

一株高效降解青霉素菌的筛选及鉴定

王礼君^{1,2}, 冯丽妍^{1,2}, 徐建中^{*1,2}, 张伟国^{1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从青霉素生产企业附近的土壤中筛选出耐受青霉素钠质量浓度为 20 g/L 的菌株, 利用高效液相色谱法筛选到一株高效降解青霉素钠的菌株 Anti-Pen20。根据菌落及菌体形态特征和基于 18S rRNA 基因序列的分析鉴定, 结果表明, 菌株 Anti-Pen20 属粘质红酵母属(*Rhodotorula mucilaginosa*)。当菌株 Anti-Pen20 的接种体积分数为 15%、青霉素钠初始质量浓度为 20 g/L 时, 30 °C 恒温培养 24 h, 对青霉素钠的降解率可达到 85%。菌株 Anti-Pen20 在高质量浓度的青霉素钠培养基中表现出高效的降解率, 有望应用于高质量浓度青霉素钠菌渣的处理回收, 为 Anti-Pen20 在动物饲料添加剂以及果业中作为防病变添加剂的应用提供研究依据。

关键词: 青霉素钠; 粘质红酵母; 18S rRNA; 菌株鉴定; 高效降解

中图分类号: X 787 文章编号: 1673-1689(2020)05-0089-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.05.013

Screening and Identification of A High-Efficiency Penicillin Sodium-Degrading Strain

WANG Lijun^{1,2}, FENG Liyan^{1,2}, XU Jianzhong^{*1,2}, ZHANG Weiguo^{1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Strains tolerant of 20 g/L penicillin sodium were screened from the soil near the penicillin production company. A strain named Anti-Pen20 with highly efficient degradation of penicillin sodium was screened by high performance liquid chromatography. Based on the colony, cell morphological characteristics and the analysis of the 18S rRNA gene sequence, the strain Anti-Pen20 was found to belong to the genus *Rhodotorula mucilaginosa*. The degradation rate of penicillin sodium was 85% after culturing 24 h at 30 °C when Anti-Pen20 was inoculated with 15% and the initial concentration of sodium penicillin was 20 g/L. Anti-Pen20 showed high degradation rate in high concentration penicillin sodium medium, which is expected to be applied to the recovery of high concentration penicillin sodium slag, also provides research basis for the application of Anti-Pen20 as an additive for disease prevention in animal feed and fruit industry.

Keywords: penicillin sodium, *Rhodotorula mucilaginosa*, 18S rRNA, species identification, highly efficient degradation

收稿日期: 2018-07-05

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150149); 国家轻工技术与工程一流学科自主课题项目(LITE2018-07)。

* 通信作者: 徐建中(1984—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事工业微生物选育、生物能源和生物新材料等方面的研究。

E-mail: xujianzhong@jiangnan.edu.cn

青霉素作为一种高效、广谱的抗生素具有很强的抑菌杀菌作用,但是在实际生活中,特别是医疗和畜禽养殖业很容易过度使用而导致抗生素渗入环境介质中,进而影响环境微生物群的结构和活性,诱导产生各类抗生素耐药菌^[1-2]。当前,国内外在城市污水、养殖场废水与土壤中都有检测到较高的抗生素残留,因此从源头上控制抗生素的使用,以及在对含抗生素的废渣废液进行排放前进行高效的处理显得尤为重要。此外,我国是世界上最大的青霉素生产国和出口国,会产生大量的青霉素菌渣,传统处理中菌渣作为废弃物进行填埋或者焚烧处理,浪费了大量有机资源,且不能有效处理掉菌渣中残留的青霉素,对环境存在巨大的潜在威胁。目前,我国还没有完整且成熟的化学集中处理工艺,且耗资较大,不适用于菌渣大规模的处理。相比之下,利用堆肥化处理青霉素菌渣,通过堆肥过程中微生物作用降解残留青霉素,拥有绿色、环保、经济、处理方式简单等优点。因此,从土壤或菌渣中筛选得到一种具有高效降解青霉素能力的菌株,将极大地缩短堆肥化的时间,提高菌渣中残留青霉素降解效率,不仅实现了菌渣的无害化处理,还对菌渣的进一步回收利用具有极大的实际意义和经济价值。

