

一株林可霉素降解菌的筛选鉴定及其降解机制

任省涛¹, 莫改敬², 陈红¹, 王振宇¹, 王海磊^{*1}

1 河南师范大学生命科学学院 功能微生物绿色转化技术河南省工程实验室, 河南 新乡 453007

2 河南科技学院, 河南 新乡 453003

任省涛, 莫改敬, 陈红, 王振宇, 王海磊. 一株林可霉素降解菌的筛选鉴定及其降解机制[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 997-1009.

REN Shengtao, MO Gaijing, CHEN Hong, WANG Zhenyu, WANG Hailei. Isolation and working mechanism characterization of a lincomycin-degrading bacterial strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 997-1009.

摘要:【背景】抗生素污染越来越引起人们的关注。利用微生物处理抗生素污染被认为是一种环境友好型的方法。【目的】筛选林可霉素高效降解菌并研究其降解机制。【方法】经形态学观察、生理生化鉴定和 16S rRNA 基因测序分析进行鉴定; 通过 PCR 技术和质谱分析技术对该菌抗性基因和降解产物等进行分析。【结果】从林可霉素菌渣堆肥样本中获得一株高效降解林可霉素的假单胞菌(*Pseudomonas* RST-1), 该菌在林可霉素浓度为 3.0 g/L 的牛肉膏蛋白胨培养基上培养 40 h 后, 林可霉素降解率高达 57.3%。该菌含有 *int11*、*sul1*、*sul2* 等抗性基因, 降解产物为去甲基林可霉素和 2-丙基-N-甲基脯氨酸。【结论】菌株 RST-1 具有高效降解林可霉素的能力, 推测可能的降解机制为去甲基化和酰胺键水解作用, 该菌株降解特性及降解机制研究为林可霉素降解工程菌及其高效降解菌剂的研制奠定了基础。

关键词: 抗生素; 林可霉素; 假单胞菌属; 抗性基因; 降解产物

Isolation and working mechanism characterization of a lincomycin-degrading bacterial strain

REN Shengtao¹, MO Gaijing², CHEN Hong¹, WANG Zhenyu¹, WANG Hailei^{*1}

1 Henan Provincial Engineering Laboratory for Bioconversion Technology of Functional Microbes, College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

2 Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China

Abstract: [Background] Antibiotic pollution has aroused increasing concern. Degradation of

资助项目: 河南省高等学校重点科研项目(22A610004); 河南师范大学博士科研启动项目(5101049170202)

This work was supported by the Key Scientific Research Program of Henan Education Department (22A610004) and the Henan Normal University Doctoral Scientific Research Fund (5101049170202).

*Corresponding author. E-mail: whl@htu.cn

Received: 2022-06-23; Accepted: 2022-09-28; Published online: 2022-11-24

environmental antibiotics by biological methods is considered to be an environmentally friendly approach to deal with antibiotic contamination. **[Objective]** To screen out a bacterial strain with efficient lincomycin degradation and study its degradation mechanism. **[Methods]** The strain was identified based on physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence. The antibiotic resistance genes were identified by PCR and the degradation products of lincomycin by mass spectrometry. **[Results]** An efficient lincomycin-degrading strain *Pseudomonas* RST-1 was isolated from a lincomycin mycelia dreg composting sample. After incubation in the beef extract peptone medium with 3.0 g/L lincomycin for 40 h, *Pseudomonas* RST-1 degraded up to 57.3% of lincomycin. The strain carried antibiotic resistance genes such as *int11*, *sul1*, and *sul2*. The results of mass spectrometry revealed that lincomycin was degraded into demethylincomycin and 2-propyl-N-methylproline. **[Conclusion]** The strain RST-1 has the ability to degrade lincomycin efficiently, which may be achieved through demethylation and amide bond hydrolysis. These results laid a foundation for the construction of lincomycin-degrading strains and development of efficient degradation microbial agents.

Keywords: antibiotic; lincomycin; *Pseudomonas*; antibiotic resistance genes; degradation products

林可霉素是一种具有重要临床意义的抗生素, 广泛用于人或动物革兰氏阳性致病菌的感染^[1]。林可霉素主要作用于敏感菌核糖体的 50S 亚基, 阻止肽链的延长, 从而抑制细菌的蛋白质合成^[2]。据统计, 我国常用的 36 种抗生素中林可霉素使用广泛, 使用量约为 7 820 t, 显著高于四环素类(6 950 t)和青霉素(6 730 t)^[3]。畜禽粪便、生活污水、抗生素药渣等废弃物中常常检测到林可霉素的存在。然而, 相较于其他抗生素, 林可霉素性质稳定, 常规方法降解时间长、效率低^[4-5], 如何处理好林可霉素类抗生素污染成为当前研究的难题。

林可霉素菌渣是林可霉素发酵过程中产生的固体废弃物^[6], 因其含有高含量的林可霉素残留而被列为危险固体废弃物^[7]。我们课题组前期运用好氧堆肥法处理林可霉素菌渣, 发现林可霉素菌渣与糠醛渣混合堆肥后, 林可霉素残留虽然有所降解, 但是残留量仍有 50 mg/kg^[8], 严重限制了其无害化利用。同时, 随着长时间的抗生素残留压力, 堆肥过程中抗生素抗性基因剧增^[9-10]。因此, 人工筛选高效降解林可霉素

的微生物, 将其制备成微生物菌剂应用于堆肥体系, 有助于林可霉素的快速降解, 减少林可霉素对堆肥微生物群落的胁迫作用, 从而有利于降低堆肥中抗性基因和耐药菌的丰度, 实现林可霉素菌渣的无害化处理。

生物强化是指通过添加微生物菌剂来提高生物降解速度的过程。通过外加高效降解菌剂或原位筛选降解菌制成菌剂的形式加入反应体系, 可以显著提高抗生素、氨氮、杀虫剂、石油污染物等有机污染物的降解水平^[11-13]。Liu 等^[14]将土曲霉 FZC3 菌属加入庆大霉素菌渣堆肥体系中进行研究, 结果表明该菌的加入显著提高了庆大霉素的降解效率。李玮琳等^[15]在猪粪堆肥中接种抗生素降解菌剂, 结果表明抗生素去除率达 81.95%, 而且降低了细菌群落网络复杂性, 优化了有益菌和其他菌群的生态关系。

本文从林可霉素菌渣堆肥中分离到一株降解林可霉素菌, 经过 16S rRNA 基因测序、生理生化鉴定、抗性基因 PCR 扩增以及林可霉素降解产物分析等研究, 以期获得在畜禽粪便、污泥、制药固体废弃物等固废的处理有应用前

景的菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

用于筛选林可霉素降解菌的样品采集于河南新乡惟益肥业有限公司的林可霉素菌渣堆肥, 选择该堆肥高温期样品, 放入事先准备好的无菌袋中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存带回实验室。

