

刘静娴, 刘娟, 孙敏霞, 等. 抗生素对雌二醇降解菌 JX-2 降解性能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(8): 1488–1492.

LIU Jing-xian, LIU Juan, SUN Min-xia, et al. Effects of antibiotics on the estradiol degradation by strain JX-2[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(8): 1488–1492.

抗生素对雌二醇降解菌 JX-2 降解性能的影响

刘静娴, 刘娟, 孙敏霞, 高彦征, 李舜尧, 凌婉婷*

(南京农业大学土壤有机污染控制与修复研究所, 南京 210095)

摘要: 为了解抗生素对雌二醇(E2)降解菌 JX-2 降解性能的影响, 通过药敏试验研究了 12 种常用抗生素对菌株 JX-2 的最小抑菌浓度(MIC); 采用雌二醇-抗生素联合培养, 研究了不同浓度抗生素作用下菌株生物量及降解性能, 探讨了混合抗生素分别对纯培养条件下和污水中菌株 JX-2 降解 E2 的影响。结果表明, 菌株 JX-2 对青霉素和红霉素的最小抑菌浓度很低, 对氯霉素、土霉素和磺胺嘧啶的耐药性相对较高, 对其他抗生素的耐药性介于两者之间。低浓度抗生素(<MIC)对菌株的生长和降解性能影响不大, 而高浓度抗生素(>MIC)则会明显抑制菌株生长并降低其降解性能。随着时间延长, 低浓度抗生素对 JX-2 降解 E2 的抑制作用减弱, 而高浓度抗生素的抑制作用减弱不明显。当各抗生素浓度为 10.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 混合抗生素对纯培养条件下菌株 JX-2 降解 E2 并无影响, 而当各抗生素浓度增大到 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 混合抗生素显著抑制了菌株对 E2 的降解, 7 d 时 E2 降解率为 48.2%。当各抗生素浓度为 10.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株 JX-2 对污水中 E2 具有良好的降解效果, E2 降解率达 80%以上。

关键词: 抗生素; 雌二醇降解菌; 降解; 最小抑菌浓度; 污水

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)08-1488-10 doi:10.11654/jaes.2016-0620

Effects of antibiotics on the estradiol degradation by strain JX-2

LIU Jing-xian, LIU Juan, SUN Min-xia, GAO Yan-zheng, LI Shun-yao, LING Wan-ting*

(Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this work was to investigate the effects of antibiotics on the estradiol (E2) degradation by an estradiol-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. JX-2. The minimum inhibitory concentration (MIC) of 12 kinds of antibiotics to strain JX-2 was measured by the drug sensitive test. The influence of antibiotics at different concentrations on cell growth and E2-degradation performance by JX-2 was studied using an E2-antibiotics co-cultivation method. The impacts of mixed antibiotics at different concentrations and processing time on E2 degradation in both aqueous solution and sewage were elucidated. Strain JX-2 was observed to be extremely sensitive to penicillin and erythromycin. The drug resistance of strain JX-2 to chloramphenicol, oxytetracycline and sulfadiazine versus other antibiotics was relatively stronger. No significant influence was observed on the growth and E2-degradation performance of strain JX-2 under the stress of antibiotics at low concentrations, but high antibiotic concentrations obviously inhibited the strain JX-2 growth and reduced its E2-degradation performance. Extending the incubation time weakened the inhibitory effects of mixed antibiotics at low concentrations on E2 degradation, while no such effects were observed for antibiotics at the high concentrations. The mixed antibiotics did not significantly influence the E2 degradation by strain JX-2 in aqueous solution when the antibiotics concentrations were 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. However, the mixed antibiotics significantly inhibited the E2 degradation when the antibiotics concentration increased to 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the E2 degradation rate was only 48.2% in 7 days. Strain JX-2 performed well on E2 degradation in sewage when the antibiotics concentrations were 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and the degradation rates were higher than 80%.

Keywords: antibiotics; estradiol-degrading bacterium; degradation; minimum inhibitory concentration; sewage

收稿日期: 2016-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(51278252); 江苏省环保科研课题(2015023); 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2015682)

作者简介: 刘静娴(1990—), 女, 浙江临安人, 硕士研究生, 从事环境污染控制与生物修复研究。E-mail: 2014103034@njau.edu.cn

* 通信作者: 凌婉婷 E-mail: lingwanting@njau.edu.cn

当前,环境雌激素污染问题备受各国政府和学者关注,被喻为严重威胁人类生命安全的定时炸弹^[1]。其中,生活污水和养殖业畜禽粪便是环境雌激素的重要来源。大量排放到环境中的雌激素已经严重威胁人类和动物的安全与健康。利用功能降解菌有望高效去除雌激素,国内外学者已分离获得了多株雌激素降解菌^[2-5],这些降解菌具有较好的雌激素降解效果,从而为去除环境中的雌激素提供了一个很好的思路。

环境中抗生素往往与雌激素共存。目前在土壤、地表水及地下水中均能检测到抗生素^[6]。抗生素的污染状况、环境行为、生态效应等是近年来环境领域的研究热点之一。环境中抗生素能自然产生,这属于微生物自然防御机制,其环境本底值非常低,而目前环境中大量抗生素主要来自于工业生产的医用抗生素和兽用抗生素。大量未失活的抗生素通过医院的污水、使用者粪便、畜禽与水产养殖所产生的废弃物等排入环境,严重威胁人群健康和环境微生物的生态安全^[7]。环境中的残留抗生素已被证实可直接影响微生物的生物量^[8-9]、群落结构^[10-11]、活性等^[12],并诱导产生抗性基因^[13-14]。

抗菌性是抗生素的本质属性。抗生素可对雌激素降解菌这类环境有益菌产生生态效应,进而影响降解菌对环境雌激素的降解性能。然而,有关抗生素影响微生物降解与转化雌激素的文献报道还很少。Chun 等^[15]报道,粘土中的抗生素显著降低了土壤微生物的脱氢酶活性,影响雌二醇(Estradiol, E2)向雌酮(Estrone, E1)的转化。本课题组前期筛选到一株 E2 降解菌 *Rhodococcus* sp. JX-2,有望实现环境中 E2 的高效去除;但共存抗生素的影响是制约功能菌降解效率的一个关键因素。

本文选用 12 种常见抗生素,研究了抗生素对菌株 JX-2 毒性和降解性能的影响,以期利用功能菌去除实际污染环境中雌激素提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌:菌株为实验室筛选分离得到的降解菌 *Rhodococcus* sp. JX-2。

