

· 环境生物技术 ·

# 一株新型莫能菌素高效降解菌的分离鉴定及其降解性能解析

李豪<sup>1,2,3</sup>, 王传文<sup>3</sup>, 王孟冬<sup>3</sup>, 张然<sup>1,2</sup>, 张振东<sup>1,2</sup>, 桂仲争<sup>1,2</sup>, 潘保良<sup>3</sup>

1 江苏科技大学 生物技术学院, 江苏 镇江 212100

2 中国农业科学院 蚕业研究所, 江苏 镇江 212100

3 中国农业大学 动物医学院, 北京 100193

李豪, 王传文, 王孟冬, 张然, 张振东, 桂仲争, 潘保良. 一株新型莫能菌素高效降解菌的分离鉴定及其降解性能解析. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2618-2627.

LI H, WANG CW, WANG MD, ZHANG R, ZHANG ZD, GUI ZZ, PAN BL. Isolation, identification and biodegradation characterization of a novel monensin-degrading bacterial strain. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2618-2627.

**摘要:** 利用微生物对抗生素类污染物进行生物降解是目前的研究热点之一。寻找能高效降解抗生素的微生物是该类研究的重要前提。本研究以莫能菌素为唯一碳源, 从莫能菌素污染的鸡粪中分离出一株能高效降解莫能菌素的菌株 DM-1。根据菌落形态学特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因系统发育分析, 对该菌株进行种属鉴定; 利用柱后衍生化法的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测 DM-1 对莫能菌素的降解效率; 并对 DM-1 的降解条件进行了优化。结果表明, 筛选到的莫能菌素降解菌 DM-1 为不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的细菌, 命名为鲍曼不动杆菌 DM-1 (*Acinetobacter baumannii* DM-1); 该菌株在 10 mg/L 莫能菌素的无机盐液体培养基中, 避光培养 28 d 后, 莫能菌素的降解率为 87.51%, 对照组仅为 8.57%; 菌株 DM-1 对莫能菌素降解的最优条件为: pH 7.0、温度 30 °C, 最适初始添加莫能菌素浓度为 50 mg/L; 本研究表明菌株 DM-1 在莫能菌素污染环境的生物修复方面具有良好的应用前景。

**关键词:** 莫能菌素; 生物降解; 分离鉴定; 鲍曼不动杆菌

Received: March 1, 2022; Accepted: April 26, 2022; Published online: April 29, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0501206, 2018YFD0502305)

Corresponding author: PAN Baoliang. E-mail: baoliang@cau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0501206, 2018YFD0502305)

# Isolation, identification and biodegradation characterization of a novel monensin-degrading bacterial strain

LI Hao<sup>1,2,3</sup>, WANG Chuanwen<sup>3</sup>, WANG Mengdong<sup>3</sup>, ZHANG Ran<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhendong<sup>1,2</sup>, GUI Zhongzheng<sup>1,2</sup>, PAN Baoliang<sup>3</sup>

1 School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212100, Jiangsu, China

2 Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212100, Jiangsu, China

3 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Biodegradation of antibiotic pollutants by microorganisms has received widespread attention, to which the identification of microorganisms capable of efficiently degrading antibiotics is a key. In this study, a strain DM-1 with high degradation capability was successfully isolated from monensin-contaminated chicken manure by using monensin as the sole carbon source. The strain was further identified basing on morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence-based phylogenetic analysis. The degradation efficiency of DM-1 for monensin was determined by HPLC post-column derivatization, and then the degradation conditions of DM-1 were optimized. DM-1 was identified as a strain of *Acinetobacter* and named as *Acinetobacter baumannii* DM-1. The optimal conditions for monensin degradation by strain DM-1 were pH 7.0, 30 °C, and initial monensin concentration of 50 mg/L. The strain DM-1 degraded more than 87.51% of monensin at an initial concentration of 10 mg/L in 28 days, while only a slight decrease in monensin concentration was observed in the control without monensin-degrading strain. This study indicates that the strain DM-1 has a promising application prospect in the bioremediation of monensin-contaminated environment.

**Keywords:** monensin; biodegradation; isolation and identification; *Acinetobacter baumannii*

莫能菌素 (monensin, MON) 是一种聚醚离子载体类抗生素<sup>[1-2]</sup>, 拥有卓越的抗球虫效果, 具有抗虫谱广、作用方式独特、耐药性形成缓慢等特点, 是畜禽球虫病防治中最重要的防治药物, 其销量占现今抗球虫药市场的 80%<sup>[3]</sup>, 也是肉鸡球虫病防控实践中应用最广泛的抗球虫药物。此外, 莫能菌素还可以显著改善反刍动物营养物质利用率, 提高能量水平, 被广泛用作促生长饲料添加剂<sup>[4]</sup>。然而, 莫能菌素被动物摄食后, 吸收、代谢差, 80%左右的药物以原药的形式随畜禽粪便排出体外, 造成严重的环境污染<sup>[1]</sup>。由于莫能菌素水溶性较差、化

