

泰乐菌素高效降解菌的筛选及降解特性研究

刘力嘉¹, 谢 丽¹, 张作义², 刘宁普¹, 张新沙¹, 马玉龙^{1*}

(1.宁夏大学农学院, 银川 750021; 2.宁夏银川西夏区农牧水务局, 银川 750021)

摘 要: 发酵法生产泰乐菌素过程中会产生大量药渣, 因残留抗生素的存在, 极大地限制了其资源化利用。本研究采用微生物法降解药渣中残留泰乐菌素。结果表明: 从堆放泰乐菌素药渣附近土壤中分离筛选到 1 株高效降解药渣泰乐菌素的菌株, 经 16S rDNA 鉴定为无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)。该菌株适宜生长 pH 值为 6.0~7.0、温度为 30~35℃。在 30℃、pH6.5 条件下, 将无丙二酸柠檬酸杆菌按质量比为 10% 的量接种于含 50 mg·L⁻¹ 泰乐菌素培养基中, 经 48 h 发酵处理后, 95.2% 的泰乐菌素被降解。提示利用微生物法可有效降解药渣中残留泰乐菌素。

关键词: 泰乐菌素; 无丙二酸柠檬酸杆菌; 筛选; 生物降解

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2011)05-1027-04

Isolation and Degradation Characteristics of a Tylosin-degrading Strain

LIU Li-jia¹, XIE Li¹, ZHANG Zuo-yi², LIU Ning-pu¹, ZHANG Xin-sha¹, MA Yu-long^{1*}

(1.College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2.Xixiaqu Bureau of Animal Husbandry and Water Authority, Yinchuan 750021, China)

Abstract: A mass of pharmaceutical waste is produced during tylosin production by fermentation. The resource utilization of pharmaceutical waste is restricted greatly because of the existence of antibiotic residue. The aim of this study was to investigate the degradation of tylosin residue in pharmaceutical waste by microbiological method. The results showed that a tylosin-degrading strain was isolated from the soil on which the tylosin pharmaceutical waste was long stacked. This strain was identified by 16S rDNA as *Citrobacter amalonaticus*. The optimal growth conditions of *C. amalonaticus* were at pH6.0~7.0 and temperature 30~35℃. The amount of 95.2% of tylosin in medium was degraded by *C. amalonaticus* after fermentation for 48 h with conditions of initial bacteria concentration 10%, temperature 30℃, and pH 6.5. These indicate that tylosin residue in pharmaceutical waste can be degraded by using microorganism.

Keywords: tylosin; *Citrobacter amalonaticus*; isolation; biodegradation

饲用抗生素的大量使用甚至滥用, 会带来诸如耐药菌、畜禽产品药物残留等不良后果, 已受到世界各国广泛关注^[1-3]。由于高达 85% 以上抗生素不能完全被动物机体吸收, 所残留的抗生素会通过各种途径进入土壤、水域等环境中, 在雨水、风等携带或促进下, 进而污染地下水、地表水和人们的生活用水^[4-6]。我国每年也有成千上万吨的抗生素类药物被用于畜禽养殖和人的医疗中。目前, 国内外有关药渣中残留抗

生素降解技术的研究报道甚少, 更没有对于泰乐菌素这种耐高温稳定抗生素的降解研究。本课题主要采用微生物降解法对药渣中残留抗生素进行生物降解, 对药渣中残留抗生素进行降解研究, 对抗生素生产企业可持续发展具有重大现实意义, 而且对环境保护, 提高资源循环利用效率, 促进经济和环境持续、和谐发展具有重要的社会意义。

泰乐菌素(*Tylosin*)是一种由弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生的兽用抗生素, 属大环内酯类抗生素, 主要作用于革兰氏阳性菌、厌氧细菌和支原体, 又因其有促生长作用, 所以被广泛用于畜禽生产及兽医治疗^[7]。近年来, 泰乐菌素作为兽药和饲料添加剂, 在畜禽疾病防治和促进生长方面发挥了较大作用, 但其进入动物体内不能完全被吸收, 大部分被排出体外^[8-11]。

