

薛 凯,王 荣,王友富,等. 分枝杆菌原生质体诱变产 9-羟基-雄烯二酮菌种选育[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):288-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.078

分枝杆菌原生质体诱变产 9-羟基-雄烯二酮菌种选育

薛 凯¹, 王 荣², 王友富², 李良智¹, 胡翠英¹, 扶教龙¹

(1. 苏州科技大学化学生物与材料工程学院, 江苏苏州 215009; 2. 浙江神洲药业有限公司, 浙江台州 318000)

摘要:为获得转化底物植物甾醇为 9-羟基-雄烯二酮(简称 9-OH-AD)的高产稳定菌株,将出发菌株分枝杆菌制备成原生质体,并对其原生质体进行定向紫外诱变筛选。结果表明,NaCl 为最佳的分枝杆菌原生质体渗透稳定剂,最适浓度为 0.5 mol/L,在此条件下获得的原生质体数量为 3.1×10^8 个/mL,且最终获得 1 株比出发菌株 9-OH-AD 生产量提高 84.7% 的菌株 MS23,经传代 3 次,9-OH-AD 的积累量分别为 37.32、41.64、38.77 mg/L,具有良好的遗传稳定性。产品通过液相色谱进行确证,同时在 5 L 发酵罐中进行转化制备 9-OH-AD 的初步研究。经原生质体紫外诱变获得的遗传性稳定的 9-OH-AD 高产菌株可用于进一步的转化制备条件优化研究。

关键词:分枝杆菌;原生质体诱变;9-OH-AD;菌种选育;液相色谱

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0288-04

众所周知,甾体类药物是仅次于抗生素的世界第二大类药物,9-羟基-雄烯二酮(简称 9-OH-AD)则是重要的甾体类药物的重要中间体^[1]。目前,9-OH-AD 作为皮质类固醇等甾体激素类药物生产的前体化合物越来越受到研究者的关注^[2]。因 9-OH-AD 化学结构上存在 9-OH,可在 C9 位引入 1 个卤素原子,因此它更适于用作高效含卤(氟、氯)皮质激素药物工业生产中的关键中间体^[3]。

国内外以甾醇为原料、利用分枝杆菌等微生物转化生产 9-OH-AD 已成为研究热点。例如 Shtratnikova 等已测出能够转化植物甾醇为 9-OH-AD 的分枝杆菌 VKM Ac-1817D 的完整基因序列^[4];姚抗深入研究了微生物降解甾醇中与 9-OH-AD 的合成和降解相关的 2 个关键酶(3-甾酮-9 α -羟基化酶与 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶)^[5];袁家代等通过构建 *kshA* 和 *kshB* 基因共表达的重组菌对 3-甾酮-9 α -羟基化酶编码基因进行异源表达,成功对分枝杆菌生物转化特性进行了改造,制备获得了 9-OH-AD^[6];范书玥等从土壤中筛选出具备甾醇降解能力的分枝杆菌(*Mycobacterium* sp. NwIB-01),对该菌的 3-甾酮-9 α -羟基化酶进行了基因克隆、异源表达与分离纯化,为进一步利用基因工程手段改造分枝杆菌菌株,提高其转化甾醇的能力从而为利用基因工程菌进行工业化生产 9-OH-AD 等奠定了基础^[7-8]。此外, Sukhodolskaya 等研究表明,主产 9-OH-AD 的同时由于残余的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的存在,也会有部分的降解发

生^[9]。因此,田琳等通过同源重组用体外突变失活的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因代替分枝杆菌染色体上正常的 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因,导致整个 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因失活,以让 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶无法表达,从而使 9-OH-AD 得以积累^[10]。另一方面,9-OH-AD 的生产存在甾醇水溶性差、传质效率低、底物毒害、产物抑制以及产物降解等问题,许多研究者也做了大量相关的研究^[11-14]。总体而言,国内外尚无生物法制备 9-OH-AD 的工业生产,筛选并获得制备 9-OH-AD 的高效菌株具有重要的工业意义。