1.1.2 主要试剂、仪器和培养基

化学试剂葡萄糖、牛肉膏、蛋白胨均为分析纯, Oxoid 公司; $2\times\text{M5 Taq HiFi PCR Mix}$, 北京聚合美生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit, TaKaRa 公司; 抗性基因引物由武汉擎科生物有限公司合成。超净工作台, 苏州智净净化设备有限公司; 离心机, Beckman Coulter 公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司(上海); 紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; PCR 仪和凝胶成像系统, 赛默飞世尔科技有限公司(中国); 核酸蛋白质分析仪 NanoDrop ND-1000, NanoDrop 公司; 三重四级杆飞行时间质谱仪, 布鲁克公司。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 25.0, 琼脂 18.0, pH 7.2–7.3, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min, 冷却后向其中添加林可霉素使其终浓度为 3.0 g/L。无机盐培养基(g/L): K_2HPO_4 1.5, KH_2PO_4 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, MgSO_4 0.03, NaCl 1.0。pH 调至 7.0, 向其中添加林可霉素使其抗生素含量最终浓度为 3.0 g/L。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选

将林可霉素菌渣堆肥样本用无菌生理盐水进行 10^{-1} – 10^{-5} 梯度稀释, 将不同浓度的稀释液涂布于含 3.0 g/L 林可霉素的牛肉膏蛋白

胨培养基平板上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 挑取形态较大的单菌落划线纯化, 反复纯化 3 次获得纯菌株。将该菌株于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行斜面保存并进行后续实验。

1.2.2 扫描电镜观察

在菌株 RST-1 生长指数期(OD_{600} 为 0.6–1.5) 时取样, 吸取 1.0 mL 的发酵液, 于 8 000 r/min 离心 3 min 后弃上清。根据孙镇平等^[16]研究方法, 依次用 2.5% 戊二醛固定 2 h, 然后用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗, 乙醇梯度脱水、叔丁醇置换等最后置于盖玻片上, 自然晾干后离子溅射镀金, 高真空条件下观察。

1.2.3 林可霉素检测

将菌株 RST-1 接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 40 h。定期取样测定林可霉素含量。林可霉素检测采用 HPLC 检测, 参照任省涛等研究方法^[17]: 色谱柱为 C18 柱, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测器为紫外检测器, 检测波长为 214 nm, 流动相为 0.05 mol/L 硼砂溶液(85%磷酸调节 pH 6.0): 甲醇体积比为 50:50; 流速为 1 mL/min, 样品进样量为 10 μL 。

1.2.4 16S rRNA 基因序列测定

提取 RST-1 菌株的基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: $10\times\text{buffer}$ 5 μL , 27F 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA (50 ng/ μL) 10 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL , 加 ddH₂O 补足 50 μL 。PCR 反应条件: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增后的目的条带送北京擎科生物科技有限公司测序。将测序结果与 NCBI 的 GenBank 数据库进行比对, 选取与所测序列相似性较高的种或属, 应

用 MEGA 软件,采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.2.5 林可霉素抗性基因的 PCR 扩增

首先通过 NCBI 对林可霉素抗性基因进行搜索,找出相应抗性基因的序列全长。然后应用 Primer premier 5 软件进行引物设计,引物序列见表 1。以提取的 RST-1 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:前引物和后引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,DNA (200 ng/ μL) 0.5 μL , 2 \times M5 HiPer plus *Taq* HiFi PCR Mix (with blue dye) 10 μL ,加 ddH₂O 补足 20 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测抗性基因

条带。

1.2.6 林可霉素降解产物的测定

菌株 RST-1 接种于无机盐培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 40 h 后取样,然后以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 15 min,取上清进行降解产物测。利用质谱仪对林可霉素降解产物进行分析。质谱条件为:电子喷雾离子源(electron spray ionization),正离子扫描模式,毛细管电压为 4.0 kV,气体温度为 350 $^{\circ}\text{C}$ 。在 100–1 000 m/z 范围内采用全扫描方式采集。首先通过 m/z 在总离子色谱仪中鉴定出林可霉素降解产物,然后在此基础上,利用二级质谱对产物离子进行了进一步的分析。通过二级质谱特征峰,分析林可霉素降解产物。

表 1 林可霉素抗性基因引物

Table 1 Lincomycin resistance genes PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Products length (bp)
<i>ermA</i>	F: AAAACCCAAAGGACACTC R: ATTCCACCATCAATAGCA	438
<i>ermB</i>	F: AACGACGAAACTGGCTAA R: CTGTGGTATGGCGGGTAA	413
<i>ermC</i>	F: GGGGATTTTACCCTTGAA R: AATGCCAATGAGCGTTTT	308
<i>intI1</i>	F: TTCGGCATTCTGAATCTCACC R: GCAGTCCGCTCAGCAAT	348
<i>lnuB</i>	F: TGAGTACGGAACAGAGGT R: GTTTAGCCAATTATCAGCAT	376
<i>lnuC</i>	F: TCAGTCAAGAGCCCATAA R: TCAAACCTCGTATCCCAGA	318
<i>lnuA</i>	F: ACTTATTGGTTAGATGGTGGCT R: CCTTCTGGGTTTGCTTGG	257
<i>sul1</i>	F: TTCGGCATTCTGAATCTCACC R: GCAGTCCGCTCAGCAAT	348
<i>sul2</i>	F: TTTTCGGCATCGTCAACATAA R: AGAGCGAGGTTTCGGGAGC	789
<i>vgaA</i>	F: CATTATCGCCATCTGTCA R: AATTCTTCCGAAGGTTCA	541
<i>vgaB</i>	F: CGAAATCGTTGGAAACAC R: TTCTAATGCCTCAACAGC	569

2 结果与分析

2.1 林可霉素降解菌形态观察

图 1 是利用普通显微镜和扫描电镜进行林可霉素降解菌菌落和单菌观察图。由图 1 可知, 菌株在平板上生长 36 h 后, 可以观察到菌落为乳白色, 呈圆形, 半透明, 表面光滑、湿润、凸起、边缘完整; 同时革兰氏染色为阴性、杆状细菌。电镜观察显示该菌为长杆状, 长为 5.0–6.0 μm , 宽为 0.4–0.5 μm 。经后续半固体穿刺培养实验(表 2)发现, 该菌具有鞭毛运动性,

推测可能电镜制片过程中导致鞭毛丢失。

2.2 林可霉素降解菌生理生化特性

表 2 是对菌株 RST-1 进行的生理生化实验结果。由表 2 可以看出, 菌株 RST-1 革兰氏阴性、无芽孢、具有鞭毛, 具有运动能力; 能够将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 不产吲哚; 能够以葡萄糖、阿拉伯糖、淀粉等为唯一碳源生长。