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(21067009); 宁夏自然科学基金(NZ0819); 宁夏大学科学研究基金项目(ZR200804)

作者简介: 刘力嘉(1985—), 女, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 主要从事废物利用与资源化研究。E-mail: xiaojiaaya8385@163.com

* 通讯作者: 马玉龙 E-mail: nxylma@163.com

泰乐菌素药渣是在泰乐菌素生产中,发酵醪液进行固液分离时产生的菌饼部分。药渣中未提取完的泰乐菌素,在自然环境中不易分解,因此大量泰乐菌素残留对畜牧土地及泰乐菌素生产企业周边环境造成极大的污染。由于药渣中含有丰富的营养成分,应对其进行二次利用,但直接将其作为肥料和饲料原料使用,均将从不同方面、不同程度上破坏生态环境。本研究对药渣中残留泰乐菌素进行降解研究,旨在为泰乐菌素药渣环保处理及其资源化利用提供科学依据,同时也为其他抗生素废渣、废水的综合治理提供可借鉴的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 供试样品

泰乐菌素标样购买于美国 Sigma 公司,泰乐菌素药渣由泰乐菌素生产企业提供。

1.2 培养基

YPD 培养基:酵母提取物 1 g,蛋白胨 2 g,葡萄糖 2 g,水 100 mL。

S1 固体培养基:酵母提取物 0.5 g,蛋白胨 0.8 g,葡萄糖 0.5 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.53 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 1 g,水 100 mL。

泰乐菌素药渣培养基:泰乐菌素药渣与水按 1:10 比例(重量百分比)混合后,置室温下浸泡 12~14 h,离心弃沉淀,再通过抽滤弃除漂浮的杂质即可。将泰乐菌素含量调为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 泰乐菌素降解菌的筛选

1.3.1 菌株来源

取自长期堆放泰乐菌素药渣附近的土壤。

1.3.2 降解菌的分离与纯化

将采集的土壤加入到 pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液中打散、浸出,将其接入含有营养物质和泰乐菌素药渣的培养基中进行培养。通过提高药渣比例分周期进行筛选、驯化。将所得的复合菌经固体平板涂布,依据菌落形态进行分离纯化。通过对泰乐菌素降解效果的对比,筛选出降解能力较强的优势菌株。以上操作均在无菌条件下进行。

1.3.3 高效降解菌的鉴定

采用 DNA 快速提取试剂盒(MK047-3)进行 DNA 的提取。PCR 反应引物采用细菌通用引物,正向 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向 1492R:5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3'。

PCR 反应体系:10×PCR 缓冲液 10 μL , MgCl_2 (25

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 μL , 4 种 dNTP (200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 引物 27F 和 1492R 模板 DNA 1 μL , Taq DNA 聚合酶 (10 000U $\cdot \text{mL}^{-1}$) 1 μL , 加重蒸馏水至 100 μL 。

PCR 扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.4 生长曲线的测定

降解菌接种于液态 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、130 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养, 于不同时间取样, 采用活菌稀释计数法测培养基中细菌浓度, 并采用分光光度法检测样品的 OD 值, 以确定降解菌的生长量。

1.5 培养条件对泰乐菌素降解的影响

采用单因子试验, 将降解菌进行活化培养, 然后以不同接种量接种于药渣培养基, 分别在不同时间、底物(泰乐菌素)浓度、pH 和温度等条件下培养, 测定培养基中泰乐菌素残留量。每个处理设 3 次重复。

1.6 泰乐菌素浓度的测定

使用固体平板药敏试验法对泰乐菌素浓度进行测定: 取样后置于 1.5 mL 离心管, 和对照液一起以 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。稀释后进行药敏试验。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离筛选