为此,本研究对实验室已有的分枝杆菌进行原生质体紫外诱变系统研究,确定分枝杆菌原生质体的制备条件,并比较筛选得到的菌株制备生产 9-OH-AD 的能力,获得 1 株生产转化能力较好的菌株,最后用该菌株在 5-L 生物反应器中进行转化制备 9-OH-AD 的初步研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 出发菌株分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)于笔者所在实验室 4℃ 冰箱中斜面保藏。

1.1.2 试剂 植物甾醇,由浙江省神洲药业有限公司提供;玉米浆,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;溶菌酶,购自国药集团化学试剂有限公司;酵母粉为生化试剂;甘油、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、NH₄Cl、NaNO₃、(NH₄)₂HPO₄、无水乙醇、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、乙二胺四乙酸(EDTA)、NaCl、KCl、MgSO₄、蔗糖、甘露醇、乙酸乙酯等试剂均为分析纯。

预处理液:0.8% EDTA、0.1% 巯基乙醇,用 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液配制。

原生质体渗透稳定剂:0.5 mol/L 蔗糖、10.0 mmol/L MgCl₂,用 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液溶解。

分枝杆菌去壁酶液:含质量分数为 1% 的溶菌酶的原生质体渗透稳定剂,微孔滤膜过滤除菌。

收稿日期:2016-09-16

基金项目:江苏省高校青蓝工程项目(编号:SYN201321);江苏省苏州市应用基础研究(编号:SYN201412)。

作者简介:薛 凯(1991—),男,江苏泰兴人,硕士研究生,主要从事生物发酵、生物转化等研究。E-mail:752540569@qq.com。

通信作者:李良智,博士,副教授,主要从事生物化工研究。Tel:(0512)68056493;E-mail:liliangzhi01@163.com。

1.1.3 仪器 SPX-250BSH-II 生化培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);BIOTECH-5JG-7000A 5 L 发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司);PHS-3TC pH 电极(上海天达仪器有限公司);YXQ-LS-50S II 立式压力蒸汽灭菌器灭菌锅(上海博迅实业有限公司);TS2102 摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(上海博迅实业有限公司);SA224S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];TGL-20M 离心机(上海卢湘离心机仪器有限公司)。

1.1.4 培养基 固体/斜面培养基:酵母粉 5.0 g/L、甘油 10.0 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、氯化铵 1.0 g/L、琼脂 20.0 g/L, pH 值为 7.4。

种子培养基:葡萄糖 6.0 g/L、甘油 2.0 g/L、硝酸钠 5.4 g/L、磷酸氢二铵 0.6 g/L、酵母粉 15.0 g/L, pH 值为 7.5~8.0。

发酵培养基:玉米浆 20.0 g/L、硝酸钠 5.4 g/L、磷酸氢二铵 0.6 g/L、无水乙醇 10.0 mL/L、植物甾醇 5.0 g/L, pH 值为 8.0~8.5。

再生高渗培养基:酵母粉 5.0 g/L、甘油 10.0 g/L、磷酸氢二钾 0.5 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L、氯化铵 1.0 g/L、蔗糖 0.8 mol/L、琼脂 20.0 g/L, pH 值为 7.4。

1.2 试验方法

1.2.1 原生质体渗透稳定剂的选择 分别配制 NaCl、KCl、 MgSO_4 、蔗糖、甘露醇浓度为 0.7 mol/L 的再生高渗培养基,将诱变菌株分别涂于各再生高渗培养基上,每个处理 3 个平行,于 30 ℃ 恒温生化培养箱中培养 7 d 后,根据高渗培养基中原生质体的制备数确定最佳原生质体渗透稳定剂。

1.2.2 原生质体渗透稳定剂 NaCl 浓度的确定 配制 NaCl 浓度分别为 0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mol/L 的再生高渗培养基,将诱变菌株分别涂于各浓度再生高渗培养基上,每个浓度 3 个平行,于 30 ℃ 恒温生化培养箱中培养 7 d 后,根据各高渗培养基中原生质体的制备数确定最适 NaCl 浓度。

