



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110592067 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910892916.5	(51)Int.Cl.
(22)申请日 2019.09.20	<i>C12N 11/14</i> (2006.01)
(83)生物保藏信息	<i>C12N 1/20</i> (2006.01)
CGMCC No.13025 2016.09.21	<i>C12N 1/14</i> (2006.01)
(71)申请人 广东省农业科学院农业资源与环境研究所	<i>C12N 1/36</i> (2006.01)
地址 510640 广东省广州市天河区五山路广东省农科院土肥所内	<i>B09C 1/10</i> (2006.01)
(72)发明人 解开治 徐培智 卢钰升 顾文杰 李文英 李夏 孙丽丽 蒋瑞萍 卢廷超	<i>C12R 1/40</i> (2006.01)
(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245	<i>C12R 1/645</i> (2006.01)
代理人 苏运贞 裘晖	<i>C12R 1/44</i> (2006.01)
	<i>C12R 1/15</i> (2006.01)
	<i>C12R 1/13</i> (2006.01)
	<i>C12R 1/39</i> (2006.01)
	<i>C12R 1/01</i> (2006.01)

权利要求书3页 说明书10页

(54)发明名称

四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂及制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂及制备方法与应用。本发明通过将四环素类抗生素降解菌液、能量供给菌液、磁介质菌液、营养载体、吸附载体、表面活性剂混合,发酵,得到四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂。本发明的四环素类抗生素降解菌经定向诱导、能量供给菌伴生、载体耦合可显著提高菌种降解效能,提高降解菌株在原位土壤环境中的定殖、增殖能力;本发明的表面活性剂可化解水分张力,清除包裹在土壤颗粒表层的疏水基团,增强四环素类抗生素残留向富含降解菌群的耦合载体中迁移;并利用磁介质菌和吸附载体的磁吸附力提高迁移速率,加快四环素类抗生素残留的降解。从而该修复剂对四环素类抗生素降解效率高。

1. 一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

(1) 将营养载体、吸附载体和表面活性剂混合均匀,进行除菌处理,得到耦合载体;

(2) 在除菌后的耦合载体中接入四环素类抗生素降解菌液、能量供给菌液和磁介质菌液,得到混合物I;发酵,得到四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂。

2. 根据权利要求1所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

步骤(1)如下:将营养载体、吸附载体和表面活性剂混合均匀,用水调节含水率,接着进行除菌处理,得到耦合载体。

3. 根据权利要求1或2所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

所述的营养载体的组成按质量百分比计,如下:糖蜜粉10~16%、骨粉6~8%、蛋白胨3~7%、氨基酸粉5~15%、稻壳55~65%;进一步如下:糖蜜粉10~16%、骨粉6~8%、蛋白胨3~7%、氨基酸粉12~15%、稻壳55~65%;

所述的吸附载体的组成按质量百分比计,如下:磁铁矿粉8~16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒0~12%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子0~8%、麦饭石粉25~35%、凹凸棒粘土粉25~30%、生物碳15~25%;进一步如下:磁铁矿粉10~16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒0~12%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子0~8%、麦饭石粉25~32%、凹凸棒粘土粉25~30%、生物碳15~25%;

所述的表面活性剂为十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺和十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上。

4. 根据权利要求3所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

所述的混合物I中各成分的组成按质量百分比计,如下:菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的四环素类抗生素降解菌液5~10%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的能量供给菌液2~4%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的磁介质菌液2~5%、营养载体40~60%、吸附载体20~35%、表面活性剂2~6%;进一步如下:菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的四环素类抗生素降解菌液5~10%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的能量供给菌液3~4%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2) \times 10^{11}$ cfu/mL的磁介质菌液3~5%、营养载体40~60%、吸附载体20~35%、表面活性剂2~6%。

5. 根据权利要求4所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

所述的四环素类抗生素降解菌为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) JR-1、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) TJ-1、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) TD2、人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropic*) TD3中的一种或至少两种;

所述的能量供给菌为产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC20168、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) CICC 20079和产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) SCTCC 100664中的一种或至少两种;

所述的磁介质菌液为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) CICC 23919和洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) CICC 10828中的一种或两种。

6. 根据权利要求4所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

所述的四环素类抗生素降解菌液通过包含如下步骤的方法得到:

①所述的四环素类抗生素降解菌通过振荡培养,培养至对数增长期;

②再于30~37℃,120~150r/min条件下继续培养3~7天

或是通过包含如下步骤的方法得到:

A、将所述的四环素类抗生素降解菌通过振荡培养,培养至对数增长期;

B、然后通过含四环素类抗生素的培养基进行驯化培养;

C、驯化得到的菌培养至对数增长期;

D、再于30~37℃,120~150r/min条件下继续培养3~7天;