学性质比较稳定, 在环境中可长期存在<sup>[5]</sup>。大量研究表明, 家禽饲养场所周围的土壤和水体以及相关的垫料中都存在大量的莫能菌素污染<sup>[6-9]</sup>; 在无人为干预的情况下, 农场家禽垫料中的聚醚类抗生素 (包括莫能菌素) 可残留 3 年以上, 其中莫能菌素 3 年后的残留浓度甚至高达 (97.8±3.2) μg/kg<sup>[10]</sup>。此外, 环境中残留的莫能菌素对土壤生物、水生生物、哺乳动物和人都会产生比较严重的毒害作用<sup>[11-13]</sup>, 对人类的健康构成威胁。因此, 莫能菌素污染环境的修复是一个亟待解决的问题。

环境中污染的抗生素类药物可以通过非生

物降解和生物降解进行处理和修复。常见的非生物降解途径主要包括光化学降解和水解等。莫能菌素由于缺少与环境相关的吸收波长,因此很难进行光化学降解,但其在酸性环境下容易水解<sup>[4]</sup>。然而,用酸降解莫能菌素存在二次污染等缺点<sup>[5]</sup>,难以大规模推广应用。生物降解是聚醚类抗生素在环境中最重要的降解途径之一<sup>[14]</sup>。自然环境中存在大量可以降解聚醚类抗生素的微生物,这些微生物能将结构复杂的聚醚类抗生素降解转化为自身生长繁殖过程中所需的化合物或者无害的小分子化合物<sup>[14]</sup>。此外,生物降解还具有生态兼容性好、成本低、使用方便、无二次污染等优点,对莫能菌素等聚醚类抗生素引起的环境污染修复更有实际应用价值<sup>[15]</sup>。生物降解法修复抗生素污染环境的关键是筛选分离高效的降解菌株,然而,关于莫能菌素高效降解菌株的研究相对较少。目前,国内外仅有一株莫能菌素降解菌于1990年被从土壤中分离出来,鉴定为日食古菌(*Sebekia benihana*)菌株<sup>[16]</sup>。因此,本研究以莫能菌素为靶标物,从莫能菌素污染的鸡粪中筛选出一株能够高效降解莫能菌素的菌株,并对其降解性能进行了系统研究,以期莫能菌素污染环境的生物修复提供可靠的微生物材料和理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 培养基

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母浸出粉 5.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L, pH 7.0。基础无机盐液体培养基(mineral salt medium, MSM): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L, NaCl 0.5 g/L, pH 7.5。唯一碳源培养基:向锥形瓶中加入 1 mL

不同浓度莫能菌素丙酮溶液(0.22  $\mu\text{m}$  有机滤器过滤除菌),待丙酮充分挥发后,加入 MSM 液体培养基,充分混匀后备用。

所有培养基按上述配方和方法配制,之后分装于 500 mL 锥形瓶,在 121  $^\circ\text{C}$  下高压灭菌 30 min。LB 固体培养基和 MSM 固体培养基按液体培养基的配方配制,高压灭菌前加 1.5% (W/V) 琼脂,灭菌后取出,倒入 90 mm 一次性无菌培养皿中,培养基凝固后倒置平板备用。

#### 1.1.2 药品及试剂

纯度为 97.7% 的莫能菌素钠标准品(Dr. Ehrenstorfer 公司);纯度为 91.2% 的莫能菌素原料药(山东齐鲁制药有限公司);细菌微量生化鉴定管(北京陆桥生物技术有限责任公司);色谱级甲醇和乙腈(默克公司);分析级丙酮、吐温 20、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、氯化钠、浓硫酸和香草醛(国药集团化学试剂有限公司)。

#### 1.1.3 仪器设备

Waters e2695 分离系统、2489 紫外检测器和柱后衍生系统(沃特世股份有限公司);DGG-9429 型电热鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);摇床(北方同正生物技术发展有限公司);UV-5200 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司);ME204 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);生化培养箱(宁波江南仪器制造厂);pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);OLYMPUS 光学显微镜(奥林巴斯有限公司)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 莫能菌素降解菌的富集分离

称取莫能菌素污染鸡粪样品 5 g 置于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 含 20 mg/L 莫能菌素为唯一碳源的 MSM 液体培养基中,于 30  $^\circ\text{C}$ 、

150 r/min 振荡培养 7 d, 之后取 4 mL 培养液转接至 100 mL 含 40 mg/L 莫能菌素的 MSM 液体培养基中, 再按上述培养条件培养 7 d, 按照上述步骤再连续转接培养 2 次, 并逐次提高培养基中莫能菌素的浓度至 80 mg/L 和 160 mg/L。完成 4 次富集驯化后, 取最后一次 160 mg/L 莫能菌素驯化培养的菌悬液进行梯度稀释, 并分别转接涂布至含 40 mg/L 莫能菌素的 MSM 固体培养基上, 于 30 °C 培养 48 h, 然后挑取形状、大小和颜色不同的单菌落, 划线转接于含 40 mg/L 莫能菌素的 LB 固体培养基上, 30 °C 培养 48 h 后再分别挑选出菌落形态规则、生长速度较快的菌株, 进行传代、涂布, 直至 LB 培养基上的菌落形态完全一致为止。最后将纯化后的菌株进行编号, 用 20% 甘油冻存于 -80 °C, 备用。

