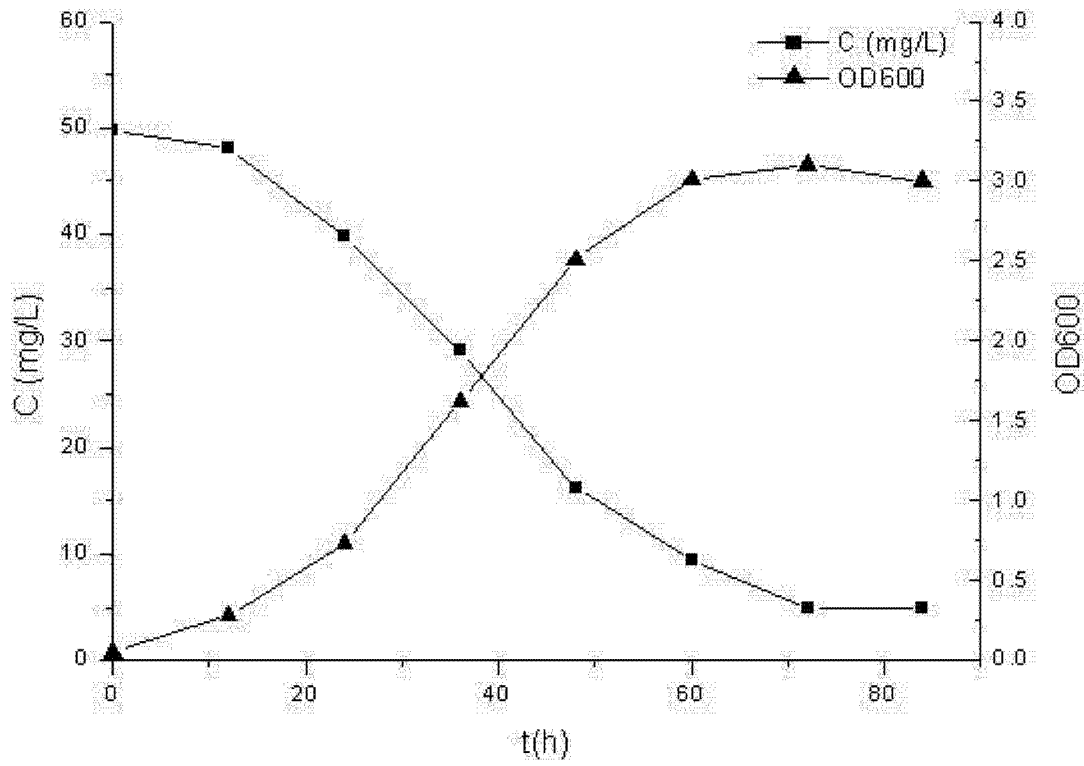


图 3

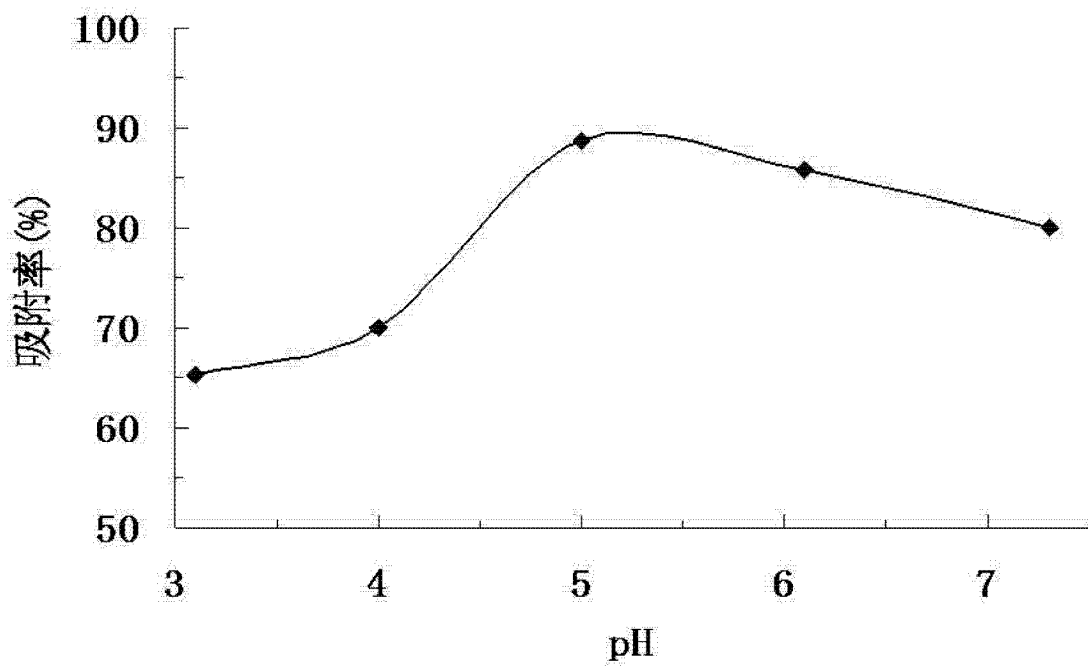


图 4

