

一株泰乐菌素高效降解菌的分离鉴定及其降解特性

孙瑞珠¹ 马玉龙^{1,2*} 张娟¹ 孙永刚¹ 王艳¹ 王敏¹ 牛海亚¹

(1. 宁夏大学 化学化工学院 宁夏 银川 750021)

(2. 宁夏天然药物工程技术研究中心 宁夏 银川 750021)

摘 要:【目的】从长期堆放泰乐菌素药渣附近的土壤中分离出泰乐菌素降解菌,并考察其对泰乐菌素的降解特性。【方法】采用梯度驯化、划线分离法筛选出泰乐菌素优势降解菌,通过形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析方法对其进行系统发育分析及菌种鉴定,并考察菌株对泰乐菌素的降解特性。【结果】从长期堆放泰乐菌素药渣的土壤中分离得到 1 株泰乐菌素高效降解菌,命名为 TS1,其为革兰氏阴性杆菌,菌落形态呈圆形,乳白色,表面光滑,不透明,边缘整齐,鉴定为越南伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)。该菌株在温度 35 °C、pH 7.0 的条件下培养 72 h,对初始浓度为 300 mg/L 泰乐菌素的降解率可达 99% 以上。【结论】说明菌株 TS1 对泰乐菌素具有良好的降解特性,可用于生物修复被泰乐菌素废渣废水污染的生态环境。

关键词: 泰乐菌素降解菌, 16S rRNA, 系统发育分析, 降解特性

Isolation and identification of a tylosin-degrading strain and its degradation characteristics

SUN Rui-Zhu¹ MA Yu-Long^{1,2*} ZHANG Juan¹ SUN Yong-Gang¹ WANG Yan¹
WANG Min¹ NIU Hai-Ya¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

(2. Ningxia Engineering Research Center for Natural Medicine, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: [Objective] This study was to isolate a tylosin-degrading strain from the soil deposited by tylosin pharmaceutical waste and investigated its degradation characteristics. [Methods] The strain was identified based on the morphology observation, experimental results of physiology and biochemistry, and then the identification and phylogenetic analysis of the isolated strain was performed by 16S rRNA gene sequence, also, the characteristics of the strain in degradation of tylosin was investigated. [Results] A strain named TS1 was newly isolated from the soil deposited by tylosin pharmaceutical waste. The cells of the isolate were Gram-negative rods and the colony morphology was round, oyster white, opaque, and smooth with regular edge. The isolate was identified as *Burkholderia vietnamiensis*. This strain was capable of degrading 99% of tylosin in medium with an initial concentration of 300 mg/L after 72 h of incubation under conditions of the initial pH 7.0 and

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21067009)

*通讯作者: Tel: 86-951-2062380; ✉: nxylma@163.com

收稿日期: 2013-03-31; 接受日期: 2013-05-31; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

35 °C. **[Conclusion]** The isolated strain has a high ability to degrade tylosin, and may be used for bioremediation of environment contaminated by solid or liquid waste containing tylosin residue.

Keywords: Tylosin-degrading strain, 16S rRNA, Phylogenetic analysis, Bioderadation characteristics

大环内酯类抗生素是由链霉菌产生的一类弱碱性抗生素,其分子中含有一个十四至十六元环的内酯结构^[1],在人类临床运用及兽药治疗中起着至关重要的作用,估计每年用量达到 100 000–200 000 t^[2],在药物类饲料添加剂中的使用量位居全球第三^[3]。泰乐菌素是首先由美国学者 Hamill 等^[4]从泰国土壤中分离得到的一种大环内酯类抗生素,是国际上广泛使用的兽用抗生素之一。目前,在中国每年使用的约 500×10^4 t 抗生素中,最常见的就有泰乐菌素^[5]。泰乐菌素在发酵生产过程中会产生大量废弃药渣,这些含有高营养成分的药渣若能有效利用,不仅可以缓解资源危机,还可达到废物治理的目的。然而,由于残留抗生素的存在,不仅极大地限制了抗生素药渣的循环利用,也造成了严重的环境污染。