菌悬液的制备:将菌落接种于 LB 液体培养基中,30℃、150 r·min⁻¹ 摇床培养 15 h,8000 r·min⁻¹ 离心 10 min,倒掉上清液,用无机盐培养基(MSM)或无菌水洗涤菌体,再次离心 5 min,倒去上清液。重复洗

涤 1 次后,利用 MSM 或无菌水重新悬浮菌体,利用分光光度计调整菌体浓度到 OD₆₀₀=1。

抗生素:青霉素(Penicillin, P; G 钠盐,纯度 98%),四环素(Tetracycline, TC; 盐酸四环素,纯度 98%),红霉素(Erythromycin, EM; 纯度 98%),庆大霉素(Gentamycin, GM; 硫酸庆大霉素,纯度 98%),链霉素(Streptomycin, SM; 硫酸链霉素,纯度 98%),氨苄青霉素(Ampicillin, AMP; 氨苄青霉素钠盐,纯度 98%),氯霉素(Chloramphenicol, C; 纯度 99%),卡那霉素(Kanamycin, KM; 硫酸卡那霉素,纯度 98%),土霉素(Oxytetracycline, OTC; 盐酸土霉素,纯度 99%),羧苄青霉素(Carbenicillin, CAR; 羧苄青霉素二钠盐,纯度 98%),金霉素(Chlortetracycline, CTC; 盐酸金霉素,纯度 98%),磺胺嘧啶(Sulfadiazine, SDZ; 纯度 98%)。

抗生素母液配置:红霉素、氯霉素配制成浓度为 5120 μg·mL⁻¹ 的乙醇溶液,其余抗生素为 5120 μg·mL⁻¹ 的水溶液,即为抗生素母液;实验前均用无菌水稀释成浓度为 1280 μg·mL⁻¹ 的溶液备用。

雌二醇(纯度≥98%)购自 Sigma-Aldrich 公司。其基本性质如下:分子量 272.38 g·mol⁻¹,纯水中溶解度 5.4~13.3 mg·L⁻¹,辛醇-水分配系数(lgK_{ow})为 3.8~4.0,蒸发压 3×10⁻⁸ kPa^[16]。

1.2 培养基组成

MH 肉汤(g·L⁻¹):牛肉粉 2.0,酸水解酪蛋白 17.5,可溶性淀粉 1.5, pH(7.3±0.1)。

无机盐培养基(g·L⁻¹):(NH₄)₂SO₄ 1.50、K₂HPO₄·3H₂O 1.91、KH₂PO₄ 0.50、NaCl 0.50、MgSO₄·7H₂O 0.20,微量元素溶液 2 mL,自然 pH 值。其中微量元素溶液成分(g·L⁻¹):CoCl₂·6H₂O 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.425, ZnCl₂ 0.05, NiCl₂·6H₂O 0.01, CuSO₄·5H₂O 0.015, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01, Na₂SeO₄·2H₂O 0.01。

E2 降解培养基(MSM-E2 培养基):1000 mg·L⁻¹ 的 E2 丙酮溶液过 0.22 μm 滤膜除菌,取一定量置于灭菌三角瓶中,待丙酮完全挥发完后,加入灭菌的 MSM 培养基,使 E2 的最终浓度达到实验设计浓度。

1.3 试验方法

1.3.1 最小抑菌浓度

菌株对抗生素的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC):指在体外培养细菌 18~24 h 后能抑制培养基内细菌生长的最低药物浓度^[17]。根据美国临床和实验室标准协会(NCCLS)关于抗菌药物敏感性试验操作标准,采用 MH 肉汤稀释法测定菌株 JX-2 的最小抑菌浓度。取无菌小试管 12 支排于试管

架上,于第1管加入MH肉汤1.6 mL,第2~12管各加1.0 mL。于第1管中加入稀释好的 $1280\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗生素0.4 mL,混匀后取1.0 mL至第2管,第2管混匀后取1.0 mL至第3管,如此连续倍比稀释至第11管,并从第11管中吸取1.0 mL弃去,第12管为不含药物的生长对照。此时各管抗生素浓度依次为256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后将菌悬液浓度校正至0.5麦氏比浊标准,并在每管内加入校正好浓度的菌液各1.0 mL。第1管至第11管抗生素终浓度分别为128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.2 抗生素对菌株生物量及降解性能的影响

根据试验测得菌株JX-2的最小抑菌浓度,设置抗生素的浓度。分为两个浓度梯度:低浓度抗生素(浓度低于MIC),菌株生长不受抑制;高浓度抗生素(浓度高于MIC),菌株生长受到抑制。在E2含量为 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MSM-E2培养基中,分别加入相应浓度的低浓度抗生素和高浓度抗生素。再按5%(体积比)的接种量向20 mL培养基中加入菌悬液, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,同时设置时间梯度,分别在第1、3、5、7 d取样,测定培养基中残留E2浓度,并对细菌进行平板计数测定其生长。试验设置不加任何抗生素的对照(CK)。

1.3.3 混合抗生素对纯培养条件下菌株JX-2降解E2的影响

在E2含量为 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MSM-E2培养基中,加入混合抗生素,使混合抗生素中每一种抗生素的浓度均达到试验要求浓度,每种抗生素浓度设置4个梯度,分别为 10.0 、 $100.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 、 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。再按5%(体积比)的接种量向20 mL培养基中加入菌悬液, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养,同时设置时间梯度,分别在第1、3、5、7 d取样,测定培养基中残留E2浓度,计算E2降解率。试验设置不添加抗生素的对照(CK)。

1.3.4 混合抗生素对污水中菌株JX-2降解E2的影响

污水样品采自南京某污染湖泊生活污水排污口,实验前测定污水中E2含量。1 L污水中按照5%(体积比)接种JX-2菌悬液50 mL,另一组污水样品中添加等体积无菌水取代菌悬液。同时在污水中添加混合抗生素,使每一种抗生素的浓度分别为 10.0 、 $100.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 、 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养7 d后测定污水中E2浓度。试验设置不添加抗生素的对照(CK)。