所述的能量供给菌液通过如下方法得到:用CM 0002改良培养基将能量供给菌培养至对数增长期,再于35~40℃、120~140r/min条件下培养3~4天,得到能量供给菌液;CM0002改良培养基的组成如下:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、乳糖10g/L、pH 7.0~7.5;

所述的磁介质菌液通过如下方法得到:用CM 0003改良培养基将磁介质菌培养至对数增长期,再于28~30℃,130~150r/min条件下培养3~5天,得到磁介质菌液;CM 0003改良培养基的组成如下:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、酪氨酸0.5g/L、氯化亚铁0.1g/L。

7. 根据权利要求6所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

所述的四环素类抗生素降解菌为混合菌时,是将四环素类抗生素降解菌中的各个菌分别通过振荡培养,培养至对数增长期;有驯化步骤时,是将各个菌分别进行驯化;然后按等体积比混合再继续培养;

所述的能量供给菌为混合菌液时,是将各个菌分别培养至对数增长期,然后按等体积比混合,再于35~40℃,120~140r/min条件下培养3~4天;

所述的磁介质菌为混合菌液时,是将各个菌分别培养至对数增长期,然后按等体积比混合,再于28~30℃、130~150r/min条件下培养3~5天。

8. 根据权利要求6所述的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,其特征在于:

步骤①和步骤A中所述的培养的条件为于28~30℃,130~150r/min条件下培养;

步骤B中所述含四环素类抗生素的培养基的组成如下:四环素类抗生素440~480mg/L、土150~200g/L,水余量;进一步的组成如下:四环素类抗生素440~480mg/L、土167g/L,水余量;

所述的驯化培养的条件为于28~30℃、140~150r/min条件下培养6~8天;

所述的驯化培养的次数为3~8次;

步骤C中所述的培养的条件为于28~37℃,110~130r/min条件下培养48~60h;进一步为于37℃,120r/min条件下培养48~60h;

步骤②和步骤D中所述的继续培养的条件为于30~37℃、120~150r/min条件下继续培养3~7天;进一步为于37℃、140r/min条件下继续培养3~7天。

9.一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂,其特征在于:通过权利要求1~8任一项所述的制备方法得到。

10.权利要求9所述四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂在环境修复中的应用。

四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂及制备方法与 应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境保护中土壤有机污染物治理领域,特别涉及一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂及制备方法与应用。

背景技术

[0002] 四环素类抗生素(Tetracyclines)是由放线菌产生的一类广谱抗生素,对革兰氏阴性需氧菌和厌氧菌、立克次体、螺旋体、支原体、衣原体及某些原虫等有抗菌作用。主要包括金霉素(Chlortetracycline)、土霉素(Oxytetracycline)、四环素(Tetracycline)及半合成衍生物甲烯土霉素、强力霉素、二甲胺基四环素等。四环素类抗生素跟大多数抗生素类药物一样,在人和动物机体内都不能够被完全代谢,以原形和活性代谢产物的形式通过粪便排到体外,能够在环境中进一步形成母体,仍然具有生物活性。近年来的资料表明,四环素类在我国许多地区的污染相当严重,含量甚至高达mg/kg级别,其输入量不亚于农药施用量,给土壤生态功能、肥力水平以及人类健康造成严重威胁,已成为我国乃至全球所面临的新的重大环境问题。

[0003] 四环素类抗生素在土壤中的降解很大程度上取决于自身的分子结构和土壤的特性。同时疏水分配、阳离子交换、阳离子键桥、表面配位螯合以及氢键等作用在降解过程中也起重要的作用。四环素类抗生素在土壤中的降解主要有生物降解、水解、光降解和微电解。其中微生物降解抗生素是被世界公认的最具潜力的绿色手段,具有广阔的应用潜力。但现有单一菌株处理技术已很难适应复杂多样的自然环境,需要越来越多的生物组合处理技术。

发明内容

[0004] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法。

[0005] 本发明的另一目的在于提供通过上述制备方法得到的四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂。

[0006] 本发明的又一目的在于提供所述四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂在修复四环素类抗生素污染土壤中的应用。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 将营养载体、吸附载体和表面活性剂混合均匀,进行除菌处理,得到耦合载体;

[0009] (2) 在除菌后的耦合载体中接入四环素类抗生素降解菌液、能量供给菌液和磁介质菌液,得到混合物I;发酵,得到四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂。

[0010] 步骤(1) 优选如下:将营养载体、吸附载体和表面活性剂混合均匀,用水调节含水率,接着进行除菌处理,得到耦合载体。

[0011] 所述的营养载体的组成按质量百分比计,如下:糖蜜粉10~16%、骨粉6~8%、蛋白胨3~7%、氨基酸粉5~15%、稻壳55~65%;更优选如下:糖蜜粉10~16%、骨粉6~8%、蛋白胨3~7%、氨基酸粉12~15%、稻壳55~65%。

