

# 两株微生物菌株对阿维菌素降解性能的研究

雒晓芳<sup>1,3</sup>, 徐开慧<sup>2</sup>, 王迎菲<sup>2</sup>, 王婉莹<sup>3</sup>, 许瑾<sup>3</sup>, 张禹晗<sup>2</sup>, 陈丽华<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>西北民族大学实验教学部; <sup>2</sup>西北民族大学化工学院; <sup>3</sup>西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030

**摘要:** 抗生素滥用问题给环境带来严重的影响, 寻求一种处理环境中残余抗生素的方法至关重要。本文采用单因素法与多因素法结合的方法, 测试枯草芽孢杆菌和志贺氏菌对阿维菌素的降解性能, 两株细菌表现出良好的阿维菌素降解性能。随后, 利用 Box-Behnken design 软件对实验结果进行响应面分析, 继而对阿维菌素的降解条件进行优化。枯草芽孢杆菌降解阿维菌素的优化条件为温度 35.43 °C、装样量 57.56 mL、菌种液量 3.85%, 此时可达到理论最大降解率 59.15%; 志贺氏菌降解阿维菌素的优化条件为温度 30.45 °C、装样量 60.24 mL、菌种液量 3.56%, 此时可达到理论最大降解率 65.34%。结果表明, 枯草芽孢杆菌及志贺氏菌是降解阿维菌素的性能优良的菌株, 其响应面模型确定系数均在 90% 以上。因此, 该模型可用于分析微生物菌株对阿维菌素的降解效果, 为实际中微生物菌株降解阿维菌素提供理论依据。

**关键词:** 阿维菌素; 枯草芽孢杆菌; 志贺氏菌; 微生物降解

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)12-2089-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.12.013

## Study on the degradation of avermectin by two microbial strains

LUO Xiao-fang<sup>1,3</sup>, XU Kai-hui<sup>2</sup>, WANG Ying-fei<sup>2</sup>, WANG WAN-Ying<sup>3</sup>, XU-Jin<sup>3</sup>, ZHANG Yu-han<sup>2</sup>, CHEN Li-hua<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Experimental Teaching Department, Northwest Minzu University; <sup>2</sup>Institute of Chemical Technology, Northwest Minzu University;

<sup>3</sup>College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China

**Abstract:** The abuse of antibiotics has a serious impact on the environment. It is very important to find a method to deal with the residual antibiotics in the environment. In this paper, the single factor method and multi factor method were used to test the degradation of avermectin by *Bacillus subtilis* and *Shigella*. The two strains showed good degradation of avermectin. Then, the response surface analysis of the experimental results was carried out by using box Behnken design software, and then the degradation conditions of avermectin were optimized. The optimum conditions for abamectin degradation by *Bacillus subtilis* were temperature 35.43 °C, sample loading 57.56 mL, bacterial concentration 3.85%, and the theoretical maximum degradation rate was 59.15%; The optimum conditions for the degradation of avermectin by *Shigella* were temperature 30.45 °C, sample loading 60.24 mL and bacterial concentration 3.56%. At this time, the theoretical maximum degradation rate was 65.34%. The results showed that *Bacillus subtilis* and *Shigella* were excellent strains for abamectin degradation, and the determination coefficients of response surface model were more than 90%. Therefore, the model can be used to analyze the degradation effect of abamectin by microbial strains, and provide a theoretical basis for the degradation of abamectin by microbial strains in practice.

**Key words:** avermectin; *Bacillus subtilis*; *Shigella*; microbial degradation

阿维菌素是一类典型的大环内酯类抗生素, 常用作兽药在畜牧业中发挥重要作用。随着畜牧业的蓬勃发展, 人类对抗生素的需求量也日益增加。目

前我国每年生产使用抗生素约为 18.9 万吨, 其中较大一部分被应用于畜牧养殖业, 其中兽药抗生素的使用量大约占到畜牧业使用抗生素总量的一半以上<sup>[1]</sup>。在 2010 年, 我国的兽药原料和使用量超过日本和美国, 成为世界第一兽药原料使用大国<sup>[2]</sup>。但大量使用的抗生素可能导致严重的后果, 兽药抗生素进入生物体后一部分被吸收, 而另一部分抗生素

收稿日期: 2022-05-13 接受日期: 2022-09-19

基金项目: 西北民族大学中央高校基本科研业务项目 (31920210136); 甘肃省自然科学基金 (21JR1RA204); 西北民族大学 2020 年创新团队项目 (SYSKF2019209)

\* 通信作者 E-mail: clh@xbmu.edu.cn

超出了受药牲畜的承受范围而被排出体内,借助迁移作用,抗生素随之转移到不同的生态系统中<sup>[3]</sup>,从而在水和土壤中不断累积,这会环境影响环境中生物的正常生命运转<sup>[4]</sup>。因此,高效简便地处理目前环境中残留的抗生素,防止其对生物造成进一步伤害成为了人们研究的热点。