国内已有部分关于降解青霉素的研究,例如岳喜庆^[3]等分离出一株能高效降解青霉素钠的菌 WM1,在菌株接种体积分数为 10%并以青霉素钠为惟一碳源的条件下,培养 9 h 对初始质量浓度为 10 mg/L 的青霉素钠的降解率达到 100%;付欢^[4]等筛选出一株对青霉素具有高效降解能力的菌 JZ6,在培养条件为 30 ℃、pH 6.7 并且外加碳氮源的条件下,培养 24 h 可以对初始质量浓度为 300 mg/L 的青霉素的降解率达到 99.98%;赵娟^[5]等分离出一株具有高效降解青霉素能力的菌 PC-2,在接种体积分数为 14%,培养温度为 37 ℃、pH 7.0 左右的培养条件下,外加碳氮源,培养 6 h 可使菌株对初始质量浓度为 400 mg/L 的青霉素的降解率达到 98%。已研究菌株对青霉素的抗性较低,降解效率虽然可在较短时间内达到 99%,但青霉素初始质量浓度较低,无法满足工业特别是一些含有较高质量浓度的青霉素的菌渣的初步处理要求,限制了菌株在实际生产生活中的应用。

作者通过从青霉素钠生产企业附近的土壤样

品中分离筛选出具有较高青霉素钠抗性的菌株,考察菌株对青霉素钠的降解能力,并探究菌株在一定条件下的最佳降解条件,以期得到一种高浓度的青霉素钠的高效降解菌。此菌株可用于处理含有较高浓度的青霉素钠的菌渣、工业废水及农场废弃物等,带来更大的实际效益,实现安全、高效的排放。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

样品为取青霉素生产企业附近的土壤若干,青霉素钠 160 万单位,华北制药集团生产。主要仪器有电子显微镜、紫外可见分光光度计、高效液相色谱仪、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪等。

1.2 主要培养基

LBG 培养基:葡萄糖 5 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,NaCl 10 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 7.0。

降解培养基:KH₂PO₄ 3 g,K₂HPO₄ 1 g,NaCl 0.1 g,MgSO₄·7H₂O 2 mg,MnSO₄ 2 mg,FeSO₄·7H₂O 2 mg,CaCl₂ 1 mg,碳源 5 g,氮源 5 g,蒸馏水定容至 1 000 mL。

培养基于 121 ℃灭菌 20 min,如要制成固体培养基则向培养基中加入终质量浓度为 20 g/L 的琼脂条。对于降解培养基,青霉素钠溶液过滤除菌后按一定终质量浓度添加。

1.3 方法

1.3.1 菌株鉴定

1) 降解青霉素钠菌株的富集和分离 称取样品土壤各 10 g,分别放入装有 100 mL 无菌水和一层玻璃珠的锥形瓶中,100 r/min 摇床振荡 15 min,充分打散,制成菌悬液,取蒸馏水稀释至 10⁻⁴~10⁻⁶倍,取菌悬液 150 μL 涂布到含青霉素钠质量浓度为 5 g/L 的 LBG 培养基上,置于 30 ℃恒温培养箱中培养 48 h。挑取生长良好的菌株逐步转接至含青霉素钠质量浓度为 10、15、20、30 g/L 的 LBG 培养基上,选择能耐受较高质量浓度的青霉素钠的菌株进行分离纯化。通过对菌落菌体的形态特征观察初步确定菌株的种属。

2) 全基因组的提取及 18S rRNA 的扩增 全基因组的提取采用康为世纪酵母基因组 DNA 提取试剂盒。使用通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株的 18S rRNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物测序由通用生物系统(安徽)有限公司完成。

