

环丙沙星对睾酮从毛单胞菌CT1降解4-氯硝基苯作用的影响

刘勇豪, 徐淼, 吴铭, 罗俊, 尚佳歧, 郭立泉

引用本文:

刘勇豪, 徐淼, 吴铭, 等. 环丙沙星对睾酮从毛单胞菌CT1降解4-氯硝基苯作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1659-1666.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0037>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

抗生素对雌二醇降解菌JX-2降解性能的影响

刘静娴, 刘娟, 孙敏霞, 高彦征, 李舜尧, 凌婉婷

农业环境科学学报. 2016, 35(8): 1488-1497 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0620>

基于木质素单体含量的园林生物质降解菌评价

吴桐, 路强强, 赵叶子, 陈智坤, 刑国强, 贾锐鱼

农业环境科学学报. 2021, 40(7): 1575-1583 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1480>

施氏假单胞菌YC-YH1对甲基对硫磷的降解及其代谢产物检测

史延华, 任磊, 贾阳, RuthNahurira, 闫艳春

农业环境科学学报. 2015, 34(11): 2097-2104 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.11.009>

花生化感物质降解菌的筛选、鉴定与降解特性研究

钱娜, 王小兵, 汪晓丽, 封克, 陈盾, 苏金成, 崔梦涵

农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1288-1295 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1358>

菌渣纤维素降解菌的筛选与鉴定

刘晓梅, 邹亚杰, 胡清秀, 杨小红, 沈德龙

农业环境科学学报. 2015(7): 1384-1391 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.07.022>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘勇豪, 徐淼, 吴铭, 等. 环丙沙星对睾丸酮丛毛单胞菌 CT1 降解 4-氯硝基苯作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1659–1666.

LIU Y H, XU M, WU M, et al. Effect of ciprofloxacin on the degradation of 4-chloro-1-nitrobenzene by *Comamonas testosteroni* CT1[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(8): 1659–1666.



开放科学 OSID

环丙沙星对睾丸酮丛毛单胞菌 CT1 降解 4-氯硝基苯作用的影响

刘勇豪¹, 徐淼¹, 吴铭¹, 罗俊¹, 尚佳歧¹, 郭立泉^{1,2*}

(1. 秸秆生物学与利用教育部重点实验室, 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室, 东北师范大学环境学院, 长春 130024)

摘要: 为了研究环境中抗生素对 4-氯硝基苯(4-chloro-1-nitrobenzene, 4-CNB)生物降解的影响, 本文选用 9 种高效降解 4-CNB 的菌株开展试验, 并通过药敏试验研究了 18 种常用抗生素对菌株 CT1 的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。采用 4-CNB-环丙沙星联合培养, 研究了不同浓度环丙沙星作用下菌体浓度、细胞活性、总超氧化物歧化酶(SOD)及降解性能的变化。结果表明: 睾丸酮丛毛单胞菌 CT1 降解 4-CNB 效率最高, 27 °C 9 h 降解效率为 98.4%±0.2%。仅 6 种抗生素存在 MIC 值, 其中环丙沙星的 MIC 值最低, 为 4 μg·mL⁻¹; 链霉素 MIC 最高, 为 64 μg·mL⁻¹。加入低浓度环丙沙星(1/4 MIC), 菌体浓度和细胞活性显著降低, 4-CNB 降解率下降至 87.0%±3.3%, 环丙沙星浓度高于最小抑菌浓度(4 MIC)时, 菌株生长受到极大抑制, 4-CNB 降解率仅为 35.7%±3.9%。SOD 酶活结果显示, 加入环丙沙星能显著降低菌体细胞的 SOD 酶活力, 引起活性氧对菌体的损伤, 因此环丙沙星导致的菌体细胞内 SOD 酶活力降低可能是 4-CNB 生物降解受到抑制的主要原因之一。

关键词: 环丙沙星; 4-氯硝基苯; 睾丸酮丛毛单胞菌; 生物降解; 超氧化物歧化酶

中图分类号: X172; X505 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)08-1659-08 doi:10.11654/jaes.2021-0037

Effect of ciprofloxacin on the degradation of 4-chloro-1-nitrobenzene by *Comamonas testosteroni* CT1

LIU Yonghao¹, XU Miao¹, WU Ming¹, LUO Jun¹, SHANG Jiaqi¹, GUO Liquan^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Straw Biology and Higher Value Application, Ministry of Education, College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. National Environmental Protection Wetland Ecology and Vegetation Restoration Key Laboratory, School of Environment, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: To investigate the effect of antibiotics on the biodegradation of 4-chloro-1-nitrobenzene (4-CNB) in the environment, nine bacterial strains that can efficiently degrade 4-CNB were selected. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the 18 common antibiotics to CT1 were studied using a drug sensitivity test. The results showed that the degradation efficiency of 4-CNB by *Comamonas testosteroni* CT1 was the highest, with a degradation efficiency of 98.4% ± 0.2% at 27 °C for 9 h. Only six antibiotics had MICs, among which ciprofloxacin had the lowest (4 μg·mL⁻¹) and streptomycin had the highest (64 μg·mL⁻¹). The effects of different concentrations of ciprofloxacin on cell concentration and activity, and the activity of total superoxide dismutase (SOD) and degradation were studied using 4-