1.4 培养液和污水中E2的分析方法

1.4.1 培养液中E2含量的测定

E2浓度测定采用定时整瓶提取培养基的方法^[18]。向培养液中加入等体积色谱纯甲醇,超声振荡30 min后过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,用高效液相色谱仪(High performance liquid chromatography, HPLC)测定E2浓度。HPLC(岛津LC-20AT)设定参数为:Inertsil ODS-SP-C18反相色谱柱($150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相为乙腈:水=70:30(V/V),流速 $1.00\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,紫外检测波长 280 nm ,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。通过加标回收试验测得此方法E2的加标回收率为95.84%,相对标准偏差RSD为1.91%($n=5$)。

1.4.2 污水中E2的分析方法

利用HPLC检测污水中E2含量参考付银杰等^[19]和李欣等^[20]文献。污水样品以约 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速通过已分别用5 mL甲醇和5 mL超纯水活化的C18固相萃取柱($200\text{ mg}/6\text{ mL}$)。5 mL超纯水淋洗柱体并抽吸3 min后,用15 mL甲醇洗脱,洗脱液收集至试管中。氮气吹干后,加入甲醇2 mL溶解,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,HPLC-荧光检测器(Fluorescence detection, FLD)分析。设定参数为:Inertsil ODS-SP-C18反相色谱柱($150\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),激发波长和发射波长分别为 280 nm 和 310 nm ,流动相为甲醇:乙腈:水=20:30:50(V/V),流速 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。通过加标回收试验测得此方法E2的加标回收率为88.34%~93.85%,RSD为1.97%~2.28%($n=5$),检出限为 $0.186\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.5 数据分析

所有图表中的数据均采用3次重复的平均值 $\pm$ 标准偏差来表示。采用SPSS 19.0统计分析软件在95%的置信区间下进行差异显著性分析。

$$\text{E2降解率}(\%) = \frac{\text{E2初始浓度} - \text{E2剩余浓度}}{\text{E2初始浓度}} \times 100\%$$

式中:E2剩余浓度指用HPLC测得培养基中经过菌株JX-2降解后的E2实际剩余浓度;E2初始浓度指用HPLC测得空白对照组的实际E2浓度。

$$\text{抑制率} I(\%) = \frac{C_0 - C_i}{C_0} \times 100\%$$

式中: C_0 指CK的E2降解率; C_i 指添加抗生素后E2降解率。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度(MIC)

菌株JX-2对青霉素和红霉素的MIC很低,其中

青霉素在试验的最低浓度 $0.125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时菌株也不可生长,红霉素浓度在 $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (含)以上时菌株不可生长;JX-2 对氯霉素、土霉素和磺胺嘧啶的耐药性相对较高;对于其他抗生素的耐药性介于两者之间。菌株 JX-2 对 12 种抗生素的 MIC 见表 1。

根据试验结果设置低浓度抗生素(<MIC):青霉素 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,四环素 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,红霉素 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,庆大霉素 $0.125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,链霉素 $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,氨苄青霉素 $0.125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,氯霉素 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,卡那霉素 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,土霉素 $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,羧苄青霉素 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,金霉素 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,磺胺嘧啶 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

高浓度抗生素(>MIC):青霉素 $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,四环素 $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,红霉素 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,庆大霉素 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,链霉素 $2.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,氨苄青霉素 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,氯霉素 $16.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,卡那霉素 $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,土霉素 $32.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,羧苄青霉素 $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,金霉素 $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,磺胺嘧啶 $16.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 抗生素对菌株 JX-2 生物量的影响

低浓度抗生素(<MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 时生物量的影响如图 1 所示。随着培养时间延长,CK 和添加低浓度抗生素的菌株生物量均增加。在低浓度抗生素的作用下,除 GM、TC、KM 和 CTC 外,7 d 时菌株 JX-2 的生长情况与 CK 差异不显著。这说明,大部分低浓度抗生素对菌株的生长没有显著影响,只有少部分低浓度抗生素(如 GM、TC、KM 和 CTC)对 JX-2 的生长有一定抑制作用,但抑制作用不强烈。

高浓度抗生素(>MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 时生物量的影响见图 2。与 CK 相比,高浓度的抗生素明显抑制菌株 JX-2 的生长。但从图 2 中可看出,即使是添加了浓度高于 MIC 值的抗生素,菌株 JX-2 的生长也并不是完全被抑制。随着培养时间延长,菌株 JX-2 的生物量从 $3.6\sim 4.0\text{ lgCFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 增长至 $5.0\sim 5.6\text{ lgCFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,增长较为明显。

2.3 抗生素对菌株 JX-2 降解 E2 的影响

低浓度抗生素(<MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 的影响如图 3 所示。培养 7 d 时,CK 处理的 E2 降解率高达 91.5%,表明在没有抗生素存在的条件下菌株 JX-2 的降解活性良好;当降解体系中加入低浓度抗生素后,培养 1 d 和 3 d 时低浓度抗生素导致菌株降解 E2 的降解率显著下降。这可能是因为菌株刚被接种到培养基中,对抗生素环境尚没有产生适应性。但 7 d 时,菌株已基本适应低浓度抗生素胁迫,其 E2 降解率相比于 1 d 和 3 d 时明显上升,达到 76%~89%。其中,低浓度 GM、CAR、AMP 和 OTC 作用下 JX-2 对 E2 的降解率与 CK 无显著性差异。