3) 序列同源性比对及系统发育树的构建 根据测序结果在 NCBI 中进行 Blast 比对,并在 MEGA 7.0 软件中用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,并进行 1 000 次 Bootstraps 检验。

1.3.2 青霉素钠降解菌株生长曲线的测定 挑取 1~2 环菌株接入 LBG 培养基中,30 ℃摇瓶培养至菌液浑浊后以 1%接种体积分数接入降解培养基中,并于最适生长条件下进行摇瓶培养,定时取样测定菌液的 OD₆₀₀ 值。

1.3.3 青霉素钠降解菌降解效率的测定

1) 样品制备与液相色谱条件 向基础培养基中加入终质量浓度为 10 g/L 的青霉素钠,含有最佳碳氮源的降解培养基记作第一组,不加入碳氮源的降解培养基记作第二组。取于最佳生长条件下培养 32 h 的发酵液 1 mL 加入 4 mL 缓冲液(乙腈:水=4:1)中,混匀后 10 000 r/min 高速离心 10 min,上清液进行液相处理。色谱检测条件为 225 nm,进样量 20 μL,流速 0.5 mL/min,流动相选用 V(磷酸二氢钾(pH 3.5)):V(甲醇)=38:62^[6]。

2) 青霉素钠溶液标准曲线的测定 青霉素钠溶液的标准质量浓度曲线:用降解培养基作为溶剂配置不同质量浓度的青霉素钠溶液并作 3 个平行样,在相同色谱条件下进样,以青霉素钠质量浓度为横坐标,对应色谱图的峰面积为纵坐标绘制青霉素钠质量浓度的标准曲线。

1.3.4 接种体积分数对降解效率的影响 在含有青霉素钠终质量浓度为 10 g/L 的降解培养基中分别接种体积分数 1%、5%、10%、15%、20%、30% 的菌液,于 30 ℃的恒温摇床中培养,取 24 h 的菌液进行液相色谱分析。

1.3.5 青霉素钠的初始质量浓度对降解效率的影响 在已知最佳菌株接种体积分数的降解培养基中,加入终质量浓度分别为 5、10、15、20、30、40 g/L 的青霉素钠,于 30 ℃的恒温摇床中培养,取 24 h 的菌液进行液相色谱分析。

1.3.6 培养时间对降解效率的影响 确定出菌株的最佳接种体积分数和青霉素钠的初始质量浓度后,在该条件下 30 ℃的恒温摇床中培养,分别取 12、24、36、48、60、72、84 h 的菌液进行分析,探究培养时间对降解效率的影响。

1.3.7 Anti-Pen20 降解青霉素钠的产物分析 取菌株在降解培养基中培养 24 h 的发酵液进行液相

色谱-质谱联用技术分析,确定菌株降解青霉素钠的产物。

2 结果与讨论

2.1 菌株的鉴定

2.1.1 菌株的初步鉴定结果 将土壤样品中的菌株涂布在含有质量浓度为 5 g/L 青霉素钠的 LBG 培养基上,培养后挑选出 8 株耐药菌株,分别编号为 J1、J2、J3、J4、J5、J6、J7、J8,通过划线分离纯化再逐步提高培养基中青霉素钠的质量浓度至 30 g/L,以及后期对各菌株降解青霉素钠效率的比较,最终在青霉素钠的质量浓度为 20 g/L 的 LBG 培养基上挑选出一株生长良好的青霉素钠高效降解菌株 J4,命名为 Anti-Pen20。对 Anti-Pen20 的划线分离结果见图 1(a)。在 LBG 固体培养基上菌落呈橙红色且具有光泽,圆形,边缘光滑,易挑起。从电镜图片 1(b)中可以看到菌株 Anti-Pen20 为椭圆形,无鞭毛,菌体表面光滑,有出芽现象,菌体长 5 μm,宽 3 μm 左右。