收稿日期: 2021-01-12 录用日期: 2021-03-24

作者简介: 刘勇豪(1995—), 男, 河南濮阳人, 硕士研究生, 从事微生物学研究。E-mail: 1359669075@qq.com

*通信作者: 郭立泉 E-mail: guolq948@nenu.edu.cn

基金项目: 国家环境保护湿地生态与植被恢复重点实验室课题项目(2019-001); 吉林省预算内基本建设资金项目(2019C055-2); 吉林省教育厅科学基金项目(JJKH20200323KJ)

Project supported: The National Environmental Protection Wetland Ecology and Vegetation Restoration Key Laboratory (2019-001); The Capital Construction Funds within the Budget of Jilin Province (2019C055-2); The Scientific Research Project of Jilin Provincial Department of Education (JJKH20200323KJ)

CNB-ciprofloxacin co-culture. When low concentration ciprofloxacin (1/4 MIC) was added, the cell concentration and activity decreased significantly, and the degradation rate of 4-CNB decreased to $87.0\% \pm 3.3\%$. When the concentration of ciprofloxacin was higher than the MIC (4 MIC), the strain barely grew, and the degradation rate of 4-CNB was only $35.7\% \pm 3.9\%$. The addition of ciprofloxacin significantly decreased SOD activity and caused damage to the reactive oxygen species. Therefore, the decrease of SOD activity caused by ciprofloxacin might be one of the main reasons for the inhibition of 4-CNB biodegradation.

Keywords: ciprofloxacin; 4-chloro-1-nitrobenzene; *Comamonas testosteroni*; biodegradation; superoxide dismutase

4-氯硝基苯(4-chloro-1-nitrobenzene, 4-CNB)是一种常见的有机氯中间体,主要用于合成材料、制备染料、药品(非那西丁、扑热息痛)、农药(除草醚)等。当前,环境中的4-CNB污染问题备受各国政府和学者关注,被喻为严重威胁人类生命安全的一个定时炸弹^[1]。大量排放到环境中的4-CNB会引起神经衰弱、溶血性贫血、肝损害、败血症等疾病甚至死亡,严重威胁人类和动物的安全与健康。在4-CNB的修复技术和方法中,生物降解技术具有安全、经济、环境友好等优点^[2]。目前,研究人员已经分离得到了多株4-CNB降解菌株,如鞣丸酮假单胞菌(*Comamonas* sp.)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、红假单胞菌(*Rhodospiridium* sp.)和醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)等^[3-6]。这些研究为环境中4-CNB的生物降解提供了重要的方法和手段。

环境污染中抗生素往往与4-CNB共存。抗生素的污染状况、环境行为、生态效应等方面均是近年来环境领域的研究热点之一。研究结果显示,在全国范围内的河流、湖泊、水库、近岸及海洋以及其沉积物中均已检出抗生素。其中,以白洋淀湖污染最为严重,湖水中氟喹诺酮类抗生素的含量最高可达 $3\ 093\ \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,其沉积物中抗生素污染物的含量高达 $1\ 475\ \text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[7]。在长江口、东海、南海及各海岸线也相继检出了抗生素,包括四环素类抗生素、大环内脂类抗生素、氨基糖苷类抗生素、 β -内酰胺类抗生素、磺胺类抗生素,这几类抗生素为环境中最常检出的几类抗生素,其典型浓度水平为 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8-11]。经证实,残留在环境中的抗生素将影响微生物的生物量、群落结构和活性,并诱导微生物产生抗性基因^[12]。

抗菌性是抗生素的本质属性。抗生素可对4-CNB降解菌这类环境有益菌产生生态效应,进而影响降解菌对环境中4-CNB的降解性能。李祎毅等^[13]通过红霉素对细菌GY2B的毒性试验,研究了菌体细胞在红霉素作用下的生理、毒理指标以及后效应期间菌体的变化。研究发现,GY2B对红霉素的最高耐受(99.9% 死亡率)浓度为 $25\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,长期接触低于

$25\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红霉素可降低GY2B对药物的敏感性,使其产生耐药性。贾慧等^[14]通过对红霉素对多环芳烃降解菌的毒性及降解性能影响的研究发现,多环芳烃生物降解菌降解性能与红霉素的浓度有关。刘静娴等^[15]通过对抗生素对雌二醇降解菌JX-2降解性能的研究发现:当各抗生素浓度为 $10.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,混合抗生素显著抑制了菌株对E2的降解。目前针对4-CNB生物降解的研究多集中在菌株筛选、鉴定、驯化和降解特性等方面,而围绕抗生素对其影响方面报道较少,而且关于抗生素对于环境污染物的微生物降解的影响因素的相关研究也并不全面,缺少有关抗生素对细胞活性及酶活性影响的研究。因此,研究抗生素对4-CNB微生物降解的影响,对微生物降解清洁技术的应用和保障人类健康安全具有重要的意义。

本文比较了9种4-CNB降解菌株的降解效率,筛选出降解效率最高的菌株——鞣丸酮丛毛单胞菌CT1(*Comamonas testosteroni* ATCC11996)。通过药物敏感性试验,研究了18种环境中常见抗生素对CT1的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。采用4-CNB-抗生素联合培养法,探讨了环境中检出率最高的氟喹诺酮类抗生素——环丙沙星对CT1菌株生长情况、细胞活性、总超氧化物歧化酶(SOD)活性以及不同浓度抗生素下对菌株降解能力的影响,以期通过研究抗生素对4-CNB降解性能的影响和所产生的生态效应,为环境中4-CNB的生物降解和应用提供技术和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