2.3 菌株 RST-1 生长曲线和林可霉素降解曲线

图 2 是菌株 RST-1 的生长曲线和林可霉素降解曲线图。由图 2 可以看出, 以不加 RST-1

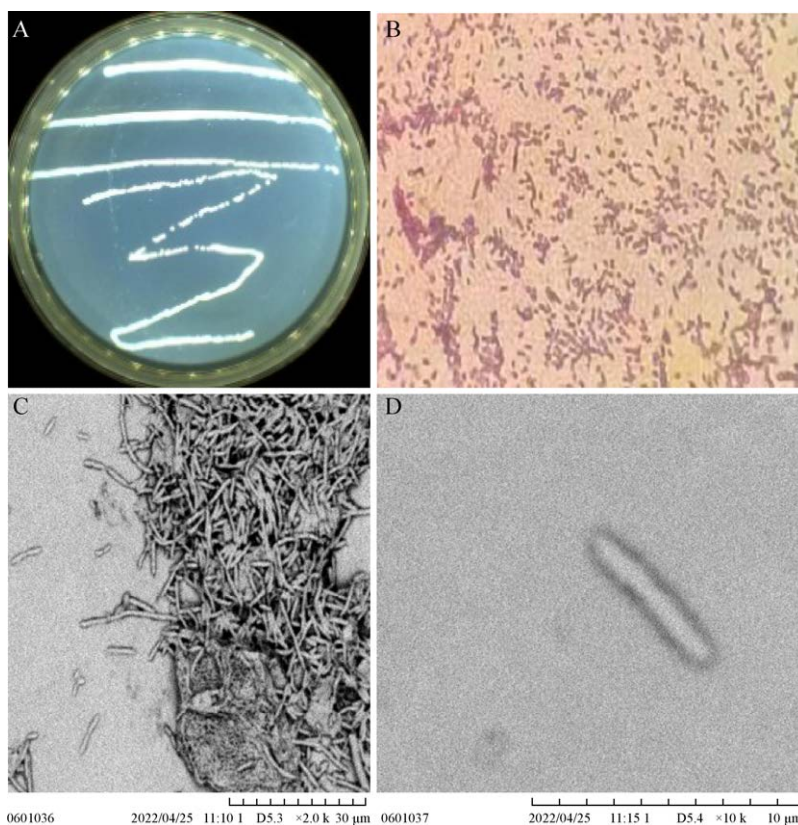


图 1 菌株 RST-1 菌落和细胞形态 A: 牛肉膏蛋白胨平板上菌株 RST-1 显微镜下菌落形态. B: 菌株 RST-1 在显微镜下细胞革兰氏染色结果. C: 菌株 RST-1 在扫描电镜下的细胞形态. D: 菌株 RST-1 在扫描电镜下的单细胞形态

Figure 1 Colony morphology and cell morphology of strain RST-1. A: The colony morphology of strain RST-1 on beef paste protein medium. B: Its Gram staining picture. C: Multicellular cells morphology of strain RST-1 under scanning electron microscope. D: Single cells morphology of strain RST-1 under scanning electron microscope.

表 2 菌株 RST-1 的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain RST-1

表型检测 Phenotype detection	结果 Result
运动性 Motility	+
硝酸盐还原能力 Nitrate reducing capacity	+
吲哚生成 Indole production	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
麦芽糖 Maltose	-
甘露糖 Mannose	-
柠檬酸钠 Sodium citrate	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+
鞭毛 Flagella	+
芽孢染色 Spore stain	-
革兰氏染色 Gram stain	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

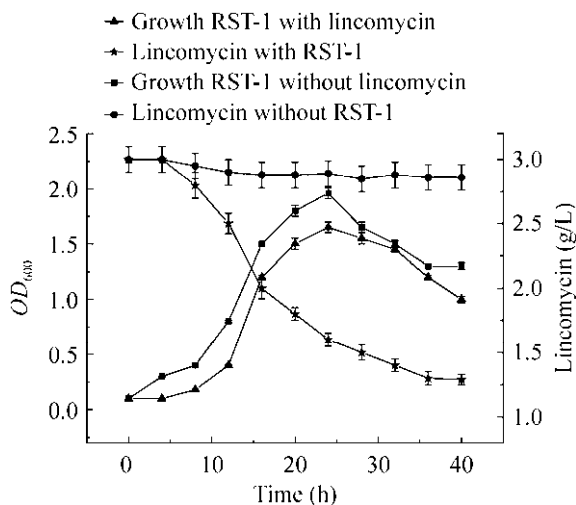


图 2 菌株 RST-1 在牛肉膏蛋白胨培养基上的生长曲线和林可霉素降解曲线图

Figure 2 Growth and lincomycin degradation curves of RST-1 strain in beef-protein medium.

菌的培养基作对照, 培养 40 h 后, 林可霉素浓度为 2.86 g/L, 林可霉素降解率仅为 4.7%。加入 RST-1 菌培养 40 h, 林可霉素浓度为 1.29 g/L 降解率高达 57.3%, 表明 RST-1 菌属具有高效

降解林可霉素的能力。同时, 从生长曲线可以看出, 林可霉素的加入对菌株 RST-1 生长初期 (0–8 h) 具有抑制作用, 此时菌体生长缓慢, 林可霉素降解也较少。8 h 内, 降解率仅为 16.7%。随着菌株生长进入指数期 (8–20 h), 林可霉素降解加剧; 此时林可霉素降解率高达 40.2%。随后菌株进入衰亡期 (20–40 h), 林可霉素降解变缓, 最终林可霉素降解效率为 57.3%。此前, 王莹等^[18]筛选出一株林可霉素降解菌, 经过 16S rRNA 基因测序表明该菌为寡养单胞菌属, 降解率最高为 39.5%。Zhang 等^[19]从林可霉素发酵废渣中筛选出一株降解林可霉素的酵母菌, 经鉴定该菌为 *Galactomyces geotrichum*, 该酵母菌对林可霉素降解率为 37.0%。由此可见, 菌株 RST-1 比此前发现的可降解林可霉素的菌株具有更高效的降解林可霉素的能力。

2.4 菌种鉴定

利用菌株 RST-1 的基因组 DNA 为模板, 使用 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增目的条带。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收并测序, 得到一段长度为 1 394 bp 的序列, 提交至 GenBank 登录号为 (OP727561) 进行同源分析。发现菌株 RST-1 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*) strain CIP 104883 序列相似性最高, 为 99.83%。利用 MEGA 软件, 采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来, 保留步长值大于 50% 显示, 结果如图 3 所示, 菌株 RST-1 与蒙氏假单胞菌共处同一分支, 可初步判断菌株 RST-1 为假单胞菌属细菌 (*Pseudomonas* sp.)。很多文献表明, 蒙氏假单胞菌在油脂降解、纤维素降解、病毒钝化、环境污染物去除等方面具有很好的应用^[20–22]。本实验筛选的 RST-1 菌是否在其他污染物处理方面也有类似效果需要进一步研究。

