



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106635933 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201710115130.3

(22)申请日 2017.02.28

(71)申请人 湖南省中科农业有限公司

地址 425000 湖南省永州市冷水滩区零陵  
南路995号

(72)发明人 文贻荣 黄生博

(51)Int. Cl.

*C12N 1/20*(2006.01)

*B09C 1/10*(2006.01)

*C12R 1/125*(2006.01)

*C12R 1/38*(2006.01)

权利要求书3页 说明书8页

### (54)发明名称

一种降解土壤中抗生素的混合菌剂及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开的一种降解土壤中抗生素的混合菌剂,涉及微生物技术领域,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按(0.1-3):1的体积比混合而成。其制备过程如下:(一)、混悬液配制;(二)、菌落培养:①、培养基制备;②、培养;(三)、菌株分离;(四)、传代驯化:①、驯化;②、LB培养基制备;③、保存;(五)、种菌液制备;(六)、混合菌剂制备。具有能有效降解土壤中残留的多种抗生素,减轻对环境的污染等特点,可用于受四环素、青霉素、磺胺嘧啶类、喹诺酮类等抗生素污染土地的修复。

1. 一种降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按(0.1-3):1的体积比混合而成。

2. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按0.1:1的体积比混合而成。

3. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按0.5:1的体积比混合而成。

4. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按1:1的体积比混合而成。

5. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按1.5:1的体积比混合而成。

6. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按2:1的体积比混合而成。

7. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按2.5:1的体积比混合而成。

8. 根据权利要求1所述降解土壤中抗生素的混合菌剂,其特征在于,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按3:1的体积比混合而成。

9. 一种如权利要求1-8中任一项所述降解土壤中抗生素的混合菌剂的制备方法,其特征在于,制备过程如下:

(一)、混悬液配制:取抗生素污染的土壤,按1:9的重量比加入到灭菌水中,搅拌成混悬液,备用;

(二)、菌落培养:

①、培养基制备:分别取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、琼脂1.5g,混合均匀,加蒸馏水至100ml,调节pH值至5.5~7.5,再高压灭菌后冷却至50℃,然后,加入土霉素,使其终质量浓度为100mg/L,即得土霉素基础盐固体培养基,备用;

②、培养:将混悬液用灭菌水10~120倍比稀释,然后涂布于土霉素基础盐固体培养基平板上,在25~37℃下,培养1~3天,成为培养菌落,备用;

(三)、菌株分离:在经过培养的土霉素基础盐固体培养基平板上挑取单菌落,通过平板划线,分离纯化出细菌菌株,再经生理生化和16S rDNA测序鉴定,保留枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)J5P2和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)J2,备用;

(四)、传代驯化:

①、驯化:将分离纯化的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,再经土霉素基础盐固体培养基传代驯化,其方法是:将枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株接种入质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在25~37℃下培养1~3天后;再接种入质量浓度为200mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在25~37℃下培养1~3天,……,以此类推,连续传代培养,每次使土霉素质量浓度增加100mg/L,至土霉素最终质量浓度达500mg/L,完成传代驯化,分别成为驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,备用;

②、LB培养基制备:分别取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g、琼脂1.5g,加蒸馏水至100mL,摇动容器,直至溶质溶解,用5mol/L的NaOH调节pH值至7.0,再用去离子水定容

至1L,然后在15psi高压下蒸汽灭菌18-24min,即得LB培养基,备用;

③、保存:将驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株分别接种于LB培养基斜面,制成斜面菌种,-4℃保存,备用;

(E)、种菌液制备:在pH值5.5~7.5的条件下,取保存的枯草芽孢杆菌J5P2斜面菌种和假单胞菌J2斜面菌种,在土霉素质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐培养基上活化24h~72h后,分别挑取枯草芽孢杆菌J5P2的单菌落和假单胞菌J2的单菌落接种于LB培养基中培养至对数生长期,5000r/min离心10min,收集菌体,经0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl洗涤3次,再用0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl调整菌液浓度,使其浓度为 $1 \times 10^{10}$ 个/mL $\pm 0.5\%$ ,分别成枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液,备用;

(F)、混合菌剂制备:将枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按(0.1~3):1的体积比混合,即成降解土壤中抗生素的混合菌剂。

10.根据权利要求9所述降解土壤中抗生素的混合菌剂的制备方法,其特征在于,制备过程如下:

(一)、混悬液配制:取抗生素污染的土壤,按1:9的重量比加入到灭菌水中,搅拌成混悬液,备用;

(二)、菌落培养:

①、培养基制备:分别取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、琼脂1.5g,混合均匀,加蒸馏水至100ml,调节pH值至6.5,再高压灭菌后冷却至50℃,然后,加入土霉素,使其终质量浓度为100mg/L,即得土霉素基础盐固体培养基,备用;

②、培养:将混悬液用灭菌水100倍比稀释,然后涂布于土霉素基础盐固体培养基平板上,在30℃下,培养2天,成为培养菌落,备用;

(三)、菌株分离:在经过培养的土霉素基础盐固体培养基平板上挑取单菌落,通过平板划线,分离纯化出细菌菌株,再经生理生化和16S rDNA测序鉴定,保留枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)J5P2和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)J2,备用;

(四)、传代驯化:

①、驯化:将分离纯化的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,再经土霉素基础盐固体培养基传代驯化,其方法是:将枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株接种入质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天后;再接种入质量浓度为200mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天,……,以此类推,连续传代培养,每次使土霉素质量浓度增加100mg/L,至土霉素最终质量浓度达500mg/L,完成传代驯化,分别成为驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,备用;

②、LB培养基制备:分别取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g、琼脂1.5g,加蒸馏水至100mL,摇动容器,直至溶质溶解,用5mol/L的NaOH调节pH值至7.0,再用去离子水定容至1L,然后在15psi高压下蒸汽灭菌21min,即得LB培养基,备用;

③、保存:将驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株分别接种于LB培养基斜面,制成斜面菌种,-4℃保存,备用;

(E)、种菌液制备:在pH值6.5的条件下,取保存的枯草芽孢杆菌J5P2斜面菌种和假单胞菌J2斜面菌种,在土霉素质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐培养基上活化48h后,分别挑取枯草芽孢杆菌J5P2的单菌落和假单胞菌J2的单菌落接种于LB培养基中培养至对数生长

期,5000r/min离心10min,收集菌体,经0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl洗涤3次,再用0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl调整菌液浓度,使其浓度为 $1 \times 10^{10}$ 个/mL $\pm 0.5\%$ ,分别成枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液,备用;

(六)、混合菌剂制备:将枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按(0.1~3):1的体积比混合,即成降解土壤中抗生素的混合菌剂。

## 一种降解土壤中抗生素的混合菌剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,特别是一种降解土壤中抗生素的混合菌剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 抗生素(四环素类、青霉素类、磺胺嘧啶类、喹诺酮类等)是一种以低微浓度即能抑制或影响它种生物机能的化学物质。它的发现与应用,在人类保健及动植物病虫害防治方面发挥了巨大的作用。但是,随着其大量生产及应用,污染问题也变得越来越严重,其滥用可造成抗生素普遍存在于环境中(尤其是土壤环境中),造成土壤环境的严重污染,进而危及人类健康。我国抗生素污染来源主要有三个方面:

[0003] 一是医用抗生素污染。医用抗生素污染被认为是目前抗生素污染的主要途径之一,抗生素已被广泛地用来保护人类的健康,据世界卫生组织调查显示,目前我国住院患者抗生素药物使用率高达80%,其中使用广谱抗生素和联合使用两种以上抗生素的占58%,远远高于30%的国际水平。而家庭自备抗生素的也已达80%。与世界其它国家比,我国已成为世界上滥用抗生素最为严重的国家之一。

[0004] 二是饲用抗生素污染。由于抗生素成本低,自20世纪50年代以来,被广泛用在畜禽养殖中,在畜禽业及水产养殖业中,用作动物的疾病预防剂及生长促进剂来提高生长速率获得较大的经济效益。目前,大量的饲用抗生素作为饲料添加剂使用,称之为抗菌生长促进剂(antimicrobial growth promoter, AGP)。AGP在使用时,动物本身并无明确的病症,目的也并不是为了治疗某种疾病,而是为促进动物的生长,提高畜禽生产效率。

[0005] 三是农用抗生素污染。利用抗生素防治植物病害,很早就有人研究。最早在农业上大面积应用的抗生素要推链霉素、土霉素及其混合液“农霉素”。它们对苹果、梨、胡桃、柑桔、烟草、蔬菜、豆类等植物的细菌性病害等有特效,对少数真菌性病害如霜霉、疫霉等也有防治作用。杀稻瘟菌素是第一个在大面积上应用并得到十分成功的农用抗生素,它曾在日本稻瘟病大流行的1963年发挥了巨大作用。