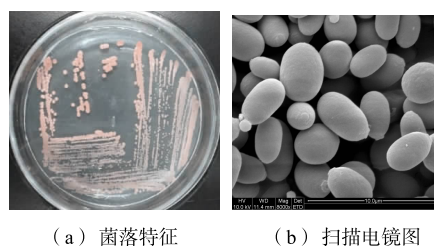


图 1 菌株 Anti-Pen20 的菌落特征及电镜扫描图

Fig. 1 Colony characteristics and electron microscope scans of strain Anti-Pen20

2.1.2 菌株的分子鉴定结果 经初步的生理生化鉴定菌株 Anti-Pen20 为酵母菌属,采用康为世纪酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取 Anti-Pen20 的全基因组,通过 PCR 扩增获得菌株的 18S rRNA 基因的目的片段,由琼脂糖凝胶电泳显示片段的大小约为 700 bp 左右,见图 2。对 PCR 产物纯化后进行测序,测序结果显示,菌株 Anti-Pen20 的 18S rRNA 长度为 621 bp,其序列如下:

```
TTTCCTCCGCCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGG
GTAGTCCTACCTGATTTGAGATCTAATCTTAAAAT
GTAGACATTCTGATTAGAAGCTTCCTTTAACCCAA
CCCGGCTCTAATCCGAAGATTAGAATTCCTCAGCG
AATAGTCTATTACGCCAAGTCAATCCGAAGTTCGA
TTGCGGATGCTAATGCATTACGAACGAGCTAGAC
```


CGTAAAGGCCAGCAGCGCTCAGAAACCAAACACC
TCTTCAATCATTAAGAAAGAGGAGGGTTGAAGTA
TTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCACGGAAT
ACCATGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGAT
GATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCG
CATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAA
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTATTTTGTATATAA
ATTTAATACATTCATAGACTTTGTGTTTATAAGTGA
ATAGGAGTTCCGCCCTCTTGGAGAGTTACTATCCC
AAACAAATGCACAGGGTTAGAAAGTGAGAGTTTCG
GACTCCAAGTTAAGTTGGACGTCCTATATTCATA
ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTTACGGAA

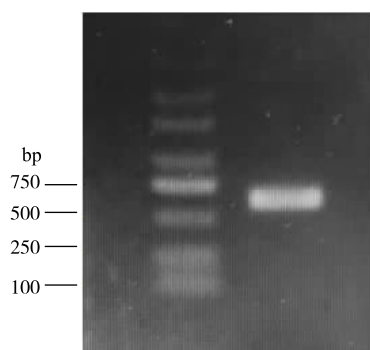


图2 18S rRNA PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of 18S rRNA

将测序结果在 NCBI 上进行序列比对,发现菌株 Anti-Pen20 与粘质红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 的序列同源性在 99% 以上,通过 MEGA7 软件中的 Neighbor-Joining 分析方法构建出菌株的系统发育树图^[7-8],见图 3。菌株 Anti-Pen20 已保藏在中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, 简称 CCTCC), 菌种保藏登记号为: CCTCC M 2018202。

目前部分关于粘质红酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 的研究表明,粘质红酵母表现出良好的拮抗酵母特性,其能在水果表皮上生长而对由病菌引起的水果病变表现出显著的拮抗效果^[9-10],可以控制并降解水果及其制品中的展青霉素^[11]。另有报道表明,粘质红酵母可通过添加至鱼类、家禽类的养殖饲料中来增强养殖动物的抗病性,提高产品质量^[12-13]。

2.2 菌株 Anti-Pen20 的生长曲线

图 4 为菌株 Anti-Pen20 在降解培养基中的生长曲线图,生长温度为 30 ℃,pH 7.0,恒温摇床转速

100 r/min。由图 4 可以看出, Anti-Pen20 在前 8 个小时内生长较慢, 培养的第 8~16 小时为菌株的生长对数期,在培养 20 h 后进入了生长稳定期。