### 1.2.2 形态观察和生理生化实验

菌体形态学观察、生理生化试验及生长特性测定参照 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 进行。

### 1.2.3 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析

采用细菌基因组 DNA Mini 试剂盒 (Sangon, 上海) 提取莫能菌素降解菌 DM-1 基因组 DNA。降解菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司进行测序, 得到的降解菌 16S rRNA 基因序列, 上传至 GenBank, 编号为 MH447170。使用 BLAST 搜索功能将测序结果与 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对, 采用 MEGA 5.0 软件, neighbor-joining 法进行多序列比对分析并构建系统发育树。

### 1.2.4 降解菌降解能力的测定

将冻存备用的莫能菌素高效降解菌株

DM-1, 转接至 5 mL 无菌 LB 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 过夜复苏, 之后取 1 mL 复苏菌液加入到 99 mL 无菌 LB 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 振荡培养至细菌对数生长期, 然后, 4 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀, 用 20 mL 无菌无机盐液体培养基洗涤菌体 2 次, 之后用 10 mL 无菌无机盐液体培养基重新涡旋菌体, 制成菌悬液, 并通过微调将菌悬液配制成  $OD_{600}$  为 1.5 的预接种液。

将 97 mL 含有 10  $\mu$ g/mL 莫能菌素的无机盐液体培养基置于摇床中振摇 2 h (避光, 30 °C、150 r/min), 之后将 3 mL 上述预接种液加入实验组, 对照组接入同体积无菌无机盐液体培养基作空白对照。避光 30 °C, 150 r/min 振荡培养 28 d, 分别在 0、3、7、14、21、28 d 取样。采用 HPLC 法 (方法见 1.2.8) 测定样品中莫能菌素的含量, 计算各降解体系莫能菌素的浓度和降解率, 同时监测降解菌  $OD_{600}$  值的变化。试验重复 3 次。

$$\text{降解率}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

式中,  $C_0$  为 0 d 样品中莫能菌素的浓度;  $C$  为不同时间点样品中莫能菌素的浓度。

### 1.2.5 温度对降解菌生长及降解性能的影响

温度对降解菌生长及降解性能影响试验于 100 mL 含 10 mg/L 莫能菌素的无机盐液体培养基 (含 0.1% 吐温 20) 中进行。培养基 pH 为 7.0,  $OD_{600}$  为 1.5 的预接种菌液按 3% (V/V) 比例添加, 分别在 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C 恒温摇床中, 避光振荡培养 (150 r/min), 72 h 后取样测定降解菌  $OD_{600}$  值和莫能菌素的降解率。每个温度条件设置 3 个重复。

### 1.2.6 pH 对降解菌生长及降解性能影响

用酸碱 pH 标准校正液将无机盐液体培养基的初始 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0

和 9.0, 121 °C, 30 min 高压灭菌后备用。pH 对降解菌生长及降解性能影响试验于 100 mL 含 10 mg/L 莫能菌素的无机盐培养基 (含 0.1% 吐温 20) 中进行。 $OD_{600}$  为 1.5 的预接种菌液按 3% (V/V) 比例添加, 30 °C、150 r/min 振荡培养 72 h 后, 取样测定降解菌  $OD_{600}$  值和莫能菌素的降解率。每个 pH 条件设置 3 个重复。

### 1.2.7 初始添加浓度对降解菌生长及降解性能的影响

将  $OD_{600}$  为 1.5 的预接种菌液按 3% (V/V) 的比例接种于莫能菌素初始浓度分别 5、10、25、50 和 100 mg/L 无机盐液体培养基 (含 0.1% 吐温 20) 中, 培养基 pH 为 7.0, 于 30 °C、150 r/min 振荡培养 72 h。每隔 12 h 取样一次, 测定不同时间点莫能菌素的浓度。

### 1.2.8 莫能菌素高效液相色谱 (HPLC) 检测方法的建立

色谱条件: Waters C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 硅胶粒径 5 μm); Waters 柱后衍生器; 检测波长 520 nm; 柱温 25 °C; 流动相配比, 甲醇-水-冰乙酸 (90:10:0.1, V/V); 流速 0.7 mL/min; 进样量 20 μL; 柱后衍生泵流速 0.7 mL/min; 衍生装置反应温度 98 °C; 衍生试剂配比, 香草醛: 甲醇: 硫酸=15 g: 475 mL: 10 mL。

标准储备液制备: 精密称取纯度为 97.7% 的莫能菌素钠标准品 1.02354 g, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 加入色谱级甲醇充分溶解并定容至刻度线, 再次混匀, 即得 1 000 μg/mL 莫能菌素钠标准储备液。储备液冻存于-20 °C 冰箱备用, 用前恢复至室温。

