



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108611285 A

(43)申请公布日 2018.10.02

(21)申请号 201810297357.9

B09C 1/10(2006.01)

(22)申请日 2018.04.04

C02F 103/34(2006.01)

(83)生物保藏信息

C12R 1/645(2006.01)

GDMCC NO:60319 2018.01.16

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 陈烁娜 曾洁仪 檀笑 陈杨梅
解启来 韩伟江

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int. Cl.

C12N 1/16(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

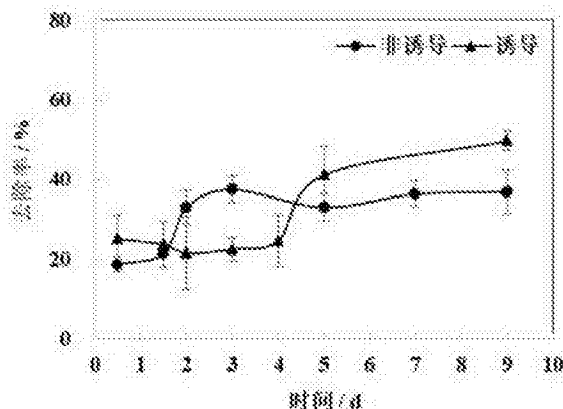
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种磺胺类抗生素降解菌及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种磺胺类抗生素降解菌及其应用。该降解菌为酵母菌(*Sakaguchia cladiensis*)A5,该菌株已于2018年1月26日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号:GDMCC NO:60319。该菌株对磺胺甲噁唑和磺胺甲噁唑等磺胺类抗生素具有很好的降解效果,可用于磺胺类抗生素污染的降解治理,应用对象可包括含有磺胺类抗生素污染物的废水废渣、水环境或土壤等,能减少抗生素对生态环境安全产生的危害,且具有节能、环保等优点,具有广阔的应用前景。



1. 一株能降解磺胺类抗生素的酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) A5菌株,其特征在于,该菌株已于2018年1月26日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号:GDMCC NO:60319。

2. 酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) 在降解处理磺胺类抗生素方面的应用或在提高磺胺类抗生素降解去除率中的应用。

3. 酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) 在治理受磺胺类抗生素污染的水环境和土壤方面的应用。

4. 根据权利要求2或3所述应用,其特征在於,所述酵母菌为权利要求1所述酵母菌A5菌株。

5. 根据权利要求2或3所述应用,其特征在於,所述磺胺类抗生素为磺胺甲噁啉、磺胺甲噁唑和/或磺胺嘧啶。

6. 一种磺胺类抗生素降解菌剂,其特征在於,含有酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*)。

7. 根据权利要求6所述降解菌剂,其特征在於,所述酵母菌为权利要求1所述酵母菌A5菌株。

8. 根据权利要求7所述降解菌剂,其特征在於,所述降解菌剂为酵母菌A5菌株的菌悬液。

9. 根据权利要求7所述降解菌剂,其特征在於,是酵母菌A5菌株活化培养后制备而成。

10. 根据权利要求8所述降解菌剂,其特征在於,所述菌悬液的制备方法为:将斜面保存的酵母菌A5接种到液体LB培养基或酵母培养基中,恒温振荡培养制得活化种子液;然后将种子液接种到新鲜培养基,继续扩大培养后,离心弃上清液收集菌体,无菌水重悬得菌悬液。

一种磺胺类抗生素降解菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境污染处理技术领域。更具体地,涉及一种磺胺类抗生素降解菌及其应用。

背景技术

[0002] 我国是抗生素生产和使用大国,每年有成千上万吨抗生素药物被用于禽畜养殖和个人医疗中,其中磺胺类抗生素由于其广谱性和质优价廉的优点成为我国医药和兽药抗生素中使用量较大的一类。事实上,大部分抗生素并不能完全被机体所吸收。研究发现,高达85%~90%抗生素以药物原形或代谢物形式经排泄物进入环境中,对土壤和水体等造成严重污染。莫测辉课题组主要针对华南地区抗生素污染对蔬菜种植以及农业食品安全的影响进行研究,证实通过畜禽粪便堆肥会将抗生素污染带入蔬菜等农产品。从文献调研的数据显示,我国地表水中磺胺类抗生素污染情况非常严峻,河水中抗生素含量明显高于其他国家。在我国各大河流域均检测到高浓度磺胺类抗生素残留。珠江枯水期检测到磺胺甲恶唑浓度为1.4~157 ng/L,磺胺甲嘧啶浓度为29.5~120 ng/L;辽河、海河流域分别检测到浓度高达173和211 ng/L的磺胺甲恶唑;黄浦江枯水期磺胺甲嘧啶浓度为14.9~623.3 ng/L;福建九龙江中也检出磺胺甲嘧啶,浓度为775.5 ng/L。