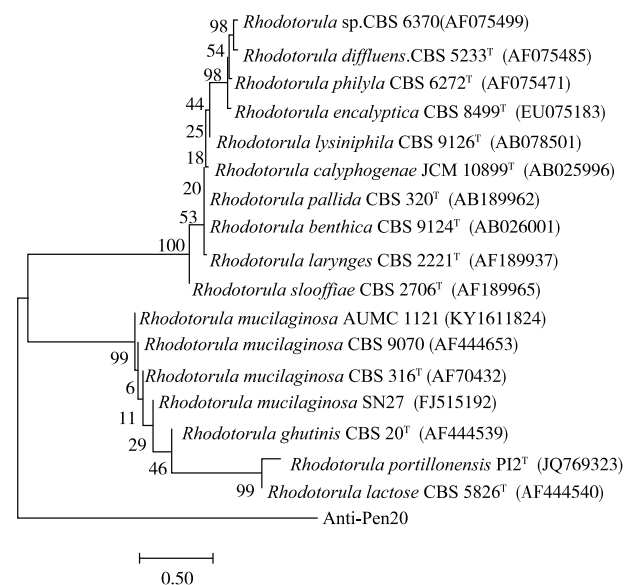


图3 菌株 Anti-Pen20 的系统发育树图

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain Anti-Pen20

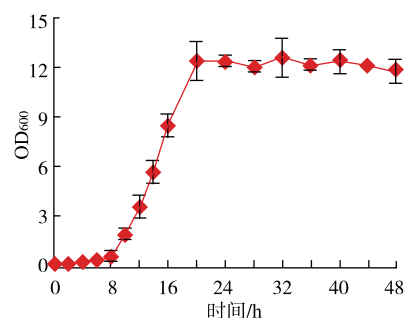


图4 Anti-Pen20 的生长曲线图

Fig. 4 Growth curve of Anti-Pen20

2.3 接种体积分数对降解效率的影响

在培养基中青霉素钠初始质量浓度为 10 g/L、30 ℃恒温摇床培养 24 h 的条件下,不同接种体积分数 Anti-Pen20 菌液中青霉素钠降解率见图 5。从图 5 可知,青霉素降解率在接种体积分数为 1%~15% 区间逐步上升,但在接种体积分数超过 15% 时,降解率显著降低,因此菌株 Anti-Pen20 降解青霉素钠的最佳接种体积分数为 15%。

2.4 青霉素钠的初始浓度对降解效率的影响

在确定接种体积分数为 15% 的条件下,向培养基中加入不同质量浓度的青霉素钠溶液,在 30 ℃恒温摇床中培养 24 h,得到的降解结果见图 6。从图

6 可知,在测试的青霉素钠质量浓度为 5~20 g/L 范围内,菌株 Anti-Pen20 对青霉素钠的降解率都保持较高水平,其中青霉素钠质量浓度为 20 g/L 时的降解率达到 85%。然而,但青霉素钠质量浓度大于 20 g/L 时,降解率显著下降,其原因可能是高质量浓度的青霉素钠溶液抑制了菌株的生长,从而影响青霉素钠的降解。因此,确定菌株 Anti-Pen20 最佳青霉素钠降解质量浓度为 20 g/L。

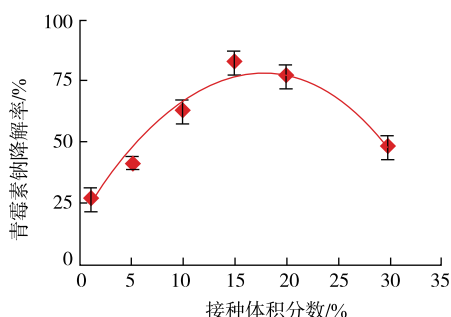


图 5 接种体积分数对降解效率的影响

Fig. 5 Effect of inoculum size on degradation efficiency

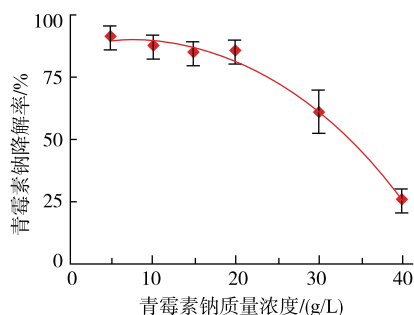


图 6 青霉素钠的初始质量浓度对降解效率的影响

Fig. 6 Effect of initial concentration of penicillin sodium on degradation efficiency