标准工作液制备: 精密吸取莫能菌素钠标准储备液, 置于 10 mL 棕色容量瓶中, 加入色谱级甲醇稀释至刻度线, 倍比稀释配制系列浓度的标准工作液: 100、50、20、10、5、1、0.1 μg/mL, 储存于 4 °C 冰箱备用, 用前恢复至

室温。

香草醛衍生液配制: 量取 20 mL 浓硫酸, 缓慢加入 950 mL 色谱级甲醇中, 置于冰水浴中, 缓慢加入 30 g 香草醛, 混匀, 脱气后避光保存, 每次使用前现配。

莫能菌素标准曲线的绘制: 将标准工作液取出, 恢复至室温, 用 1 mL 一次性注射器取适量, 过 0.22 μm 有机滤膜于 HPLC 进样小瓶中, 进行 HPLC 测定。以药物浓度 (C) 为横坐标, HPLC 检测的吸收峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线。

MSM 液体培养基中莫能菌素的提取净化: 从-20 °C 冰箱取出冻存的无机盐样品, 待其恢复室温后, 吸取 0.5 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 2 mL 乙腈提取, 振荡混匀 1 min, 超声 10 min, 然后 10 000 r/min 离心 8 min, 移取上清液, 向沉淀物中再加入 2 mL 乙腈, 重复提取 1 次, 合并 2 次离心后的上清液于 15 mL 离心管中备用。用氮气吹干仪将上清液吹干, 并迅速用甲醇定容至 1.0 mL, 用 0.22 μm 有机滤膜过滤, HPLC 上机检测。

### 1.3 数据处理

使用 SPSS 软件进行数据的统计分析与计算, 并使用 ANOVA 进行多重比较, Student's *t* test 检验差异显著性, GraphPad Prism 8.0 画图。

## 2 结果与分析

### 2.1 莫能菌素降解菌株的分离、形态特征及生理生化特性

经富集、分离纯化后得到 1 株能够高效降解莫能菌素的菌株, 命名为 DM-1。菌株 DM-1 在 LB 固体培养基上的菌落呈中等大小、圆形、灰白色、光滑的菌落形态 (图 1A)。革兰氏染色结果如图 1B 所示, 由图可知该菌株为红色

杆菌,革兰氏阴性菌。生理生化鉴定结果(表1)显示,葡萄糖、蔗糖和木糖阳性,硫化氢、硝酸盐还原、甘露醇、纤维二糖和麦芽糖均为阴性。

## 2.2 降解菌 DM-1 系统发育地位的鉴定

通过对莫能菌素降解菌 DM-1 的 16S rRNA 基因序列的比对分析发现,菌株 DM-1 与鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、琼氏不动杆菌 (*Acinetobacter junii*) 和拜氏不动杆菌 (*Acinetobacter beijerinckii*) 等多株不动杆菌一致性在 95% 以上,可以推测菌株 DM-1 为不动

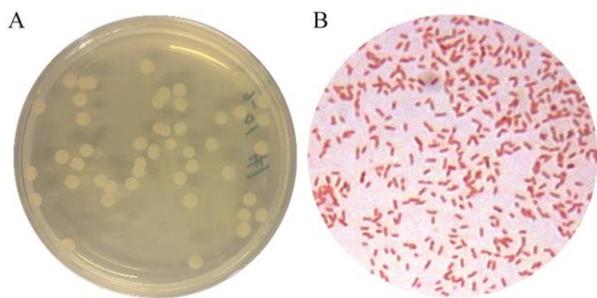


图1 降解菌 DM-1 的菌落形态 (A) 及革兰氏染色光学显微图 (B, 10×100)

Figure 1 Morphological characteristics of DM-1 colony (A) and microstructure of DM-1 after crystal violet staining (B, 10×100).

表1 降解菌 DM-1 生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification of the monensin-degrading strain DM-1

Test indicator	DM-1
Urea	-
Hydrogen sulfide	-
Nitrate reduction	-
Mannitol	-
Cellobiose	-
Glucose	+
Maltose	-
Sucrose	+
Xylose	+

Note: “+”: positive; “-”: negative.

杆菌属 (*Acinetobacter sp.*)。为进一步确定菌株 DM-1 的系统发育地位,利用 MEGA 软件对包括 DM-1 在内的 22 株同源性较高的菌株构建系统发育树。由系统发育树的结果(图2)可知,菌株 DM-1 与 *Acinetobacter baumannii* PS3 位于同一分支,序列一致性高达 99%。综合形态学、生理生化特征、16S rRNA 序列和系统发育分析,可以确定菌株 DM-1 为鲍曼不动杆菌菌种 (*Acinetobacter baumannii*)。因此,将其命名为 *Acinetobacter baumannii* DM-1 (GenBank 登录号: MH447170)。

## 2.3 莫能菌素 HPLC 柱后衍生化检测方法的建立

本研究采用香草醛作为衍生试剂,对无机盐液体培养基中提取净化的莫能菌素衍生化后,用 HPLC 进行检测分析,图3为莫能菌素的 HPLC 检测标准曲线,莫能菌素在 0.1–100.0  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内,HPLC 检测峰面积与浓度线性关系良好,其线性回归方程为  $y=37\,444x-3\,230$ ,  $R^2=0.999\,993$  ( $n=3$ ),满足药物残留检测要求。