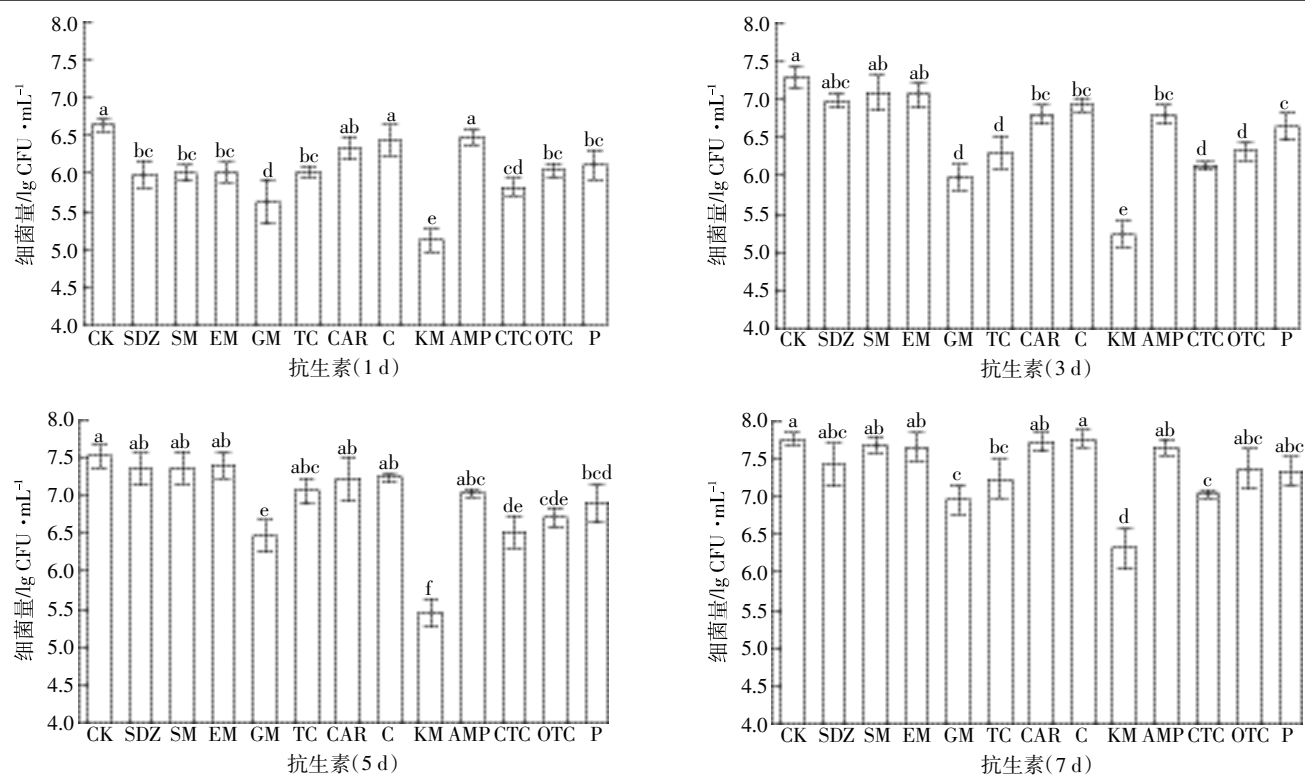
高浓度抗生素(>MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 的影响见图 4。在 1、3、5、7 d 内,高浓度抗生素均导致菌株对 E2 的降解率显著低于 CK,7 d 时 E2 的降解率仅为 20%~35%。随着降解时间延长,JX-2 对 E2 降解率从 1 d 时的不到 10%提高至 7 d 时的 20%~35%,说明菌株 JX-2 在高浓度抗生素环境中仍具有一定生长和降解能力,但其活性已受到了一定抑制。

根据图 3 和图 4 的结果计算了不同浓度抗生素

表 1 菌株 JX-2 对 12 种抗生素的最小抑菌浓度
Table 1 The minimum inhibitory concentration for strain JX-2 tested with 12 kinds of antibiotics

抗生素	抗生素浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$										
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TC	+	+	+	+	-*	-	-	-	-	-	-
EM	+	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GM	+	+	-*	-	-	-	-	-	-	-	-
SM	+	+	+	-*	-	-	-	-	-	-	-
AMP	+	+	-*	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	-*	-	-	-	-
KM	+	+	+	+	-*	-	-	-	-	-	-
OTC	+	+	+	+	+	+	+	-*	-	-	-
CAR	+	+	+	+	-*	-	-	-	-	-	-
CTC	+	+	+	+	-*	-	-	-	-	-	-
SDZ	+	+	+	+	+	+	-*	-	-	-	-

注: +表示菌株可生长, -表示菌株不可生长, * 表示菌株对该抗生素的最小抑菌浓度。



相同小写字母表示各处理间差异不显著($P>0.05$),下同

图1 低浓度抗生素(<MIC)对菌株 JX-2 生物量的影响

Figure 1 Effects antibiotics at low concentrations on the cell growth of strain JX-2

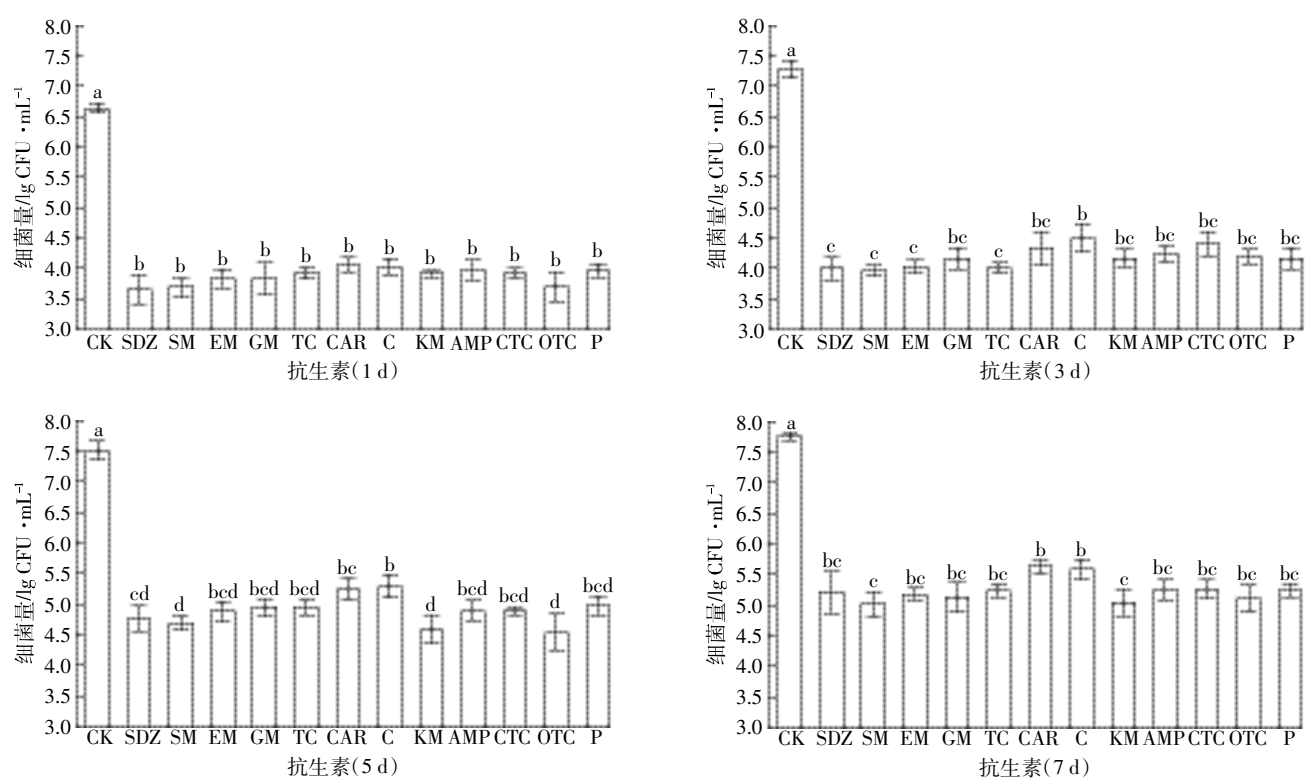


图2 高浓度抗生素(>MIC)对菌株 JX-2 生物量的影响

Figure 2 Effects antibiotics at high concentrations on the cell growth of strain JX-2