由于抗生素的大量使用及其废弃物不合理排放对环境造成的危害已备受人们关注^[6]。大量研究表明^[7-14],市政废水中抗生素类污染物随处可见。另外,在不同的环境基质中也可检测到泰乐菌素的存在,Kolz 等^[15]发现泰乐菌素在粪池液中浓度是 1–30 mg/L,Zuccato 等^[16]采用 HPLC 法检测出饮用水中泰乐菌素的残留浓度为 0.6–1.7 ng/L,在河水沉淀物中为 2 640 ng/kg,Dolliver 等^[17]研究发现,泰乐菌素在土壤浸出液中的最高浓度为 1.2 µg/L,在径流中的浓度为 6.0 µg/L;Kolpin 等^[18]在美国地表水中测得泰乐菌素浓度高达 280 µg/L。大量抗生素药物残留不仅污染环境,而且残留的抗生素会对微生物的耐药性进行筛选,导致耐药性生物的出现^[19-20],从而使生态环境遭到破坏。因此,如何解决抗生素类物质污染问题,已成为当前国际上的讨论热点之一。

目前,抗生素类污染物的去除方法主要集中在废物处理设备、膜分离等工艺方面。已有研究表明,现有的传统废水处理设备(WWTPs)仍不能彻底的去除抗生素类药物污染物^[21-23];虽然,畜禽粪便中残留的抗生素可通过高温堆肥腐熟处理方式降解掉,但其所需时间较长^[24];而直接排放到环境中的抗生素残留较难处理,生物降解无异是一条优良途径。之前本实验室已筛选到一株可降解药渣残留泰乐菌素的降解菌——无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*, 登录号为 JF272614),该菌经 48 h 发酵处理后对初始浓度为 50 mg/L 泰乐菌素的降解率为 95.2%^[25],但其可降解泰乐菌素的初始浓度较低,而药渣中泰乐菌素残留量一般都在 300 µg/g 左右。因此,本研究在前期研究基础上,进一步筛选驯化泰乐菌素高效降解菌,旨在为泰乐菌素药渣处理及其资源化利用提供相关数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

泰乐菌素标样购于美国 Sigma 公司,泰乐菌素药渣(泰乐菌素发酵醪液进行固液分离时产生的菌饼部分,其主要成分是微生物菌丝体,粗灰分含量 11.26%–11.41%,粗蛋白含量 32.89%–35.35%,粗脂肪含量 12.98%–13.78%,钙含量 0.67%–0.71%,总磷含量 0.73%–0.79% 及残留泰乐菌素)由泰乐菌素生产企业提供。

酵母膏蛋白胨葡萄糖(YPD)培养基:酵母膏 1 g,蛋白胨 2 g,葡萄糖 2 g,蒸馏水 100 mL(固体加入琼脂 1.2 g), 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

药渣培养基:泰乐菌素药渣与蒸馏水按 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,再通过抽滤去除漂浮的杂质。

磷酸盐缓冲溶液:取 0.1 mol/L 的 K_2HPO_4 溶液 615 mL 与 KH_2PO_4 溶液 385 mL,即得 0.1 mol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液 1 L^[26]。

1.2 菌种 TS1 的筛选、驯化与分离

从长期堆放泰乐菌素药渣附近的土壤中采集土样。称取采集的土样 10.0 g,加入装有 90 mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液的三角瓶中,并加入一定量的玻璃珠,在摇床上充分打散后取出土壤浸出液备用。向土壤浸出液中加入泰乐菌素药渣 10.0 g,蛋白胨 2.0 g,葡萄糖 1.0 g,置于 35 °C、130 r/min 恒温振荡摇床中驯化培养,每 7 天转接一次,每次转接时取培养液 10 mL 接入到 90 mL 新鲜药渣培养基中,开始下个周期培养,其中药渣培养基中泰乐菌素的浓度每次增加 100 mg/L,直到泰乐菌素浓度达到 500 mg/L。将培养液梯度稀释为 10^{-1} – 10^{-7} ,采用平板涂布法,根据菌落生长速度、大小、形状、颜色等进行多次划线分离纯化。用无菌接种环分别挑取分离的单一菌落于 YPD 液体培养基中培养,然后分别取 10 mL 处于对数生长期的菌液接入到泰乐菌素初始浓度为 300 mg/L 的 YPD 液体培养基中,考察单一菌株对泰乐菌素的降解效果。通过降解效果的对比,筛选出降解能力较强的优势菌株,纯化后挑取单一菌落接种于斜面培养基 4 °C 冰箱保存。以上操作均在无菌环境下进行。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态观察及生理生化特征的鉴定:降解菌 TS1 筛选过程中,将分离纯化后得到的高效降解菌涂布于 YPD 固体平板培养基上,置于 35 °C 恒温生化培养箱中培养 72 h,通过菌落形状、大小、颜色、表面特征、革兰氏染色等观察菌体形态。