[0003] 城市污水处理厂通常被认为是污染物进入环境的一道防线,但现今的污水处理系统对抗生素的去除效果并不显著,出水仍含较高浓度的抗生素残留,致使城市污水处理厂出水成为环境中抗生素的主要来源之一。而在我国水产养殖中,抗生素作为饲料添加剂更是直接被投放到水中。人畜粪便被用作农家肥使用时,其中残留的抗生素也会进入到土壤中,形成更难控制的面源污染。虽然抗生素在医学上曾为人类健康做出巨大贡献,然而随着抗生素的滥用,导致耐药菌不断出现和大量繁殖,诱导产生的抗性基因对生态环境造成潜在的基因污染。目前,细菌抗生素耐药性已成为威胁人类健康和生态安全的焦点问题。2000年WHO的一份报告提出,抗生素抗性已成为21世纪挑战人类健康的关键性难题之一。

[0004] 环境中抗生素降解包括光解、水解等非生物降解以及生物降解,其中微生物降解是环境中抗生素降解的最主要途径。目前对含有抗生素残留污水的理化处理方法已进行了大量的研究和实践,包括高级氧化法、活性炭吸附法、低温等离子体技术和膜处理技术等,但这些理化处理法所需成本高、管理复杂,除了高级氧化法可以达到较高的去除率,其它的技术方法去除效果均较低,并且对固态介质中抗生素残留的处理存在局限性。因此,有关抗生素的微生物降解逐渐成为研究热点。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有磺胺类抗生素污染处理技术的缺陷和不足,提供一种能够高效降解磺胺类抗生素的微生物菌。旨在促进微生物技术在环境磺胺类抗生素污染治理中的应用,解决环境磺胺类抗生素污染问题。

[0006] 本发明的目的是提供一种磺胺类抗生素降解菌。

[0007] 本发明另一目的是提供所述降解菌在磺胺类抗生素污染物处理方面的应用。

[0008] 本发明上述目的通过以下技术方案实现：

本发明研究发现，酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) 对磺胺甲噁唑和磺胺甲噻唑等磺胺类抗生素具有很好的降解效果，可用于磺胺类抗生素污染的降解治理。

[0009] 而且本发明还从珠三角地区某畜禽养殖场受污染土壤中筛选、驯化、分离纯化得到一株酵母菌A5菌株，已于2018年1月26日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号：GDMCC NO:60319。

[0010] 因此，酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) 在降解处理磺胺类抗生素方面的应用或在提高磺胺类抗生素降解去除率中的应用，以及在治理受磺胺类抗生素污染的水环境和土壤方面的应用，均应在本发明的保护范围之内。

[0011] 优选地，所述酵母菌为上述酵母菌A5菌株。

[0012] 优选地，所述磺胺类抗生素为磺胺甲噁唑、磺胺甲噻唑和/或磺胺嘧啶。

[0013] 一种含有酵母菌 (*Sakaguchia cladiensis*) 的磺胺类抗生素降解菌剂，也应在本发明的保护范围之内。优选地，所述酵母菌为所述酵母菌A5菌株。

[0014] 优选地，所述降解菌剂为酵母菌A5菌株的菌悬液。

[0015] 优选地，是酵母菌A5菌株活化培养后制备而成。具体是将酵母菌A5菌株在LB培养基或酵母培养基中培养活化，离心收集沉淀物，经洗涤后稀释制备而成。

[0016] 更优选地，所述菌悬液的制备方法为：将斜面保存的酵母菌A5接种到液体LB培养基中，于25~30℃、150~160 r/min恒温振荡培养24~36 h，制得活化种子液；按接种量1%~10%将种子液接种到新鲜培养基，继续于25℃、150 r/min扩大培养24~36 h；然后25℃、6000 r/min离心5~10min，弃上清液收集菌体，无菌水洗涤2~3次，最后用无菌水配置成1 g/L的菌悬液。