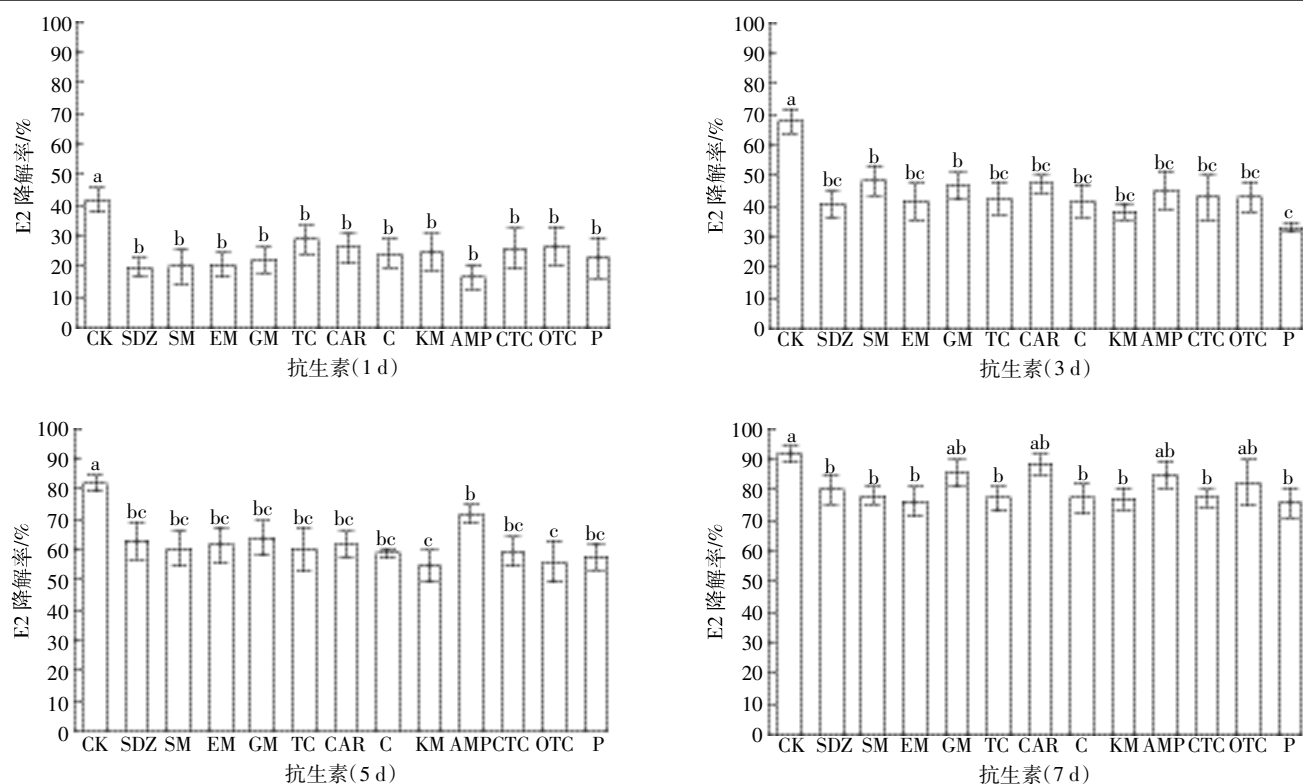


图 3 低浓度抗生素(<MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 的影响

Figure 3 Effects of antibiotics at low concentrations on E2 degradation by strain JX-2