目前抗生素的处理方法主要有物理吸附法、高级氧化法和微生物降解法<sup>[5]</sup>。由于人们环保意识不断加强,微生物降解法成为研究者青睐的技术<sup>[6]</sup>。现今,已报道的可降解阿维菌素的微生物主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[7]</sup>、不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)<sup>[8]</sup>、志贺氏菌(*Shigella*)<sup>[9]</sup>、白腐真菌<sup>[10]</sup>等,它们通常利用新陈代谢作用产生的大环内酯类降解酶对阿维菌素进行降解,但大多数研究仅简单通过单因素实验研究微生物对阿维菌素的降解特性,没有利用正交法或响应面法进一步分析,无法准确得出最优降解条件。故本实验以阿维菌素为代表抗生素,利用高效液相色谱法<sup>[11]</sup>测得不同温度、pH、装样量、菌种液量、培养时间条件下枯草芽孢杆菌、志贺氏菌对阿维菌素的降解特性,并利用响应面法<sup>[12]</sup>分析降解特性以得到该微生物菌株降解阿维菌素的最佳条件,以期为微生物降解阿维菌素乃至其余兽药抗生素的实际应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

95%阿维菌素原药(成都华夏试剂厂,20190327);无机盐培养基( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.5 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 蛋白胨 0.2 g, 蒸馏水定容至 1 L,  $\text{pH} = 7.0$ <sup>[13]</sup>);营养肉汤培养基(蛋白胨 10 g、牛肉浸出粉 3 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g, 蒸馏水定容至 1 L);乙腈(色谱纯);甲醇(色谱纯);枯草芽孢杆菌、志贺氏菌(兰州市黄河段河水中分离筛选)。

### 1.2 仪器

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);超净工作台(苏州智净净化设备有限公司);高压灭菌锅(日本 Hirayama 公司);分析天平(梅特勒-托利多公司)。

### 1.3 标准曲线的绘制

#### 1.3.1 液相色谱仪工作条件

选择测定波长 244 nm、流动相为甲醇-水、流动相比为 95:5、流量 1 min/mL、柱温 28 °C、进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.3.2 标准曲线的绘制

称量 100 mg 阿维菌素,放入 100 mL 棕色容量瓶中,加入甲醇至刻度线,配制成 1 000 mg/L 的阿维菌素母液,摇匀,放入冰箱备用。

分别移取阿维菌素母液加入无机盐培养基中稀释至 20、40、60、80、100 mg/L。然后从不同浓度阿维菌素溶液中分别移取 2 mL 至试管中,加入 4 mL 乙腈及 0.5 g NaCl,将试管于振荡器上振荡 1 min,静置 30 min<sup>[14]</sup>。取上层清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤。用高效液相色谱仪测得其峰面积,根据结果绘制成标准曲线。

### 1.4 单因素实验设计

将温度、pH、装样量、菌种液量、培养时间作为影响因素,测得其对各菌株降解能力的影响,筛选出影响最显著的三组因素进行多因素实验。

菌种液的制备:通过无机盐培养基在 50 mL 三角瓶中以 35 °C、pH 为 7、120 r/min 震荡通气条件下培养枯草芽孢杆菌和志贺氏菌。通过血细胞计数板计数,稀释菌种液的菌浓至约  $1 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 1.4.1 温度对降解性能的影响

根据一般细菌的生长温度范围为 5 ~ 60 °C,同时中性细菌的最适温度一般为 37 °C,设计温度梯度为 25、30、35、40、45 °C。固定实验条件装样量 80 mL(250 mL 三角瓶)、菌种液 1 mL、pH 7.0、120 r/min 震荡通气培养 6 d,研究温度对微生物菌株降解阿维菌素的影响。

#### 1.4.2 pH 对降解性能的影响

根据本实验所用菌株最适 pH 范围均为 7.2 ~ 7.6,设计 pH 梯度为 5、6、7、8、9,通过向培养基中加入适量盐酸或氢氧化钠调节 pH 至所需值。固定实验条件温度 35 °C、装样量 80 mL、菌种液 1 mL、培养时间 6 d,研究 pH 对微生物菌株降解阿维菌素的影响。

#### 1.4.3 装样量对降解性能的影响

设计装样量梯度为 40、60、80、100、120 mL,通过加入不同体积的无机盐培养基达到所需装样量。固定实验条件温度 35 °C、装样量 80 mL、菌种液 1 mL、培养时间 6 d,研究 pH 对微生物菌株降解阿维菌素的影响。