[0017] 优选地，所述LB培养基的配方为：NaCl 5g/L，酵母提取物10g/L，胰蛋白胨10g/L，溶剂为水，pH为7.0~7.2。实验前高温高压灭菌。

[0018] 本发明具有以下有益效果：

本发明筛选得到一种酵母菌，对磺胺甲噁唑和磺胺甲噻唑等磺胺类抗生素具有很好的降解效果，可用于磺胺类抗生素污染的降解治理，应用对象可包括含有磺胺类抗生素污染物的废水废渣、水环境或土壤等，能减少抗生素对生态环境安全产生的危害

而且，利用本发明的酵母菌处理磺胺类抗生素污染，与物理吸附和化学降解等方法相比，具有节能、环保等优点，具有十分广阔的应用前景。

附图说明

[0019] 图1为酵母菌A5的平板生长的形态形貌。

[0020] 图2为酵母菌A5的显微镜成像图。

[0021] 图3为酵母菌A5的系统发育树。

[0022] 图4为酵母菌A5的生长曲线图。

[0023] 图5为酵母菌A5对磺胺甲噁唑的降解曲线。

具体实施方式

[0024] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0025] 除非特别说明,本发明所用试剂和材料均为市购。

[0026] 实施例1 磺胺类抗生素降解菌的分离与鉴定

1、实验材料

营养培养基:氯化钠5 g、牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、蒸馏水1000mL、pH为7.0~7.2。固体培养基则加琼脂粉(条)15 g/L。无机盐培养基:(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 0.1g、KH₂PO₄ 3g、K₂HPO₄·3H₂O 7g、柠檬酸钠0.5g、蒸馏水1000mL、pH为7.0~7.2。

[0027] 所述培养基实验前均置于高压蒸汽灭菌锅中,121℃灭菌30min。

[0028] 2、菌株的分离与鉴定

(1)磺胺类抗生素耐受菌的筛选、驯化:

微生物驯化分4个阶段进行。采集珠三角某一畜禽养殖场受污染的土壤样,首先在无菌操作条件下,将土样加到100 mL含磺胺类抗生素(10 mg/L)的营养培养基中,置于30℃,150 r/min的恒温摇床中避光培养7 d。之后,取10%体积的培养液转接到另一抗生素浓度为30 mg/L的营养培养液中,同样条件继续培养7 d,进行第二阶段驯化。接下来,每7 d为一周期,继续培养驯化,第三阶段驯化抗生素浓度提升到50 mg/L;第四阶段驯化抗生素浓度提升为100 mg/L;驯化过程除抗生素浓度变化,其它培养条件不变。

[0029] (2)磺胺类抗生素降解菌的分离纯化和筛选:

驯化结束,将菌群培养液按10⁻¹~10⁻⁶梯度稀释,分别取10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3个稀释梯度的培养液各200 μL涂布接种到固体营养培养基上,倒置于培养箱中30℃培养24~36 h。对长出的菌落进行编号,并分别挑出进一步划线分离培养,直到获得纯化到单一菌落。

[0030] 之后,分别将每一单一菌落接种到含磺胺类抗生素唯一碳源的无机盐培养基中进行降解实验,考察每种菌对磺胺类抗生素的降解能力。所述的磺胺类抗生素为磺胺甲嘧啶、磺胺甲噁唑和磺胺嘧啶,优选磺胺甲嘧啶。

[0031] 所述的降解实验条件为:每20 mL无机盐培养基中,磺胺类抗生素浓度 1 mg/L,投菌量1 g/L,置于25℃,150 r/min的恒温摇床中避光培养。