2.5 培养时间对青霉素钠降解效率的影响

菌株 Anti-Pen20 在接种体积分数为 15%,青霉素钠初始质量浓度为 20 g/L 的条件下,在前 24 小时内的降解青霉素钠的速率较快,12 h 时降解率可达 41%,24 h 降解率可达 83%,而在 24 h 后青霉素钠降解率虽然仍在增加,但降解速率显著下降,见图 7,这可能与培养基中营养物质的消耗、代谢产物的积累有关^[15-16]。

2.6 菌株 Anti-Pen20 降解青霉素钠的产物分析

将菌株 Anti-Pen20 在降解培养基中培养 24 h 后的发酵液处理后进行液质联用分析,得到的质谱图见图 8。由物质的质荷比联系物质的分子结构分

析可知,产物中存在着青霉素的几种标志性降解产物,主要有青霉素噻唑酸及去羧青霉素噻唑酸,符合 β -内酰胺酶作用的降解产物,见表 1^[17]。

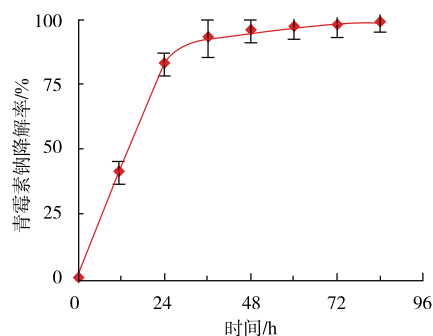


图 7 培养时间对青霉素钠降解率的影响

Fig. 7 Effect of culture time on penicillin sodium degradation rate

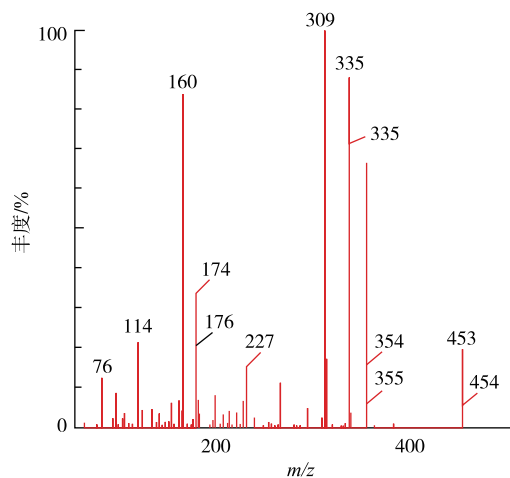


图 8 降解产物二级质谱图

Fig. 8 Secondary spectra of degradation products

表 1 Anti-Pen20 降解青霉素钠的主要产物

Table 1 Main degradation products of penicillin sodium

物质	分子式	相对分子量	m/z
邻氯青霉素噻唑酸	$C_{19}H_{21}ClN_3O_6$	453	454
青霉素 G	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334	335
青霉素噻唑酸	$C_{16}H_{21}N_2O_5S$	352	353
去羧青霉素噻唑酸	$C_{15}H_{21}N_2O_3S$	308	309
碎片 1	$C_{15}H_{19}N_2O_3S$	306	307
碎片 2	$C_7H_{12}NO_2S$	173	174
碎片 3	$C_6H_{10}NO_2S$	159	160

3 结 语

从青霉素钠生产企业附近的土壤中筛选出一株具有青霉素钠抗性的菌株 Anti-Pen20,通过生理

生化以及分子水平鉴定,发现该菌与粘质红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)的序列同源性超过99%。通过高效液相色谱分析作图,发现青霉素钠在10 g/L范围内响应峰的峰面积与青霉素钠质量浓度高度契合一级反应动力学方程式 $y=244.21x+1.6087$,其中 y 表示液相色谱响应峰面积, x 表示青霉素钠质量浓度, $R^2=0.9999$ 。优化降解条件后发现,Anti-Pen20降解青霉素钠的最佳接种体积分数为15%,青霉素钠的最佳质量浓度为20 g/L,随着培养时间