鞣丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)CT1和KF-1、弧菌(*Vibrio*)H5、布丘氏菌(*Buttiauxella*)S19-1、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)PS、红球菌(*Rhodococcus* sp.)P14、施氏假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)JP1、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)LY1和醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)LM1。

1.2 主要试剂及培养基

抗生素:盐酸四环素、红霉素、硫酸庆大霉素、链霉素硫酸盐、氨苄青霉素钠、氯霉素、卡那霉素硫酸盐、羧苄青霉素钠、甲硝唑、盐酸环丙沙星、头孢氨苄、盐酸土霉素、盐酸金霉素、阿莫西林、盐酸克林霉素、磺胺甲恶唑、磺胺二甲恶唑和强力霉素,均购自上海瑞华制药有限公司。

抗生素配制:所有抗生素溶液均为单标,使用5 mL容量瓶进行配制。红霉素、氯霉素分别配制成浓度为 $5\ 120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乙醇溶液,其余抗生素为 $5\ 120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的水溶液,即为抗生素母液。试验前均使用无菌水稀释成浓度为 $1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, $4\ ^\circ\text{C}$ 储存备用。

色谱纯4-CNB(美国Sigma-Aldrich公司)。

4-CNB溶液的配制:使用无水乙醇配制成 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的4-CNB母液, $4\ ^\circ\text{C}$ 储存备用。试验时,吸取 $20\ \mu\text{L}$ 4-CNB母液,加入2 mL LB培养基中,即4-CNB的终浓度为 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

分析纯氯仿(北京化工厂);色谱纯甲醇(Fisher Scientific公司);CCK-8试剂(Bio-sharp公司);SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

LB培养基、MH培养基(青岛海博生物技术有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 4-CNB提取方法

培养液中的4-CNB采用氯仿进行提取,制备的样品分别加入500 μL 氯仿进行萃取,在摇床上振荡20 min,然后 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,吸取下相400 μL ,再 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取下相300 μL ,室温下真空干燥。

1.3.2 4-CNB检测方法

采用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)(Waters e2695)检测4-CNB的含量。检测器:UV(2988 Water Detector)。色谱柱: C_{18} 柱(粒径 $5\ \mu\text{m}$, $4.6\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}$)。液相色谱条件为流动相:甲醇:水=60:40(V:V);流速: $0.7\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长: $\lambda=275\ \text{nm}$;进样量: $5\ \mu\text{L}$;柱温: $25\ ^\circ\text{C}$ 。真空干燥后的样品加入40 μL 甲醇复溶后进行检测。

1.3.3 不同菌株对4-CNB的生物降解

将1.1中的菌株分别活化后,再将处于对数生长期的细菌悬液用LB液体培养基调整至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$,分别加入终浓度为 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-CNB标准品,置于 $27\ ^\circ\text{C}$ 、 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温摇床中培养9 h,按1.3.1方法提

取培养液中的4-CNB,HPLC分别检测4-CNB降解前后的含量,计算得到4-CNB的降解效率(每组样品设置3组平行)。

1.3.4 菌株MIC的测定

菌株对抗生素的MIC:指在体外培养细菌18~24 h后,能够抑制培养基内细菌生长的最低药物浓度^[16]。根据美国临床和实验室标准协会(NCCLS)关于抗菌药物敏感性试验操作标准,采用MH肉汤稀释法测定优势降解菌株的MIC。取无菌小试管($15\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}$)12支置于试管架上,于第1管加入MH肉汤1.6 mL,第2~12管各加MH肉汤1.0 mL。于第1管中加入浓度为 $1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗生素0.4 mL,混匀后取1.0 mL至第2管,第2管混匀后取1.0 mL至第3管,如此连续倍比稀释至第11管,并从第11管中吸取1.0 mL溶液弃去,第12管为不含抗生素的对照组。此时各试管中抗生素浓度依次为256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后将菌悬液浓度校正至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$,并在每管内加入该菌液各1.0 mL。第1管至第11管抗生素终浓度分别为128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后将其放至摇床中培养24 h(培养条件为: $27\ ^\circ\text{C}$ 、 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。然后在波长为600 nm处,测定每管的吸光度值(每组样品设置3组平行)。

1.3.5 环丙沙星对菌株降解性能的影响

菌株活化后,将处于对数生长期的细菌悬液用LB液体培养基调整至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$,分别加入终浓度为 $0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-CNB标准品,然后加入 $1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的环丙沙星溶液,使溶液中环丙沙星的终浓度分别为1/4 MIC、1/2 MIC、MIC和4 MIC($1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $16\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。CK为空白对照组, $27\ ^\circ\text{C}$ 、 $180\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养9 h后取样,分别检测4-CNB在降解前后的浓度,计算得到其降解效率。

1.3.6 生长曲线的测定

将处于对数生长期的细菌悬液用新鲜灭菌的LB培养基调整至 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$,加入 $1\ 280\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的环丙沙星溶液,使溶液中环丙沙星的终浓度为1/4MIC、1/2MIC、MIC和4MIC。CK₀为不加抗生素和4-CNB的空白对照组,CK_c为加4-CNB、不加抗生素的对照组。 $27\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中分别培养4、8、12、24 h和48 h后,用酶标仪(美国Bio-Tek公司)于600 nm波长处测OD值(每组样品设置3组平行)。