2.5 林可霉素抗性基因分析

林可霉素抗生素抗性机理已知有 3 种方式: (1) 通过对细菌核糖体保护作用达到保护细胞的目的, 主要是 *erm*、*sul* 类抗性基因起作用; (2) 通过 *vag* 基因的外排泵作用将林可霉素排除菌体外; (3) 通过对林可霉素磷酸化作用或

者核苷酸化作用使其失活, 主要是 *lnu* 类基因起作用^[23]。本文通过对林可霉素抗性基因 PCR 扩增, 通过电泳条带有无研究其抗性机制, 探寻其降解机理。由图 4 电泳图可以看出, 菌株 RST-1 的 *int11*、*sul1*、*sul2* 泳道有明显条带, 表明该菌含有这些抗性基因, 推测该菌的

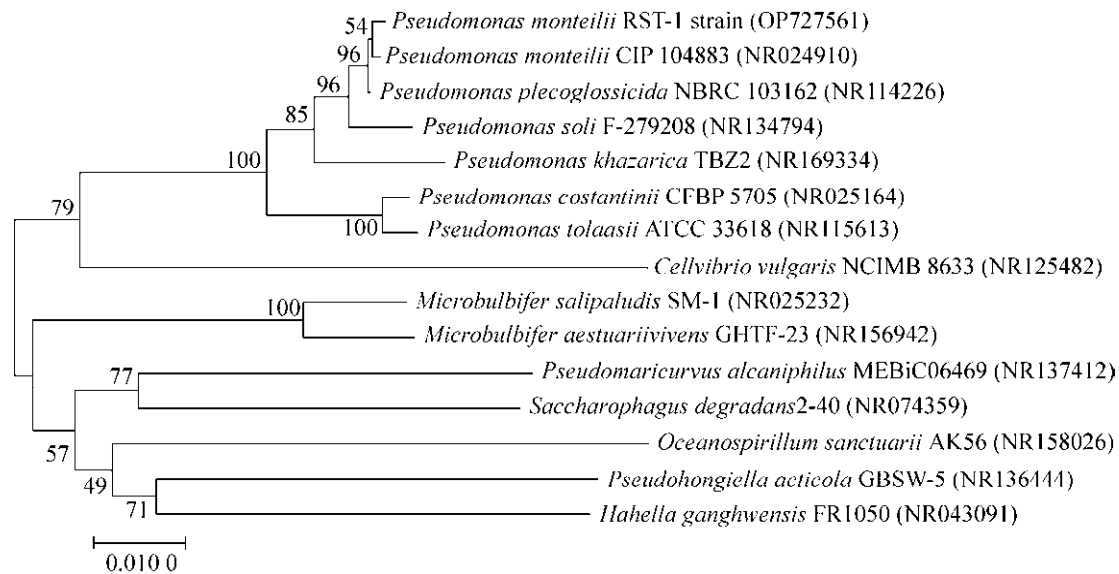


图 3 菌株 RST-1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中的序号为序列 GenBank 登录号; 分支点数值代表进化树 bootstrap 值; 分支长度代表进化距离, 标尺为 0.01

Figure 3 Phylogenetic tree of strain RST-1 based on 16S rRNA gene sequence. The GenBank accession No. of aligned sequences were shown in the parenthesis; Values at branch nodes represent bootstrap value; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.01.

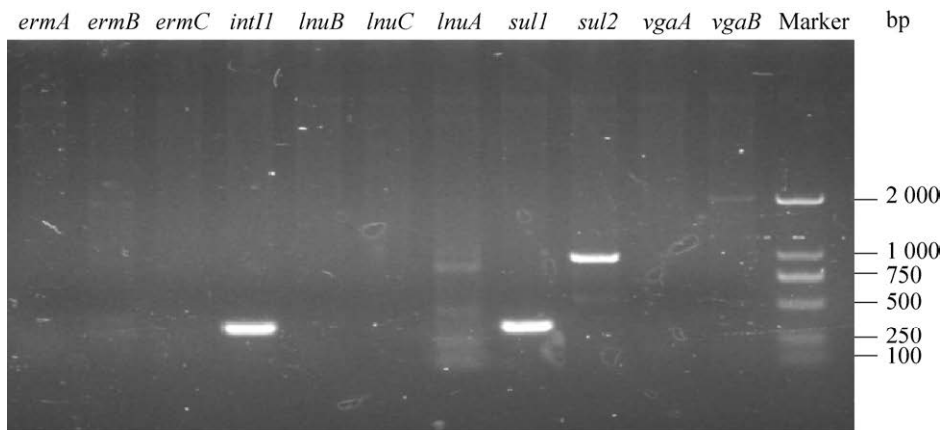


图 4 菌株 RST-1 抗性基因 PCR 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4 PCR agarose gel electrophoresis of RST-1 antibiotic resistance genes.

抗性机制主要为核糖体保护作用。同时,该菌含有转座子元件基因 *int11*,表明该菌在环境中可能存在抗性基因水平转移的风险^[24]。我们课题组在前期关于堆肥化处理林可霉素菌渣资源化研究中,发现堆肥样本中存在 *lunA* 基因,且质谱分析发现林可霉素存在磷酸化降解途径^[25]。然而本实验筛选的 RST-1 菌株中并未检测到 *lnu* 类基因的存在,推测林可霉素降解过程中可能未发生磷酸化作用。Wang 等^[26]从林可霉素菌渣中筛选到一株林可霉素耐药菌 *Clostridium* sp.,并对该菌抗性基因进行了引物扩增,结果表明该菌含有 *lnu* 类基因 *lnuB* 抗性基因,并基于降解产物证明该基因参与了林可霉素降解。刘苏瑶等^[27]从林可霉素生产药厂废水中筛选出一株半乳糖霉菌,并发现该菌中环氧化物水解酶基因 *dgs1* 在降解林可霉素的过程中起了重要作用。