[0006] 据统计,中国是世界上最大的抗生素生产和消费国,年产21万t,每年生产2.8万t的青霉素和1万t的土霉素,分别占世界总产量的60%和65%。大多数医药抗生素被设计成能够迅速从体内排出,因此,通常多达30~90%的抗生素以母体化合物排出体外。长期服用抗生素的养殖动物,其肠道菌群产生耐药菌株,耐药基因随粪便进入环境;另外,水产养殖废水、制药厂废水和医院废水等排放致使环境中抗生素污染物不断积聚进而诱导耐药基因。在自然界,抗生素耐药因子可以通过多种途径如土壤、食水、粪便、微生物、植物、动物和人之间相互传递。土壤含有丰富的微生物资源,如果抗生素污染导致耐药菌产生,将可导致土壤成为巨大的耐药基因库。若某种致病菌或条件致病菌获得某一种或几种抗药因子,则会给社会带来巨大的潜在危害。抗生素可通过多个途径进入环境,特别是进入土壤环境以后,可使土壤微生物区系发生变化。抗生素可诱导菌体内产生耐药基因,又由于耐药基因的易传播性,将极易产生高度耐药的多重耐药菌,使土壤变成一个极大的耐药基因库。研究表

明,自2000—2015年,土壤中的抗生素耐药基因数量急剧增长。如果耐药基因从非致病菌转入致病菌,则可对人类造成相当大的危害。

[0007] 减少抗生素的使用是解决抗生素污染的根本出路,抗生素残留的去除也是减少抗生素污染的有效途径。土壤中抗生素污染的消除方法有许多,包括物理的、化学的和生物的。传统的物理方法(以客土、土壤淋洗、施加稳定剂为主)和化学方法(包括氧化、还原和水解)成本高,可能产生新的污染物,且作用相对较慢。利用生物或生物产品来降解污染物的生物修复方法具有无毒、无残留、无二次污染等优点,是消除和降解抗生素残留的一种安全、有效、廉价的方法。目前,国外许多专家学者致力于研究土壤中抗生素的生物降解技术,国内也有许多土壤中抗生素降解技术以及降解微生物筛选方面的研究报道,已报道的能降解土壤中抗生素的微生物有细菌、真菌、放线菌和藻类等。例如,王立群等从内酰胺环类抗生素生产废水中分离筛选到了4株对此类抗生素具有高效降解作用并有较强耐受能力的效应菌株,它们分别为不动杆菌属、假单胞菌属、埃希菌属和芽孢杆菌属;王永杰等从污泥中分离筛选到1株以共代谢方式可广谱降解抗生素的芽孢杆菌,初步鉴定为地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*)。

[0008] 国内外研究比较多的降解抗生素的微生物大部分是专一性裂解,仅起到降解某一类抗生素的作用,降解范围具有局限性,并且降解率较低。

[0009] 中国专利(专利申请号为201310148812.6)公开的“一种抗生素药物红霉素高效降解菌剂的制备方法”,包括:(1)活性污泥接入培养基中,以梯度压力式驯化法驯化;驯化后,静置,取上层水样,梯度稀释后采用涂布分离法和平板划线法分离,然后再进行培养、纯化,将分离出的菌株接种至牛肉膏和蛋白胨培养基中,振荡培养至其处于对数生长期;(2)将上述培养所得的菌株接入培养基中培养,即得。该发明的制备方法简单易行、安全性高、成本低;所得的红霉素降解菌剂使用方便,能够高效降解抗生素药物红霉素,而且菌株易于灭活,能够应用于水处理中红霉素的有效去除。

[0010] 另一中国专利(专利申请号为201410348058.5)公开的“菌根真菌菌剂及其在降解残留四环素类抗生素方面的应用”,该菌剂包括培养基质以及混于所述培养基质中的丛枝菌根真菌的孢子和/或菌丝。所述菌根真菌菌剂在降解残留四环素类抗生素方面的应用具体为在四环素类抗生素污染的土壤中接种上述菌根真菌菌剂,然后再在该土壤中播种宿主植物,从而构建四环素类抗生素污染的土壤修复体系。宿主植物生长90-120天收获后测定土壤中四环素类抗生素的浓度,其降解率可达20-60%。