[0032] 最后筛选获得一株降解能力最好生长性能稳定的作为目标菌株,编号为A5。

[0033] (3)磺胺类抗生素降解菌(目标菌株A5)的鉴定

电子显微镜样品的制备和观察:在干净的载玻片中间滴1滴无菌水,用灼烧冷却的接种环挑取少量菌A5与载玻片上水滴充分混匀后,在载玻片上涂布成一均匀的薄层;自然晾干;在已经干燥固定的菌体上滴加草酸铵结晶紫染色液,静置1~2 min;之后将染液倾倒,斜置载玻片,用清水冲去残留多余染液,直到流出的水呈无色为止,自然晾干。按显微镜操作步骤,先在低倍镜下观察,找到合适视野之后用油镜在高倍镜下进一步观察菌体细胞形貌。

[0034] 菌株形态及生理生化鉴定结果:酵母菌A5的平板生长的形态形貌如图1所示,显微镜成像图如图2所示。菌落呈红色、不透明、圆形、表面光滑湿润、边缘整齐;显微镜下菌细胞成单个椭球状,细胞较大,着色性好。

[0035] 菌A5的分子鉴定:菌A5的分子鉴定委托广东省微生物研究所进行。经过DNA提取,PCR扩增,序列测序及序列对比,菌A5的26S rDNA测序序列与*Sakaguchia cladiensis*具有

最高同源性。并构建了系统发育树,如图3所示。

[0036] 综上形态鉴定和分子鉴定结果,本发明筛选得到的菌A5鉴定为酵母菌*Sakaguchia cladiensis*。并已于2018年1月26日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号:GDMCC NO:60319;保藏地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0037] 实施例2 酵母菌A5的生长曲线的测定

1、将酵母菌A5分别接种到LB培养基和含有磺胺类抗生素的LB培养基中,置于25℃,150 r/min摇床恒温培养,并分别于0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72、96、120、144、168、192、216 h取样,测定培养液的 OD_{600} ,用灭菌的LB液体培养基调零。

[0038] 所述的LB培养基为:NaCl 5g/L,酵母提取物10g/L,胰蛋白胨10g/L,水 1000mL,pH为7.0~7.2。

[0039] 所述的含有磺胺类抗生素的LB培养基为:上述的LB培养基中加入磺胺甲噁唑,使其浓度为100mg/L。

[0040] 2、结果如图4所示,所述酵母菌A5在含有磺胺类抗生素的培养体系中也能正常生长。

[0041] 实施例3 酵母菌A5对磺胺甲噁唑的降解实验

1、实验方法

(1) 菌悬液的制备:

从保种斜面,刮取1~2环菌A5,接入到已灭菌的LB培养基中,包扎后置于恒温摇床培养箱(25℃,150 r/min),扩大培养24~36 h。取已活化的菌A5培养液,离心(6000 r/min,25℃),收集菌体,用无菌水洗涤2次(6000 r/min,25℃)之后用无菌水重悬,制成一定浓度的菌悬液。

[0042] (2) 酵母菌A5对磺胺甲噁唑的降解:

在高压灭菌的无机盐培养基中加入一定量的磺胺甲噁唑作为唯一碳源,使其浓度为1 mg/L;之后接入1 mL菌悬液,使投菌量为1 g/L(湿重);同时设计空白组(不加菌)对照。所有样品包扎后置于25℃,150 r/min避光培养,分别于1、2、4、8、12、24、36、48、72h取样,测定溶液中残留磺胺甲噁唑的浓度。

[0043] (3) 诱导酵母菌A5对磺胺甲噁唑的降解:

在菌A5扩大培养的LB培养基中加入磺胺甲噁唑,使其浓度为100 mg/L,活化培养至对数期,按上述制备菌悬液,并按上述方法进行菌A5对磺胺甲噁唑的降解实验。

[0044] (4) 磺胺甲噁唑的测定:

样品离心后取定量上清液与萃取剂(含0.1%甲酸水:乙腈:甲醇=10:3:1)按1:1充分混合,高速离心后取上清液过滤(0.22 μm),利用高效液相色谱(HPLC)分析磺胺甲噁唑残余浓度。分析条件为: C18反相柱,5μm,4.6×250mm,紫外检测器,检测波长 270nm,水(含0.1%甲酸):乙腈=30:70(V/V)为流动相,流速 1 mL/min,进样量 20 μL。