经筛选、驯化获得对泰乐菌素有明显降解效果的复合菌群。根据菌落形态等特征区分, 试验初步分离得到 4 株菌株, 分别编号为 FY、FL、FG 和 FQ。在相同条件下, 菌株 FY 降解效果明显优于其他 3 株菌株, 降解效果明显且稳定, 处理重现性好。经革兰氏染色及倒置显微镜观察, 菌株 FY 为革兰氏阴性杆菌。

2.2 优势菌的鉴定

以细菌总 DNA 为模板, 利用细菌 16S rDNA 通用引物, 正向引物 27F 和反向引物 1492R 进行 PCR 扩增, 得到 PCR 扩增产物, 测定了分离菌株部分长度的 16S rDNA (约 1 438 bp) 序列。将所测序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行对比性分析。结果显示, 与 FY 同源性最高的是 *Citrobacter amalonaticus*, 同源性达到 99%, 故在分子系统发育分类学上属于无丙二酸柠檬酸杆菌。

2.3 生长曲线的测定

分别采用活菌计数和分光光度法对降解菌 FY 生长曲线进行测定。由图 1 可见: 利用活菌稀释计数法测定的菌生长曲线, 0~16 h 为迟缓期, 16~40 h 为对

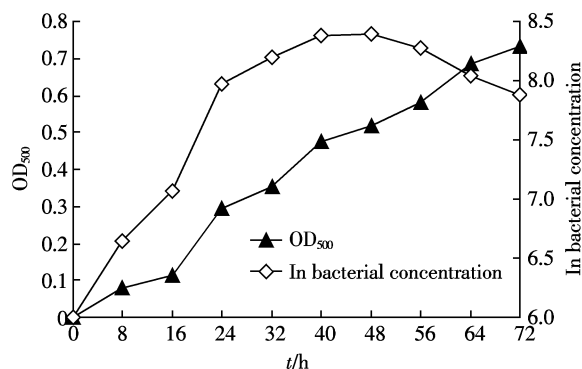


图1 降解菌生长曲线

Figure 1 Growth curve of degradation bacterium

数生长期,40~48 h 为稳定期,48~72 h 为衰退期。而利用分光光度法测定的生长曲线,在 48~72 h 期间未出现数值下降的趋势,这是由于采用分光光度仪测定的细菌浓度,包含了代谢死亡后的菌体,使吸光度仍然持续升高。

2.4 培养条件对泰乐菌素降解效果的影响

2.4.1 培养时间

将菌株 FY 接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 泰乐菌素的药渣培养基中, 30°C 下摇床振荡 ($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 72 h。由图 2 可知:随着培养时间的延长,培养基中泰乐菌素的降解率增大,0~8 h 降解效果不明显,在 8 h 降解率仅为 6.8%,之后降解效果明显增强,其中 16~48 h 的降解效果最为显著,其降解率由 22.3% 升至 89.1%,当培养至 72 h 时,用微生物法未能检出残留泰乐菌素。

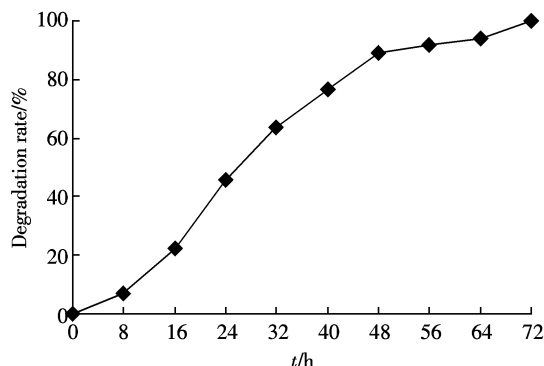


图2 培养时间对降解菌降解能力的影响

Figure 2 The effect of time to biodegradation

2.4.2 泰乐菌素浓度

将菌株 FY 接种于含不同泰乐菌素浓度 (10、20、30、40、50、60、70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的药渣培养基中,在 30°C 条件下摇床振荡 ($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 48 h。由图 3 可知:当泰乐菌素浓度低于 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,用微