[0011] 还有中国专利(专利申请号为201610807117.X)公开的“一种降解抗生素与农药残留的复合微生物菌剂及其制备与应用”,该发明的复合微生物菌剂按各活体菌占复合菌粉活菌总数的重量百分比配制成多菌体复合菌粉,其中,枯草芽孢杆菌10-15%、黑曲霉10-15%、胶质芽孢杆菌10-15%、粪肠球菌10-15%、地衣芽孢杆菌8-12%、巨大芽孢杆菌8-12%、荧光假单胞菌8-12%、植物乳杆菌5-8%、多粘芽孢杆菌5-8%、嗜热链球菌6-8%。该发明的复合微生物菌剂具有降解抗生素与农药残留、有机物发酵腐熟、功能性肥料及修复环境的作用,应用于农业与生态环境,可解决养殖排泄物中抗生素残留的二次污染及有机废弃物资源化利用的难题,实现土壤中抗生素与农药残留的生物降解,对农业生态环境修复及保障人类健康具有重要价值与现实意义。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的在于提供一种可以降解土壤中抗生素的生物菌剂,能有效降解土壤中残留的多种抗生素,减轻对环境的污染。

[0013] 为实现上述目的,本发明所采取的技术措施是发明一种降解土壤中抗生素的混合菌剂,是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按(0.1-3):1的体积比混合而成。

[0014] 其优化的技术方案一是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按0.1:1的体积比混合而成。

[0015] 其优化的技术方案二是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按0.5:1的体积比混合而成。

[0016] 其优化的技术方案三是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按1:1的体积比混合而成。

[0017] 其优化的技术方案四是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按1.5:1的体积比混合而成。

[0018] 其优化的技术方案五是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按2:1的体积比混合而成。

[0019] 其优化的技术方案六是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按2.5:1的体积比混合而成。

[0020] 其优化的技术方案七是由枯草芽孢杆菌J5P2和假单胞菌J2的菌液按3:1的体积比混合而成。

[0021] 与此同时,还提供一种降解土壤中抗生素的混合菌剂的制备方法,其制备过程如下:

[0022] (一)、混悬液配制:取抗生素污染的土壤,按1:9的重量比加入到灭菌水中,搅拌成混悬液,备用;

[0023] (二)、菌落培养:

[0024] ①、培养基制备:分别取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、琼脂1.5g,混合均匀,加蒸馏水至100ml,调节pH值至5.5~7.5,再高压灭菌后冷却至50℃,然后,加入土霉素,使其终质量浓度为100mg/L,即得土霉素基础盐固体培养基,备用;

[0025] ②、培养:将混悬液用灭菌水10~120倍比稀释,然后涂布于土霉素基础盐固体培养基平板上,在25~37℃下,培养1~3天,成为培养菌落,备用;

[0026] (三)、菌株分离:在经过培养的培养基平板上挑取单菌落,通过平板划线,分离纯化出细菌菌株,再经生理生化和16S rDNA测序鉴定,保留枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)J5P2和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)J2,备用;

[0027] (四)、传代驯化:

[0028] ①、驯化:将分离纯化的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,再经土霉素基础盐固体培养基传代驯化,其方法是:将枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株接种入质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在25~37℃下培养1~3天后;再接种入质量浓度为200mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在25~37℃下培养1~3天,……,以此

类推,连续传代培养,每次使土霉素质量浓度增加100mg/L,至土霉素最终质量浓度达500mg/L,完成传代驯化,分别成为驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,备用;

[0029] ②、LB培养基制备:分别取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g、琼脂1.5g,加蒸馏水至100mL,摇动容器,直至溶质溶解,用5mol/L的NaOH调节pH值至7.0,再用去离子水定容至1L,然后在15psi高压下蒸汽灭菌18-24min,即得LB培养基(液体),备用;

[0030] ③、保存:将驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株分别接种于LB培养基斜面,制成斜面菌种,-4℃保存,备用;