#### 1.4.4 菌种液量对降解性能的影响

设计菌种液量梯度为 0.625%、1.25%、2.5%、3.75%、5% (加入适量营养肉汤培养基对菌种液量为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬浮液进行稀释以达到目标浓度)。固定实验条件温度 35 °C、装样量 80 mL、

培养时间 6 d, 研究菌种液量对微生物菌株降解阿维菌素的影响。

#### 1.4.5 培养时间对降解性能的影响

设计培养时间梯度为 1、2、3、4、5、6 d。固定实验条件温度 35 ℃、装样量 80 mL、菌种液量 1.25%，研究培养时间对微生物菌株降解阿维菌素的影响。

### 1.5 多因素实验设计

根据单因素实验结果, 将温度、装样量、菌种液量作为自变量, 降解率为响应值, 利用 Design-Expert 中的 Box-Behnken 模块设计三因素三水平的响应面实验。每组实验重复 3 次。根据实验结果进行模型的建立及响应面分析。响应面设计因素与水平如表 1、表 2。

表 1 枯草芽孢杆菌响应面优化设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface optimization design of *Bacillus subtilis*

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature (℃)	B 装样量 Sample loading (mL)	C 菌种液量 Bacterial concentration (%)
-1	30	40	2.5
0	35	60	3.75
1	40	80	5

表 2 志贺氏菌响应面优化设计因素与水平

Table 2 Factors and levels of response surface optimization design of *Shigella*

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature (℃)	B 装样量 Sample loading (mL)	C 菌种液量 Bacterial concentration (%)
-1	25	40	2.5
0	30	60	3.75
1	35	80	5

利用 Design-Expert 对阿维菌素的降解实验进行设计, 可得出枯草芽孢杆菌及志贺氏菌对阿维菌素的理论最大降解率及此时的降解条件。将降解条件固定, 利用最佳降解条件对阿维菌素进行降解, 以验证优化后方案的准确性及可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线分析

由图 1 可知, 阿维菌素标准曲线的  $R^2 = 0.9973$ , 说明在 20 ~ 100 mg/L 范围内该曲线线性关

系良好, 可用于实验数据分析。

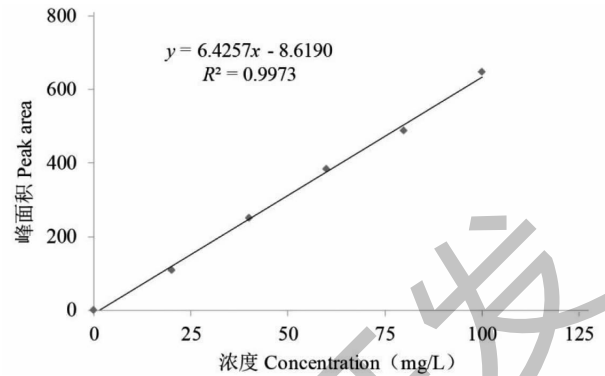


图 1 阿维菌素标准曲线

Fig. 1 Standard curve of avermectin

### 2.2 初筛实验结果分析

根据实验结果可知, 在 1 d 的培养时间内, 枯草芽孢杆菌对阿维菌素的降解率为  $(21.76 \pm 0.88)\%$ , 志贺氏菌对阿维菌素的降解率为  $(17.91 \pm 0.66)\%$ , 即说明分离筛选获得的两株细菌均有较好的阿维菌素降解能力, 可进一步优化研究其对阿维菌素的降解性能。

### 2.3 单因素实验分析

#### 2.3.1 温度单因素条件下微生物菌株对阿维菌素降解率的影响

温度是影响细菌生长的重要因素, 而细菌的生长量能够间接反应出其对抗生素的降解性能。由图 2 可知, 随着温度的升高, 枯草芽孢杆菌的降解率在 30 ~ 35 ℃ 时呈现上升趋势, 在 35 ℃ 时达到峰值, 超过 35 ℃ 则下降较明显, 说明枯草芽孢杆菌的生长和对阿维菌素降解性能与温度关系密切。志贺氏菌的降解率在 30 ℃ 时达到最大值, 高于 30 ℃ 呈下降趋势。当温度不为最适降解值时, 细胞的生长均会受

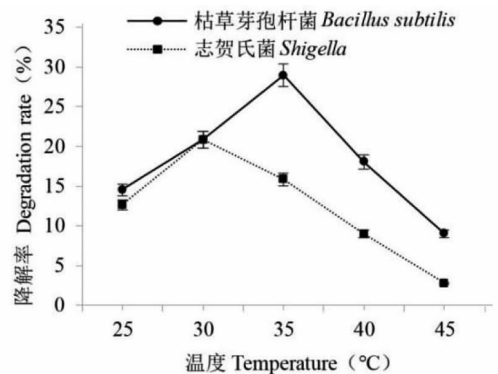


图 2 不同温度下阿维菌素的降解率

Fig. 2 Degradation rate of avermectin at different temperatures

到影响,过高的温度会抑制细菌体内酶的活性,从而  
影响细菌正常生长,而过低温度会抑制细菌的代谢  
活力。此外,在不同温度下,枯草芽孢杆菌对阿维菌素  
的降解率均高于志贺氏菌。因此,35 ℃ 是枯草芽  
孢杆菌的最适降解温度,30 ℃ 是志贺氏菌的最适降  
解温度。