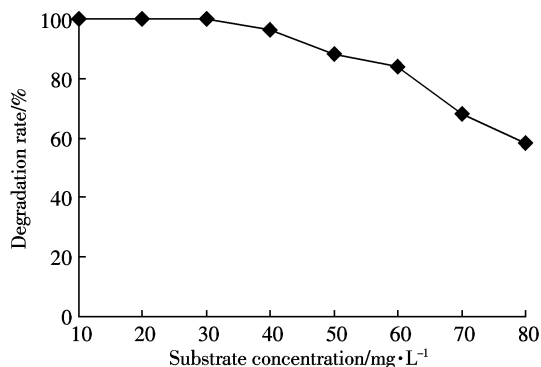


图3 泰乐菌素浓度对降解菌降解能力的影响

Figure 3 The effect of tylosin concentration to biodegradation

生物法未检测到残留泰乐菌素。泰乐菌素浓度高于 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随着底物浓度增加,降解能力相应减弱。

2.4.3 接菌量

将菌株 FY (活菌浓度 $2.1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别按 2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16% 接种量接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的泰乐菌素的药渣培养基中,在 30°C 下摇床振荡 ($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 48 h。由图 4 可知:当接种量较低时,菌株 FY 对泰乐菌素的降解效果随接种量的增加在一定范围内增加,当接菌量为 10% 时,其降解率为 95.2%。当接种量超过 10% 后,菌株 FY 对泰乐菌素的降解效果有所下降,可能由于降解菌之间存在竞争抑制作用。从实际应用及效益考虑,选 10% 作为适宜接种量。

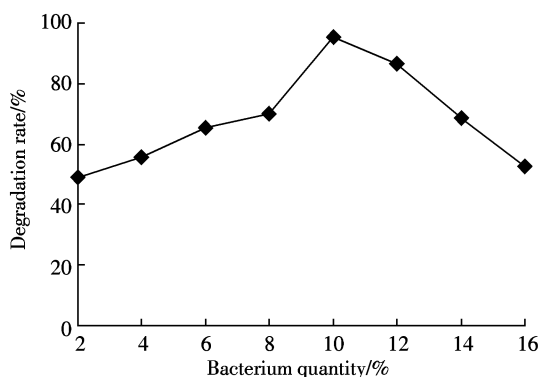


图4 接菌量对降解菌降解能力的影响

Figure 4 The effect of bacterium quantity to biodegradation

2.4.4 pH 值

将菌株 FY 接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 泰乐菌素的药渣培养基中,将培养基 pH 分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5。在 30°C 下摇床振荡 ($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 48 h。由图 5 可知:当培养基 pH 值在 5.0~6.0 的范围内,菌株 FY 对泰乐菌素的降解率随 pH 值升高

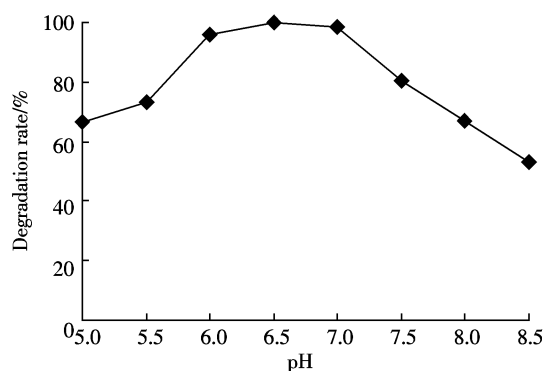


图 5 pH 对降解菌降解能力的影响

Figure 5 The effect of pH value to biodegradation

而增加,从 66.7% 升至 96.2%;在 pH 值为 6.0~7.0 时降解效果最佳,在 pH 值为 6.5 时用微生物法未能检出残留泰乐菌素;当培养基 pH 值在 7.0~8.5 的范围内,随着 pH 值的升高,降解率呈直线下降趋势,从 98.2% 升至 53.1%。可见菌株 FY 在中性偏酸性的环境下对泰乐菌素的降解效果最明显,所以适宜的降解 pH 值为 6.0~7.0。