1.3.7 细胞活性的测定

将处于对数生长期的细菌悬液用新鲜灭菌的LB

培养基调整至OD_{600nm}=0.1,加入1 280 μg·mL⁻¹的环丙沙星溶液,使溶液中环丙沙星的终浓度为1/4MIC、1/2MIC、MIC和4MIC。CK₀为不加抗生素和4-CNB的空白对照组,CK₁为加4-CNB、不加抗生素的对照组。27℃恒温培养箱中分别培养4、8、12、24 h和48 h后,取每种样品100 μL于96孔板中,迅速分别加入CCK-8(Cell Counting Kit-8)指示剂10 μL混匀后,于37℃恒温培养箱中静置1 h。然后于450 nm波长处测OD值(每组样品设置3组平行)。

抑制率(%)=
$$\frac{\text{空白对照孔OD值} - \text{测定孔OD值}}{\text{空白对照孔OD值} - \text{溶剂对照孔OD值}} \times 100\%$$

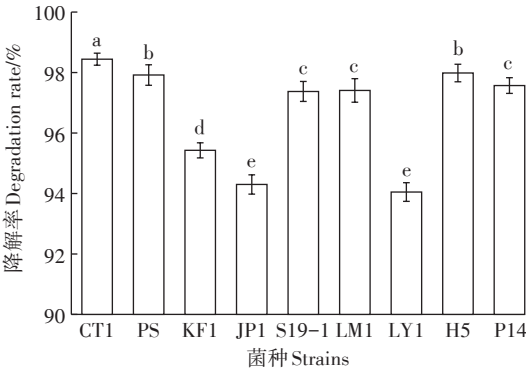
1.3.8 SOD酶活力测定

将处于对数生长期的细菌悬液用新鲜灭菌的LB培养基调整至OD_{600nm}=0.1,加入1 280 μg·mL⁻¹的环丙沙星溶液,使溶液中环丙沙星的终浓度为1/4MIC、1/2MIC、MIC和4MIC。CK₀为不加抗生素和4-CNB的空白对照组,CK₁为加4-CNB、不加抗生素的对照组。27℃恒温培养箱中培养9 h后,使用总SOD活性检测试剂盒(WST-8法)测定细菌培养液中SOD的活性。每组各设4个复孔,每组试验重复3次。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对4-CNB的生物降解

为比较不同菌株对4-CNB降解效率的差异,利用9种4-CNB天然降解菌株分别降解终浓度为0.1 mmol·L⁻¹的4-CNB,结果如图1所示。其中,CT1降解能力最强,经9 h降解后其降解率即可达98.4%±0.2%,与其他菌株降解效率均有显著差异(P<0.05)。



不同小写字母表示菌种间差异显著(P<0.05)。下同
Different lowercase letters indicate significant difference among strains (P<0.05). The same below

图1 4-CNB降解菌对4-CNB的生物降解
Figure 1 Biodegradation of 4-CNB by 4-CNB degradation bacteria

李明堂等^[17]选用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和醋酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)在纯培养条件(25℃、160 r·min⁻¹)下混合培养6 d,对4-CNB降解率为94.5%,CT1与其相比具有明显优势。因此本研究选择CT1开展抗生素对4-CNB降解影响的研究。

2.2 18种抗生素的MIC

在18种常见抗生素中,仅有6种抗生素存在MIC(表1),其中环丙沙星的MIC值最低,为4 μg·mL⁻¹,链霉素MIC最高,为64 μg·mL⁻¹。由于环丙沙星对CT1的抑制作用最为显著且环境中氟诺酮类抗生素的污染比较严重,因此选择环丙沙星进行后续试验,研究不同浓度环丙沙星对菌株CT1的影响。

2.3 环丙沙星对菌株CT1降解4-CNB的影响

环丙沙星对菌株CT1降解4-CNB的影响如图2所示,不同浓度的环丙沙星均导致菌株对4-CNB的降解率显著低于CK。随着环丙沙星浓度的增加,菌株对4-CNB的降解率随之降低。当环丙沙星浓度分别为1/4MIC、1/2MIC、MIC和4MIC时,4-CNB降解率

表1 不同抗生素对CT1的最低抑菌浓度
Table 1 Minimum inhibitory concentration of different antibiotics on CT1

抗生素 Antibiotics	抗生素浓度 Antibiotic concentration/(μg·mL ⁻¹)								
	0	1	2	4	8	16	32	64	128
环丙沙星	+	+	+	-*	-	-	-	-	-
四环素	+	+	+	+	+	-*	-	-	-
卡那霉素	+	+	+	+	+	-*	-	-	-
庆大霉素	+	+	+	+	+	+	-*	-	-
红霉素	+	+	+	+	+	+	-*	-	-
链霉素	+	+	+	+	+	+	+	-*	-
头孢氨苄	+	+	+	+	+	+	+	+	+
克林霉素	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氨苄青霉素钠	+	+	+	+	+	+	+	+	+
羧苄青霉素钠	+	+	+	+	+	+	+	+	+
土霉素	+	+	+	+	+	+	+	+	+
金霉素	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿莫西林	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氯霉素	+	+	+	+	+	+	+	+	+
强力霉素	+	+	+	+	+	+	+	+	+
磺胺甲恶唑	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甲硝唑	+	+	+	+	+	+	+	+	+
磺胺二甲恶唑	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: +表示菌株生长, -表示菌株不生长, -*表示抗生素的MIC。
Note: + indicates strains can grow, - indicates strains cannot grow, and -* indicates the minimum inhibitory concentration.