### 2.3.2 装样量单因素条件下微生物菌株对阿维菌素降解率的影响

由图 3 可知,当影响因素为装样量时,两种菌株  
对阿维菌素降解率的变化趋势基本一致,在 40 ~ 60  
mL 时呈上升趋势,在装样量为 60 mL 时降解率达到  
峰值,大于 60 mL 时呈下降趋势。当装样量大于 60  
mL 时,体积较大的无机盐培养基会抑制细菌的呼吸  
作用,从而阻碍细菌的生长;当装样量较小时,无机  
盐培养基无法给细菌提供充足的营养,较少的生存  
空间也会进一步阻碍细菌生长。此外,细菌代谢会  
产生一些有害物质,过少的装样量会限制有害物  
质的扩散,继而影响细菌生长。因此,60 mL 为两种菌  
株的最适装样量。

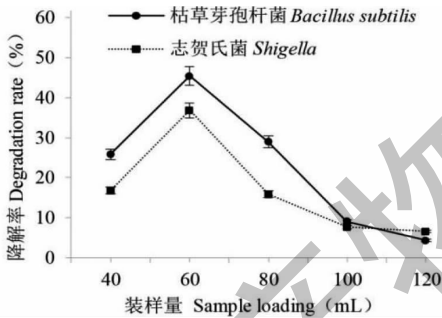


图 3 不同装样量条件下阿维菌素的降解率

Fig. 3 Degradation rate of avermectin  
at different sample loadings

### 2.3.3 初始菌种液量单因素条件下微生物菌株对阿维菌素降解率的影响

由图 4 可知,随着菌种液量的增加,枯草芽孢杆  
菌和志贺氏菌对阿维菌素的降解率均呈现先增加后  
降低趋势。枯草芽孢杆菌对阿维菌素的降解率在  
0.625% ~ 2.5% 快速增大,在菌种液量为 2.5% 时  
达到峰值,初始菌浓高于 2.5% ~ 5% 降解率则呈下  
降趋势。志贺氏菌对阿维菌素的降解率在 0.625%  
~ 3.75% 时逐渐增加,在菌种液量为 3.75% 时达到  
最大降解率,在 3.75% ~ 5% 之间呈下降趋势。当  
菌种液量过大时,培养基中细菌数量较多,营养物质  
无法维持细菌的进一步繁殖,从而使降解率下降。  
当菌种液量过小时,细菌生长需要一定时间,在 3 d  
内难以达到理想的降解浓度。同时,不同菌株的生  
长速率不同,从而影响其降解性能。因此,2.5% 是  
枯草芽孢杆菌的最适菌种液量,3.75% 是志贺氏菌  
的最适菌种液量。

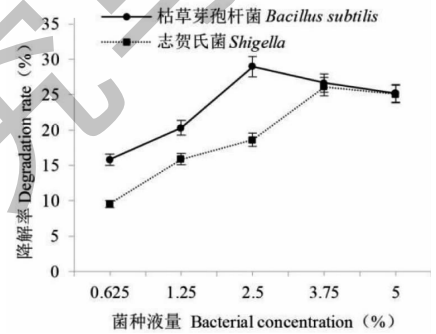


图 4 不同菌种液量下阿维菌素的降解率

Fig. 4 Degradation rate of avermectin at  
different bacterial concentrations

## 2.4 多因素实验设计

### 2.4.1 枯草芽孢杆菌响应面试验设计及结果分析

根据单因素实验结果,选择温度 30、35、40 ℃,  
装样量 40、60、80 mL,菌种液量 2.5%、3.75%、5%  
作为三因素三水平,利用 Box-Behnken 设计实验如  
表 3。

表 3 枯草芽孢杆菌响应面试验设计及结果分析

Table 3 Response surface test design and result analysis of *Bacillus subtilis*

试验号 Test number	A 温度 Temperature (°C)	B 装样量 Sample loading (mL)	C 菌种液量 Bacterial concentration (%)	降解率 Degradation rate (%)
1	0	0	0	55.96
2	0	1	-1	28.98
3	-1	1	0	21.90
4	1	0	-1	37.52

续表 3 (Continued Tab. 3)