[0012] 所述的吸附载体的组成按质量百分比计,如下:磁铁矿粉8~16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒0~12%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子0~8%、麦饭石粉25~35%、凹凸棒粘土粉25~30%、生物碳15~25%;更优选如下:磁铁矿粉10~16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒0~12%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子0~8%、麦饭石粉25~32%、凹凸棒粘土粉25~30%、生物碳15~25%。

[0013] 所述的表面活性剂为十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺和十二烷基磺酸钠中的一种或两种以上。

[0014] 所述的表面活性剂为两种以上形成的混合物时,各组分质量份数相同。

[0015] 所述的混合物I中各成分的组成按质量百分比计,优选如下:菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的四环素类抗生素降解菌菌液5~10%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的能量供给菌菌液2~4%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的磁介质菌菌液2~5%、营养载体40~60%、吸附载体20~35%、表面活性剂2~6%;优选如下:菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的四环素类抗生素降解菌菌液5~10%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的能量供给菌菌液3~4%、菌体浓度为 $(0.8\sim 1.2)\times 10^{11}$ cfu/mL的磁介质菌菌液3~5%、营养载体40~60%、吸附载体20~35%、表面活性剂2~6%。所述的混合物I是忽略不计用以调节含水率的水的。

[0016] 所述的含水率优选为45~55%。

[0017] 所述的四环素类抗生素降解菌菌液的菌体浓度优选为 1.2×10^{11} cfu/mL。

[0018] 所述的四环素类抗生素降解菌优选为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) JR-1(保藏编号为CGMCCNo.13025,于2016年9月21日保藏位于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的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaetechrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) TJ-1、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) TD2、人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropic*) TD3中的一种或至少两种;优选为至少四种。

[0019] 所述的四环素类抗生素降解菌菌液优选通过包含如下步骤的方法得到:

[0020] ①所述的四环素类抗生素降解菌通过振荡培养,培养至对数增长期;

[0021] ②再于30~37℃,120~150r/min条件下继续培养3~7天

[0022] 或是通过包含如下步骤的方法得到:

[0023] A、将所述的四环素类抗生素降解菌通过振荡培养,培养至对数增长期;

[0024] B、然后通过含四环素类抗生素的培养基进行驯化培养;

[0025] C、驯化得到的菌培养至对数增长期;

[0026] D、再于30~37℃,120~150r/min条件下继续培养3~7天。

[0027] 所述的四环素类抗生素降解菌为混合菌时,是将四环素类抗生素降解菌中的各个菌分别通过振荡培养,培养至对数增长期,如步骤①、步骤A、步骤C;有驯化步骤时,是将各个菌分别进行驯化,如步骤B;然后按等体积比混合再继续培养,如步骤②、步骤D。

[0028] 步骤①和步骤A中所述的培养的条件优选为于28~30℃,130~150r/min条件下培养。

[0029] 步骤①和步骤A中所述的培养中的培养基为LB液体培养基。LB液体培养基适合于细菌的培养。

[0030] 步骤B中所述含四环素类抗生素的培养基的组成如下:四环素类抗生素440~480mg/L、土150~200g/L,水余量;更优选组成如下:四环素类抗生素440~480mg/L、土167g/L,水余量。

[0031] 所述的四环素类抗生素包括四环素、土霉素、金霉素。

[0032] 所述的驯化培养的条件优选为于28~30℃、140~150r/min条件下培养6~8天。

[0033] 所述的驯化培养的次数为3~8次;优选为5~6次。

[0034] 步骤C中所述的培养的条件优选为于28~37℃,110~130r/min条件下培养48~60h;更优选为于37℃,120r/min条件下培养48~60h。

[0035] 步骤②和步骤D中所述的继续培养的条件优选为于30~37℃、120~150r/min条件下继续培养3~7天;更优选为于37℃、140r/min条件下继续培养3~7天。

[0036] 所述的能量供给菌菌液的菌体浓度优选为 1×10^{11} cfu/mL。

[0037] 所述的能量供给菌为产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)CICC20168、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)CICC 20079和产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)SCTCC 100664中的一种或至少两种。

[0038] 所述的能量供给菌菌液优选通过如下方法得到:用CM 0002改良培养基将能量供给菌培养至对数增长期,再于35~40℃、120~140r/min条件下培养3~4天,得到能量供给菌菌液;更优选为于37℃、130r/min条件下培养3~4天;CM 0002改良培养基的组成如下:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、乳糖10g/L、pH 7.0~7.5。

[0039] 所述的能量供给菌为混合菌液时,是将各个菌分别培养至对数增长期,然后按等体积比混合,再于35~40℃,120~140r/min条件下培养3~4天;更优选为于37℃,130r/min条件下培养3~4天。

[0040] 所述的将能量供给菌培养至对数增长期中的培养条件为:于28~30℃,110~150r/min条件下震荡培养48~72h;更优选为:于30℃、120r/min条件下震荡培养48~72h。