2.6 林可霉素降解机理分析

为了分析林可霉素的去向,采用质谱仪测定可能的林可霉素降解产物。首先经过一级质谱确定分子量,然后根据二级质谱确定可能的分子结构,结果如图 5 和表 3 所示。林可霉素分子($m/z=407.22$)有 2 个主要的碎片峰($m/z=126.13$ 和 359.21),分别通过 3-丙基-N-甲基吡咯烷的裂解和 1 个甲硫基的丢失而形成^[28]。分子量为 393 的物质经二级质谱后显示具有 112.11 和 345.21 这 2 个特征峰,经鉴定为去甲基林可霉素。去甲基林可霉素是林可霉素合成过程中的中间产物^[29]。本实验检测到去甲基林可霉素,表明 RST-1 菌株可能存在有逆林可霉素的合成途径的降解途径。此前,Li 等^[30]从抗生素废水处理厂中筛选 3 株林可霉素降解菌,也发现了林可霉素的降解存在去甲基化降解机制。分子量为 172.13 的物质经二级质谱后显示具有 126.13 的特征碎片峰,经鉴定为 2-丙基-N-甲基

脯氨酸,表明林可霉素分子中酰胺基团中的 C-N 键发生了水解作用^[31]。类似地,在青霉素的生物降解中发现酰胺酶的存在导致青霉素酰胺键水解,从而分解青霉素^[32],菌株 RST-1 降解林可霉素过程中是否存在类似的酰胺酶,需要后续进一步研究。

3 讨论与结论

我国抗生素年产量约 24.8 万 t,位居世界第一。作为抗生素发酵过程中的固体废弃物-抗生素菌渣更是高达 200 万 t 以上。这些抗生素菌渣相较于畜禽粪便、污水污泥等具有更高的抗生素残留,如果任其随意排放且不及时处理,必然会产生更大的环境污染^[33]。同时,这些抗生素菌渣有机质含量丰富,资源化利用价值巨大,如何高效去除抗生素残留对实现抗生素菌渣的资源化具有重要意义。

堆肥法是利用环境微生物或人为添加微生物菌剂的代谢作用消除其中污染物,实现固体废弃物的资源化利用。堆肥法一直是处理畜禽粪便、污水污泥等固体废弃物的重要方式^[34]。堆肥法处理抗生素菌渣也有很多相关报道,但是由于抗生素菌渣本身抗生素残留量较高(1%~5%),自然堆肥处理后堆体中依然含有高含量的抗生素残留,这些高浓度抗生素的持续存在会改变堆肥微生物群落结构,增加耐药菌和耐药基因的丰度,存在严重的生态风险^[35]。如何高效、快速地降低抗生素残留,减少抗生素对环境产生的持续胁迫作用是解决该类污染物资源化的关键。因此,本文从林可霉素菌渣堆肥样本中原位筛选出林可霉素降解菌 RST-1,研究其降解特性及其降解机理,有助于制备高效林可霉素降解菌剂,通过生物强化实现林可霉素菌渣中林可霉素的快速消解,实现林可霉素菌渣的资源化。

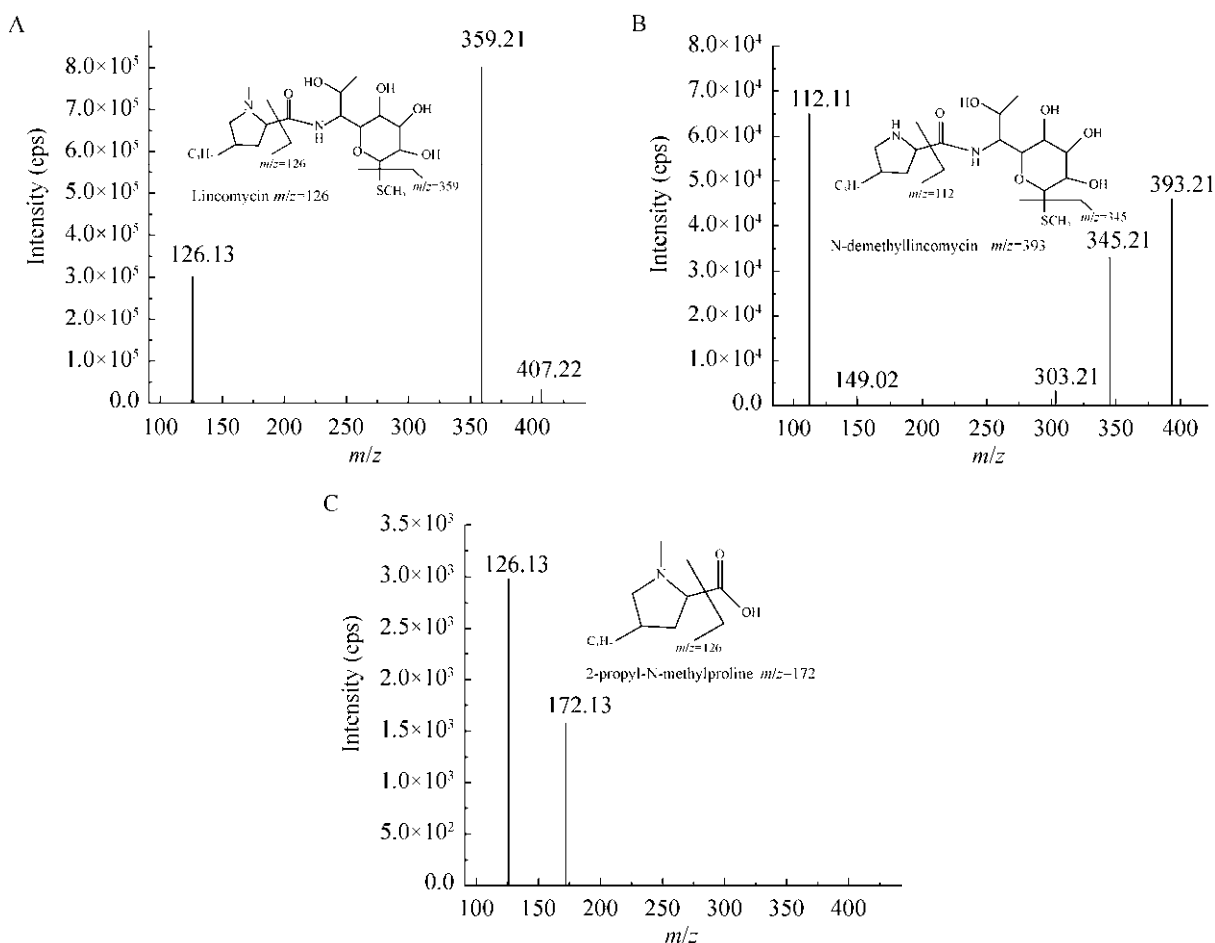


图5 菌株 RST-1 降解林可霉素过程中降解产物的二级质谱图 A: 林可霉素分子二级质谱图及对应的分子结构式. B: 去甲基林可霉素分子二级质谱图及对应的分子结构式. C: 2-丙基-N-甲基脯氨酸分子二级质谱图及对应的分子结构式

Figure 5 Secondary mass spectrometry of lincomycin degradation products by strain RST-1. A: Secondary mass spectrometry of lincomycin and its corresponding molecular structures. B: Secondary mass spectrometry of demethyl lincomycin its corresponding molecular structures. C: Secondary mass spectrometry of its corresponding molecular structures.