试验号 Test number	A 温度 Temperature(°C)	B 装样量 Sample loading(mL)	C 菌种液量 Bacterial concentration(%)	降解率 Degradation rate(%)
5	0	1	1	12.52
6	0	-1	-1	25.88
7	0	0	0	57.63
8	0	-1	1	43.27
9	-1	0	-1	46.26
10	0	0	0	53.52
11	0	0	0	62.19
12	-1	0	1	48.02
13	1	-1	0	40.51
14	0	0	0	64.75
15	1	1	0	26.38
16	-1	-1	0	17.34
17	1	0	1	36.95

#### 2.4.2 枯草芽孢杆菌降解阿维菌素模型的建立及显著性检验与方差分析

根据 Box-Behnken 中设计结果可知,该二次模型  $P = 0.0088 < 0.01$ ,表明该模型是显著的,具有统计学意义。而失拟项  $P = 0.0746 > 0.05$ ,表明该模型失拟项不显著,没有失拟因素存在。该模型回归方程为:

$$R = 58.81 + 0.98A - 4.65B + 0.27C - 4.67AB - 0.58AC - 8.46BC - 8.88A^2 - 23.40B^2 - 7.75C^2$$

由表 4 可知,方程中  $A^2$  项和  $B^2$  项  $P < 0.05$ ,表明  $A^2$  和  $B^2$  项对  $R$  值影响显著。根据分析结果,影响阿维菌素降解率的影响因子主次顺序为装样量 > 温度 > 菌种液量。

表 4 枯草芽孢杆菌回归方程方差分析

Table 4 Results of variance analysis of regression model of *Bacillus subtilis*

方差来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 df	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	3 679.11	9	408.79	7.04	0.008 8	**
A	7.68	1	7.68	0.13	0.726 8	
B	173.17	1	173.17	2.98	0.127 9	
C	0.56	1	0.56	0.009 6	0.924 4	
AB	87.33	1	87.33	1.50	0.259 8	
AC	1.36	1	1.36	0.023	0.882 8	
BC	286.46	1	286.46	4.93	0.061 8	
$A^2$	331.74	1	331.74	5.71	0.048 2	*
$B^2$	2 305.76	1	2 305.76	39.69	0.000 4	**
$C^2$	252.65	1	252.65	4.35	0.075 5	
残差 Residual	406.63	7	58.09			
失拟度 Lack of fit	322.43	3	107.48	5.11	0.074 6	
纯误差 Pure error	84.21	4	21.05			
总离差 Cor total	4 085.75	16				

注: \*  $P < 0.05$ , 差异显著; \*\*  $P < 0.01$ , 差异极显著, 下同。

Note: \*  $P < 0.05$ , significant difference; \*\*  $P < 0.01$ , extremely significant difference, the same below.

### 2.4.3 枯草芽孢杆菌降解阿维菌素模型的响应面交互分析

根据枯草芽孢杆菌的回归模型,选择将温度固定在一定水平,装样量和菌种液量交互影响作用的响应面图及等高线图进行分析。由图5可知,等高

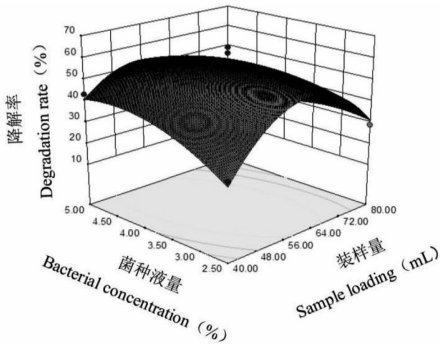


图5 菌种液量和装样量交互影响降解率的响应面图

Fig. 5 Response surface of the effects of bacterial concentration and sample loading on degradation rate

线呈现椭圆形,具有较好的显著性。在温度为 35 ℃、装样量为 60 mL、菌种液量为 3.75% 时,可从 3D 建模中得到阿维菌素最大降解率为 53.52%。

根据 Design Expert 中 Box-Behnken design 中的优化功能,得到枯草芽孢杆菌降解阿维菌素的优化条件为温度为 35.43 ℃、装样量 57.56 mL、菌种液量为 3.85%,此时理论降解率为 59.15%。

### 2.4.4 志贺氏菌响应面试验设计及结果分析

根据单因素实验结果,选择温度 25、30、35 ℃,装样量 40、60、80 mL,菌种液量 2.5%、3.75%、5% 作为三因素三水平,利用 Box-Behnken 设计实验如表 5。

### 2.4.5 志贺氏菌降解阿维菌素模型的建立及显著性检验与方差分析

根据 Box-Behnken 中设计结果可知,该二次模型  $P=0.0004 < 0.01$ ,表明该模型是显著的,具有统计学意义。而失拟值  $P=0.0918 > 0.05$ ,表明该