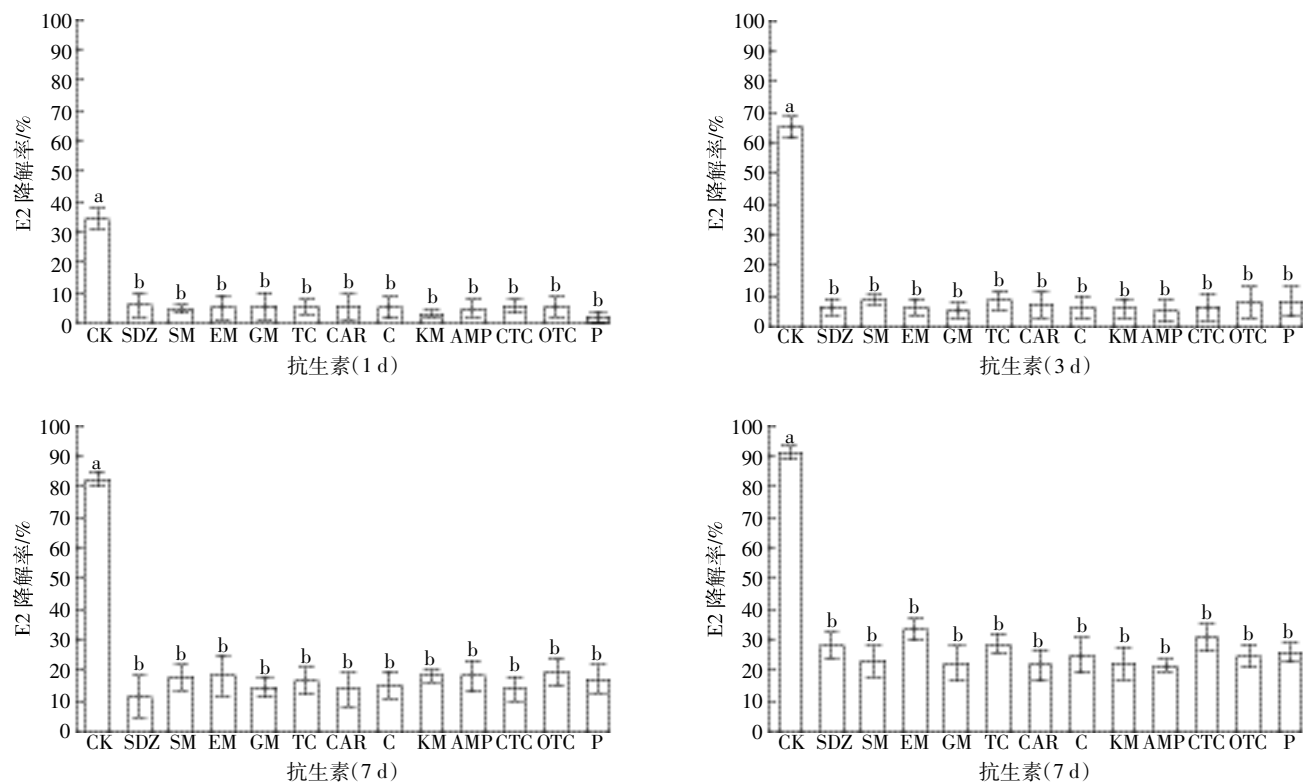


图 4 高浓度抗生素(>MIC)对菌株 JX-2 降解 E2 的影响

Figure 4 Effects of antibiotics at high concentrations on E2 degradation by strain JX-2

对菌株 JX-2 降解 E2 的抑制率(表 2)。随着降解时间延长,低浓度抗生素对 JX-2 降解 E2 的抑制作用减弱,其抑制率由 1 d 时的 31.10%~60.13%下降至 7 d 时的 3.37%~16.96%。当环境抗生素浓度低于 MIC 值时,菌株 JX-2 对 E2 的降解作用基本不受影响,其 7 d 降解率可达 76%以上,抑制率 17%以下。而高浓度抗生素对 JX-2 降解 E2 的抑制作用减弱不明显,其抑制率由 1 d 时的 82.25%~93.88%下降至 7 d 时的 63.55%~76.37%。当环境抗生素浓度高于 MIC 值时,菌株 JX-2 对 E2 的降解能力受到一定程度的抑制。但是在高浓度抗生素作用下,菌株 JX-2 对 E2 仍具有 20%~35%的降解率,再结合图 2 高浓度抗生素对菌株 JX-2 降解 E2 生物量的影响,可说明此时菌株 JX-2 并没有被完全杀死。这是因为当抗生素浓度高于 MIC 值后,在短时间内对受试菌的生长产生了抑制,但并不是完全杀死受试菌;只有当抗生素浓度大于等于最小杀菌浓度 (Minimum bactericidal concentration, MBC)时,才能杀死 99.9%以上的受试菌。

2.4 混合抗生素对纯培养条件下菌株 JX-2 降解 E2 的影响

进一步研究了 12 种抗生素的混合体系对菌株 JX-2 降解 E2 的影响(图 5)。当各抗生素浓度为 10.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,混合抗生素对菌株 JX-2 的降解并无影响,7 d 时 E2 降解率均可达到 90%以上,与 CK 处理的降解率无显著差异;但当抗生素浓度增大到 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,混合抗生素明显抑制了 JX-2 对 E2 的降解,7 d 时 E2 降解率仅 48.2%。从时间梯度看,随着培养时间延长,4 个抗生素浓度下菌株对 E2 的降解率均增大。这说明该浓度的混合抗生素没有完全抑制菌株 JX-2 的活性。

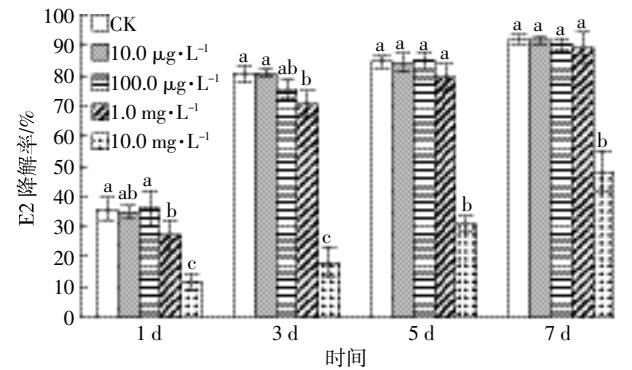
2.5 混合抗生素对污水中菌株 JX-2 降解 E2 的影响

污水样品中的抗生素环境本底值与人为添加量相比非常低^[20],且试验设置了 CK 作为对照,因此可忽略污水中原有的抗生素含量。图 6 为 7 d 时不同浓度混合抗生素对污水中菌株 JX-2 降解 E2 的影响。用 HPLC-FLD 测得污水样品中 E2 的平均含量为 78.26 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在不同浓度抗生素作用下,即使不接种菌株

表 2 不同浓度抗生素对菌株 JX-2 降解 E2 的抑制率

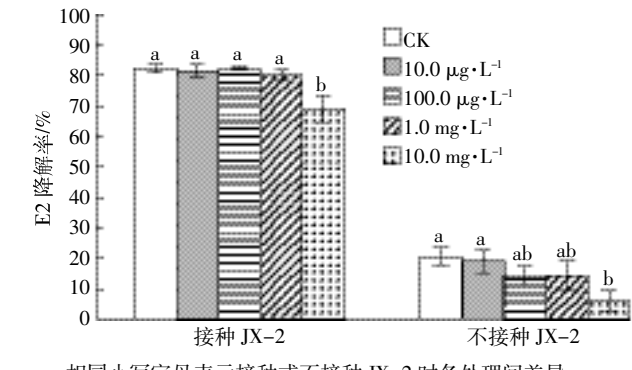
Table 2 Inhibition rate of antibiotics at different concentrations on E2 degradation by strain JX-2