[0031] (五)、种菌液制备:在pH值5.5~7.5,取保存的枯草芽孢杆菌J5P2斜面菌种和假单胞菌J2斜面菌种,在土霉素质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐培养基上活化24h~72h后,分别挑取枯草芽孢杆菌J5P2的单菌落和假单胞菌J2的单菌落接种于LB培养基中培养至对数生长期,5000r/min离心10min,收集菌体,经0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl洗涤3次,再用0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl调整菌液浓度,使其浓度为 $1 \times 10^{10}$ 个/mL $\pm 0.5\%$ ,分别成枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液,备用;

[0032] (六)、混合菌剂制备:将枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按(0.1~3):1的体积比混合,即成降解土壤中抗生素的混合菌剂。

[0033] 其降解土壤中抗生素的混合菌剂的制备方法的优化技术方案的制备过程如下:

[0034] (一)、混悬液配制:取抗生素污染的土壤,按1:9的重量比加入到灭菌水中,搅拌成混悬液,备用;

[0035] (二)、菌落培养:

[0036] ①、培养基制备:分别取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、琼脂1.5g,混合均匀,加蒸馏水至100ml,调节pH值至6.5,再高压灭菌后冷却至50℃,然后,加入土霉素,使其终质量浓度为100mg/L,即得土霉素基础盐固体培养基,备用;

[0037] ②、培养:将混悬液用灭菌水100倍比稀释,然后涂布于土霉素基础盐固体培养基平板上,在30℃下,培养2天,成为培养菌落,备用;

[0038] (三)、菌株分离:在经过培养的土霉素基础盐固体培养基平板上挑取单菌落,通过平板划线,分离纯化出细菌菌株,再经生理生化和16S rDNA测序鉴定,保留枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)J5P2和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)J2,备用;

[0039] (四)、传代驯化:

[0040] ①、驯化:将分离纯化的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,再经土霉素基础盐固体培养基传代驯化,其方法是:将枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株接种入质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天后;再接种入质量浓度为200mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天,……,以此类推,连续传代培养,每次使土霉素质量浓度增加100mg/L,至土霉素最终质量浓度达500mg/L,完成传代驯化,分别成为驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,备用;

[0041] ②、LB培养基制备:分别取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g、琼脂1.5g,加蒸馏水至100mL,摇动容器,直至溶质溶解,用5mol/L的NaOH调节pH值至7.0,再用去离子水定容至1L,然后在15psi高压下蒸汽灭菌21min,即得LB培养基(液体),备用;



[0042] ③、保存：将驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株分别接种于LB培养基斜面，制成斜面菌种，-4℃保存，备用；

[0043] (五)、种菌液制备：在pH值6.5，取保存的枯草芽孢杆菌J5P2斜面菌种和假单胞菌J2斜面菌种，在土霉素质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐培养基上活化48h后，分别挑取枯草芽孢杆菌J5P2的单菌落和假单胞菌J2的单菌落接种于LB培养基中培养至对数生长期，5000r/min离心10min，收集菌体，经0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl洗涤3次，再用0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl调整菌液浓度，使其浓度为 $1 \times 10^{10}$ 个/mL $\pm 0.5\%$ ，分别成枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液，备用；

[0044] (六)、混合菌剂制备：将枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按(0.1~3):1的体积比混合，即成降解土壤中抗生素的混合菌剂。

[0045] 所述的灭菌水是经灭菌后的蒸馏水。

[0046] 上述含土霉素质量浓度不同的土霉素基础盐培养基只是土霉素量的多少不同，其他组分量均是相同的。

[0047] 本发明的降解土壤中抗生素的混合菌剂中的种菌液配比比例的确定过程如下：

[0048] (1)、基础培养基制备：取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g，加蒸馏水至100mL，调节pH值至6.5，成为基础培养基，备用。

[0049] (2)、土霉素降解试验：

[0050] ①、土霉素基础盐液体培养基制备：将土霉素加入到基础培养基，使其土霉素质量浓度为300mg/L，即得土霉素基础盐液体培养基，备用；

[0051] ②、接种试验：按4~6%接种量，将不同组合接种于100mL的土霉素基础盐液体培养基中，同时，以不接菌的土霉素基础盐固体培养基(将土霉素与基础培养基按1:1的重量比例混合，加热至完全溶解，再用NaOH调pH值到7.2，冷却后就得土霉素基础盐固体培养基)为对照，在25~37℃下培养3~5天后，用气相色谱测定其对土霉素的降解率为55~75%，耐受土霉素最高浓度为500mg/L。