表 5 志贺氏菌响应面试验设计及结果分析

Table 5 Response surface test design and result analysis of *Shigella*

试验号 Test number	A 温度 Temperature (℃)	B 装样量 Sample loading (mL)	C 菌种液量 Bacterial concentration (%)	降解率 Degradation rate (%)
1	0	0	0	17.53
2	0	1	-1	23.9
3	-1	1	0	53.63
4	1	0	-1	18.63
5	0	1	1	45.66
6	0	-1	-1	27.68
7	0	0	0	50.02
8	0	-1	1	26.24
9	-1	0	-1	14.56
10	0	0	0	46.23
11	0	0	0	52.11
12	-1	0	1	13.57
13	1	-1	0	65.29
14	0	0	0	10.69
15	1	1	0	48.55
16	-1	-1	0	45.82
17	1	0	1	47.97

模型失拟项不显著,没有失拟因素存在,即说明建立所得模型可靠性高,可进行优化分析。该模型回归方程为:

$$R = 65.30 + 11.14A + 0.25B + 3.36C - 1.70AB + 0.30AC + 0.96BC - 27.82A^2 - 14.10B^2 - 10.41C^2$$

为进一步验证所得方程的可靠性,采用回归方

程方差分析。分析可知,方程决定系数  $R^2$  为 96.00%,说明该模型的拟合性较好,仅有总变异的 4.00% 不能用该模型解释,可用来为志贺氏菌降解阿维菌素进一步分析提供依据。根据表 6 可知,方

程中  $A^2$  项、 $B^2$  项、 $C^2$  项  $P < 0.05$ ,表明  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  项对  $R$  值影响显著,其余均为不显著,即  $P > 0.05$ 。由  $F$  值分析可知,影响阿维菌素降解率的影响因子主次顺序为  $A$  温度  $> C$  菌种液量  $> B$  装样量。

表 6 志贺氏菌回归方程方差分析

Table 6 Results of variance analysis of regression model of *Shigella*

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
模型 Model	458 5.18	9	509.46	18.67	0.000 4	**
<i>A</i>	136 9.22	1	136 9.22	50.17	0.000 2	**
<i>B</i>	0.45	1	0.45	0.016	0.902 0	
<i>C</i>	82.61	1	82.61	3.03	0.125 4	
<i>AB</i>	15.81	1	15.81	0.58	0.471 4	
<i>AC</i>	0.49	1	0.49	0.018	0.896 8	
<i>BC</i>	3.67	1	3.67	0.13	0.724 8	
$A^2$	227 1.85	1	227 1.85	83.25	< 0.000 1	**
$B^2$	837.39	1	837.39	30.68	0.000 9	**
$C^2$	455.85	1	455.85	16.70	0.004 6	**
残差 Residual	191.04	7	27.29			
失拟度 Lack of fit	146.95	3	48.98	4.44	0.091 8	
纯误差 Pure error	44.08	4	11.02			
总离差 Cor total	477 6.22	16				

#### 2.4.6 志贺氏菌降解阿维菌素模型的响应面交互分析

根据志贺氏菌的回归模型,选择将菌种液量固定在一定水平,装样量和温度交互影响作用的响应面图及等高线图进行分析。根据图 6 可知,等高线呈现椭圆形,具有较好的显著性。在温度为 30 °C、装样量为 60 mL、菌种液量为 3.75% 时,可从 3D 建模中得到最大降解率为 53.63%。

优化设计,得到志贺氏菌降解阿维菌素的优化条件为温度为 30.45 °C、装样量 60.24 mL、菌种液量 3.56%,此时理论降解率为 65.34%。

#### 2.5 验证实验

为确定优化后得到的方案的准确性,我们利用优化后的方案对阿维菌素进行降解实验。固定降解条件,令枯草芽孢杆菌和志贺氏菌分别对阿维菌素进行降解,进行 3 组平行实验。由表 7 可知,优化后,枯草芽孢杆菌对阿维菌素的降解率达到 58.59%,与其理论值较为接近,误差仅为 0.28%,同时比 3D 模型中得到的最大降解率高 3% 左右;志贺氏菌对阿维菌素的降解率达到 66.47%,与其理论值较为接近,误差仅为 0.57%,同时比 3D 模型中得到的最大降解率高 18% 左右。说明优化后方案显著提高了其降解效率,建立的模型拟合性较好,同时能够较为准确地预测各因素对最终降解率的影响,即响应面法能有效对降解条件进行优化。