1.2.3 细胞悬液制备及原生质体的制备与再生 用接种环在斜面培养基上刮取 1 环菌体,接种于种子培养基上,于 30 ℃、200 r/min 摇床上振荡培养 48 h 后,取 10 mL 种子液,4 000 r/min 离心 10 min,用渗透压稳定剂洗涤 2 次,将菌体悬浮于 10 mL 渗透压稳定剂中制备成细胞悬液。取 1 mL 细胞悬液稀释至 10^{-6} ,用平板菌落计数法测细胞悬液浓度。原生质体诱变参考相关文献^[15]并加以改进。取 5 mL 细胞悬液,4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 5 mL 预处理液,静置 15 min,用渗透压稳定剂洗涤 2 次,离心 10 min 弃上清液,然后加入 5 mL 1% 溶菌酶液,30 ℃ 振荡保温 2 h,2 000 r/min 离心 10 min 后,加入 5 mL 渗透稳定剂悬浮原生质体。取 0.5 mL 原生质体悬液,加入 4.5 mL 渗透稳定剂稀释至 10^{-6} ,涂布于再生高渗培养基培养计数。另取 0.5 mL 原生质体悬液,加入 4.5 mL 无菌水,稀释至 10^{-6} 后,用固体培养基培养计数。

1.2.4 紫外诱变 将制备好的原生质体用渗透压稳定剂稀释至 10^{-6} ,取 0.2 mL 涂布于再生高渗培养基表面,置于已预热 30 min 20 W 紫外灯下,照射距离为 30 cm。磁力搅拌下分别照射 20、40、60、80、100、120、140、160、180 s,每个时间 3 个

平行,30 ℃ 下倒置遮光培养 1 周。观察菌落形态,统计平板中的菌落数量,计算致死率,以未经诱变处理的菌悬液涂布平板作对照。

1.2.5 固体斜面培养 将菌株活化扩培于 30 ℃ 恒温生化培养箱中培养 3~4 d,紫外诱变再生渗透培养基中菌株生长培养 7 d。

1.2.6 摇瓶转化试验 挑取 1 环菌种接种于装发酵培养基 50 mL 的 250 mL 摇瓶中进行种子液培养,在 30 ℃、200 r/min 摇床上培养 3 d 后,取 5 mL 种子液接入装有 0.25 g 甾醇的 50 mL 发酵液中,于 30 ℃、200 r/min 摇瓶中培养转化植物甾醇制备 9-OH-AD,培养时间为 120 h。

1.2.7 5-L 发酵罐转化试验 将活化培养 3 d 的种子液按 10% 接种量接至装有 12.5 g 甾醇的 2.5 L 发酵培养基中,于 30 ℃、400 r/min 培养, pH 值维持在 8.2~8.7。每隔 12 h 取 1 次样,测样品中 9-OH-AD 的浓度。

1.2.8 高效液相色谱(HPLC)分析方法 转化 120 h 后,按体积比 1:1 加入乙酸乙酯,于 30 ℃、200 r/min 提取 30 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,取乙酸乙酯有机相层,用 0.22 μm 有机膜过滤后超声脱气进行高效液相色谱测定。色谱条件:二极管阵列检测器(DAD 检测器),波长 254 nm;色谱柱为 Thermo: ODS-2 HYPERSIL (5 μm × 250 mm × 4.6 mm);柱温 40 ℃;流动相:甲醇与水体积比为 7:3,流速 1 mL/min,进样量为 30 μL 。