## 2.4 降解菌 DM-1 以莫能菌素为唯一碳源的降解规律

对莫能菌素降解菌 DM-1 的降解能力及其生长情况进行研究,28 d 内莫能菌素浓度变化和降解菌生长曲线如图4所示,在以莫能菌素为唯一碳源培养的过程中,DM-1 菌株生长迅速, $OD_{600}$  值维持在较高水平。此外,随着 DM-1 菌株  $OD_{600}$  值的不断上升,莫能菌素浓度则不断下降。上述结果说明莫能菌素降解菌 DM-1 降解能力的强弱跟菌株生长性能呈正相关。此外,通过对莫能菌素的降解率进行分析发现,DM-1 对莫能菌素 28 d 后的降解率达到 87.51%,空白对照组 28 d 降解率仅为 8.57%,该结果说明 DM-1 为莫能菌素的高效降解菌。

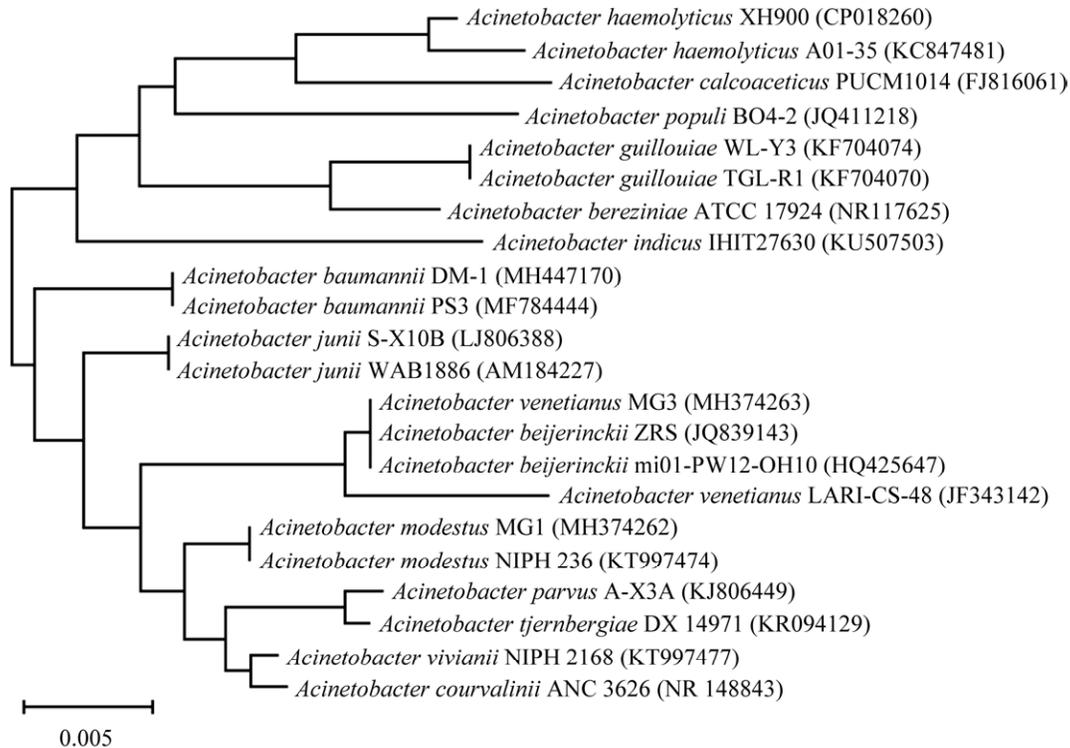


图 2 莫能菌素降解菌 DM-1 系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of DM-1 based on 16S rRNA gene sequence.

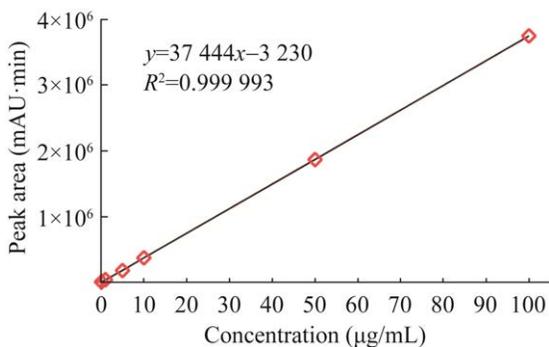


图 3 莫能菌素标准曲线图

Figure 3 The standard curve of monensin.