#### 3 讨论与结论

近年来,随着绿色工业的逐步发展,在处理环境污染物方面,利用微生物菌株进行降解逐渐成为研究者青睐的课题。由于阿维菌素水溶性较差,因此

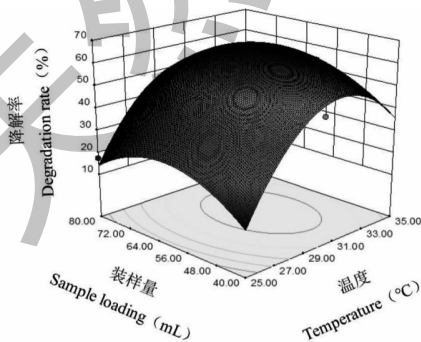


图 6 温度和装样量交互影响降解率的响应面图

Fig. 6 Response surface of the effects of temperature and sample loading on degradation rate

根据 Design Expert 中 Box-Behnken design 中的

其在微生物降解法中周期较四环素类、 $\beta$ -内酰胺类抗生素更长,通常在15 d以上才能达到80%以上的降解效果。研究表明,仅有少部分菌株能够更加高效地降解阿维菌素,如伯克霍尔德氏菌能够在48 h

内降解80%左右的阿维菌素<sup>[15]</sup>、嗜热脂肪芽孢杆菌在72 h对阿维菌素标准品的降解率可达到77.6%<sup>[16]</sup>。故研究并筛选出特定菌株有利于微生物降解法的进一步发展。

表7 模型验证

Table 7 Regression validation

菌株 Bacterial strain	温度 Temperature(°C)	装样量 Sample loading(mL)	菌种液量 Bacterial concentration(%)	预测值 Predicted value (%)	实际值 Actual value(%)	误差 Error (%)
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	35.43	57.56	3.85	59.15	58.59	±0.28
志贺氏菌 <i>Shigella</i>	30.45	60.24	3.56	65.34	66.47	±0.57

细菌一般通过代谢产生大环内酯类抗生素灭活转移酶对该类物质进行降解,这些灭活转移酶主要可以分为大环内酯酯酶、2'-糖基磷酸内酯转移酶mph1、糖基磷酸转移酶,它们能够促使抗生素分子结构发生磷酸化、糖基化,从而使抗生素失去其原有性质<sup>[17]</sup>。但目前常用于抗生素处理的菌株的降解机理仍未被完全探究,这也是现今研究者需要解决的难题。同时,近来研究也报道了一些能够产生大环内酯类灭活酶菌株,但并没有进行后续的降解性能测试,如肺炎支原体<sup>[18]</sup>、猪链球菌<sup>[19]</sup>、假单胞菌<sup>[20]</sup>等。

综合研究现状和存在问题,细菌降解阿维菌素的发展方向可分为以下几点:①对微生物菌株降解阿维菌素的机理进一步研究,为降解菌株的筛选提供依据。②通过筛选和组合不同种微生物菌株来达到更好的降解效果。③降低生产成本,选用价格适宜的培养基,培育生产周期短的菌种。④筛选出绿色环保、无二次污染的菌株能够有效避免对环境造成次生污染。

在菌株筛选实验中,枯草芽孢杆菌对阿维菌素的降解率较高,为21.76%;志贺氏菌的降解率较枯草芽孢杆菌略低,为17.91%。这说明枯草芽孢杆菌和志贺氏菌对阿维菌素有较强降解能力。进一步对这两株细菌的降解性能进行探究,在优化后条件下,枯草芽孢菌和志贺氏菌在实际降解中均有较好作用,但相对枯草芽孢杆菌,志贺氏菌的最佳降解温度较低,有利于减少实际降解中能量的消耗。然而志贺氏菌为常见致病菌,在处理环境中阿维菌素残留时可能会造成二次污染;枯草芽孢杆菌为非致病菌,对环境和人体不产生较大的影响,故能直接投入处理构筑物中,无需进行消毒处理,更为安全、环保,适合实际应用。

### 参考文献

- Zhou LJ, Ying GG, Liu S, et al. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China[J]. *Sci Total Environ*, 2013, 452: 365-376.
- Kim KR, Owens G, Kwon SI, et al. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment[J]. *Water Air Soil Pollut*, 2011, 214: 163-174.
- Luo Y, Xu L, Michal R, et al. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China[J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45: 1827-1833.
- 9Xu J, Hu P, Lv JP, et al. Pollution characteristics and control measures of antibiotics and antibiotic resistance genes in the aquatic environment[J]. *Sci Technol Rev(科技导报)*, 2018, 36: 13-23.
- Chen XL, Wei JH, Lin Z, et al. Advances in microbial degradation of antibiotics[J]. *Mod Agr Sci Technol(现代农业科技)*, 2018, 16: 167-168.
- Wu Y, Feng PY, Li R, et al. Progress in microbial remediation of antibiotic-residue contaminated environment[J]. *Chin J Biotechnol(生物工程学报)*, 2019, 35: 2133-2150.
- Yan CH. Screening and identification of three efficient degradation bacteria of avermectin and their study of degradation characteristics[D]. Yangzhou: Yangzhou University(扬州大学), 2011.
- Hu XH, Zhang TH, Tang CH, et al. Mutation breeding and degradation characteristics of abamectin degrading bacteria[J]. *Guizhou Agr Sci(贵州农业科学)*, 2015, 43: 102-104.
- Howie RL, Folsyer JP, Bowen A, et al. Reduced azithromycin susceptibility in *Shigella sonnei*, United States[J]. *Microb Drug Resist*, 2010, 16: 245-248.
- Dong JX, Xu W, Luo RM, et al. Study on carbon dioxide to produce synthesis gas[J]. *Coal Chem Ind(煤炭与化工)*,