[0041] 所述的磁介质菌菌液的菌体浓度优选为 1×10^{11} cfu/mL。

[0042] 所述的磁介质菌菌液为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)CICC 23919和洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)CICC 10828中的一种或两种。

[0043] 所述的磁介质菌菌液优选通过如下方法得到:用CM 0003改良培养基将磁介质菌培养至对数增长期,再于28~30℃,130~150r/min条件下培养3~5天,得到磁介质菌菌液;更优选为于30℃、140r/min条件下培养3~4天;CM 0003改良培养基的组成如下:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、酪氨酸0.5g/L、氯化亚铁0.1g/L。

[0044] 所述的磁介质菌为混合菌液时,是将各个菌分别培养至对数增长期,然后按等体积比混合,再于28~30℃、130~150r/min条件下培养3~5天;更优选为于30℃,140r/min条件下培养3~4天。

[0045] 所述的将磁介质菌培养至对数增长期中的培养条件为:于28~30℃、130~150r/min条件下震荡培养48~72h;更优选为:于28℃、140r/min条件下震荡培养48~72h。

- [0046] 步骤(1)中所述的除菌优选为通过蒸汽灭菌实现。
- [0047] 所述的蒸汽灭菌的时间优选为1~2h。
- [0048] 步骤(2)中所述的发酵的条件优选在密闭式固体发酵反应器中发酵,每隔6h翻堆一次。
- [0049] 一种四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂,通过上述制备方法得到。
- [0050] 所述四环素类抗生素污染土壤原位微生物修复剂在环境修复中的应用,特别适用于四环素类抗生素污染土壤修复中的应用。
- [0051] 本发明的优点和技术效果如下:
- [0052] (1) 本发明为四环素类抗生素污染土壤的原位消解提供了一种高效复合微生物修复剂;
- [0053] (2) 本发明的四环素类抗生素降解菌经定向诱导、能量供给菌伴生、载体耦合可显著提高菌种降解效能,提高降解菌株在原位土壤环境中的定殖、增殖能力;
- [0054] (3) 本发明的表面活性剂可化解水分张力,清除包裹在土壤颗粒表层的疏水基团,增强四环素类抗生素残留向富含降解菌群的耦合载体中迁移。并利用磁介质菌和吸附载体的磁吸附力提高迁移速率,加快四环素类抗生素残留的降解;
- [0055] (4) 本发明的高效复合微生物修复剂在原位消解四环素类抗生素残留的同时,还可提供作物营养,促进作物生长。

具体实施方式

- [0056] 下面结合实施例对本发明做进一步详细说明,但本发明保护范围并不限于所述内容。
- [0057] 所用菌株可由四川省微生物资源平台菌种保藏中心(SICC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)、中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)、中国普通微生物保藏管理中心(CGMCC)获得;其中,ATCC菌株可由美国模式菌种中心获得,或通过北纳生物获得。
- [0058] Fe_3O_4 磁性纳米颗粒、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子由西安瑞禧生物科技有限公司可由提供;其余原料均由市场商业途径获得。
- [0059] LB液体培养基:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠10g/L。
- [0060] 液体CM 0002改良培养基:胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、乳糖10g/L、pH 7.0~7.5。
- [0061] 实施例1
- [0062] 1、四环素类抗生素降解菌群
- [0063] 将恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12(已在文献“解开治,徐培智,陈建生,等.恶臭假单胞菌XP12对拟除虫菊酯类农药的酶促降解特性及其应用研究[J].广东农业科学,2009(12):156-160.”中公开)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) JR-1、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) TJ-1(已在文献“郭梦婷.高土霉素残留猪粪的高效好氧堆肥技术研究.浙江工商大学硕士学位论文.”中公开)、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) TD2(已在文献“许晓玲等.四环素降解菌的选育_鉴定及其降解特性.农业生物技术学报,2011,19(3):549-556.”公开)、人苍白杆菌(*Ochrobactrum*

anthropic) TD3(已在文献“许晓玲等.四环素降解菌的选育_鉴定及其降解特性.农业生物技术学报,2011,19(3):549-556.”公开)等7种单个降解菌用LB培养基培养至对数期(培养在29℃、150r/min震荡条件下进行),制备形成单一降解菌种子原液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。之后将各单一降解菌种子原液按照等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、140r/min液体发酵5天制备形成四环素类抗生素降解菌群,菌体浓度约为 1.2×10^{11} cfu/mL。

[0064] 2、能量供给菌菌液的制备

[0065] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的能量供给菌产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC 20168、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) CICC 20079、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) SCTCC 100664分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0002改良培养基(pH 7.0),30℃、120r/min震荡培养72h,再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、130r/min液体发酵4天制备形成能量供给菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0066] 3、磁介质菌菌液的制备