抗生素浓度	时间/d	抑制率/%											
		SDZ	SM	EM	GM	TC	CAR	C	KM	AMP	CTC	OTC	P
低浓度	1	52.41	51.89	50.81	46.83	31.10	37.34	41.83	40.63	60.13	37.98	35.73	45.22
	3	39.87	28.74	38.49	31.13	37.19	30.11	38.35	43.45	33.24	36.61	36.55	51.09
	5	23.38	26.28	25.09	22.11	26.60	24.70	28.16	33.51	12.62	27.40	31.63	29.56
	7	12.45	14.35	16.54	6.25	15.58	3.37	15.60	15.72	7.02	15.52	10.06	16.96
高浓度	1	82.25	86.62	85.06	83.78	84.16	84.26	84.78	91.08	85.73	83.07	84.23	93.88
	3	90.08	86.46	89.89	91.83	86.69	88.76	90.27	90.95	92.26	89.94	87.64	87.38
	5	86.07	78.47	77.69	82.26	79.79	83.21	81.50	77.85	77.85	82.99	76.27	79.05
	7	69.23	74.71	63.55	75.55	68.50	76.11	72.63	75.44	76.37	66.43	72.93	71.83



相同小写字母表示在相同处理天数内各处理间差异不显著($P>0.05$)

图 5 混合抗生素对纯培养条件下菌株 JX-2 降解 E2 的影响
Figure 5 Effect of mixed antibiotics on E2 degradation in aqueous solution by strain JX-2



相同小写字母表示接种或不接种 JX-2 时各处理间差异不显著($P>0.05$)

图 6 混合抗生素对污水中菌株 JX-2 降解 E2 的影响
Figure 6 Effect of mixed antibiotics on E2 degradation in sewage by strain JX-2

JX-2, 其E2含量仍有所下降, 但降解率只有6.2%~19.1%。接种菌株JX-2后, 当抗生素浓度为10.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株JX-2对污水中E2具有良好的降解效果, 降解率均达80%以上, 与CK降解率无显著性差异, 远高于不接种JX-2处理的降解率。而当抗生素浓度为10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株JX-2对E2的降解率略有下降, 为68.9%, 但仍明显高于不接种JX-2处理的降解率。

3 讨论

利用降解菌高效降解雌激素已在实验室纯培养条件下取得初步成功, 但环境中抗生素往往与雌激素共存, 抗生素的影响是制约降解菌降解效率的一个关键因素, 而目前关于抗生素对降解菌降解雌激素影响的研究报道还很少。水体中抗生素实际浓度一般为痕量残留^[7]。本文结果表明, 环境中实际浓度水平下抗生素对降解菌JX-2的降解率没有显著影响, 菌株JX-2在抗生素作用下仍能发挥高效降解性能。这为应用菌株JX-2时如何规避抗生素风险、并高效去除环境中E2的实际应用提供了基础依据。

添加了高浓度抗生素后, 菌株的生长和降解受到一定抑制。但随着培养时间的延长, 菌株生物量和降解率都有所增加, 这说明培养基中的抗生素对菌株的抑制作用在减弱, 可能是因为抗生素在各类环境介质中会自然降解, 但其降解机理与降解速率随抗生素的种类及环境条件的不同而有所差异。大环内酯类、内酰胺类和磺胺类抗生素易溶于水并水解^[23], 四环素类抗生素易光解^[23], 部分抗生素如喹乙醇、甲硝唑、泰乐菌素和土霉素在水体中也会被生物降解^[24]。在摇床培养过程中, 随着抗生素浓度的自然衰减, 其药性将会有一定程度的减弱。培养7 d时, 不同浓度的抗生素对菌株JX-2的抑制强度相对于1、3、5 d同比降低, 这与抗生素自身的缓慢降解以及菌株JX-2对抗生素胁迫产生一定的适应性有关。

抗生素能否影响菌株JX-2在环境介质中的高效降解性能, 取决于抗生素在环境中的实际浓度与对应MIC值的大小关系。本实验设计的抗生素浓度系列包含了环境中抗生素的实际浓度, 同时设置了高浓度组作为对照。叶计朋等^[25]分析了珠江流域水体中典型抗生素的环境含量, 指出珠江广州河段(枯季)和深圳河抗生素污染严重, 最高含量可达1.34 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Zhang等^[21]研究发现, 在抗生素污染严重的珠江流域中, 浓度最高的抗生素是阿莫西林, 达到3384 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

大量文献数据显示^[21, 26-29], 不同抗生素在不同环境介质中的浓度不同: 水体残留浓度为 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 级到 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 级; 土壤残留浓度一般为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级; 粪便农用的土壤可达到 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级。抗生素种类、用量和环境条件等都会影响环境介质中抗生素的残留量。一般来说, 环境介质中的残留抗生素浓度小于菌株JX-2对各抗生素的MIC值。理论上, 环境中的抗生素不会完全抑制菌株JX-2对E2的降解活性。

将含有E2的生活污水作为培养基, 并添加一定浓度的混合抗生素, 模拟自然条件下的降解环境, 揭示不同浓度抗生素对E2降解菌降解性能的影响, 这在已有文献中还鲜见报道。Xuan等^[30]证明了在粉砂壤土中微生物直接参与降解E2, 并研究了抗生素在粉砂壤土中对E2降解动力学的影响, 发现在浓度为40 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的磺胺二甲氧嘧啶共存下, E2降解速率常数从0.750 d^{-1} 下降到0.492 d^{-1} 。本研究结果表明, 抗生素对环境中E2降解菌的降解活性产生了明显的抑制作用, 而菌株JX-2在混合抗生素浓度高达10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的污水中对E2的降解率仍有68.9%, 具有较强的抗抗生素胁迫能力。在混合抗生素对污水中菌株降解E2的影响结果中, 不接种菌株JX-2时E2降解率为6.2%~19.1%, 这是因为环境中E2可自然降解或被生物降解, 但降解效率不高。研究表明, 环境中的E2可在生物或非生物作用下转化为E1, 其在淡水沉积物中的半衰期为5~10 $\text{d}^{[31]}$, 在20 $^{\circ}\text{C}$ 河水中半衰期可达9 $\text{d}^{[32]}$ 。在添加了不同浓度的抗生素后, 随着抗生素浓度的提高, 不接种菌株JX-2的污水中E2降解率逐渐下降。这可能是因为抗生素抑制了污水中土著微生物的降解活性, 降低了E2降解率。而接种了降解菌JX-2, 即使添加高于环境浓度100~1000倍的混合抗生素, 菌株JX-2仍具有良好的降解性能, 降解率均能达到80%以上。这说明菌株JX-2在环境中的正常生理功能不易受到各类抗生素的抑制, 其有望直接应用于我国各类环境介质中E2的去除, 具有应用前景。