2 结果与分析

2.1 原生质体渗透稳定剂的选择

在再生高渗培养基配制中分别选用 5 种浓度为 0.7 mol/L 的渗透压稳定剂,考察这些稳定剂对分枝杆菌原生质体制备的影响。由图 1 可知,以 KCl 和蔗糖作为原生质体渗透压稳定剂对原生质体制备效果的影响较小,而以 NaCl 作为渗透稳定剂的再生高渗培养基中所制备的原生质体数量较其他 4 种高,达到 5.85×10^8 个/mL。其原因主要在于 NaCl 可能更符合菌体的外界液体环境,菌体外围的 Na^+ 与菌体的渗透压有关,能够更好地维持菌体的渗透压使原生质体不被外界破坏且能促进细胞壁的生成,从而获得较多的原生质体。因此,本研究选用 NaCl 作为分枝杆菌原生质体的渗透压稳定剂来进行原生质体的制备。

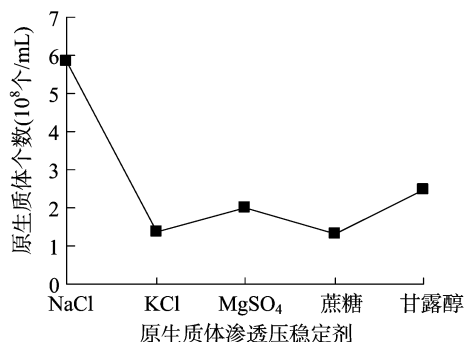


图1 不同的渗透压稳定剂对分枝杆菌原生质体数量的影响

2.2 原生质体渗透稳定剂 NaCl 浓度的确定

在再生高渗培养基中加入不同浓度的 NaCl 溶液,考察其对分枝杆菌原生质体数量的影响。由图 2 可知,当 NaCl 浓度

为 0.5 mol/L 时原生质体个数达到最大值,为 3.1×10^8 个/mL。随着 NaCl 浓度的进一步增大,原生质体的数量逐渐减少,原因可能是 NaCl 浓度为 0.5 mol/L 时使原生质体的渗透压恰好与外界液体环境平衡,这个浓度能够维持细胞稳定并促进细胞壁的生成,随着 NaCl 浓度的增大,外界液体环境的渗透压易使原生质体脱水死亡从而导致原生质体制备率降低。

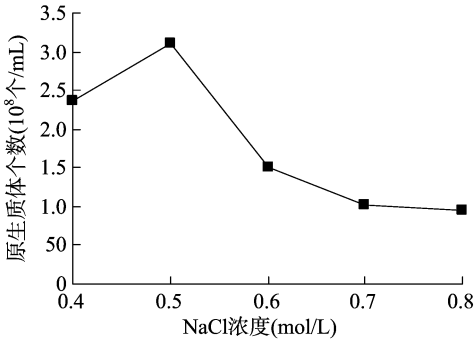


图2 NaCl 浓度对原生质体数量的影响

2.3 原生质体制备率和再生率

由表 1 可知,通过公式原生质体制备率 = (酶解前菌落数 - 固体培养基上菌落数)/酶解前菌落数 $\times 100\%$,原生质体再生率 = (再生高渗固体培养基上菌落数 - 固体培养基上菌落数)/(酶解前菌落数 - 固体培养基上菌落数) $\times 100\%$ 计算得原生质体的制备率和再生率分别为 98.3%、52.6%。表明以 0.5 mol/L NaCl 作为渗透压稳定剂,分枝杆菌原生质体在经紫外诱变后可获得较高的原生质体制备率和再生率。

表 1 分枝杆菌原生质体的制备率和再生率

酶解前菌落数 (个/mL)	固体培养基上菌落数 (个/mL)	再生高渗固体培养基上菌落数 (个/mL)	原生质体制备率 (%)	原生质体再生率 (%)
1.76×10^9	3×10^7	9.4×10^8	98.3	52.6

2.4 菌株生长曲线及诱变条件确定

2.4.1 分枝杆菌生长曲线 将分枝杆菌用接种环接于装有 50 mL 种子液的 250 mL 摇瓶中,于 30 ℃、200 r/min 摇床中培养,每隔 6 h 测定菌液 600 nm 处的吸光度。由图 3 可知,分枝杆菌在 0~48 h 时处于停滞期,在 48~96 h 期间为对数期,96 h 之后步入平稳期。48~96 h 的对数期是分枝杆菌生长代谢最旺盛的时期,也是分枝杆菌对外界环境最敏感的时期,在此时间段对其进行诱变处理易获得理想突变株。