表3 菌株 RST-1 降解林可霉素的降解产物分析

Table 3 Analysis of lincomycin degradation product by strain RST-1

降解机理	降解产物	分子式	一级质谱	二级质谱特征碎片
Degradation mechanism	Degradation products	Molecular formula	Primary mass spectrometry (m/z)	Characteristic fragmentation of secondary mass spectrometry (m/z)
去甲基化	林可霉素	$C_{18}H_{35}N_2O_6S$	407.22	126.13, 359.21, 407.22
Demethylation	去甲基林可霉素	$C_{17}H_{33}N_2O_6S$	393.21	112.11, 345.21, 393.21
	Demethyl lincomycin			
酰胺键水解	2-丙基-N-甲基脯氨酸	$C_9H_{17}NO_2$	172.13	126.13, 172.13
Amide bond hydrolysis	2-propyl-N-methylproline			

本研究筛选的林可霉素降解菌株 RST-1 在牛肉膏蛋白胨培养基和林可霉素浓度 3.0 g/L 的高浓度下, 培养 40 h 降解率高达 57.3%, 与以往研究相比表现出较强的降解能力^[36]。同时, 本文对 RST-1 菌株降解林可霉素的机理进行了探究。通过设计不同抗性机制的引物进行 PCR 检测, 研究该菌对林可霉素的抗性机制, 然后通过液相-质谱分析, 分析林可霉素的可能降解产物, 分析其降解途径。根据林可霉素抗性基因 3 种抗性机制设计引物进行 PCR 检测, 结果发现菌株 RST-1 具有 *int11*、*sul1*、*sul2* 等抗性基因, 表明该菌含有外排和核糖体保护作用等抗性机制。*int11* 转座子基因与很多抗生素抗性基因的水平转移有关^[37], *int11* 的检出表明该菌在环境中存在抗性基因水平转移的生态风险。本文通过对发酵液进行质谱分析, 鉴定出去甲基林可霉素和 2-丙基-N-甲基脯氨酸两种成分, 表明菌株 RST-1 降解林可霉素的过程中发生了去甲基化和酰胺键水解作用。目前, 关于林可霉素去甲基化和酰胺键水解对应的酶或基因尚无相关报道。林可霉素合成过程中首先合成林可霉素前体-去甲基林可霉素, 然后在 *lmbJ* 基因产生的甲基转移酶作用下合成林可霉素^[38]。*lmbJ* 基因产生的甲基转移酶是否可逆, 或者存在其他的去甲基化作用还有待研究。Crofts 等^[39]从土壤中筛选出 4 株青霉素降解菌, 通过基因组、转录组和代谢组分析青霉素可能的降

解途径。结果表明, 可能的途径是: 青霉素首先被 β -内酰胺酶分解产生苄基青霉酸, 然后通过酰胺酶水解, 变成苯乙酸, 通过苯乙酸分解代谢途径形成乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A 作为碳源进入三羧酸循环(图 6)。菌株 RST-1 是否也存在这样的酰胺酶参与林可霉素降解还需进一步研究。

目前, 关于抗生素污染更多关注的是抗生素浓度、耐药菌及其抗性基因的污染^[40-42], 对抗生素的微生物降解基因、降解产物及其降解机制研究相对有限^[43-44]。基于此, 一方面利用分子生物学手段结合代谢组学技术, 从分子生物学水平上解析抗生素降解机理, 明晰降解过程中的限速步骤; 另一方面去除转座子、质粒等导致抗性基因水平转移的移动元件, 这些研究或许是今后构建林可霉素高效降解菌的研究方向。

综上所述, 本文从林可霉素菌渣堆肥中是选出一株高效林可霉素降解菌。分子生物学鉴定该菌株 RST-1 系蒙氏假单胞菌属, 革兰氏阴性、杆状(0.4–0.5) $\mu\text{m} \times (5.0–6.0) \mu\text{m}$, 该菌在林可霉素的 3.0 g/L 浓度下发酵 48 h 后降解率为 57.3%。同时对该菌可能的抗性机制和降解机制进行分析, 表明菌株 RST-1 对林可霉素的降解主要发生了去甲基化和酰胺键水解作用, 并且该菌含有 *int11*、*sul1*、*sul2* 等抗性基因, 推测该菌的抗性机制主要为核糖体保护作用并存在抗性基因转移风险。

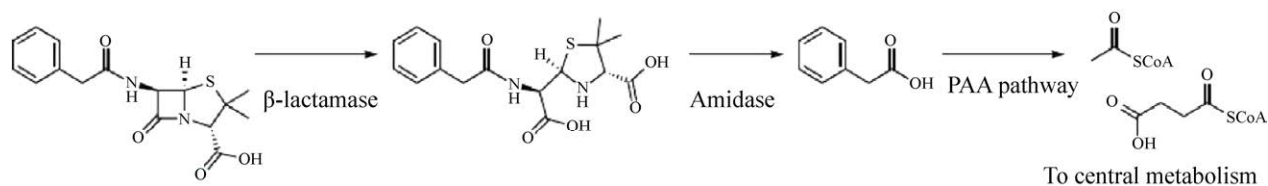


图 6 青霉素可能的降解途径^[39]

Figure 6 Hypothesized pathway for penicillin degradation^[39].