降解菌的生理生化特征鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[27]和《伯杰细菌系统鉴定手册》(第 9 版)^[28],考察了菌株 TS1 的氧化酶、吲哚产生、V.P.反应等特征,并分别考察了菌株 TS1 在不同的

醇类、糖类基质中的生长特征。

1.3.2 抗逆性测定:抗逆性实验采用涂布接菌的方法。将降解菌 TS1 分别接种于含有不同 pH 值和不同氯化钠浓度的 YPD 培养基中,于 35 °C、130 r/min 恒温振荡摇床中培养,或涂布于 YPD 固体平板中在不同温度下培养 7 d,观察菌株在不同条件下的生长情况,并记录结果。生长旺盛记为“+++”,生长较好记为“++”,生长记为“+”,不生长记为“-”,每个试验设 3 个平行,重复 3 次。

1.3.3 16S rRNA 基因序列扩增及系统发育分析:采用 DNA 快速提取试剂盒(MK047-3)进行降解菌 DNA 的提取。PCR 反应的引物为细菌 16S rRNA 基因全长通用引物,8f :5'-CACGGATCCA GAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3'和 1510r :5'-GTGAAGTTACGG(C/T)TACCTTGTTACGAC TT-3'^[29]。反应体系(50 μ L):缓冲液 5 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 5 μ L,EX Taq DNA 聚合酶 1.25 μ L,1–10 μ g/L 模板 1 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L。反应条件:94 °C 1 min;94 °C 20 s,52 °C 20 s,68 °C 40 s,共 30 个循环;68 °C 10 min;4 °C 保存^[30]。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。基因序列测定委托中国科学院微生物研究所(北京)菌种鉴定中心完成。

将测得的 16S rRNA 基因序列用 NCBI 中的 Bankit 软件在线提交,以获得菌株在 GenBank 中的登录号。用 NCBI 的 BLAST 程序进行序列同源性比对,并用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树^[31]。

1.4 检测方法

1.4.1 泰乐菌素浓度的测定:泰乐菌素浓度采用高效液相色谱仪器(LC-20AT,日本岛津),用外标法定量检测。色谱条件:色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱(5 μ m,250 mm×4.6 mm);流动相:乙腈: KH_2PO_4 (0.02 mol/L,pH 2.5)=30:70 (体积比)等度洗脱;流速:1 mL/min;柱温:25 °C;进样量:20 μ L;检

测波长: 286 nm; 待测物过 0.45 μm 滤膜供液相色谱测定。

1.4.2 菌株 TS1 生长及其对泰乐菌素降解性能: 降解菌浓度的测定, 每间隔一定时间取培养液, 用 UV-1200 型紫外分光光度计测定 500 nm 处的光密度 (OD_{500}), 细菌浓度计算公式为: $C_{\text{cell}} = 314.5 \times OD_{500}^{[32]}$, 绘制吸光度与时间关系曲线即得细菌生长曲线。

在 250 mL 容量瓶中加入 YPD 培养基和一定量的泰乐菌素粉末, 调节泰乐菌素初始浓度为 300 mg/L, pH 7.0–7.2, 接入 10 mL 处于对数生长期的降解菌 TS1 (菌液浓度为 10^8 cells/mL), 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 的恒温振荡摇床中培养(同时以不接入降解菌为空白对照), 每隔 12 h 取样, 测定培养液中泰乐菌素的浓度, 绘制剩余泰乐菌素浓度与时间关系曲线, 即得泰乐菌素降解曲线。以上每个处理设置 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

经过初步筛选, 分离得到 3 株单一菌, 命名为 TS1、TS2 和 TS3 (图 1), 通过 3 株菌对泰乐菌素的降解能力进行复筛, 保留了一株对泰乐菌素降解效果最大的菌株 TS1。其对初始浓度为 300 mg/L 的泰乐菌素在 3 d 内的降解率可达 99% 以上, 而菌株在前期筛选过程中对 300 mg/L 的药渣泰乐菌素降解 99% 则需要 7 d^[33], 可见经过驯化一段时间后, 降解菌 TS1 对泰乐菌素的降解能力明显提高。

2.2 形态观察及生理生化特征的鉴定

菌株 TS1 在 YPD 固体培养基上呈圆形, 中间凸起, 乳白色, 表面光滑, 不透明, 边缘整齐, 菌落直径约为 2–3 mm (图 2)。菌株 TS1 经革兰氏染色确定为革兰氏阴性菌, 在电子扫描显微镜下观察, 菌株为杆状(图 3)。菌株 TS1 生理生化特征见表 1。