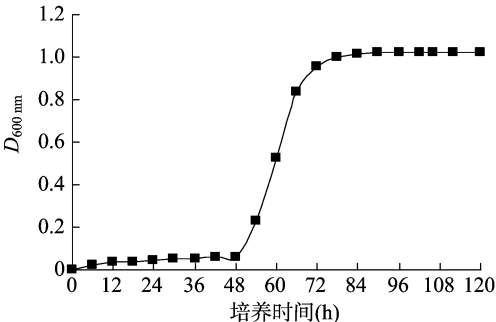


图3 分枝杆菌生长曲线

2.4.2 紫外诱变对菌株的致死率 由图 4 可知,致死率随紫外照射时间的延长而增加,140 s 左右达到 99%,之后基本稳

定。当紫外照射时间为 60~74 s 时,致死率为 70%~80%,此时回复突变株的出现率较低,因此确定紫外诱变的最佳时间为 65 s。

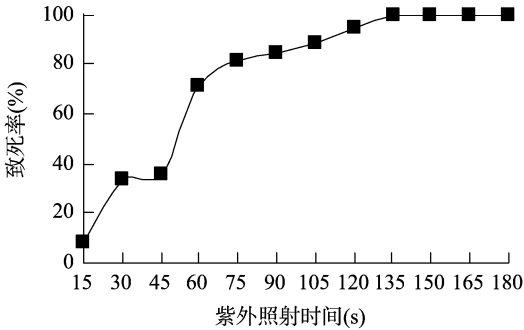


图4 紫外诱变致死率曲线

2.5 突变菌株摇瓶转化制备 9-OH-AD 分析

经过紫外诱变筛选获得了 143 株突变株,挑取其中的 63 株进行初筛,经过初筛后获得 11 株转化积累 9-OH-AD 效果优于出发菌株的突变株。由表 2 可知,菌株 MS5 的 9-OH-AD 积累量为 62.31 mg/L,与出发菌株相比,提高了 134.25%。11 株菌株中,MS13 菌株的 9-OH-AD 积累量最低,但与出发菌株相比提高了 32.89%。对 11 株菌株进行复筛和遗传稳定性研究,各菌株传代 3 次产 9-OH-AD 的结果如图 5 所示,MS23 菌株经过 3 次连续传代,其 9-OH-AD 积累量基本保持稳定,3 次传代后其 9-OH-AD 产量分别为 37.32、41.64、38.77 mg/L,表明该菌株相对来说具有良好的遗传稳定性。采用 HPLC 对所得到的发酵液样品进行液相色谱分析。由图 6 可知,出发菌株、突变菌株、9-OH-AD 标准品均在 3.03 min 出现吸收峰,说明所获得的样品在这一时间点出现的吸收峰即为 9-OH-AD 的峰,所获得的 MS23 突变菌株转化制备获得的对应产物为 9-OH-AD。

表 2 出发菌株及突变株摇瓶培养转化制备 9-OH-AD 的情况

菌株	9-OH-AD 积累量(mg/L)
出发菌株	26.60
MS2	37.88
MS3	38.14
MS5	62.31
MS11	35.46
MS13	35.35
MS19	42.25
MS23	49.13
MS27	46.16
MS28	35.57
MS30	39.92
MS52	58.22

2.6 5 L 发酵罐中高产菌株 MS23 转化制备 9-OH-AD 分析

考察菌株 MS23 在 5 L 发酵罐中转化底物甾醇为 9-OH-AD 的情况。由图 7 可知,在 0~102 h,9-OH-AD 的产量增加不明显,而到 102 h 时,9-OH-AD 的产量进入对数期式的增长,在 124 h 时达到 50.41 mg/L,可能是由于在菌体转化底物植物甾醇代谢途径中产生了能够促进 3-甾酮-9 α -羟基化酶活性的代谢物,使得 9-OH-AD 的合成进程