分别为 $87.0\% \pm 3.3\%$ 、 $78.5\% \pm 2.4\%$ 、 $67.8\% \pm 3.7\%$ 和 $35.7\% \pm 3.9\%$ 。这表明环丙沙星会抑制 CT1 的降解,从而在一定程度上影响环境中 4-CNB 的生物降解。宋国滨等^[18]研究发现,在亚抑菌浓度的头孢西丁及阿米卡星作用下,与对照组相比,3 种浓度(1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC)的 2 种抗生素对 2 种毒力基因均有明显的抑制作用($P < 0.05$)。梁珂娟等^[19]研究发现环丙沙星会抑制 DNA 的合成和复制,因此环丙沙星可能是通过抑制菌株 CT1 的 DNA 的合成和复制,从而抑制菌株的生长,降低 4-CNB 的降解。

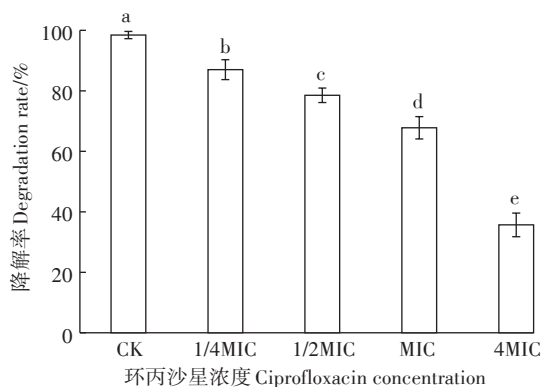


图2 不同浓度环丙沙星对菌株 CT1 降解 4-CNB 的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of ciprofloxacin on degradation of 4-CNB by strain CT1

2.4 环丙沙星对菌株 CT1 生物量的影响

采用紫外分光光度法研究了不同浓度环丙沙星对 CT1 菌株生物量的影响,结果如图 3 所示。随着培养时间延长,CK₀和仅添加 4-CNB(CK_c)的对照组其菌体浓度均显著增加。但是,在 4-CNB 存在条件下,与 CK₀相比,菌体浓度有所下降。这说明 4-CNB 作为降解底物会对菌体产生一定的抑制作用。

对比 CK₀和 CK_c,加入环丙沙星后,环丙沙星明显抑制了菌体的生长。经过 48 h 的培养,CK₀的 OD_{600nm}值增至 1.030,生长迅速。而当环丙沙星浓度分别为 1/4MIC、1/2MIC、MIC、4MIC 时,菌体浓度 OD_{600nm} 值分别为 0.333、0.274、0.239、0.153。但是,当环丙沙星浓度高于 MIC 时,菌株并没有被完全杀死,这是因为当抗生素浓度高于 MIC 值后,在短时间内对受试菌的生长产生了抑制,而并不是完全杀死受试菌^[20];只有当抗生素浓度大于等于最小杀菌浓度(Minimum bactericidal concentration, MBC)时,才能杀死 99.9% 以上的受试菌。

2.5 环丙沙星胁迫下菌株 CT1 的细胞活性的变化

采用 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 法,比较了在

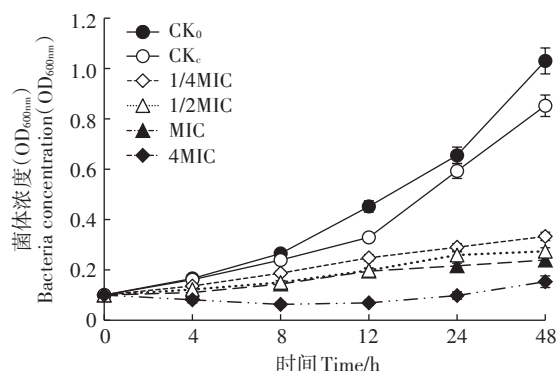


图3 不同浓度环丙沙星对菌株 CT1 生物量的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of ciprofloxacin on CT1 biomass

不同浓度的环丙沙星胁迫下 CT1 细胞活性的变化,结果如图 4 所示。由对照组 CK_c结果可知,4-CNB 对菌体存在一定的抑制作用,0~12 h 时,抑制作用随着时间的延长而增强。在 12 h 后,随着 4-CNB 的降解,细胞活性逐渐升高。环丙沙星的浓度低于 MIC 时,随着环丙沙星浓度的升高,细胞的抑制率逐渐升高。在 0~24 h 时,细胞的抑制率呈增加趋势,在 24~48 h 时,抑制率的增加趋势逐渐放缓,即环丙沙星对 CT1 的抑制作用达到最大。这与前述不同浓度环丙沙星对菌体 CT1 增殖的影响结果相同。

2.6 环丙沙星对细胞内 SOD 酶活性的影响

SOD 酶广泛分布于生物中,是生物体内用于清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶^[21]。通过测定 CT1 菌细胞内的总 SOD 酶活性,探讨 CT1 菌体在不同浓度环丙沙星胁迫下细胞内酶活性的变化。由图 5 可知,在没有抗生素但有 4-CNB 的存在时(CK_c),CT1 菌体与对照组(CK₀)SOD 酶活性没有显著差异($P >$

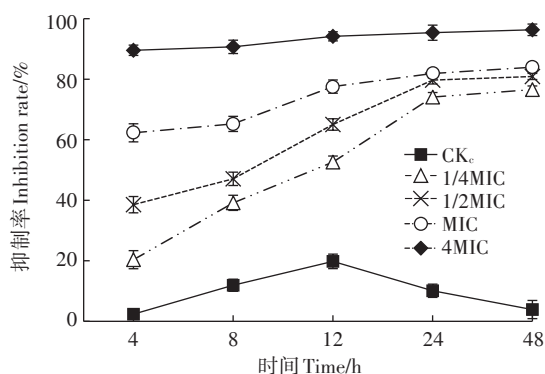


图4 不同浓度环丙沙星对菌株 CT1 细胞活性的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of ciprofloxacin on the activity of CT1 cells