## 2.5 温度对降解菌 DM-1 的生长及其降解能力的影响

由图 5 A 可知, 随着温度的升高, 72 h 内莫能菌素的降解率增加明显, 10 °C 时, 莫能菌素的降解率仅为 14.42%, 20 °C 时为 28.87%, 30 °C 时, 莫能菌素的降解率则高达

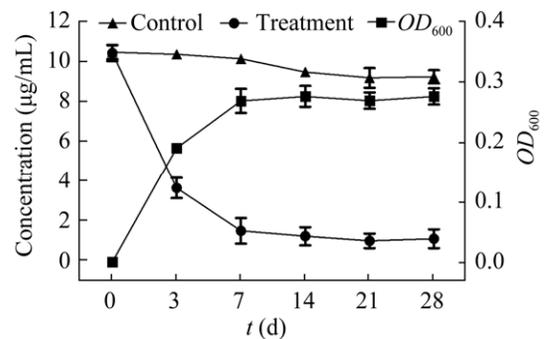


图 4 以莫能菌素为唯一碳源的 DM-1 生长及降解曲线

Figure 4 Utilization of monensin as sole carbon source for growth by strain DM-1.

64.75%。当温度高于 30 °C 时, 莫能菌素的降解率开始下降, 40 °C 时莫能菌素的降解率为 35.35%, 当温度为 50 °C 时莫能菌素的降解率更低, 仅为 8.47%, 甚至低于 10 °C 时的降解率, 而且在 10 °C 条件下 DM-1 的 OD<sub>600</sub> 值也高

于 50 °C 时的  $OD_{600}$  值, 该结果说明降解菌 DM-1 对低温耐受性更好, 可以用于低温条件下莫能菌素污染环境的修复。此外, DM-1 对莫能菌素的降解率及其  $OD_{600}$  值均随着温度的升高呈先升后降的规律, 这说明温度能显著影响降解菌 DM-1 的生长情况, 并最终影响其对莫能菌素的降解能力。DM-1 在温度为 30 °C 的条件下, 72 h 后  $OD_{600}$  值达到最高, 为 0.5 左右, 达到最大生物量, 而此时莫能菌素降解率也最高, 说明 DM-1 的最适生长和降解温度均为 30 °C。

## 2.6 pH 对降解菌 DM-1 的生长及其降解能力的影响

不同 pH 对莫能菌素高效降解菌 DM-1 细胞生长及其降解能力的影响结果如图 5B 所示, pH 对莫能菌素降解菌 DM-1 的生长情况和降解性能有较大的影响, 随着 pH 的增高, 降解菌  $OD_{600}$  值呈先升高后下降的趋势。莫能菌素的降解率也随着 pH 的变化, 呈现先升高后降低的规律。上述结果说明降解菌 DM-1 的生长情况与莫能菌素降解率呈正相关。此外, pH 值低于 7 时, DM-1 的  $OD_{600}$  值低于 0.3, 说明酸性环境能显著抑制降解菌的生长, 进而影响降解菌对莫能菌素的降解。在 pH 值为 7 的条件下, DM-1 菌株 72 h 后  $OD_{600}$  值达到最高, 为

1.2 左右, 莫能菌素降解率也达到最大, 说明 DM-1 菌株的最适降解 pH 为 7。

## 2.7 初始添加浓度对降解菌 DM-1 的生长及其降解能力的影响

为了考察不同初始浓度莫能菌素对高效降解菌株 DM-1 生长及降解能力的影响, 本试验设计了 5、10、25、50 和 100 mg/L 五种浓度的莫能菌素降解体系。在无机盐培养基 (pH 7, 30 °C、150 r/min) 中, 经过 72 h 的培养, 不同初始添加浓度对 DM-1 降解能力的影响见图 6。当莫能菌素初始浓度为 5 mg/L 时, 经过 72 h 的降解作用, DM-1 对以上 5 种浓度的降解速率分别为 29.7、62.5、195.9、436.8 和 672.6  $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。DM-1 对初始浓度为 5、10、25、50 和 100 mg/L 莫能菌素的总降解率分别为 42.24%、41.87%、61.02%、65.37% 和 50.81%。上述结果说明, 莫能菌素初始浓度对 DM-1 降解菌降解性能有显著影响, 在一定范围内莫能菌素浓度升高有利于莫能菌素的降解, 随着底物浓度的继续升高, 超过微生物的耐受极限, 菌株 DM-1 的降解效率开始受到抑制, 降解率也随之下降, 其中初始添加浓度为 50 mg/L 时菌株 DM-1 的降解率最高, 达到 65.37%, 该浓度为菌株 DM-1 的最适莫能菌素初始添加浓度。

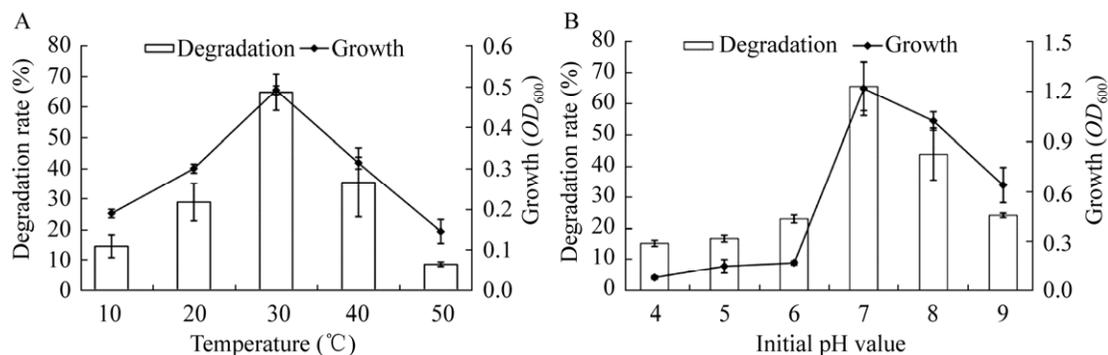


图5 不同温度 (A) 和 pH (B) 对 DM-1 生长及降解性能的影响

Figure 5 Effects of temperature (A) and pH (B) on growth and biodegradability of DM-1 in the mineral salt medium.