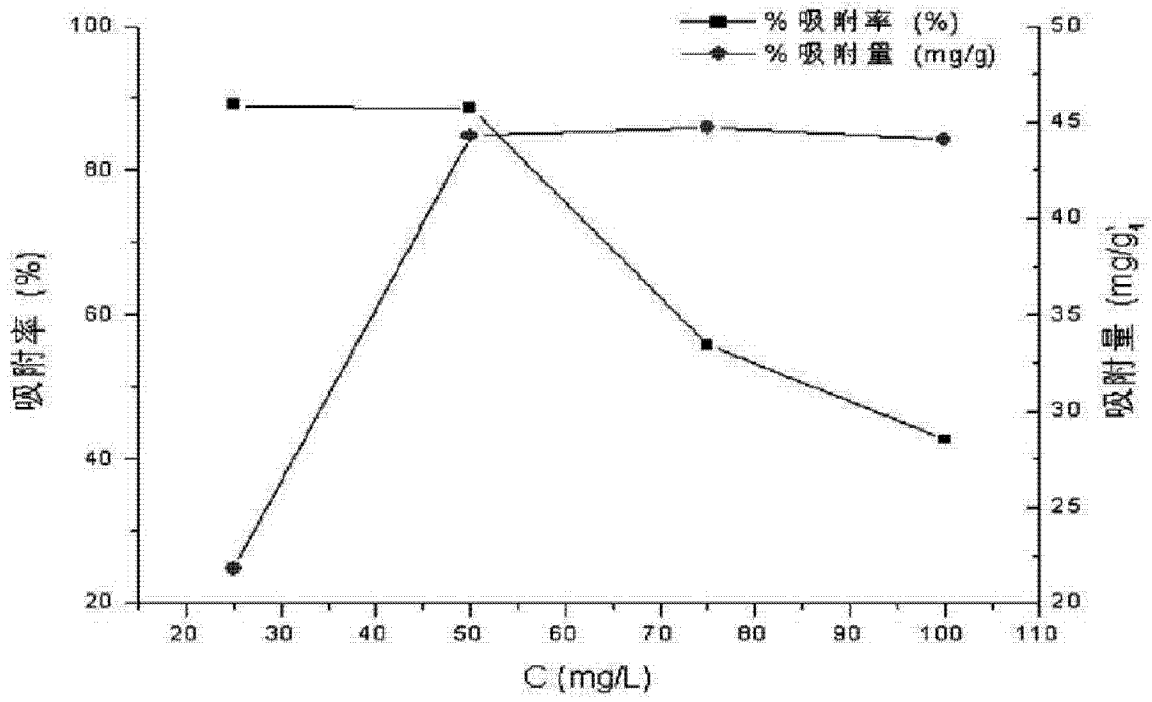


图 5

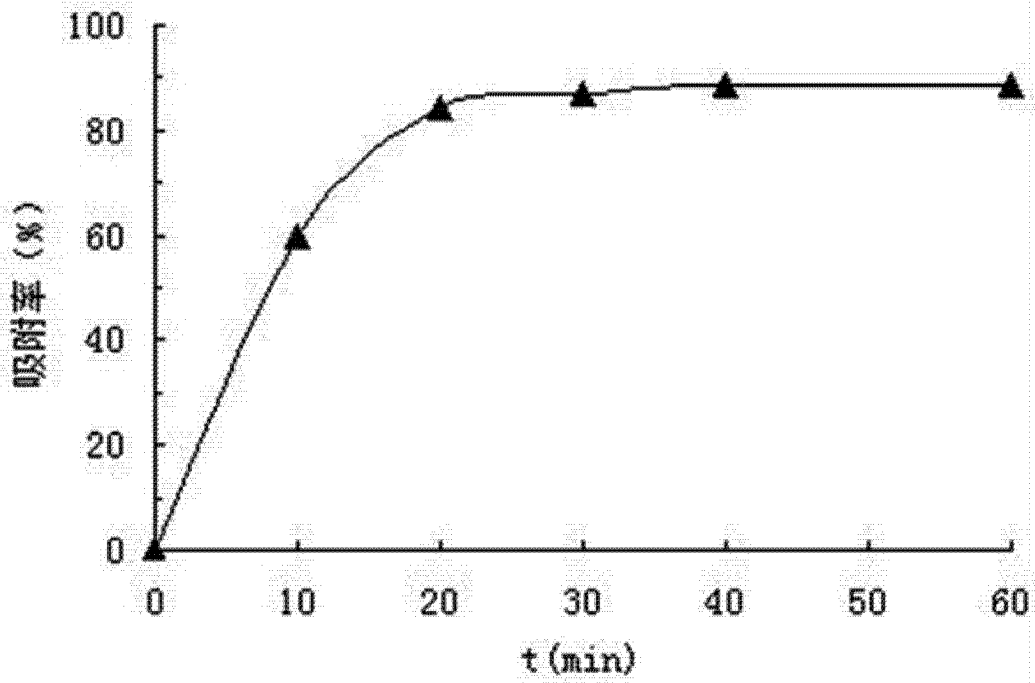


图 6