0.05), 分别为 $21.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $20.8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可见, 4-CNB 对 CT1 菌体细胞内酶活性没有显著影响 ($P>0.05$)。而随着环丙沙星浓度的增加, CT1 菌体细胞内 SOD 酶活性分别下降了 4.5%、18.0%、20.9% 和 43.2%。由此可见, 环丙沙星对细胞内 SOD 酶活性的抑制作用, 是细胞增殖受抑制的主要原因之一。

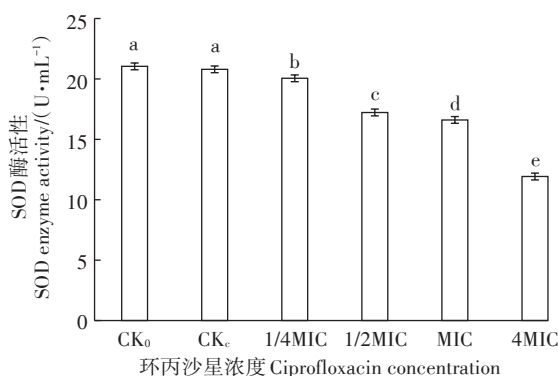


图5 不同浓度环丙沙星对菌株 CT1 细胞内总 SOD 活性影响
Figure 5 Effect of different concentrations of ciprofloxacin on total SOD activity of CT1 strain

3 讨论

近年来, 已有多位学者筛选得到降解 4-CNB 的菌株, LIU 等^[22]分离得到的 *Pseudomonas stutzeri* 需 84 h 才能降解 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻氯硝基苯。KATSIVELA 等^[23]分离得到单一菌株 *Comamonas.sp.*, 在 36 h 可降解 $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-CNB。本文首先通过对比 9 株菌降解 4-CNB 的差异, 选择降解效果最佳的菌株。结果表明, 睾丸酮丛毛单胞菌 CT1 降解 4-CNB 效果最佳, 在 9 h 时, 可降解 98.4% 的 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-CNB。由此可知, 菌株 CT1 具有高效降解 4-CNB 的能力, 因此本研究最终选用菌株 CT1 开展生物降解的研究。

环境中的 4-CNB 污染物通常与抗生素共存。李威等^[24]调查得知, 天津冬季某耕地磺胺类抗生素残留量为 $2.6 \sim 12.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 喹诺酮类抗生素残留量为 $10.3 \sim 30.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。朱宇恩等^[25]选取山西省汾河沿岸的农田土壤为研究对象, 检测到环丙沙星浓度为 $0.54 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在抗生素存在的情况下, 细菌在环境中能否正常生长, 能否实现本身的降解功能还要视其对应的 MIC 值和抗生素在环境中的残留浓度。因此本试验研究了 18 种常用抗生素对菌株 CT1 的 MIC。结果显示: 环丙沙星、四环素、卡那霉素、庆大霉素、红霉素和链霉素的 MIC 分别是 4、16、16、32、32

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $64 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这些抗生素的 MIC 浓度远比环境中残留的浓度高, 但某些含抗生素的医药废弃物、滥用抗生素的人畜产生的粪便随意排放, 可能会造成某污染点瞬时浓度过高甚至远超出这个浓度水平, 从而影响 CT1 正常的生理功能。因此在使用菌株 CT1 进行环境修复时, 也要考虑这些抗生素的不良影响。所以本研究选用环境中残留最广泛和 MIC 值最低的环丙沙星进行相关试验。

通过 4-CNB-环丙沙星联合培养, 研究在不同环丙沙星浓度作用下菌株的生长情况和降解情况。结果显示: 与 CK 相比, 不同浓度环丙沙星均会抑制菌株 CT1 降解 4-CNB, 且不同浓度环丙沙星对菌株 CT1 的抑制均存在显著差异 ($P<0.05$)。黄莺^[26]的研究发现红霉素浓度高于 $0.25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MIC) 即会抑制细菌的生长和菲的降解, 红霉素胁迫可显著改变降解菌的蛋白表达, 尤其是降解相关的蛋白表达量下调。因此环丙沙星可能也是通过抑制降解 4-CNB 基因的合成, 而降低了 4-CNB 的降解效率。

CCK-8 法具有灵敏、重现性好等特点, 细胞线粒体中的脱氢酶在电子载体的作用下可将 CCK-8 还原为甲臞产物, 甲臞产物的数量与活细胞的数量成正比, 可间接反映出活细胞的数量, 同时也可间接反映出抗生素的毒性^[27]。加入不同浓度环丙沙星后, 菌株的生物量和细胞活性均受到显著抑制。且随着培养时间的延长抑制逐渐增强。菌体的生长繁殖受多种因素的影响。SOD 是生物体内用于清除超氧阴离子自由基的重要抗氧化酶^[28], 本研究通过测定 CT1 的 SOD 酶活性来探讨环丙沙星对该菌株生长的抑制情况。细胞代谢过程中会产生活性氧, 活性氧的产生和清除在细胞正常增殖和代谢时一般会保持动态平衡。如若失衡则会导致氧化胁迫, 并对生物膜、酶等造成可逆或不可逆损伤, 损伤严重时还可引起细胞死亡^[29]。本试验中与 CK 相比, 加入不同浓度的环丙沙星均会导致菌株 SOD 酶活性显著下降, 菌株 SOD 酶活性的下降可能是菌体生物量下降、细胞活性受到抑制的主要原因。研究表明^[30], 环丙沙星主要作用于细胞 DNA 解旋酶的 A 亚单位, 抑制 DNA 的合成和复制, 从而起到抗菌作用。因此环丙沙星可能是通过抑制 DNA 的合成和复制, 降低 SOD 酶活性, 从而引起活性氧对菌体损伤, 这可能是环丙沙星对细胞毒性机制的一部分重要内容。