[0067] 分别将LB琼脂斜面培养基上生长良好的磁介质菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) CICC 23919、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*) CICC 10828分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0003改良培养基[胰蛋白胨10g/L、酵母提取物5g/L、氯化钠5g/L、酪氨酸0.5g/L、氯化亚铁0.1g/L],28℃、140r/min震荡培养72h,再以等体积比混合均匀置于摇床30℃、140r/min液体发酵4天制备形成磁介质菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0068] 4、四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂的制备

[0069] 将60%营养载体(糖蜜粉16%、骨粉(粗制骨粉粉碎)8%、蛋白胨7%、氨基酸粉14%、稻壳55%)、20%吸附载体(磁铁矿粉(磁性物含量 $\geq 95\%$; -325目粒度含量 $\geq 85\%$ 、水份 $< 8\%$)16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒11%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子8%、麦饭石粉25%、凹凸棒粘土粉25%、生物碳15%)、6%表面活性剂(十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物(分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$, CAS:26836-07-7)、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺(CDEA,分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$)、十二烷基磺酸钠(分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_3\text{S}$, CAS:2386-53-0)按等质量进行混合)按质量百分比混合均匀形成耦合载体,调节含水率为45%后装入密闭式固体发酵反应器中搅拌蒸汽灭菌1.5h,待自然冷却至35℃时,分别按5%四环素类抗生素降解菌群(步骤1)、4%能量供给菌菌液(步骤2)、5%磁介质菌菌液(步骤3)喷雾接种于已灭菌的耦合载体中,在密闭式固体发酵反应器中发酵,每隔6h翻堆一次。待发酵产物水分含量小于30%,重金属含量符合GB/T23349-2009标准,有效活菌数大于 2×10^{11} cfu/g时,即制得四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂。

[0070] 实施例2

[0071] 1、四环素类抗生素降解菌群的制备,基本同实施例1步骤1,区别仅在于培养及发酵时间不同,具体如下:

[0072] 将恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) TJ-1、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*) TD2、人苍白杆菌

(*Ochrobactrum anthropic*) TD3等6种单个降解菌用LB培养基培养至对数期(培养在30℃、130r/min震荡条件下进行),制备形成单一降解菌种子原液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。之后将各单一降解菌种子原液按照等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、140r/min液体发酵7天,得到四环素类抗生素降解菌群,菌体浓度约为 1.2×10^{12} cfu/mL。

[0073] 2、能量供给菌菌液的制备,同实施例1步骤2,具体如下:

[0074] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的能量供给菌产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC 20168、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) CICC 20079、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*) SCTCC 100664分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0002改良培养基(pH 7.0),30℃、120r/min震荡培养72h,再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、130r/min液体发酵4天,得到能量供给菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0075] 3、磁介质菌菌液的制备,同实施例1步骤3,具体如下:

[0076] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的磁介质菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) CICC 23919、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*) CICC 10828分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0003改良培养基[配方:胰蛋白胨(Tryptone) 10g/L、酵母提取物(Yeast extract) 5g/L、氯化钠(NaCl) 5g/L、酪氨酸(Tyrosine) 0.5g/L、氯化亚铁(FeCl_2) 0.1g/L],28℃、140r/min震荡培养72h,再以等体积比混合均匀置于摇床30℃、140r/min液体发酵4天,得到磁介质菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0077] 4、四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂的制备,同实施例1步骤4,具体如下:

[0078] 将60%营养载体(糖蜜粉16%、骨粉8%、蛋白胨7%、氨基酸粉14%、稻壳55%)、20%吸附载体(磁铁矿粉16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒11%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子8%、麦饭石粉25%、凹凸棒粘土粉25%、生物碳15%)、6%表面活性剂(十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物(分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$,CAS:268-36-07-7)、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺(CDEA,分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$)、十二烷基磺酸钠(分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_3\text{S}$,CAS:2386-53-0)按等质量进行混合)按质量百分比混合均匀形成耦合载体,调节含水率45%后装入密闭式固体发酵反应器中搅拌蒸汽灭菌1.5h,待自然冷却至35℃时,分别按5%四环素类抗生素降解菌群(步骤1)、4%灭活的能量供给菌菌液(步骤2)、5%灭活的磁介质菌菌液(步骤3)喷雾接种于已灭菌的耦合载体中,在密闭式固体发酵反应器中发酵,每隔6h翻堆一次。待发酵产物水分含量小于30%,重金属含量符合GB/T23349-2009标准,有效活菌数大于 2×10^{11} cfu/g时,即制得四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂。