2.4.5 温度

将菌株 FY 接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 泰乐菌素的药渣培养基中,在温度分别为 15、20、25、30、35 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床振荡 ($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 48 h。由图 6 可知:温度对降解菌活性有明显影响。在 15~25 $^{\circ}\text{C}$ 之间,泰乐菌素的降解率随着温度的升高而增加,从 59.2% 上升至 88.1%。在温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 时用微生物法未能检出残留泰乐菌素,而温度上升至 40 $^{\circ}\text{C}$ 时泰乐菌素降解率下降至 80.5%。因此,适宜的降解温度是 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 。

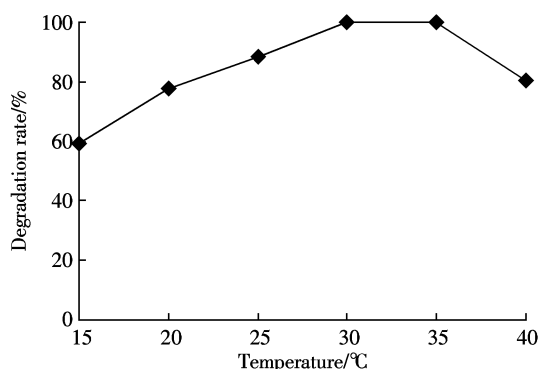


图 6 温度对降解菌降解能力的影响

Figure 6 The effect of temperature to biodegradation

3 结论

(1) 从长期堆放泰乐菌素药渣的土壤中,分离纯化出的 1 株高效降解泰乐菌素的菌株,该菌为革兰氏阴性杆菌。经 16S rDNA 鉴定为无丙二酸柠檬酸杆菌 (*Citrobacter amalonaticus*)。

(2) 在实验室条件下,降解菌降解泰乐菌素的适宜 pH 值为 6.0~7.0、温度为 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 。该降解菌在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.5、摇床转速 $125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、接种量 10% 的条件下培养 48 h,对泰乐菌素 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的降解率达 95.2%。

参考文献:

- [1] Sassman S A, Lee L S. Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 7452-7459.
- [2] Kumar K, Gupta S C, Baidoo S K, et al. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(6): 2082-2085.
- [3] 余伯良. 减少使用抗生素饲料添加剂的途径 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998, 4: 21-22.
- [4] YU Bo-liang. Pathways of reduce the use of antibiotics feed additive [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 1998, 4: 21-22.
- [5] 王敏, 唐景春. 土壤中的抗生素污染及其生态毒性研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29: 261-266.
- [6] WANG Min, TANG Jing-chun. Research of antibiotics pollution in soil environments and its ecological toxicity [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29: 261-266.
- [7] Nolwenn Prado, Juan Ochoa, Abdeltif Amrane. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system [J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44: 1302-1306.
- [8] Kay P, Blackwell P A. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 134(2): 333-341.
- [9] Prats C, Francesch R, Arboix M, et al. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography B*, 2001, 766: 57-65.
- [10] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P F. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review [J]. *Chemosphere*, 1998, 36: 357-393.
- [11] Jemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: A review [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2002, 93: 267-278.
- [12] Kumar K, Gupta S C, Chander Y, et al. Antibiotic use in agriculture and their impact on terrestrial environment [J]. *Adv in Agron*, 2005, 87: 1-54.
- [13] Phillips I, Casewell M, Cox T, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health: A critical review of published data [J]. *J Antimicrob Chemotherapy*, 2004, 53: 28-52.