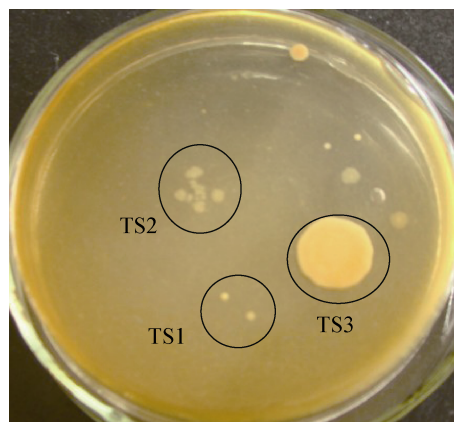


图 1 分离得到 3 株单一菌的菌落特征

Figure 1 Colony characteristic of the three single strains

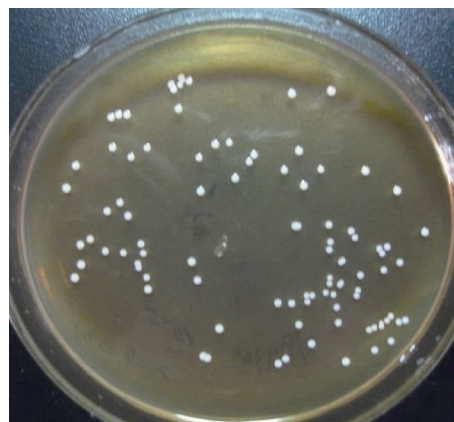


图 2 菌株 TS1 的菌落特征

Figure 2 The colony characteristic of strain TS1

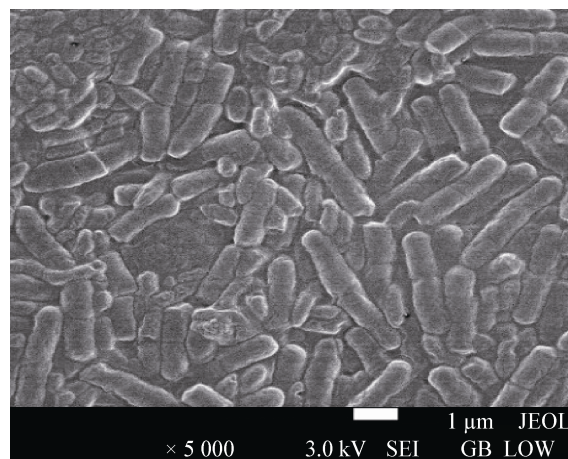


图 3 扫描电子显微镜下菌株 TS1 的形态(5 000 \times)

Figure 3 The morphous of strain TS1 obtained by SEM (5 000 \times)

表 1 菌株 TS1 的生理生化特征					
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain TS1					
实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
Items	Results	Items	Results	Items	Results
细胞形态	杆状	革兰氏染色	—	接触酶	+
Cell morphology		Gram-staining		Catalase	
氧化酶	—	β-半乳糖苷酶	+	精氨酸双水解酶	—
Oxidase		β- Galactose enzyme		Arginine double enzyme hydrolysis	
赖氨酸脱羧酶	—	鸟氨酸脱羧酶	—	脲酶	—
Lysine decarboxylase		Ornithine decarboxylase		Urease	
色氨酸脱氨酶	—	明胶液化	+	吲哚产生	—
Tryptophan deaminase		Gelatin liquefaction		Indole	
硝酸盐还原	+	柠檬酸盐利用	+	V.P.反应	—
Nitrate reduction		Citrate		Diacetyl	
D-半乳糖	+	D-塔格糖	—	蜜二糖	—
D-Galatose		D-Tagatose		Melibiose	
甘油	+	D-葡萄糖	+	葡萄糖酸盐	—
Glycerol		D-Glucose		Gluconate	
赤藓醇	—	D-果糖	+	N-乙酰-葡糖胺	—
Erythritol		D-Fructose		N-Acetyl glucosamine	
D-阿拉伯糖	+	D-甘露糖	+	苦杏仁苷	—
D-Arabinose		D-Mannose		Amygdalin	
L-阿拉伯糖	+	L-山梨糖	—	熊果甙	—
L-Arabinose		L-Sorbose		Arbutin	
D-核糖	+	L-鼠李糖	—	七叶灵	—
D-Ribose		L-Rhamnose		Esculin	
D-木糖	+	卫茅醇	+	水杨苷	—
D-Xylose		Dulcite		Salicin	
L-木糖	—	肌醇	+	纤维二糖	+
L-Xylose		Inositol		Cellobiose	
阿东醇	—	甘露醇	+	麦芽糖	+
Adonitol		Mannitol		Maltose	
β-甲基-D-木糖甙	—	山梨醇	+	乳糖	+
β-Methyl-D-xylose		Sorbitol		Lactose	
α-甲基-D-甘露糖甙	—	D-来苏糖	—	D-岩藻糖	—
α-Methyl-D-mannose		D-Lyxose		D-Fucose	
α-甲基-D-葡萄糖甙	—	D-阿拉伯糖醇	+	L-阿拉伯糖醇	—
α-Methyl-D-glucose		D-Arabitol		L-Arabitol	
2-酮基-葡萄糖酸盐	—	L-岩藻糖	—	木糖醇	—
2-Keto-gluconate		L-Fucose		Xylitol	
D-松二糖	—	菊糖	—	淀粉	—
D-Turanose		Synanthrin		Starch	
蔗糖	+	松山糖	—	糖原	—
Sucrose		Matsuyama sugar		Glycogen	
海藻糖	—	棉子糖	—	龙胆二糖	—
Mycose		Raffinose		Gentiobiose	