[0045] 2、结果如图5所示,菌A5对磺胺甲噁唑的降解率随时间延长而增大,第2 d时其降解率就达到38.2%。诱导后的菌A5对磺胺甲噁唑的降解明显提高。

[0046] 实施例4 酵母菌A5对不同浓度磺胺甲噁唑的降解研究

在高压灭菌的无机盐培养基中加入一定量的磺胺甲噁唑作为唯一碳源,使其浓度分别为0.5、1、3和5 mg/L;之后接入1 mL菌悬液,使投菌量为1 g/L(湿重);同时设计空白组(不

加菌)对照。所有样品包扎后置于25 °C,150 r/min避光培养,反应2 d后取样,测定溶液中残留磺胺甲嘧啶的浓度。菌悬液制备和磺胺甲嘧啶测定的方法如实施例3中所述。

[0047] 结果表明,菌A5对不同浓度的磺胺甲嘧啶均具有降解效果,其中对1 mg/L的磺胺甲嘧啶降解效果最佳,对0.5 mg/L的磺胺甲嘧啶降解效果次之,高浓度磺胺甲嘧啶(5 mg/L)的降解效果更次之。

[0048] 实施例5 不同投菌量的酵母菌A5对磺胺甲嘧啶的降解研究

在高压灭菌的无机盐培养基中加入一定量的磺胺甲嘧啶作为唯一碳源,使其浓度为1 mg/L;之后接入一定量的菌悬液,使投菌量分别为0.5、1、1.5和2 g/L(湿重);同时设计空白组(不加菌)对照。所有样品包扎后置于25 °C,150 r/min避光培养,反应2 d后取样,测定溶液中残留磺胺甲嘧啶的浓度。菌悬液制备和磺胺甲嘧啶测定的方法如实施例3中所述。

[0049] 实验结果表明,降解1 mg/L 磺胺甲嘧啶的最佳投菌量为1 g/L,其它浓度投菌量对磺胺甲嘧啶降解的影响不显著。

[0050] 实施例6 酵母菌A5对不同pH体系中磺胺甲嘧啶的降解研究

在高压灭菌的无机盐培养基中加入一定量的磺胺甲嘧啶作为唯一碳源,使其浓度为1 mg/L;调节溶液pH,使体系pH分别为酸性(1~3)、弱酸性(5~6)、中性(7)、弱碱性(9~10)和碱性(12~14)。之后接入一定量的菌悬液,使投菌量为1 g/L(湿重);同时设计空白组(不加菌)做对照。所有样品包扎后置于25 °C,150 r/min避光培养,反应2 d后取样,测定溶液中残留磺胺甲嘧啶的浓度。菌悬液制备和磺胺甲嘧啶测定的方法如实施例3中所述。

[0051] 实验结果表明,酸性条件下不利于磺胺甲嘧啶的去除。中性到碱性pH范围内,对磺胺甲嘧啶降解的影响不明显。

[0052] 实施例7 酵母菌A5对含磺胺类抗生素废水的降解处理

在含有多种磺胺类抗生素(磺胺甲嘧啶、磺胺甲噁唑和磺胺嘧啶)的水体中加入菌A5菌悬液,投菌量为1 g/L(湿重),设计空白组(不加菌)对照。置25 °C,150 r/min避光反应2 d后取样,测定溶液中残留磺胺甲嘧啶、磺胺甲噁唑和磺胺嘧啶的浓度。菌悬液制备和磺胺甲嘧啶测定的方法如实施例3中所述。