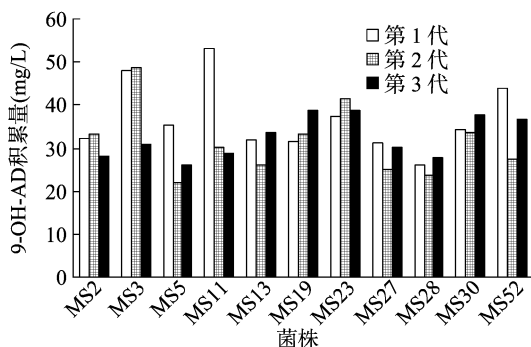


图5 突变菌株传代稳定性

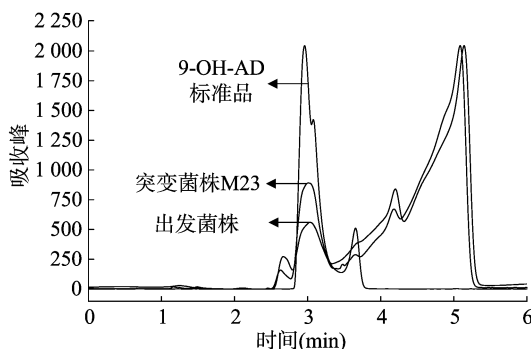


图6 9-OH-AD 标准品、出发菌和 MS23 突变菌株的 9-OH-AD 产量对比

加速从而导致 9-OH-AD 积累量的对数式增长^[16]。124 h 之后 9-OH-AD 的产量逐渐减少,由 124 h 时的 50.41 mg/L 在 143 h 时降为 48.66 mg/L,可能由于 C1,2 位脱氢酶的作用效果在 124 h 后开始大于 3-甾酮-9 α -羟基化酶,使得 9-OH-AD 的母核得以降解从而进一步水解导致 9-OH-AD 的产量减少^[17-18]。总之,发酵罐中生物转化制备 9-OH-AD,其积累量与摇瓶转化相比提高了 2.61%,今后将进一步通过控制发酵罐中转速、温度、pH 值及添加甾醇底物的促溶剂等其他发酵条件来提高 9-OH-AD 的产量。

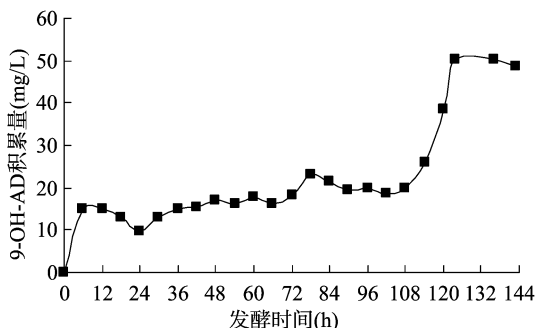


图7 MS23 菌株在 5L 发酵罐中制备 9-OH-AD 的情况

3 结论与讨论

原生质体诱变是通过去除菌体细胞壁以便更好地进行诱变的一种诱变方法,可使紫外线作用更为直接,可增强诱变效果。姚笛等对 1 株产木糖醇季也蒙的毕赤酵母进行原生质体紫外诱变,获得的木糖醇产量明显提高,比出发菌株 DQ11 提高了 186%,且具有良好的遗传稳定性^[19]。胡基华等对 1 株产几丁质酶的黏质沙雷氏菌进行原生质体紫外诱变,获得比