注：+：阳性；—：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

2.3 菌株 TS1 抗逆性

由表 2 可见：菌株 TS1 耐碱性能力比较强，在弱酸性条件(pH 为 5–6)时也可以生长 ,但较适宜的生长 pH 值为 7；菌株 TS1 对盐的耐受性较好，在 NaCl 浓度达到 3% 时，仍能正常生长；降解菌对温度的适应范围较宽，在 20–50 °C 范围内均能生长。

2.4 菌株 TS1 序列测定及系统发育分析

将菌株 TS1 扩增的序列测序后得到长度为 1 436 bp 的基因序列 ,该序列在 GenBank 中的登录号为 KC282371。部分序列为：5'-CAGCTTACCAT GCAGTCGAACGGCAGCACGGGGTGCTTGACAC CTGGTGGCGAGTGGCCAACGGGTGAGTAATAC ATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCG GCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTAC GGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGC TATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTG GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAG TAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCCACTG

GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAA AGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGA AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGA AAGAAATCCTTG-3'。

将菌株 TS1 的 16S rRNA 基因序列登录 GenBank 用 BLAST 程序进行同源性比较分析，结果表明菌株 TS1 与多株越南伯克霍尔德氏菌株的 16S rRNA 基因序列同源性为 99%以上，用软件 MEGA 5.0 将菌株 TS1 与 GenBank 中同源性高的菌株一起构建系统发育树。系统发育树(图 4)显示，菌株 TS1 与伯克霍尔德氏菌属 *Burkholderia* sp.在 100% Bootstrap 水平上相聚一群，而与越南伯克霍尔德氏菌(登录号 NR074698、U96928、EF667353)的亲缘关系更近。

根据形态学特征和生理生化反应，结合 16S rRNA 基因序列分析结果，将菌株 TS1 鉴定为越南伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*)。

表 2 pH 值、盐和温度对菌株 TS1 生长性能的影响 Table 2 Effect of pH, salt and temperature on growth performance of strain TS1					
pH	生长性能 Growth performance	NaCl 浓度 NaCl concentration (%)	生长性能 Growth performance	温度 Temperature (°C)	生长性能 Growth performance
2	—	0	+	–20	—
3	—	0.2	+	0	—
4	—	0.4	+	4	—
5	+	0.6	+	10	—
6	++	0.8	+	20	+
7	+++	1.0	++	30	++
8	++	2.0	++	40	++
9	++	3.0	+	50	+
10	+	4.0	—	60	—
11	+	5.0	—	70	—
12	—				

注：+++：生长旺盛；++：生长良好；+：能生长；—：不能生长。
Note: +++: Growing eugonic; ++: Well-grown; +: Growth; -: No growth.