由于环境中抗生素的残留一般为痕量水平^[31], 远低于试验中使用的环丙沙星浓度, 而且即使添加高

于环境浓度 100~1 000 倍的环丙沙星(MIC),菌株 CT1 仍具有较为良好的降解性能,降解率能达到 67.7% 以上。这说明菌株 CT1 在自然环境中的正常生理功能不易受到环丙沙星的抑制,因此其有望直接应用于我国各类环境介质中 4-CNB 的去除,具有一定的应用前景。

4 结论

(1)本文比较了 9 种 4-CNB 降解菌株的降解效率,其中羧苄唑酮丛毛单胞菌 CT1 菌株的降解效率最高。在 27 ℃ 条件下,9 h 的降解效率可达 98.4%±0.2%,与其他菌株相比具有显著性差异。

(2)18 种常见抗生素中,环丙沙星对菌株 CT1 的 MIC 最低,而四环素、卡那霉素、庆大霉素、红霉素、链霉素等抗生素对 CT1 菌株的 MIC 较高,其他 12 种抗生素则没有 MIC。这说明不同抗生素对 CT1 菌体的抑制作用具有较大的差异性,可以应对环境中复杂的抗生素污染。

(3)不同浓度的环丙沙星均会显著抑制菌株对 4-CNB 的降解,在高浓度环丙沙星(4MIC)胁迫下,4-CNB 降解率仅为 35.7%±3.9%。

(4)SOD 酶活性结果显示,4-CNB 不会对 CT1 菌株造成细胞损伤。而加入环丙沙星后,CT1 菌体内 SOD 酶活性显著降低。这说明了环丙沙星通过降低 CT1 细胞内 SOD 活性从而引起的活性氧对菌体损伤,这可能是 CT1 细胞受到环丙沙星伤害和其降解 4-CNB 能力下降的主要原因之一。

(5)本文筛选出了 4-CNB 优势降解菌株,并考察了环境中抗生素对降解产生的影响。本研究将有利于正确评价抗生素和 4-CNB 的环境风险,并为 4-CNB 降解菌等环境有益菌在实际应用过程中的有效应用提供科学依据。然而对环丙沙星抑制 CT1 降解 4-CNB 的分子机理并不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈良文. 硝基氯化苯市场分析报告[J]. 精细化工原料及中间体, 2011, 7:41-45. CHEN L W. Market analysis report of nitrochlorobenzene[J]. *Fine Chemical Intermediates*, 2011, 7:41-45.
- [2] 刘磊, 刘志培, 吴建峰, 等. 氯代硝基苯降解菌 *Comamonas* sp. strain CNB-1 对污染土壤生物修复作用的研究[J]. 环境科学学报, 2007 (4): 615-621. LIU L, LIU Z P, WU J F, et al. Bioremediation of chloronitrobenzene-polluted soil with *Comamonas* sp. strain CNB-1 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007(4):615-621.
- [3] 镇达, 陈茂彬. 假单胞菌 ZWL73 降解 4-氯硝基苯的代谢途径研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 358-362. ZHEN D, CHEN M B.

Identification of metabolic pathways of 4-chloronitrobenzen degradation by *Pseudomonas* strain ZWL73[J]. *Microbiology China*, 2008, 35 (3):358-362.

- [4] MARKUS A, KLAGES U, KRAUSS S, et al. Oxidation and dehalogenation of 4-chlorophenylacetate by a two-component enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain CBS3[J]. *Journal of Bacteriology*, 1984, 160(2):618-621.
- [5] PARK H S, LIM S J, CHANG Y K, et al. Degradation of chloronitrobenzenes by a co-culture of *Pseudomonas putida* and a *Rhodococcus* sp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (3) : 1083-1091.
- [6] LIU L, JIANG C Y, LIU X Y, et al. Plant-microbe association for rhizoremediation of chloronitroaromatic pollutants with *Comamonas* sp. strain CNB-1[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 76(4):418-421.
- [7] ZHANG L L, SHEN L N, QIN S, et al. Quinolones antibiotics in the Baiyangdian Lake, China: Occurrence, distribution, predicted no-effect concentrations(PNECs) and ecological risks by three methods[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256:113-122.
- [8] GUO X Y, FENG C H, GU E X, et al. Spatial distribution, source apportionment and risk assessment of antibiotics in the surface water and sediments of the Yangtze Estuary[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671:548-557.
- [9] CHEN Y H, CUI K P. Comprehensive insights into the occurrence, distribution, risk assessment and indicator screening of antibiotics in a large drinking reservoir system[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 716:418-421.
- [10] LI F F, CHEN Y J, CHEN W D, et al. Antibiotics in coastal water and sediments of the East China Sea: Distribution, ecological risk assessment and indicators screening[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 151:110-118.
- [11] ZHANG R J, YU K F, LI A, et al. Antibiotics in corals of the South China Sea: Occurrence, distribution, bioaccumulation, and considerable role of coral mucus[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 250:503-510.
- [12] ARIAS C A, MURRAY B E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century: A clinical super-challenge[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(5):439-443.
- [13] 李伟毅, 杨琛, 郭楚玲, 等. 红霉素对非降解菌 GY2B 的毒性及抗生素后效应[J]. 环境工程学报, 2014, 8(3): 1221-1228. LI Y Y, YANG C, GUO C L, et al. Cytotoxicity and post-antibiotic effect of erythromycin on phenanthrene-degrading strain GY2B[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(3): 1221-1228.
- [14] 贾慧, 邵磊. 红霉素对多环芳烃降解菌的毒性及降解性能的影响研究[J]. 化工管理, 2016(8):122. JIA H, SHAO L. Study on toxicity and degradation performance of erythromycin on PAHs degrading bacteria[J]. *Chemical Enterprise*, 2016(8): 122.
- [15] 刘静娴, 刘娟, 孙敏霞, 等. 抗生素对雌二醇降解菌 JX-2 降解性能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(8): 1488-1497. LIU J X, LIU J, SUN M X, et al. Effects of antibiotics on the estradiol degradation by strain JX-2[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(8):1488-1497.