REFERENCES

- [1] LUO XY, YANG Q, LIN YT, TANG ZJ, TOMBERLIN JK, LIU W, HUANG YP. Black soldier fly larvae effectively degrade lincomycin from pharmaceutical industry wastes[J]. Journal of Environmental Management, 2022, 307: 114539.
- [2] SCHREIER J, KARASOVA D, CRHANOVA M, RYCHLIK I, RAUTENSCHLEIN S, JUNG A. Influence of lincomycin-spectinomycin treatment on the outcome of *Enterococcus cecorum* infection and on the cecal microbiota in broilers[J]. Gut Pathogens, 2022, 14(1): 3.
- [3] ZHANG QQ, YING GG, PAN CG, LIU YS, ZHAO JL. 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 & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [4] ZHOU LJ, HAN P, ZHAO MY, YU YC, SUN DY, HOU LJ, LIU M, ZHAO Q, TANG XF, KLÜMPER U, GU JD, MEN YJ, WU QL. Biotransformation of lincomycin and fluoroquinolone antibiotics by the ammonia oxidizers AOA, AOB and comammox: a comparison of removal, pathways, and mechanisms[J]. Water Research, 2021, 196: 117003.
- [5] MEHRTENS A, LICHA T, BURKE V. Occurrence, effects and behaviour of the antibiotic lincomycin in the agricultural and aquatic environment-a review[J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146306.
- [6] WANG MM, LIU HL, DAI XH. Dosage effects of lincomycin mycelial residues on lincomycin resistance genes and soil microbial communities[J]. Environmental Pollution, 2020, 256: 113392.
- [7] WANG MM, LIU HL, CHENG XM, ZHANG B, CAI C, WANG J. Hydrothermal treatment of lincomycin mycelial residues: antibiotic resistance genes reduction and heavy metals immobilization[J]. Bioresource Technology, 2019, 271: 143-149.
- [8] REN ST, GUO XL, LU AQ, GUO XY, WANG Y, SUN GP, GUO WW, REN CB, WANG LZ. Effects of co-composting of lincomycin mycelia dregs with furfural slag on lincomycin degradation, maturity and microbial communities[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 155-162.
- [9] REN ST, LU AQ, GUO XY, ZHANG QQ, WANG Y, GUO XL, WANG LZ, ZHANG BB. Effects of co-composting of lincomycin mycelia dregs with furfural slag on lincomycin degradation, degradation products, antibiotic resistance genes and bacterial community[J]. Bioresource Technology, 2019, 272: 83-91.
- [10] 任省涛, 郭夏丽, 芦阿虔, 张倩倩, 郭笑盈, 王岩, 王连忠, 张宝宝. 林可霉素菌渣堆肥抗生素抗性基因变化分析[J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4276-4283.
- REN ST, GUO XL, LU AQ, ZHANG QQ, GUO XY, WANG Y, WANG LZ, ZHANG BB. Variations of antibiotic resistance genes during lincomycin mycelia dreg composting[J]. China Environmental Science, 2018, 38(11): 4276-4283 (in Chinese).
- [11] 张玉秀, 豆梦楠, 朱康兴, 柴团耀, 张怡鸣, 徐伟超. 嗜淋降解菌 *Rhodococcus* sp. 的降解特性与生物强化作用[J]. 中国环境科学, 2017, 37(6): 2340-2346.
- ZHANG YX, DOU MN, ZHU KX, CHAI TY, ZHANG YM, XU WC. Bioaugmentation and characteristics of a quinoline-degrading strain *Rhodococcus* sp.[J]. China Environmental Science, 2017, 37(6): 2340-2346 (in Chinese).
- [12] 王硕, 胡振, 刘紫君. 耐冷氨氧化功能菌群强化人工湿地低温脱氮[J]. 中国环境科学, 2020, 40(2): 640-646.
- WANG S, HU Z, LIU ZJ. Enhanced nitrogen removal of constructed wetland under low temperature based on cold resistant ammonia-oxidizing functional consortia[J]. China Environmental Science, 2020, 40(2): 640-646 (in Chinese).
- [13] 刘向阳, 张千, 吴恒, 李宸, 唐健泓, 封丽, 肖芃颖, 赵天涛. HN-AD 菌生物强化接触氧化工艺处理猪场沼液[J]. 环境科学, 2019, 40(5): 2349-2356.
- LIU XY, ZHANG Q, WU H, LI C, TANG JH, FENG L, XIAO PY, ZHAO TT. Treatment of piggery biogas slurry by enhanced biological contact oxidation with HN-AD bacteria[J]. Environmental Science, 2019, 40(5): 2349-2356 (in Chinese).
- [14] LIU YW, FENG Y, CHENG DM, XUE JM, WAKELIN S, LI ZJ. Dynamics of bacterial composition and the fate of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during the co-composting with gentamicin fermentation residue and lovastatin fermentation residue[J]. Bioresource Technology, 2018, 261: 249-256.
- [15] 李玮琳, 张昕, 马军伟, 孙万春, 成琪璐, 林辉. 抗生素降解菌剂对猪粪堆肥腐熟和细菌群落演替的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(10): 4789-4800.
- LI WL, ZHANG X, MA JW, SUN WC, CHENG QL, LIN H. Effect of antibiotic-degrading bacteria on maturity and bacterial community succession during pig manure composting[J]. Environmental Science, 2022, 43(10): 4789-4800 (in Chinese).
- [16] 孙镇平, 李佳, 刘洪红, 王忠敏, 孙伟, 李敬盼, 单哲, 薛太平, 顾玉泉. 不同处理技术对环境扫描电镜下细