[0053] 实验结果表明,菌A5对3中磺胺类抗生素均具有良好降解效果,其中对磺胺甲嘧啶的降解去除效果最好。

[0054] 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。

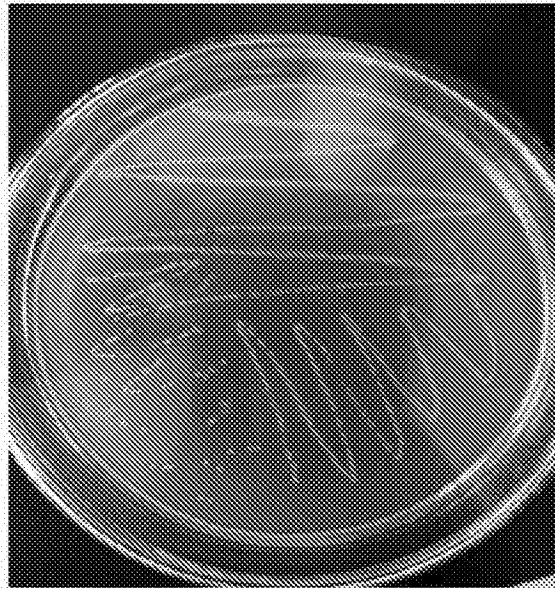


图1