- [16] PRIDMORE A, BURCH D, LEES P. Determination of minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of tiamulin against field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 151(3):409-412.
- [17] 李明堂, 徐镜波, 卢振兰, 等. 两株细菌对邻氯硝基苯的协同降解[J]. *环境科学学报*, 2010, 30(6):1138-1143. LI M T, XU J B, LU Z L, et al. Synergistic degradation of 2-chloronitrobenzene by two strains of bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(6):1138-1143.
- [18] 宋国滨, 王刚, 黄颖, 等. 亚抑菌浓度抗生素对高毒力肺炎克雷伯菌毒力基因表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 3:352-357. SONG G B, WANG G, HUANG Y, et al. Effect of sub inhibitory concentration antibiotics on the expression of virulence genes of highly virulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2021, 3:352-357.
- [19] 梁珂娟, 杨号杰, 马攀龙, 等. 喹诺酮类抗菌材料制备及性能研究[J]. *广东化工*, 2020, 47(18):32-34. LIANG K J, YANG H J, MA P L, et al. Preparation and properties of quinolone antibacterial materials[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2020, 47(18):32-34.
- [20] 鲁萌萌, 李文茹, 周少璐, 等. 生姜精油化学成分及其抗菌活性[J]. *微生物学通报*. 2020, 54(23):22-24. LU M M, LI W R, ZHOU S L, et al. Chemical constituents and antibacterial activity of ginger essential oil[J]. *Microbiology China*, 2020, 54(23):22-24.
- [21] BELINKY P A, GOLDBERG D, KRINFELD B, et al. Manganese containing superoxide dismutase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Its function, expression and gene structure[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(6):754-764.
- [22] LIU H, WANG S J, ZHOU N Y. A new isolate of *Pseudomonas stutzeri* that degrades 2-chloronitrobenzene[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(4):309-312.
- [23] KATSIVELA E, WRAY V, PIEPER D H, et al. Initial reactions in the biodegradation of 1-chloro-4-nitrobenzene by a newly isolated bacterium, strain LW1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65:1405-1412.
- [24] 李威, 李佳熙, 李吉平. 我国不同环境介质中的抗生素污染特征研究进展[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2020, 44(1):205-214. LI W, LI J X, LI J P. Research progress on characteristics of antibiotic contamination in different environmental media in China[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2020, 44(1):205-214.
- [25] 朱宇恩, 苗佳蕊, 郑静怡. 汾河沿岸农田土壤喹诺酮类抗生素残留特征及风险评估[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(6):1989-1998. ZHU Y E, MIAO J R, ZHENG J Y. Residue characteristics and risk assessment of quinolones in farmland soils along Fenhe River[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(6):1989-1998.
- [26] 黄莺. 红霉素胁迫下非降解菌 *Sphingomonas* sp. GY2B 的微观形貌及蛋白组学研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017:10-12. HUANG Y. Micromorphology and proteomics of *Sphingomonas* sp. GY2B under erythromycin stress[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017:10-12.
- [27] 蔡文涛. MTT法和CCK-8法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(3):305-310. CAI W T. Comparison of MTT assay and CCK-8 assay in detecting cytotoxicity of antiviral active components of traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Hubei University (Natural Science)*, 2017, 39(3):305-310.
- [28] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(9):405-410.
- [29] 唐家全, 郝大志, 李婷婷. 棘孢木霉菌对钠胁迫的生理响应机制[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(1):23-34. TANG J Q, HAO D Z, LI T T. Physiological response of *Trichoderma asperellum* to Na⁺ stress[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(1):23-34.
- [30] 马驿, 彭金菊, 王芸, 等. 环丙沙星对土壤微生物量碳和土壤微生物群落碳代谢多样性的影响[J]. *生态学报*, 2013(5):1506-1512. MA Y, PENG J J, WANG Y, et al. Effects of ciprofloxacin on microbial biomass carbon and carbon metabolism diversity of soil microbial communities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013(5):1506-1512.
- [31] 俞慎, 王敏, 洪有为. 环境介质中的抗生素及其微生物生态效应[J]. *生态学报*, 2010, 31(15):4437-4446. YU S, WANG M, HONG Y W. Antibiotics in environmental media and their microbial ecological effects[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 31(15):4437-4446.