[0079] 实施例3

[0080] 1、四环素类抗生素降解菌群

[0081] 将优选的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) XP12、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) TJ-1等4种单个降解菌分别经LB液体培养基培养至对数期,培养在28℃、140r/min震荡条件下进行。接着,进行驯化:A、取0.1mL各菌培养液于250mL三角瓶中,其中已装有高浓度(440mg/L)四环素土壤悬浮液(土壤悬浮液是土水按质量比1:5配比,灭菌得到)100mL,进行野生驯化8天(驯化条件为28℃、140r/min震荡条件下进行);B、取0.2mL

野生驯化液重复步骤A5次后在LB液体培养基中37℃、120r/min震荡培养48h制备形成单一降解菌种子原液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL;C、将各单一降解菌种子原液按照等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、140r/min液体发酵3天制备形成四环素降解菌群,菌体浓度约为 1.2×10^{11} cfu/mL。

[0082] 2、能量供给菌菌液的制备

[0083] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的能量供给菌产氨棒杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC 20168、产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) SCTCC 100664分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0002改良培养基 (pH 7.5), 30℃、120r/min震荡培养48h,再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、130r/min液体发酵3天制备形成能量供给菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0084] 3、磁介质菌菌液的制备

[0085] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的磁介质菌荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) CICC 23919加入CM 0003改良培养基[配方:胰蛋白胨 (Tryptone) 10g/L、酵母提取物 (Yeast extract) 5g/L、氯化钠 (NaCl) 5g/L、酪氨酸 (Tyrosine) 0.5g/L、氯化亚铁 (FeCl_2) 0.1g/L], 28℃、140r/min震荡培养48h,再于摇床30℃、140r/min液体发酵3天制备形成磁介质菌菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0086] 4、四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂的制备

[0087] 将40%营养载体(糖蜜粉12%、骨粉6%、蛋白胨3%、氨基酸粉14%、稻壳65%)、35%吸附载体(磁铁矿粉16%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒12%、麦饭石粉32%、凹凸棒粘土粉25%、生物碳15%)、6%表面活性剂[十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物(分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$, CAS: 268-36-07-7)和十二烷基磺酸钠(分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_3\text{S}$, CAS: 2386-53-0)按等质量进行混合]按质量百分比混合均匀形成耦合载体,调节含水率55%后装入密闭式固体发酵反应器中搅拌蒸汽灭菌2h,待自然冷却至35℃时,分别按10%四环素降解菌群(步骤1)、4%能量供给菌菌液(步骤2)、5%磁介质菌菌液(步骤3)喷雾接种于已灭菌的耦合载体中,在密闭式固体发酵反应器中发酵,每隔6h翻堆一次。待发酵产物水分含量小于30%,重金属含量符合GB/T23349-2009标准,有效活菌数大于 2×10^{11} cfu/g时,即制得四环素污染土壤原位复合微生物修复剂。

[0088] 实施例4

[0089] 1、四环素类抗生素降解菌群

[0090] 将不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.) TJ-1、缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*) TD2、人苍白杆菌 (*Ochrobactrum anthropic*) TD3等5种单个降解菌分别经LB液体培养基培养至对数期,培养在29℃、150r/min震荡条件下进行。接着,进行驯化:A、取0.1mL各菌悬液于250mL三角瓶在灭菌土水比1:5的高浓度土霉素类抗生素(480mg/L)土壤悬浮液(土壤悬浮液是土水按质量比1:5配比,灭菌得到)100mL中进行野生驯化6天(驯化条件为29℃、150r/min震荡条件下进行);B、取0.2mL野生驯化液重复步骤A5次后在LB液体培养基中37℃、120r/min震荡培养60h制备形成单一降解菌种子原液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL;将各单一降解菌种子原液按照等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、140r/min液体发酵4天制备形成土霉素类抗生素降解菌群,菌体浓度

约为 1.2×10^{11} cfu/mL。

[0091] 2、能量供给菌菌液的制备

[0092] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的优选能量供给菌产氨棒杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC20168加入CM 0002改良培养基 (pH 7.0), 30℃、120r/min震荡培养60h, 再置于摇床37℃、130r/min液体发酵3天制备形成能量供给菌菌液, 菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0093] 3、磁介质菌菌液的制备

[0094] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的磁介质菌荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) CICC 23919、洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) CICC 10828分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0003改良培养基 [配方: 胰蛋白胨 (Tryptone) 10g/L、酵母提取物 (Yeast extract) 5g/L、氯化钠 (NaCl) 5g/L、酪氨酸 (Tyrosine) 0.5g/L、氯化亚铁 (FeCl_2) 0.1g/L], 28℃、140r/min震荡培养60h, 再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床30℃、140r/min液体发酵4天制备形成磁介质菌菌液, 菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0095] 4、四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂的制备