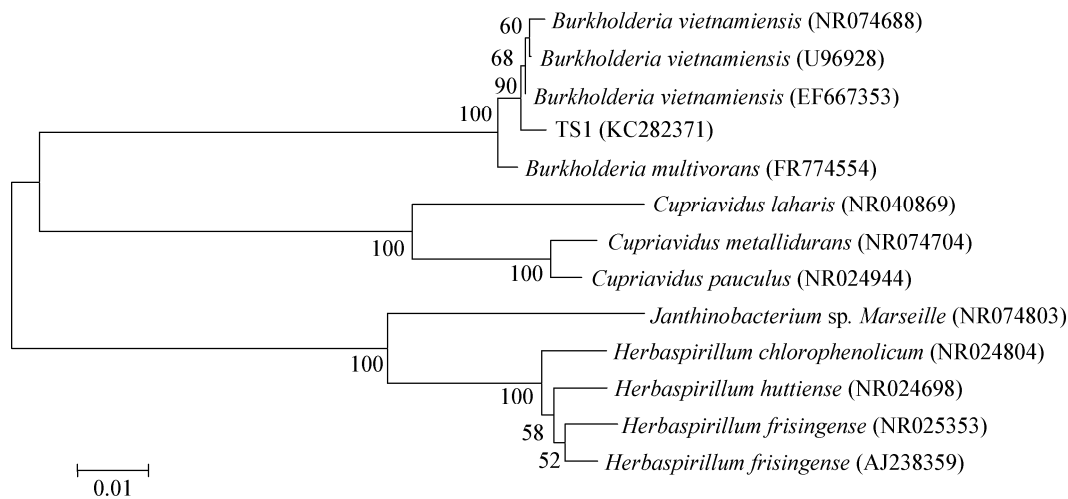


图 4 菌株 TS1 系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree of strain TS1

注：括号中的序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字为计算 1 000 次聚类到一起的几率；比例尺为 1% 的序列差异。
Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the percentage of occurrence in 1 000 boot-straped trees. Bar 0.01 represent sequence divergence.

2.5 菌株 TS1 生长及其对泰乐菌素的降解特性

将降解菌 TS1 制成菌悬液(菌液浓度为 10^8 cells/mL)，以 10%接种量接种于初始泰乐菌素浓度为 300 mg/L 的 YPD 培养基中，在 35 °C、pH 7.0、130 r/min 的恒温振荡摇床中培养 72 h，研究了菌株 TS1 对泰乐菌素的降解特性，结果如图 5 所示。由图 5 可知：随着培养时间的延长，泰乐菌素的浓度逐渐下降。0–12 h 内细菌生长处于停滞期，降解效果不明显；而在 12–48 h 内细菌到对数生长期，细菌浓度显著增大，而泰乐菌素浓度明显下降，降解效果明显；而在 48–72 h 内细菌到了生长稳定期，出现了生长平台，此时泰乐菌素浓度的变化不明显；72 h 后，99%的泰乐菌素被降解。可见泰乐菌素的降解和菌株生长情况是相一致的。图 6 是初始浓度为 300 mg/L 的泰乐菌素降解前后的液相色谱图。降解前，保留时间 15.751 min 为泰乐菌素的特征峰(图 6A)，经菌株

TS1 降解 72 h 后，泰乐菌素的特征峰消失，而色谱图上出现了新的特征峰(图 6B)，其保留时间为 6.673 min，猜测可能是泰乐菌素经菌株 TS1 降解后的产物。