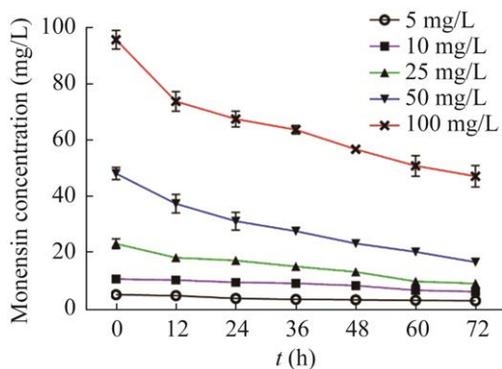


图 6 莫能菌素初始浓度对降解菌 DM-1 降解能力的影响

Figure 6 Biodegradability of strain DM-1 for monensin at different initial concentrations in the mineral salt medium.

### 3 讨论

利用微生物降解菌株对环境中残留药物进行生物降解,从而修复受污染环境正成为环境修复领域的研究热点<sup>[17-21]</sup>。目前,聚醚类抗生素微生物降解的研究也已有了一些报道。Vértesy 等发现从土壤中分离到的施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 和成团肠杆菌 (*Enterobacter agglomerans*) 菌株可以将盐霉素分子分解成非离子产物<sup>[22]</sup>。Delort 等从土壤中分离到的 *Sebekia benihana* 菌株可将尼日利亚菌素生物转化成 3 种代谢产物<sup>[23]</sup>。然而,有关莫能菌素降解菌的筛选及降解特性的报道很少。截至目前,国内外仅有一株莫能菌素降解菌于 1990 年被从土壤中分离出来,该菌株被鉴定为 *Sebekia benihana*,但其降解性能并未见报道<sup>[16]</sup>。因此,筛选出对高毒性和长半衰期的莫能菌素具有较好降解能力的降解菌就显得尤为重要。

获得药物降解菌株的途径很多,常见的有定向培育、诱变育种和工程菌的改造构建等<sup>[24]</sup>,而在被兽药污染的鸡粪中可能会存在能够高效降解残留兽药的菌株,从中进行兽药高效降解菌株的筛选分离也是十分可行的方法。本研究

通过富集驯化和唯一碳源法,从莫能菌素污染的鸡粪中筛选分离到一株新型莫能菌素降解菌株 DM-1,该菌株对初始浓度为 10 mg/L 的莫能菌素,28 d 后的降解率达到 87.51%。通过形态学观察、生理生化特性分析和 16S rRNA 基因系统发育分析等,确定了高效降解菌 DM-1 为鲍曼不动杆菌菌株 (*Acinetobacter baumannii*),命名为鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* DM-1。相关的研究表明,鲍曼不动杆菌对化学污染物有很好的降解能力,孙大鹏研究发现,鲍曼不动杆菌菌株培养 48 h 对 200 mg/L 硝基苯的好氧降解率达 60.53%<sup>[25]</sup>;阳重阳研究表明鲍曼不动杆菌菌株能高效降解偶氮染料,降解率可达 90% 以上<sup>[26]</sup>。本研究将拓宽该菌株在环境修复领域的应用范围。但需要注意的是,鲍曼不动杆菌属于条件致病菌,在环境中广泛存在,对医院 ICU 等特殊人群有一定致病性,减少其对医院等环境的污染是其危害防控的重点。因此,该菌株在实际应用前需要充分论证。但掌握和了解这类降解菌的降解性能,对推动抗生素类药物污染环境的生物修复依然意义重大。

通过对莫能菌素高效降解菌 DM-1 的降解特性进行研究,我们发现降解菌 DM-1 能够在较广的温度和 pH 范围内对莫能菌素进行有效降解,还可以耐受并降解高达 100 mg/L 的莫能菌素。莫能菌素高效降解菌 DM-1 的这些降解特性,对其在修复莫能菌素污染的畜禽粪便和有机废水实际处理应用中十分重要。本研究不但表明菌株 DM-1 在莫能菌素污染环境的生物修复方面具有良好的应用前景,还将为抗生素污染环境的微生物修复提供理论支撑。尽管本研究对莫能菌素降解菌 DM-1 的降解效率及最适培养条件进行了研究,但是菌株 DM-1 对莫能菌素的生物降解途径和代谢产物尚不明确,在今后的研究中,通过改进代谢产物提取方法