[0096] 将52%营养载体 (糖蜜粉10%、骨粉8%、蛋白胨7%、氨基酸粉15%、稻壳60%)、30%吸附载体 (磁铁矿粉16%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子8%、麦饭石粉26%、凹凸棒粘土粉25%、生物碳25%)、4%表面活性剂 [十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物 (分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$, CAS: 268-36-07-7) 和十二烷基磺酸钠 (分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_3\text{S}$, CAS: 2386-53-0) 按等质量进行混合] 按质量百分比混合均匀形成耦合载体, 调节含水率45%后装入密闭式固体发酵反应器中搅拌蒸汽灭菌1h, 待自然冷却至35℃时, 分别按8%土霉素类抗生素降解菌群 (步骤1)、3%能量供给菌菌液 (步骤2)、3%磁介质菌菌液 (步骤3) 喷雾接种于已灭菌的耦合载体中, 在密闭式固体发酵反应器中发酵, 每隔6h翻堆一次。待发酵产物水分含量小于30%, 重金属含量符合GB/T23349-2009标准, 有效活菌数大于 2×10^{11} cfu/g时, 即制得土霉素污染土壤原位复合微生物修复剂。

[0097] 实施例5

[0098] 1、四环素类抗生素降解菌群

[0099] 将恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) XP12、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) CICC 10462、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) ATCC 24725、葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.) TJ-1、缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta*) TD2等5种单个降解菌分别经LB液体培养基培养至对数期, 培养在30℃、130r/min震荡条件下进行。接着, 进行驯化: A、取0.1mL各菌悬液于250mL三角瓶在灭菌土水比1:5的高浓度 (460mg/L) 金霉素土壤悬浮液 (土壤悬浮液是土水按质量比1:5配比, 灭菌得到) 100mL中进行野生驯化8天 (驯化条件为30℃、140r/min震荡条件下进行); B、取0.1mL野生驯化液重复步骤A6次后在LB液体培养基中37℃、120r/min震荡培养48h制备形成单一降解菌种子原液, 菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL; 将各单一降解菌种子原液按照等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、140r/min液体发酵4天制备形成金霉素降解菌群, 菌体浓度约为 1.2×10^{11} cfu/mL。

[0100] 2、能量供给菌菌液的制备

[0101] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的能量供给菌产氨棒杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) CICC 20168和产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*) SCTCC 100664分

别以同样的接种量加入同样体积的CM 0002改良培养基(pH 7.5),30℃、120r/min震荡培养72h,再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床37℃、130r/min液体发酵3天制备形成能量供给菌液,菌体浓度约为 1×10^{11} cfu/mL。

[0102] 3、磁介质菌液的制备

[0103] 将LB琼脂斜面培养基上生长良好的磁介质菌荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)CICC 23919和洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)CICC 10828分别以同样的接种量加入同样体积的CM 0003改良培养基[配方:胰蛋白胨(Tryptone)10g/L、酵母提取物(Yeast extract)5g/L、氯化钠(NaCl)5g/L、酪氨酸(Tyrosine)0.5g/L、氯化亚铁(FeCl_2)0.1g/L],28℃、140r/min震荡培养60h,再以等体积比接种于三角瓶混合均匀置于摇床30℃、140r/min液体发酵4天制备形成磁介质菌液,菌体浓度约为 1×10^{10} cfu/mL。

[0104] 4、四环素类抗生素污染土壤原位复合微生物修复剂的制备

[0105] 将56%营养载体(糖蜜粉12%、骨粉7%、蛋白胨5%、氨基酸粉12%、稻壳64%)、30%吸附载体(磁铁矿粉10%、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒4%、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性纳米复合粒子4%、麦饭石粉32%、凹凸棒粘土粉30%、生物碳20%)、2%表面活性剂[十二烷基苯磺酸与2-氨基乙醇的1:1型化合物(分子式 $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{S}$,CAS:268-36-07-7)、椰子油脂肪酸二乙醇酰胺(CDEA,分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$)、十二烷基磺酸钠(分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_3\text{S}$,CAS:2386-53-0)按等质量进行混合]按质量百分比混合均匀形成耦合载体,调节含水率45%后装入密闭式固体发酵反应器中搅拌蒸汽灭菌1h,待自然冷却至35℃时,分别按5%金霉素降解菌群(步骤1)、3%能量供给菌液(步骤2)、4%磁介质菌液(步骤3)喷雾接种于已灭菌的耦合载体中,在密闭式固体发酵反应器中发酵,每隔6h翻堆一次。待发酵产物水分含量小于30%,重金属含量符合GB/T23349-2009标准,有效活菌数大于 2×10^{11} cfu/g时,即制得金霉素污染土壤原位复合微生物修复剂。

[0106] 应用效果

[0107] 通过田间小区实验研究了4种四环素类抗生素(四环素、土霉素、金霉素和强力霉素)污染土壤施用实施实例1~5复合微生物修复剂的降解效果。

[0108] 试验共设11个处理:

[0109] 处理1,实验对照,为空白对照;

[0110] 处理2,耕层(30cm)深施实施实例1步骤4制备的复合微生物修复剂500kg/667m²;