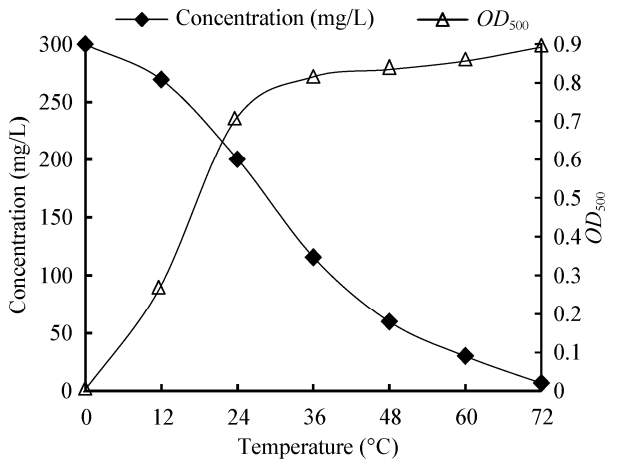


图 5 菌株 TS1 生长情况及泰乐菌素的降解效果
Figure 5 Strain TS1 growth and degradation to tylosin

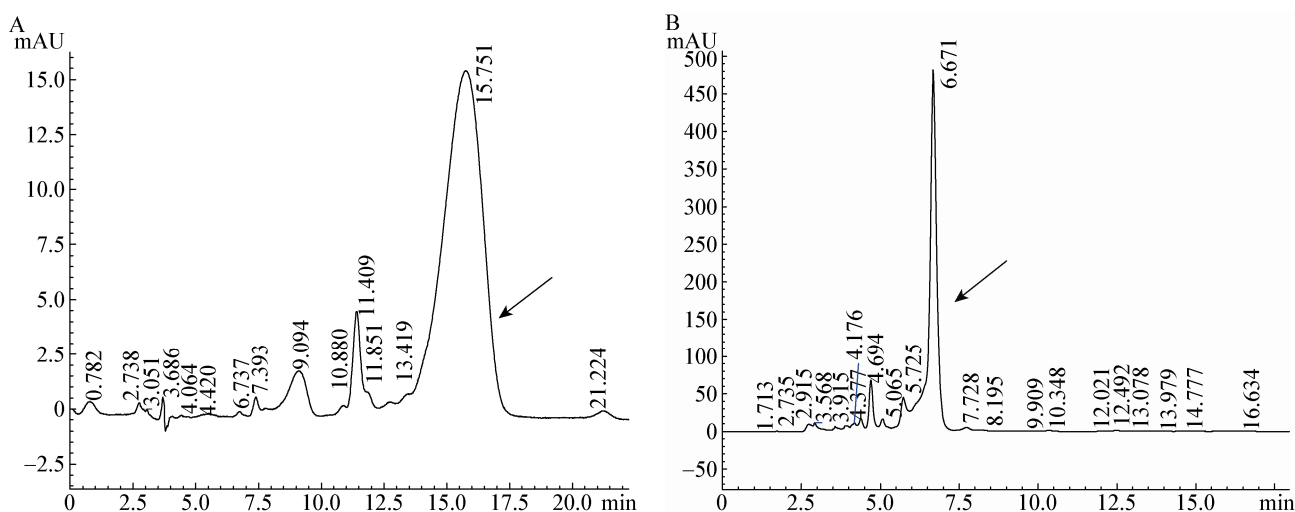


图6 泰乐菌素的 HPLC 图谱

Figure 6 HPLC spectra of tylosin

注：A：泰乐菌素空白样；B：泰乐菌素经菌株 TS1 处理后。

Note: A: The blank sample of tylosin; B: Tylosin degraded by strain TS1 after 72 h.

3 讨论

近年来，关于泰乐菌素的研究报道逐渐增多，主要集中于泰乐菌素在强酸、强碱环境中的水解、光解以及在土壤中的吸附方面。另外，Holly^[34]、Loke^[35]、Teeter^[36]等报道称采用堆肥法可降解畜禽粪便中残留的泰乐菌素，但其降解时间长达 20–35 d 左右，甚至更长，而对泰乐菌素微生物降解菌株的研究鲜有报道。

本研究从长期堆放泰乐菌素药渣附近土壤中分离筛选出 1 株泰乐菌素高效降解菌 TS1，为革兰氏阴性杆菌，经形态观察、生理生化实验及 16S rRNA 基因鉴定为越南伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*)。目前已有研究表明，越南伯克霍尔德氏菌 (*B. vietnamiensis*) 对多种真菌性病害和细菌性病害作物都有良好的防效，具有固氮、解磷、解钾能力。山东省微生物重点实验室分离到具有多种功能的生防微生物越南伯克霍尔德氏菌 B418，已广泛用于田间^[37]。汪茜等^[38]首次报道了越南伯克霍尔德氏菌对柑橘炭疽病的生物防治效果。但此类菌株对泰乐菌素的降解尚未见报道。本研究筛选的泰乐菌素降解菌株 TS1，耐碱能

力较强，在 pH 11 的环境中仍能生长，但最适宜的 pH 为 7.0–8.0；对温度的适应范围较宽，在 20–50 °C 范围内均能生长。菌株 TS1 在温度为 35 °C、pH 7.0、接菌量 10%、转速 130 r/min 的恒温振荡摇床中，72 h 内对初始浓度为 300 mg/L 的药渣残留泰乐菌素的降解率可达 99% 以上。

泰乐菌素微生物降解及生物修复研究目前仍处于初期阶段，高效降解菌株的缺乏，代谢基质的不明确及实际应用工作的开展等问题需要进一步研究。本研究筛选的菌株 TS1 对泰乐菌素具有良好的降解效果，研究结果具有潜在的实际应用价值，为进一步找到泰乐菌素的生物降解酶奠定了基础，继续通过分子生物学技术和基因工程技术探明其降解基因，将其在微生物中克隆和表达，将成为环境治理与修复中降解泰乐菌素的新资源，具有良好的研究开发与应用前景。

参 考 文 献

- [1] Pal S. A journey across the sequential development of macrolides and ketolides related to erythromycin[J]. Tetrahedron, 2006, 62(14): 3171-3200.
- [2] Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49(4):