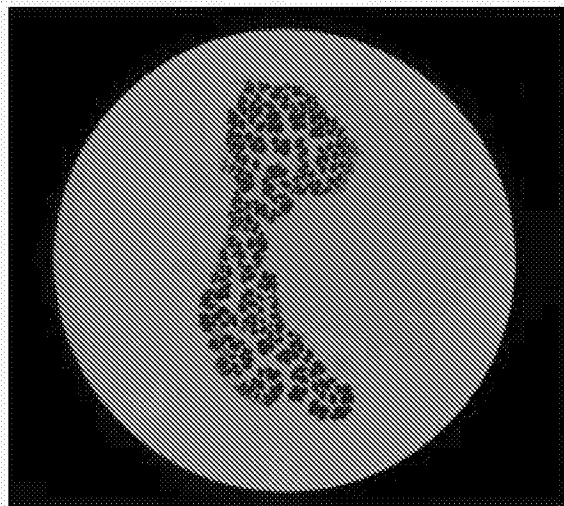


图2

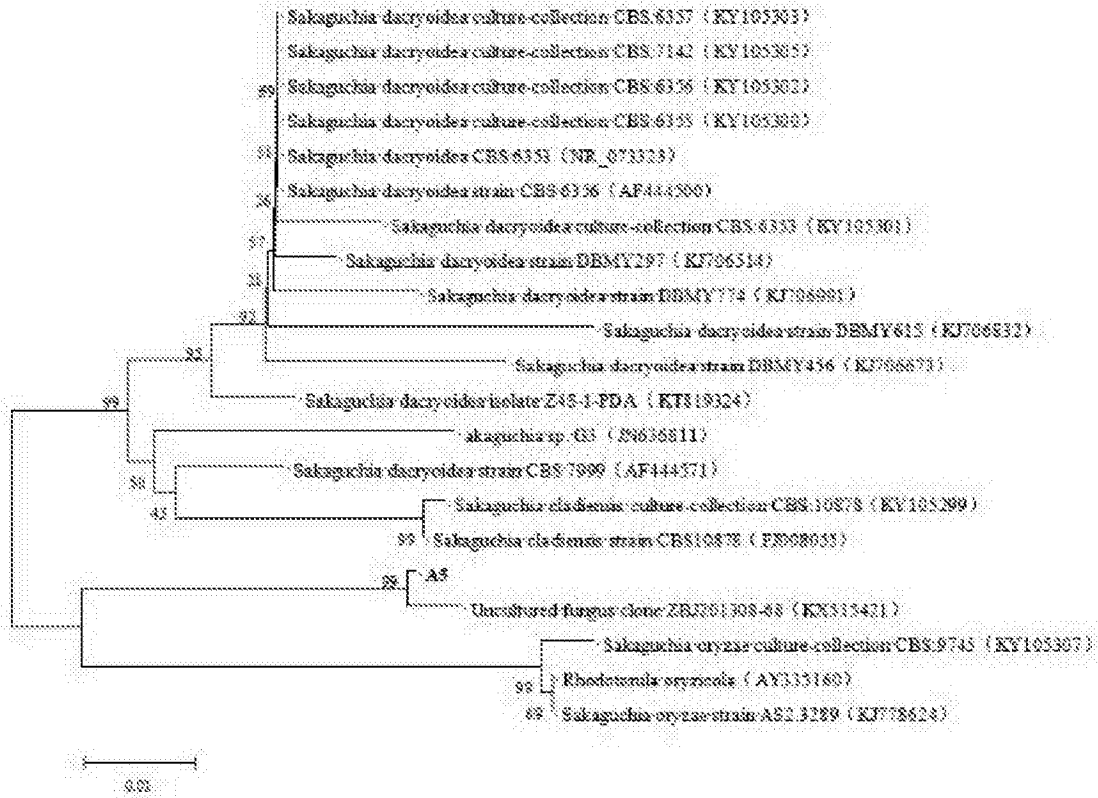


图3

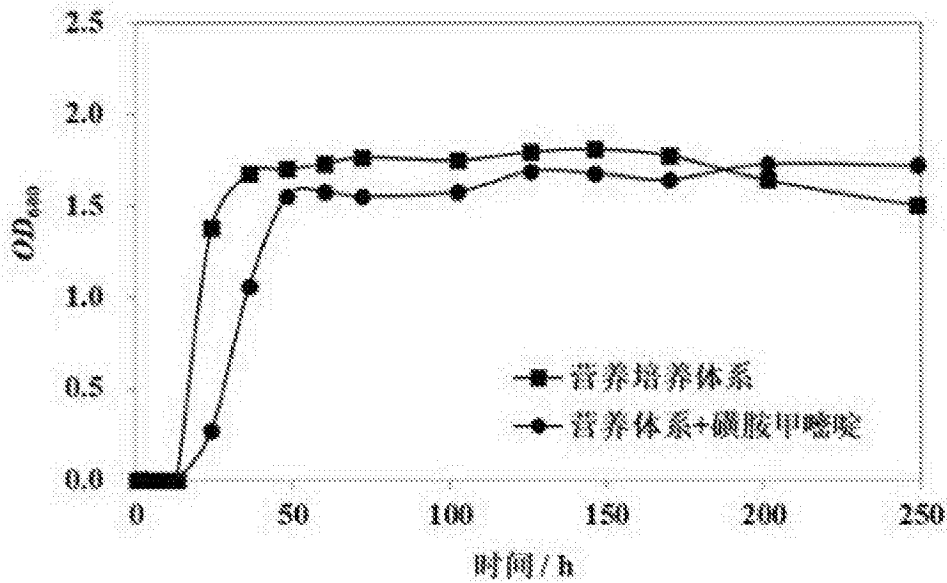


图4

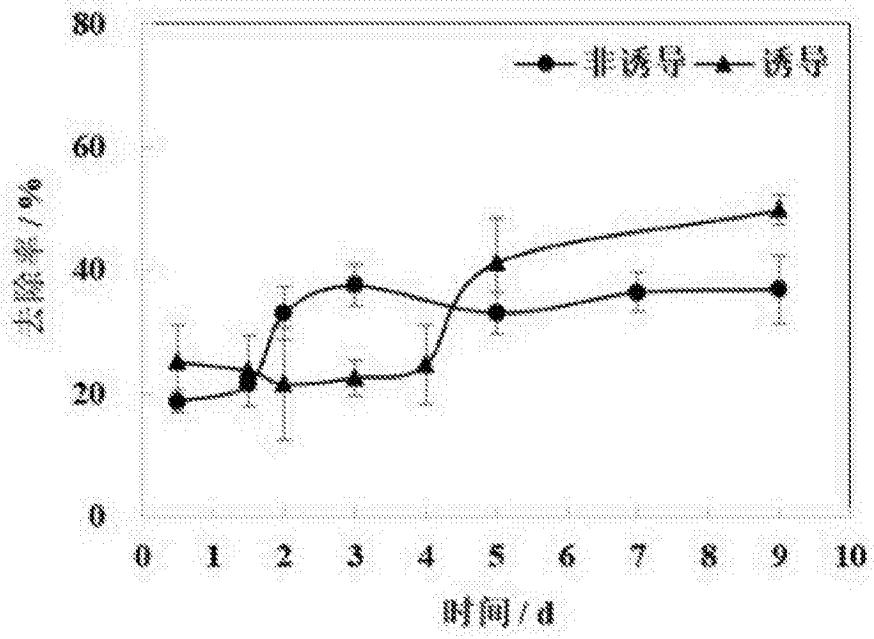


图5