原始菌株提高 4.3 倍的几丁质酶产量^[20]。本研究通过原生质体诱变试验表明,NaCl 为最佳的分枝杆菌原生质体渗透稳定剂,其最适浓度为 0.5 mol/L。在此条件下制备的原生质体通过紫外诱变,在摇瓶生物转化中,获得的高产稳定菌株 MS23 比出发菌株转化制备 9-OH-AD 的能力提高了 84.7%。通过初步的发酵罐放大转化,9-OH-AD 积累量达到 50.41 mg/L。张怀成等研究的分枝杆菌转化甾醇产 9 α -羟基雄甾烯酮促进剂的筛选中,通过加入促进剂聚醚改性硅油投入 10 g/L 底物,获得的 9-OH-AD 大于 4 g/L^[11]。高兴强等研究的油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产 9 α -羟基雄甾烯酮中,投入 20 g/L 底物获得 1.28 g/L 9-OH-AD^[12]。因此,虽然相对于出发菌株来说 MS23 菌株转化植物甾醇制备 9-OH-AD 的能力有所提高,但 9-OH-AD 的积累量还是相对较低,还不能满足工业化生产的要求。进一步的研究将对转化过程的工艺进行系统优化,以期获得更高的 9-OH-AD 制备率。

参考文献:

- [1] 刘 夺,张 莹,周 晓,等. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望[J]. 生命科学,2013,25(10):958-965.
- [2] 杨 英. 微生物转化植物甾醇制备甾体药物关键中间体研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2009:14-17.
- [3] 杨亚力,杨顺楷,吴中柳. 偶发分枝杆菌发酵断甾醇侧链积累 9 α -羟基雄甾二酮[J]. 应用与环境生物学报,2015,21(2):256-262.
- [4] Shtratnikova V Y, Schelkunov M I, Dovbnya D V, et al. Complete genome sequence of *Mycobacterium* sp. strain VKM Ac-1817D, capable of producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from phytosterol[J]. Genome Announcements, 2015, 3(1): e01447-14.
- [5] 姚 抗. 分枝杆菌甾醇代谢机制的解析以及其代谢工程改造应用于制备重要甾药中间体的研究[D]. 上海:华东理工大学,2014:20-22.
- [6] 袁家代,陈贵英,程世君,等. 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因在分枝杆菌中的异源表达与 9 α -羟基雄甾二酮的制备[J]. 生物工程学报,2015,31(4):523-533.
- [7] 范书玥,魏 巍,王凤清,等. 分枝杆菌 *Mycobacterium* sp. NwIB-01 3-甾酮-9 α -羟基化酶基因的克隆、异源表达及分离纯化[J]. 生物工程学报,2009,25(12):2014-2021.
- [8] Wei W, Wang F Q, Fan S Y, et al. Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01; biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(13):4578-4582.
- [9] Sukhodolskaya G V, Nikolayeva V M, Khomutov S M, et al. Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D strain producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from sitosterol[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2007, 74(4):867-873.
- [10] 田 琳,李 玉,史文玉,等. 分枝杆菌甾酮 C₁₂ 位脱氢酶基因敲除的研究[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(5):39-44.
- [11] 张怀成,王凤清,马昱澍,等. 分枝杆菌转化甾醇产 9 α -羟基雄

刘 锐. 屠宰废水中抗生素抗性基因在废水处理各工艺中去除与累积效果的研究[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(23): 292–295.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.079

屠宰废水中抗生素抗性基因在废水处理各工艺中去除与累积效果的研究

刘 锐

(嘉兴职业技术学院, 浙江嘉兴 314036)

摘要:为探讨屠宰废水中抗生素抗性基因去除最佳处理工艺,采用荧光定量(PCR)技术检测屠宰废水处理工程各个环节中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetB* 和 *tetC* 等 5 种抗生素抗性基因绝对含量和相对丰度。结果表明,厌氧处理工艺和氧化塘工艺可以通过减少微生物量降低抗生素抗性基因的绝对含量,但也可以导致部分抗生素抗性基因相对丰度上升,而表面流人工湿地对于屠宰废水中抗生素抗性基因有有效的处理效果。