- 菌原始形态的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, 34(1): 41-43.
- SUN ZP, LI J, LIU HH, WANG ZM, SUN W, LI JP, SHAN Z, XUE TP, GU YQ. The impact of different processing techniques on the original form of environmental scanning electron microscope bacteria[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2013, 34(1): 41-43 (in Chinese).
- [17] 任省涛, 郭夏丽, 芦阿度, 张倩倩, 郭笑盈, 王岩, 王连忠, 张宝宝. 林可霉素菌渣堆肥微生物群落多样性分析[J]. 环境科学, 2018, 39(10): 4817-4824.
- REN ST, GUO XL, LU AQ, ZHANG QQ, GUO XY, WANG Y, WANG LZ, ZHANG BB. Microbial community diversity analysis during composting of lincomycin mycelia dreg with manure[J]. Environmental Science, 2018, 39(10): 4817-4824 (in Chinese).
- [18] 王莹, 刘凤霞, 李杰, 何际芳, 沈大战. 林可霉素降解菌 LD25#菌株的分类鉴定及其降解特性研究[J]. 南阳理工学院学报, 2017, 9(6): 114-120.
- WANG Y, LIU FX, LI J, HE JF, SHEN DZ. Study on the identification and degradation characteristics of lincomycin-degrading bacteria ld 25# strain[J]. Journal of Nanyang Institute of Technology, 2017, 9(6): 114-120 (in Chinese).
- [19] ZHANG L, SHEN YL, HUI FL, NIU QH. Degradation of residual lincomycin in fermentation dregs by yeast strain S9 identified as *Galactomyces geotrichum*[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1333-1340.
- [20] 李庆元, 肖微微, 张本旭, 邢翔. 蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*)对食用油脂的利用效率研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(8): 46-49.
- LI QY, XIAO WW, ZHANG BX, XING X. The utilization efficiency of *Pseudomonas monteilii* to edible fats and oils[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(8): 46-49 (in Chinese).
- [21] 袁莲莲, 王耀锋, 刘相甫, 靳志伟, 张静, 李伟, 董石飞, 赵存孝, 黄明迪, 王凤龙, 杨金广. 蒙氏假单胞菌 3A 菌株对烟草漂浮育苗中 TMV 的钝化效果[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 37-42.
- YUAN LL, WANG YF, LIU XF, JIN ZW, ZHANG J, LI W, DONG SF, ZHAO CX, HUANG MD, WANG FL, YANG JG. Passivation effect of *Pseudomonas monteilii* 3A on Tobacco mosaic virus in tobacco float seedlings[J]. Plant Protection, 2017, 43(2): 37-42 (in Chinese).
- [22] 蔡茜, 何腾霞, 冶青, 李振轮. 耐冷嗜碱蒙氏假单胞菌 H97 的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 环境科学, 2018, 39(7): 3314-3320.
- CAI X, HE TX, YE Q, LI ZL. Identification and characterization of a hypothermic alkaliphilic aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas monteilii* strain H97[J]. Environmental Science, 2018, 39(7): 3314-3320 (in Chinese).
- [23] LI L, SUN J, LIU BT, ZHAO DH, MA J, DENG H, LI X, HU FY, LIAO XP, LIU YH. Quantification of lincomycin resistance genes associated with lincomycin residues in waters and soils adjacent to representative swine farms in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 364.
- [24] ZHU YG, GILLINGS M, SIMONET P, STEKEL D, BANWART S, PENUELAS J. Microbial mass movements[J]. Science, 2017, 357(6356): 1099-1100.
- [25] 任省涛. 好氧堆肥法无害化处理林可霉素菌渣研究[D]. 郑州: 郑州大学博士学位论文, 2020.
- REN ST. Study on harmlessness of lincomycin mycelia dregs by aerobic composting treatment[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Zhengzhou University, 2020 (in Chinese).
- [26] WANG MM, CAI C, ZHANG B, LIU HL. Characterization and mechanism analysis of lincomycin biodegradation with *Clostridium* sp. strain LCM-B isolated from lincomycin mycelial residue (LMR)[J]. Chemosphere, 2018, 193: 611-617.
- [27] 刘苏瑶, 雷绳尾, 张宏鑫, 牛秋红. 地霉菌对发酵药渣中残余林可霉素的生物降解[J]. 食品工业, 2022, 43(4): 188-192.
- LIU SY, LEI SW, ZHANG HX, NIU QH. Biodegradation of lincomycin residues in fermentation residue by *Geotrichum* sp.[J]. The Food Industry, 2022, 43(4): 188-192 (in Chinese).
- [28] WANG MM, ZHANG B, WANG J, CAI C, XIN YJ, LIU HL. Degradation of lincomycin in aqueous solution with hydrothermal treatment: kinetics, pathway, and toxicity evaluation[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 343: 138-145.
- [29] 张海丹. 林可霉素的生物合成及发酵工艺的调控[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2014.
- ZHANG HD. The research of lincomycin biosynthesis and fermentation process optimization[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology University, 2014 (in Chinese).
- [30] LI YH, FU LP, LI X, WANG Y, WEI YJ, TANG JF, LIU HM. Novel strains with superior degrading efficiency for lincomycin manufacturing biowaste[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 209: 111802.
- [31] 王梦梦. 林可霉素菌渣水热处理效能与土壤施用安全

- 性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2019.
- WANG MM. Performance of hydrothermal treatment of lincomycin mycelial residues (LMRs) and soil application safety investigation[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2019 (in Chinese).
- [32] 王礼君, 冯丽妍, 徐建中, 张伟国. 一株高效降解青霉素菌的筛选及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(5): 89-94.
- WANG LJ, FENG LY, XU JZ, ZHANG WG. Screening and identification of a high-efficiency penicillin sodium-degrading strain[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(5): 89-94 (in Chinese).
- [33] 倪巍洪, 钱斯日古楞, 周传文, 王红英. 土霉素菌渣源酵母菌的筛选及其培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3037-3048.
- NI WH, QIAN SRGL, ZHOU CW, WANG HY. Screening of yeast from oxytetracycline fermentation residue and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3037-3048 (in Chinese).
- [34] 赵彬涵, 孙宪响, 黄俊, 李少杰. 微生物在有机固废堆肥中的作用与应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 223-240.
- ZHAO BH, SUN XY, HUANG J, LI SJ. Application and effects of microbial additives in aerobic composting of organic solid wastes: a review[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 223-240 (in Chinese).
- [35] 田哲, 张昱, 杨敏. 堆肥化处理对畜禽粪便中四环素类抗生素及抗性基因控制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 936-943.
- TIAN Z, ZHANG Y, YANG M. Control of tetracyclines and resistance genes in animal manure by composting[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 936-943 (in Chinese).
- [36] 张小红, 王亚娟, 陶红, 张锐, 马志义. 一株同时降解4种四环素类抗生素降解菌的筛选及降解特性[J]. 环境化学, 2022, 41(8): 2761-2770.
- ZHANG XH, WANG YJ, TAO H, ZHANG R, MA ZY. Screened and degradation characteristics of a four tetracycline antibiotics degrading bacterium[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(8): 2761-2770 (in Chinese).
- [37] 苏志国, 张衍, 代天娇, 陈嘉瑜, 张永明, 温东辉. 环境中抗生素抗性基因与I型整合子的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2217-2233.
- SU ZG, ZHANG Y, DAI TJ, CHEN JY, ZHANG YM, WEN DH. Antibiotic resistance genes and class I integron in the environment: research progress[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2217-2233 (in Chinese).
- [38] 刘瑞华. 林可霉素生物合成的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1138-1145.
- LIU RH. Proceedings of lincomycin biosynthesis[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1138-1145 (in Chinese).
- [39] CROFTS TS, WANG B, SPIVAK A, GIANOULIS TA, FORSBERG KJ, GIBSON MK, JOHNSKY LA, BROOMALL SM, ROSENZWEIG CN, SKOWRONSKI EW, GIBBONS HS, SOMMER MOA, DANTAS G. Shared strategies for β -lactam catabolism in the soil microbiome[J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14(6): 556-564.
- [40] ZHANG ZY, ZHANG Q, WANG TZ, XU NH, LU T, HONG WJ, PENUELAS J, GILLINGS M, WANG MX, GAO WW, QIAN HF. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes[J]. Nature Communications, 2022, 13: 1553.
- [41] ABDURAHMAN MH, ABDULLAH AZ, SHOPARWE NF. A comprehensive review on sonocatalytic, photocatalytic, and sonophotocatalytic processes for the degradation of antibiotics in water: synergistic mechanism and degradation pathway[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 413: 127412.
- [42] VILA-COSTA M, GIOIA R, ACEÑA J, PÉREZ S, CASAMAYOR EO, DACHS J. Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism[J]. Water Research, 2017, 115: 309-317.
- [43] AHMAD F, ZHU DC, SUN JZ. Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives[J]. Environmental Sciences Europe, 2021, 33(1): 64.
- [44] LIANG DH, HU YY, HUANG RZ, CHENG JH, CHEN YC. Effects of various antibiotics on aerobic nitrogen removal and antibiotic degradation performance: Mechanism, degradation pathways, and microbial community evolution[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 422: 126818.