[0052] (3)、青霉素降解试验：

[0053] ①、青霉素基础盐液体培养基制备：将青霉素加入到基础培养基，使其青霉素质量浓度为300mg/L，即得青霉素基础盐液体培养基，备用；

[0054] ②、接种试验：按4~6%接种量，将不同组合接种于100mL的青霉素基础盐液体培养基中，同时，以不接菌的土霉素基础盐固体培养基为对照，在25~37℃下培养3~5天后，用气相色谱测定其对青霉素的降解率为60~73%，耐受青霉素最高浓度为500mg/L。

[0055] (4)、磺胺嘧啶类降解试验：

[0056] ①、磺胺嘧啶类基础盐液体培养基制备：将磺胺嘧啶类加入到基础培养基，使其磺胺嘧啶类质量浓度为300mg/L，即得磺胺嘧啶类基础盐液体培养基，备用；

[0057] ②、接种试验：按4~6%接种量，将不同组合接种于100mL的磺胺嘧啶类基础盐液体培养基中，同时，以不接菌的土霉素基础盐固体培养基为对照，在25~37℃下培养3~5天后，用气相色谱测定其对磺胺嘧啶类的降解率为50~70%，耐受磺胺嘧啶类最高浓度为5000mg/L。

[0058] 枯草芽孢杆菌J5P2单菌菌剂对土霉素、青霉素和磺胺嘧啶类的降解率分别为30~55%、35~55%、40~65%，假单胞菌J2单菌菌剂对土霉素、青霉素和磺胺嘧啶类的降解率

分别为40~55%、35~60%、40~65%。

[0059] 最终筛选出两种菌液的最佳配比范围为枯草芽孢杆菌J5P2:假单胞菌J2=(0.1~3):1。

[0060] 本发明的降解土壤中抗生素的混合菌剂用于土壤抗生素残留的降解,其优点在于:

[0061] 1、抗逆性强、且降解酶系丰富,降解底物范围广,它不仅能降解以土霉素为代表的四环素族、以青霉素为代表的青霉素族抗生素,还能降解磺胺嘧啶类、喹诺酮类等抗生素。

[0062] 2、应用两种细菌配比,实现了优势互补,有效地提高了对抗生素的降解率,缩短了降解时间。对四环素族的降解率最高达75%,对青霉素族的降解率最高达73%,对磺胺嘧啶类降解率最高达70%,比单菌菌剂的降解率高出10~40%。

[0063] 3、对抗生素污染的土壤修复效果良好,能把有毒有害的抗生素在微生物作用下,使抗生素残留物的结构发生改变,从而引起其化学和物理性质发生改变,即通过将抗生素从大分子化合物降解为小分子化合物,最后分解成为H<sub>2</sub>O和CO<sub>2</sub>,实现对环境污染的无害化处理的过程,其转化效率高,环保效果明显。

[0064] 4、生产采用通用发酵设备,生产工艺简单,生产原料易得,成本低,应用操作方便,无污染产生,易于推广应用。

### 具体实施方式

[0065] 以下结合实施例,对本发明作进一步的说明。下面的说明是以例举的方式,但本发明的保护范围并不局限于此。

[0066] 本实施例的降解土壤中抗生素的混合菌剂,其制备过程如下:

[0067] (一)、混悬液配制:取抗生素污染的土壤,按1:9的重量比加入到灭菌水中,搅拌成混悬液,备用;

[0068] (二)、菌落培养:

[0069] ①、培养基制备:分别取NaCl 0.1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15g、NH<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> 0.1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g、琼脂1.5g,混合均匀,加蒸馏水至100ml,调节pH值至6.5,再高压灭菌后冷却至50℃,然后,加入土霉素,使其终质量浓度为100mg/L,即得土霉素基础盐固体培养基,备用;

[0070] ②、培养:将混悬液用灭菌水100倍比稀释,然后涂布于土霉素基础盐固体培养基平板上,在30℃下,培养2天,成为培养菌落,备用;

[0071] (三)、菌株分离:在经过培养的培养基平板上挑取单菌落,通过平板划线分离纯化出两株细菌菌株,经生理生化和16S rDNA测序鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) J5P2和假单胞菌(*Pseudomonas sp.*) J2的留下备用;否则,重新分离纯化;

[0072] (四)、传代驯化:

[0073] ①、驯化:将分离纯化的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,再经土霉素基础盐固体培养基传代驯化,其方法是:将枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株接种入质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天后;再接种入质量浓度为200mg/L的土霉素基础盐固体培养基上,在30℃下培养2天,……,以此类推,连续传代

培养,每次使土霉素质量浓度增加100mg/L,至土霉素最终质量浓度达500mg/L,完成传代驯化,分别成为驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株,备用;

[0074] ②、LB培养基制备:分别取胰蛋白胨1g、酵母提取物0.5g、氯化钠1g、琼脂1.5g,加蒸馏水至100mL,摇动容器,直至溶质溶解,用5mol/L的NaOH调节pH值至7.0,再用去离子水定容至1L,然后在15psi高压下蒸汽灭菌21min,即得LB培养基(液体),备用;

[0075] ③、保存:将驯化后的枯草芽孢杆菌J5P2菌株和假单胞菌J2菌株分别接种于LB培养基斜面,制成斜面菌种,-4℃保存,备用;

[0076] (五)、种菌液制备:在pH值6.5的条件下,取保存的枯草芽孢杆菌J5P2斜面菌种和假单胞菌J2斜面菌种,在土霉素质量浓度为100mg/L的土霉素基础盐培养基上活化48h后,分别挑取枯草芽孢杆菌J5P2的单菌落和假单胞菌J2的单菌落接种于LB培养基中培养至对数生长期,5000r/min离心10min,收集菌体,经0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl洗涤3次,再用0.05mol/L、pH7.4的Tris-HCl调整菌液浓度,使其浓度为 $1 \times 10^{10}$ 个/mL $\pm 0.5\%$ ,分别成枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液,备用;

[0077] (六)、混合菌剂制备:将枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按(0.1~3):1的体积比混合,即成降解土壤中抗生素的混合菌剂。

[0078] 据测试,本实施例的降解土壤中抗生素的混合菌剂,当枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液的体积比为3:1时,对土霉素的降解率为75%。当枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液的体积比为0.5:1时,对青霉素的降解率为73%。

[0079] 本实施例的降解土壤中抗生素的混合菌剂,经田间多次反复试验,取得了非常好的技术效果,有关实验情况如下:

[0080] 田间试验:选取交通便利、易于观察及管理、有代表性的田块,要求田块方正、田面平整、肥力均匀、排灌方便、种植水平与当地生产水平相当的水稻田(本例选择在湖南省永州市市东安县内)。

[0081] 本试验共分两组:

[0082] (1)、对照组:常规施肥+多次喷施磺胺嘧啶类抗生素(其浓度为500mg/L)的田地。

[0083] (2)、处理组:常规施肥+本实施例的降解土壤中抗生素的混合菌剂+多次喷施磺胺嘧啶类抗生素(其浓度为500mg/L)的田地,试验设3次重复,随机排列,小区面积不小于60平方米。

[0084] 枯草芽孢杆菌J5P2种菌液和假单胞菌J2种菌液按1:1的体积比制得降解土壤中抗生素的混合菌剂,按2mL/m<sup>2</sup>或1.3L/亩的剂量喷洒于处理组土壤表面,分别在使用降解土壤中抗生素的混合菌剂0、5、10、20天后取样,每小区按“S”形方法采取土样送检,检测土样磺胺嘧啶类残留量变化。磺胺嘧啶类残留量结果如表1所示,在使用降解土壤中抗生素的混合菌剂20天后磺胺嘧啶类抗生素基本降解完全。

[0085] 表1磺胺嘧啶类残留量(mg/Kg)

[0086]

时间 组别	0 天	5 天	10 天	20 天
对照组	1500	1500	1500	1500
处理组	1500	1164	657	255
差值	0	-336	-843	-1245

[0087] 上述试验,三年内连续在不同的地方,不同面积的田间,如60m<sup>2</sup>、80m<sup>2</sup>、120m<sup>2</sup>等试验18次,均取得了相同和相近似的结果。在试验中,未发现不良效果,这表明本发明的降解土壤中抗生素的混合菌剂具有很好的降解抗生素残留的作用,使用安全,性能稳定可靠,能有效降低抗生素的毒副作用,有利于农业的丰产丰收和人们的身体健康。

[0088] 本发明的降解土壤中抗生素的混合菌剂,可用于受四环素、青霉素、磺胺嘧啶类、喹诺酮类等抗生素污染土地的修复。