- 585-586.
- [3] Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils-a review[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2003, 166(2): 145-167.
- [4] Hamill RL. Tylosin, a new antibiotic[J]. *Antibiotics & Chemotherapy*, 1960, 11: 328-334.
- [5] 张倩, 杨琛, 党志, 等. 泰乐菌素在华南地区农业土壤上的吸附动力学和热力学特征[J]. *环境科学研究*, 2010, 23(8): 1019-1024.
- [6] Nie XP, Liu BY, Yu HJ, et al. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *pseudokirchneriella subcapitata*[J]. *Environment Pollution*, 2013, 172: 23-32.
- [7] Daughton CG, Ruhoy IS. Environment footprint of pharmaceuticals: the significance of factor beyond direct excretion to sewers[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(12): 2495-2521.
- [8] Gracia-Lor E, Sancho JV, Serrano R, et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of valencia[J]. *Chemosphere*, 2012, 87(5): 453-462.
- [9] Gros M, Petrovic M, Ginebreda A, et al. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environment risk assessment using hazard indexes[J]. *Environment International*, 2010, 36(1): 15-26.
- [10] Karthikeyan KG, Meyer MT. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 361(1/3): 196-207.
- [11] Miao XS, Bishay F, Chen M. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of waste- water treatment plants in Canada[J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(13): 3533-3541.
- [12] Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, et al. The occurrence of antibiotics in an urban water-shed: from wastewater to drinking water[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(8): 2711-2723.
- [13] Xu W, Zhang G, Li X, et al. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta(PRD), South China[J]. *Water Research*, 2007, 41(19): 4526-4234.
- [14] Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, et al. Occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179(1/3): 1042-1048.
- [15] Kolz AC, Ong SK, Mooman TB. Sorption of tylosin onto swine manure[J]. *Chemosphere*, 2005, 60: 284-289.
- [16] Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, et al. Presence of therapeutic drugs in the environment[J]. *The Lancet*, 2000, 355: 1789-1790.
- [17] Dolliver H, Gupta S. Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land[J]. *Environmental Quality*, 2008, 37(3): 1227-1237.
- [18] Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance[J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36(6): 1202-1211.
- [19] Underwood JC, Harvey RW, Metge DW, et al. Effects of the antimicrobial sulfamethoxazole on groundwater bacterial enrichment[J]. *Environmental Science Technology*, 2011, 45(7): 3096-3101.
- [20] Pruden A, Pei RT, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [21] Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, et al. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(1): 357-363.
- [22] Watkinson AJ, Murby EJ, Costanzo SD, et al. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment implications for environmental discharge and wastewater recycling[J]. *Water Research*, 2007, 41(18): 4161-4176.
- [23] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ, et al. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters[J]. *Water Research*, 2009, 43(2): 363-380.
- [24] Ho YB, Zakaria MP, Latif PA, et al. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 131: 476-484.
- [25] 刘力嘉, 谢丽, 张作义, 等. 泰乐菌素高效降解菌的筛选及其降解特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(5): 1027-1030.
- [26] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001: 84-109.
- [27] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 302.
- [28] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed[J]. Maryland: Williams & Wilkins Baltimore, 1994: 574-590.
- [29] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology*, 1995, 59: 143-169.

- [30] 图雅, 朱伟云, 陆承平. 东北虎粪细菌区系的16S rRNA 基因序列分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 671-674.
- [31] 唐玉斌, 孙常宇, 陈芳艳, 等. 一株[+屈]高效降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 593-597.
- [32] Li Y, Loh KC. Activated carbon impregnated polysulfone hollow fiber membrane for cell immobilization and cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol in the presence of phenol[J]. Journal of Membrane Science, 2006, 276: 81-90.
- [33] 孙瑞珠, 马玉龙, 张娟, 等. 泰乐菌素降解菌的筛选及其降解动力学研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(3): 30-42.
- [34] Holly D, Satish G, Sally N. Antibiotic degradation during manure composting[J]. Environmental Quality, 2008, 37(3): 1245-1253.
- [35] Loke ML, Lngerslev F, Halling-Sansen B, et al. Stability of tylosin A in manure containing test systems by high performance liquid chromatography[J]. Chemosphere, 2000, 40(7): 759 -765.
- [36] Teeter JS, Meyerhoff R. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta[J]. Environmental Research, 2003, 93: 45-51.
- [37] 陈凯, 李纪顺, 杨合同, 等. 越南伯克霍尔德氏工程菌株 B418-37的温室防病增产效果[J]. 山东农业科学, 2008, 7: 58-60.
- [38] 汪茜, 胡春锦, 柯仿钢, 等. 生防细菌 T132的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的抑制效果[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1260-1271.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!