- 2006,29:60-62.
- 11 Liu YX, Deng YJ. Analysis of antibiotic drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. Light Ind Sci Technol (轻工科技), 2019, 35: 116-117.
  - 12 Luo XF, Chen LH, Yang CB, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of *Streptomyces* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 2073-2080.
  - 13 He QL, Liu WB, Yang HJ, et al. Isolation, identification of a phenol-degrading strain and optimization for phenol degradation using response surface methodology [J]. Acta Sci Circum (环境科学学报), 2016, 36: 112-123.
  - 14 Hu XH, Huang J. Screening and identification of avermectin-degrading bacterium strain AW1-12 [J]. Southwest China J Agr Sci (西南农业学报), 2013, 26: 583-586.
  - 15 Li R, Guan XJ, Chen RZ, et al. Isolation and identification of an avermectins degrading strain AW 70 and its degrading characteristics [J]. Soils (土壤), 2009, 41: 607-611.
  - 16 Wei YL, Li JS, Hu JD, et al. Isolation and degradation characteristics of an abamectin-degrading and thermophilic bacterial strain AZ11 [J]. Shandong Sci (山东科学), 2013, 26: 16-19.
  - 17 Liu YW, Li ZJ, Feng Y, et al. Research progress in microbial degradation of antibiotics [J]. J Agro-Environ Sci (农业环境科学学报), 2016, 35: 212-224.
  - 18 Ni SS, Sun HM. Recent research on mechanisms of resistance to macrolides in *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Chin J Zoonoses (中国人兽共患病学报), 2018, 34: 743-747.
  - 19 Guan L, Wang DD, Zhu HD, et al. Analysis of drug resistance and resistance gene of *Streptococcus suis* serotype 9 isolates [J]. Chin J Zoonoses (中国人兽共患病学报), 2019, 35: 1015-1020.
  - 20 Hua T, Li SN, Feng YH, et al. Research on typical macrolides degradation by microbial electrochemical technologies [J]. Ind Water Treat (工业水处理), 2020, 40: 50-55.

(上接第 2062 页)

- 14 Zhang W, Draeger S, Schulz B, et al. Ring B aromatic steroids from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. [J]. Nat Prod Commun, 2009, 4: 1449-1454.
- 15 Tan JW, Dong ZJ, Liu JK. New cerebrosides from the basidiomycete *Cortinarius tenuipes* [J]. Lipids, 2003, 38: 81-84.
- 16 Liu HW, Gao JM. Chemical constituents from fruiting bodies of *Hudnellum* sp. no. 2 [J]. Acta Bot Bor-Occid Sin (西北植物学报), 2012, 32: 600-603.
- 17 Zhang X, Qian XQ, Liu LY, et al. Secondary metabolites of fungus *Chaetomium funicola* CIB-604 and their bioactivities [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1887-1893.
- 18 Zhang XD, Liu XQ, Li LL, et al. Study on the chemical constituents of *Tiarella polyphylla* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 40: 1886-1888.
- 19 Yu XL, Bai LJ, Li L, et al. Chemical constituents from *Phylloporia ribis* and their *in vitro* antiviral activities [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2020, 42: 1777-1781.
- 20 Wu ZH, Cheng WM, Zhang ZY, et al. Chemical constituents of ethyl acetate extracts from *Inonotus obliquus* and their anti-tumor activity [J]. J Anhui Med Univ (安徽医科大学学报), 2018, 53: 1757-1761.
- 21 Zhang L, Jia YL, Fang YW, et al. The Chemical structures and bioactivities of cerebrosides isolated from the marine-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. collected from Xisha Islands [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2017, 36: 35-39.
- 22 Feng N, Zhang JS, Tang QJ, et al. Steroids from fruiting bodies of *Coprinus comatus* and their inhibition to tumor cell proliferation [J]. Mycosystema (菌物学报), 2010, 29: 249-253.
- 23 Wang B, Qiu PJ, Li GQ, et al. Anti-tumor constituents from *Scorzonera mongolica* [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2009, 7: 283-286.