[0111] 处理3,耕层(30cm)深施实施实例1步骤1制备的四环素类抗生素降解菌群500kg/667m²;

[0112] 处理4,耕层深施实施实例2步骤4制备的复合微生物修复剂500kg/667m²;

[0113] 处理5,耕层(30cm)深施实施实例2步骤1制备的四环素类抗生素降解菌群500kg/667m²;

[0114] 处理6,耕层深施实施实例3步骤4制备的复合微生物修复剂500kg/667m²;

[0115] 处理7,耕层(30cm)深施实施实例3步骤1制备的四环素类抗生素降解菌群500kg/667m²;

[0116] 处理8,耕层深施实施实例4步骤4制备的复合微生物修复剂500kg/667m²;

[0117] 处理9,耕层(30cm)深施实施实例4步骤1制备的四环素类抗生素降解菌群500kg/667m²;

[0118] 处理10,耕层深施实施实例5步骤4制备的复合微生物修复剂500kg/667m²;

[0119] 处理11,耕层(30cm)深施实施实例5步骤1制备的四环素类抗生素降解菌群500kg/667m²。

[0120] 每个处理小区面积4m²,3次重复。分别用浓度为200mg/L的四环素、土霉素、金霉素、强力霉素溶液污染小区土壤至小区土壤四环素、土霉素、金霉素和强力霉素含量达15mg/kg。四环素(Tetracycline,98.0%)、土霉素(Oxytetracycline,95.6%)、金霉素(Chlortetracycline,92.0%)、强力霉素(doxycycline,98.5%)均购于德国Dr.Ehrenstorfer公司。之后按上述处理组施用不同实施实例制备的四环素类抗生素降解菌群或复合微生物修复剂后保持田间持水量60~80%10天。在第10天时用土钻采集5~8个点表层土壤(20cm)组成混合样1kg左右于-60℃冷冻干燥研磨,并过60目筛后用于四环素类抗生素的分析。准确称取1.00g干土样品置于10mL离心瓶中,加入甲醇/EDTA-McIlvaine缓冲液(甲醇和EDTA-McIlvaine缓冲液按体积比1:1配比)5mL,依次振荡和超声提取各15min,离心(4500r/min)收集上清液。残渣按上述方法反复提取2次。合并上清液,利用旋转蒸发仪在40℃水浴中减压蒸发至1mL左右,再经固相萃取柱净化富集。

[0121] 固相萃取HLB小柱处理:先后用6mL甲醇和6mL EDTA-McIlvaine缓冲液活化固相萃取小柱,再用6mL高纯水淋洗小柱;将上述经旋转蒸发后的清液过固相萃取小柱,控制流速为60~120滴/min。先用6mL水淋洗小柱,真空干燥10min,再用3mL甲醇洗脱小柱,控制流速约为30滴/min。收集洗脱液于40℃水浴下用氮气吹至近干,用甲醇/水(60/40,V/V)溶液定容至1mL,溶液过0.22μm滤膜后收集于样品瓶中进行LC-MS/MS分析。色谱条件:色谱柱,20RBAXXDB-C18(2.1mm×50mm);流动相为水(0.4%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)(80:20,V/V);进样体积5μL。质谱条件:离子源为ESI源;离子源I(GS1)和II(GS2)的气体流量分别为50、60mL/min,气帘气流量为10mL/min,气体均为N₂;离子源温度为500℃;离子源电压为4500V;检测方式为多反应选择监测(MRM)离子模式。

[0122] 结果表明,施用实施例1~5复合微生物修复剂(即通过各个实施例步骤4制备得到)的5个处理四环素、土霉素、金霉素、强力霉素含量较对照有极显著的降低(P<0.01),四环素降解率分别达到100%(未检出视为降解100%)、99.5%、100%(未检出视为降解100%)、99.6%和99.8%;土霉素降解率分别达到96.3%、98.5%、95.4%、98.8%和95.0%;金霉素降解率分别达到86.9%、83.5%、85.7%、88.6%和89.1%;强力霉素降解率分别达到99.6%、100%(未检出视为降解100%)、91.7%、96.1%和97.3%。施用实施例1~5四环素类抗生素降解菌群(即通过各个实施例步骤1制备得到)的5个处理四环素、土霉素、金霉素、强力霉素含量较对照有显著的降低(P<0.05),四环素降解率分别达到92.1%、89.4%、86.3%、91.2%和92.3%;土霉素降解率分别达到85.4%、89.7%、84.3%、86.0%和85.4%;金霉素降解率分别达到78.5%、71.9%、73.4%、74.9%和75.7%;强力霉素降解率分别达到88.7%、90.4%、82.1%、85.4%和87.3%。而空白对照组处理1土壤四环素、土霉素、金霉素、强力霉素的降解率分别为6.7%、4.8%、3.2%和5.6%。

[0123] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。