的增加,菌株对青霉素钠降解效率逐渐降低。通过对Anti-Pen20降解青霉素钠的产物进行质谱分析,发现产物中主要有青霉素噻唑酸及去羧青霉素噻唑等。

Anti-Pen20所具有的高效降解青霉素钠的能力以及粘质红酵母本身的特性,有望应用于具有高质量浓度青霉素钠菌渣的处理回收,也可以为Anti-Pen20在动物饲料添加剂以及果业中作为防病变添加剂的应用提供研究依据。

参考文献:

- [1] MARTINEZ J L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants[J]. **Environmental Pollution**, 2009, 157(11):2893-2902.
- [2] KEMPER N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment[J]. **Ecological Indicators**, 2008, 8(1):1-13.
- [3] 岳喜庆,王桐,单提波,等.一株青霉素钠降解菌的分离与鉴定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6):169-171.
- [4] 付欢,刘惠玲,王璞. 高效降解青霉素菌的筛选鉴定及降解效果研究[J]. 环境保护科学, 2015, 41(1):42-45.
- [5] 赵娟,张振华,段会英,等. 青霉素菌渣堆肥过程中青霉素钠降解菌的分离与鉴定[J]. 环境科学研究, 2016, 29(2):271-278.
- [6] 吕元元,任钟旗,张卫东,等. 高效液相色谱法测定青霉素 G 的方法改进[J]. 中国药业, 2008, 17(13):18-19.
- [7] POHL C H, SMIT M S, ALBERTYN J. *Rhodotorula bloemfonteinensis* sp. nov. *Rhodotorula eucalyptica* sp. nov. *Rhodotorula orientis* sp. nov. and *Rhodotorula pini* sp. nov. yeasts isolated from monoterpene-rich environments[J]. **International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology**, 2011, 61(Pt 9):2320.
- [8] LAICH F, VACA I, CHĂ V R. *Rhodotorula portillonensis* sp. nov. a basidiomycetous yeast isolated from Antarctic shallow-water marine sediment[J]. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2013, 63(10):3884-3891.
- [9] 束兆林,杨红福,陈红州,等. 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)对梨果采后青霉病、灰霉病的控制效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8):110-112.
- [10] FAN Qing, TIAN Shiping. Postharvest biological control of rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*[J]. **Plant Disease**, 2000, 84(11):1212-1216.
- [11] 杨其亚. 胶红酵母控制苹果展青霉素及降解的应答调控机制[D]. 镇江:江苏大学, 2017.
- [12] 王纯,孙国祥,刘志培,等. 解淀粉芽孢杆菌和胶红酵母复合菌对虹鳟生长性能及胃黏膜、肠黏膜菌群结构的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4):746-756.
- [13] 李貌. 胶红酵母固态发酵工艺优化及其发酵产物对蛋鸡蛋白质和免疫性能的影响[D]. 重庆:西南大学, 2017.
- [14] 刘杰凤,马超,刘正辉,等. 海洋石油降解酵母的分离鉴定与降解特性[J]. 环境科学研究, 2013, 26(8):899-905.
- [15] 冯福鑫,许旭萍,程群星,等. 四环素高效降解酵母菌 *Trichosporon mycotoxinivorans* XPY-10 降解特性[J]. 环境工程学报, 2013, 7(12):4779-4785.
- [16] LIU Y, WANG F, XIA S Q, et al. Study of 4- t-octylphenol degradation and microbial community in granular sludge[J]. **Journal of Environmental Sciences**, 2008, 20(2):167-171.
- [17] 赵凤娟,岳振峰,张毅,等. 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱研究人工“无抗奶”中青霉素类药物的降解产物[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(02):339-351.