和优化检测系统, 对其降解产物和降解途径进行解析, 进一步探索其降解机理, 将更好地促进其实际应用。

## REFERENCES

- [1] Munaretto JS, Yonkos L, Aga DS. Transformation of ionophore antimicrobials in poultry litter during pilot-scale composting. *Environ Pollut*, 2016, 212: 392-400.
- [2] Li H, Wan Q, Zhang SD, et al. Housefly larvae (*Musca domestica*) significantly accelerates degradation of monensin by altering the structure and abundance of the associated bacterial community. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 418-426.
- [3] 周伟伟, 卜仕金. 聚醚类离子载体抗生素的研究进展. *兽药与饲料添加剂*, 2006, 11(3): 13-15.  
Zhou WW, Bu SJ. Research progress of polyether ionophore antibiotics. *Vet Pharm Feed Addit*, 2006, 11(3): 13-15 (in Chinese).
- [4] Bohn P, Bak SA, Björklund E, et al. Abiotic degradation of antibiotic ionophores. *Environ Pollut*, 2013, 182: 177-183.
- [5] Sun PZ, Barmaz D, Cabrera ML, et al. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J Chromatogr A*, 2013, 1312: 10-17.
- [6] Sun P, Pavlostathis SG, Huang C-H. Estimation of environmentally relevant chemical properties of veterinary ionophore antibiotics. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23(18): 18353-18361.
- [7] Žižek S, Dobeic M, Pintarič Š, et al. Degradation and dissipation of the veterinary ionophore lasalocid in manure and soil. *Chemosphere*, 2015, 138: 947-951.
- [8] Matteo D, Lisa MD, Daniel NM, et al. Environmental fate and microbial effects of monensin, lincomycin, and sulfamethazine residues in soil. *Environ Pollut*, 2019, 246: 60-68.
- [9] Charles DP, Stephen AL, Jason G. Impact assessment of the reduction or removal of ionophores used for controlling coccidiosis in the UK broiler industry. *Vet Rec*, 2021, 189(11): e513.
- [10] Biswas S, McGrath JM, Sapkota A. Quantification of ionophores in aged poultry litter using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Environ Sci Health B*, 2012, 47(10): 959-966.
- [11] Doydora SA, Sun PZ, Cabrera M, et al. Stacking time and aluminum sulfate effects on polyether ionophores in broiler litter. *J Environ Qual*, 2015, 44(6): 1923-1929.
- [12] Ni H, Peng L, Gao XG, et al. Effects of maduramicin on adult zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity, tissue damage and oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 168: 249-259.
- [13] Dorne JLCM, Fernández-Cruz ML, Bertelsen U, et al. Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 270(3): 196-208.
- [14] Sun PZ, Cabrera ML, Huang CH, et al. Biodegradation of veterinary ionophore antibiotics in broiler litter and soil microcosms. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(5): 2724-2731.
- [15] Thompson IP, Van Der Gast CJ, Ciric L, et al. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol*, 2005, 7(7): 909-915.
- [16] Vaufrey F, Delort AM, Jeminet G, et al. Bioconversion of monensin by a soil bacterium, *Sebekia benihana*. *J Antibiot (Tokyo)*, 1990, 43(9): 1189-1191.
- [17] Saez JM, Benimeli CS, Amoroso MJ. Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria. *Chemosphere*, 2012, 89(8): 982-987.
- [18] Silva VP, Moreira-Santos M, Mateus C, et al. Evaluation of *Arthrobacter aurescens* strain TC1 as bioaugmentation bacterium in soils contaminated with the herbicidal substance terbuthylazine. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144978.
- [19] Zhang H, Zhang YM, Hou ZG, et al. Biodegradation potential of deltamethrin by the *Bacillus cereus* strain Y1 in both culture and contaminated soil. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2016, 106: 53-59.
- [20] Gao SM, Seo JS, Wang J, et al. Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6. *Int Biodeterior Biodegradation*, 2013, 79: 98-104.
- [21] Dubey KK, Fulekar MH. Chlorpyrifos bioremediation in *Pennisetum* rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28(4): 1715-1725.
- [22] Vértesy L, Heil K, Fehlhäber HW, et al. Microbial decomposition of salinomycin. *J Antibiot (Tokyo)*, 1987, 40(3): 388-390.
- [23] Delort AM, Jeminet G, Sancelme M, et al. Microbial conversion of nigericin in three successive steps, by *Sebekia benihana*. *J Antibiot*, 1988, 41(7): 916-924.
- [24] Singer AC, Gast CJ, Thompson IP. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(2): 74-87.
- [25] 孙大鹏. 低温硝基苯降解菌的降解动力学研究. *安徽农业科学*, 2015, 43(9): 243-245, 276.  
Sun DP. Study on degradation kinetics of low-temperature nitrobenzene degrading bacteria. *J Anhui Agric Sci*, 2015, 43(9): 243-245, 276 (in Chinese).
- [26] 阳重阳. 刚果红降解菌的分离鉴定和脱色条件研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2014.  
Yang (C/Z)Y. Isolation, identification and decolorization study of the strain for Congo red decolorization[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2014 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)