关键词:屠宰废水;抗生素抗性基因;PCR;表面流人工湿地

中图分类号: X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0292-04

伴随着抗生素在养殖业和医疗业的大量使用,抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)污染逐渐被人们重视。近年来我国浙江^[1]、上海^[2]、广东^[3-5]、河北^[6]等多个地区均有报道存在不同程度的抗生素抗性基因污染。尽管国内外对于抗生素抗性基因转移、去除开展了大量研究,但多局限于实验室内模拟阶段,工程实践方面报道较少,尤其对于抗生素抗性基因含量高于生活污水且低于养殖废水的屠宰废水,在污水处理工程中去除和累积情况未见报道。为此深入研究屠宰废水中抗生素抗性基因在污水处理各工艺中去除与累积效果,对于优化废水处理工艺和控制抗生素抗性基因污染具有重要现实意义。

本研究以 2 种磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)和 3 种四环素

类抗性基因(*tetA*、*tetB* 和 *tetC*)为研究对象,研究了其在屠宰废水处理工程中各个环节的绝对含量和相对丰度变化情况,以期寻找到最佳的抗生素抗性基因处理工艺,为相关企业单位优化设计污水处理工艺提供理论依据,为浙江省“五水共治”提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 水样来源

水样样品来源于浙江中法农业科技发展有限公司屠宰废水处理工程,其工程按流程包括 3 000 m³ 厌氧沼气池、3 600 m³ 潜流人工湿地、3 600 m³ 氧化塘和 18 hm² 表面流人工湿地等 4 个主要处理环节。按照废水处理流程选取了屠宰废水原水(即厌氧沼气池入水,采样点编号 W1)、厌氧沼气池出水(即潜流人工湿地入水,采样点编号 W2)、潜流人工湿地出水(即氧化塘入水,采样点编号 W3)、氧化塘出水(即表面流人工湿地入水,采样点编号 W4)、表面流人工湿地出水(即工程最终出水,采样点编号 W5)等 5 个采样点,样品常温采集,保存于 4 ℃ 环境,采样时间为 2014 年 6 月至 2016 年 5

收稿日期:2016-07-13

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAD21B04)。

作者简介:刘 锐(1977—),男,河北魏县人,硕士,副教授,主要从事生态养殖及动物性食品安全方向研究。E-mail:liuzywj@163.com。

甾烯酮促进剂的筛选[J]. 化学与生物工程,2013,30(12):55-58.

[12] 高兴强,冯建勋,花 强,等. 油水乳化体系中分枝杆菌转化植物甾醇产 9 α -羟基甾烯酮工艺研究[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),2014,40(4):433-437.

[13] Xu X W, Gao X Q, Feng J X, et al. Influence of temperature on nucleus degradation of 4-androstene-3,17-dione in phytosterol biotransformation by *Mycobacterium* sp. [J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(1): 63-68.

[14] 徐阳光,范雅敏,罗 兰,等. 分枝杆菌降解甾醇侧链中底物及其增溶剂的研究[J]. 化学反应工程与工艺,2015,31(5):423-429.

[15] 李 楠,熊 彬,张云开,等. *L*-苯丙氨酸解氨酶产生菌分离及酶促反应研究[J]. 食品科学,2005,26(12):74-77.

[16] 张成刚,王风清,魏东芝. 分枝杆菌 *Mycobacterium Neoaurum* NwIB-013-甾酮- Δ^1 -脱氢酶基因的克隆表达[J]. 化学与生物工程,2011,28(7):39-43.

[17] Xie R L, Shen Y B, Ning Q, et al. Genetic differences in *ksdD* influence on the ADD/AD ratio of *Mycobacterium neoaurum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(4): 507-513.

[18] Yeh C H, Kuo Y S, Chang C M, et al. Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Rhodococcus equi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorchole-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 130.

[19] 姚 笛,王 颖,王长远,等. 紫外诱变季也蒙毕赤酵母原生质体筛选木糖醇高产菌株[J]. 中国生物制品学杂志,2015,28(8):861-865.

[20] 胡基华,陈静宇,曹 旭,等. 高产几丁质酶的粘质沙雷氏菌株的诱变选育[J]. 东北林业大学学报,2016,44(3):106-109.