4 结论

(1) 菌株JX-2对青霉素和红霉素的MIC很低, 对氯霉素、土霉素和磺胺嘧啶的耐药性相对较高, 对其他抗生素的耐药性介于两者之间。

(2) 低浓度抗生素(<MIC)对菌株JX-2的生长和降解性能影响不大; 而高浓度抗生素(>MIC)则会明显抑制菌株生长并降低其对E2的降解性能。随着降

解时间延长,低浓度抗生素对菌株 JX-2 降解 E2 的抑制作用减弱。

(3) 当各抗生素浓度为 10.0 、 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,混合抗生素对菌株 JX-2 的降解并无影响,而当各抗生素浓度增大到 $10.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,混合抗生素抑制了菌株 JX-2 对 E2 的降解,7 d 时 E2 降解率仅为 48.2%。

(4) 当各抗生素浓度为 10.0 、 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株 JX-2 对污水中 E2 具有良好的降解效果(降解率 $>80\%$)。而当各抗生素浓度为 $10.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菌株 JX-2 对 E2 的降解率下降(为 68.9%)。

参考文献:

- [1] Lorenz S. EU shifts endocrine disrupter research into overdrive[J]. *Science*, 2003, 300(5622): 1069.
- [2] Kurisu F, Ogura M, Saitoh S, et al. Degradation of natural estrogen and identification of the metabolites produced by soil isolates of *Rhodococcus* sp. and *Sphingomonas* sp.[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(6): 576–582.
- [3] Yu C P, Roh H, Chu K H. 17β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(2): 486–492.
- [4] 史江红, 韩蕊, 宿凌燕, 等. 某污水处理厂中 17α -乙炔基雌二醇降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(12): 2414–2419.
- SHI Jiang-hong, HAN Rui, SU Ling-yan, et al. Isolation and identification of a 17α -ethynylestradiol-degrading strain from a wastewater treatment plant and its degradation characteristics[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(12): 2414–2419.
- [5] 杨俊, 姜理英, 陈建孟. 1 株 17β -雌二醇高效降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. *环境科学*, 2010, 31(5): 1313–1319.
- YANG Jun, JIANG Li-ying, CHEN Jian-meng. Isolation, identification of 17β -estradiol (E2)-degrading strain and its degradation characteristics[J]. *Environmental Science*, 2010, 31(5): 1313–1319.
- [6] Campagnolo E R, Johnson K R, Karpati A, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 299(1): 89–95.
- [7] 俞慎, 王敏, 洪有为. 环境介质中的抗生素及其微生物生态效应[J]. *生态学报*, 2011, 31(15): 4437–4446.
- YU Shen, WANG Min, HONG You-wei. Antibiotics in environmental matrices and their effects on microbial ecosystems[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(15): 4437–4446.
- [8] Haller M Y, Müller S R, McArdell C S, et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 952(1): 111–120.
- [9] Thiele-Bruhn S, Beck I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(4): 457–465.
- [10] Hammesfahr U, Heuer H, Mancke B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(7): 1583–1591.
- [11] Schauss K, Focks A, Leininger S, et al. Dynamics and functional relevance of ammonia-oxidizing archaea in two agricultural soils[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(2): 446–456.
- [12] Sara B, Carmen A, Javier P, et al. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS. 3) and influence of manure co-addition[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 122(3): 233–241.
- [13] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(23): 7445–7450.
- [14] Arias C A, Murray B E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century: A clinical super-challenge[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(5): 439–443.
- [15] Chun S, Lee J, Geyer R, et al. Effect of agricultural antibiotics on the persistence and transformation of 17β -estradiol in a Sequatchie loam [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2005, 40(5): 741–751.
- [16] 张方方, 秦丹, 高良敏, 等. 环境中雌激素的微生物降解[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 711–721.
- ZHANG Fang-fang, QIN Dan, GAO Liang-min, et al. Microbial degradation of estrogens in the environment[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 711–721.
- [17] Pridmore A, Burch D, Lees P. Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of tiamulin against field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 151(3): 409–412.
- [18] Gao Y, Li Q, Ling W, et al. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185(2): 703–709.
- [19] 付银杰, 高彦征, 董长勋, 等. SPE-HPLC/FLD 法同时测定水中 4 种雌激素[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(11): 2296–2303.
- FU Yin-jie, GAO Yan-zheng, DONG Chang-xun, et al. SPE-HPLC/FLD method for the determination of four estrogens in water samples[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(11): 2296–2303.
- [20] 李欣, 凌婉婷, 刘静娴, 等. 固定化菌剂对污水和牛粪中雌二醇和己烯雌酚的去除作用[J]. *环境科学*, 2015, 36(7): 2581–2590.
- LI Xin, LING Wan-ting, LIU Jing-xian, et al. Immobilization of estrogen-degrading bacteria to remove the 17β -estradiol and diethylstilbestrol from polluted water and cow dung[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(7): 2581–2590.
- [21] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(11): 6772–6782.
- [22] Combalbert S, Hernandez-Raquet G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1671–1692.

- [23] Lunestad B T, Samuelsen O B, Fjelde S, et al. Photostability of eight antibacterial agents in seawater[J]. *Aquaculture*, 1995, 134(3):217-225.
- [24] Ingerslev F, Toräng L, Loke M L, et al. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems[J]. *Chemosphere*, 2001, 44(4):865-872.
- [25] 叶计朋, 邹世春, 张 干, 等. 典型抗生素类药物在珠江三角洲水体中的污染特征[J]. *生态环境*, 2007, 16(2):384-388.
YE Ji-peng, ZOU Shi-chun, ZHANG Gan, et al. Characteristics of selected antibiotics in the aquatic environment of the Pearl River Delta, South China[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(2):384-388.
- [26] Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, et al. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092(2):206-215.
- [27] Tang C M, Huang Q X, Yi-Yi Y U, et al. Multiresidue determination of sulfonamides, macrolides, trimethoprim, and chloramphenicol in sewage sludge and sediment using ultrasonic extraction coupled with solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(8):1119-1124.
- [28] Arkan O A, Rice C, Codling E. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed[J]. *Desalination*, 2008, 226(1):121-133.
- [29] Watkinson A J, Murby E J, Kolpin D W, et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(8):2711-2723.
- [30] Xuan R, Blassengale A A, Wang Q. Degradation of estrogenic hormones in a silt loam soil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(19):9152-9158.
- [31] Lee L S, Strock T J, Sarmah A K, et al. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(18):4098-4105.
- [32] Zheng W, Yates S R, Bradford S A. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(2):530-535.