



青島農業大學

# 学士学位论文

题 目	大球盖菇 GL0170 对盐酸四环素降解 的研究
姓 名	杜海燕
学 号	20180202995
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术（食用菌）
班 级	201801
指导教师	郭立忠

二〇二二年六月

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

## 学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

## 大球盖菇 GL0170 对盐酸四环素降解的研究

**摘要：**四环素类抗生素因为其成本低廉、使用方便等优点在世界各国得到大量的使用。近年来，饲养人为了提高经济效益，往往存在过量使用抗生素的问题，不仅对生物体本身造成危害，对于环境也存在重大威胁。如何快速有效的清除环境中的抗生素残留已成为目前研究的热点。本文以大球盖菇为研究对象，通过研究培养基组分、接种量、四环素类抗生素种类、四环素浓度、培养时间等因素对四环素降解的影响，探讨大球盖菇降解四环素的特性与最佳降解条件，测定不同时间加入四环素降解效率，利用高效液相色谱法检测四环素降解产物，并制备降解产物。利用大球盖菇降解四环素丰富了四环素真菌降解的微生物资源，对于环境保护具有深远意义。

**关键词：**盐酸四环素；四环素降解；高效液相色谱（HPLC）

## Study on the degradation of tetracycline hydrochloride by *stropharia rugoso-annulata* GL0170

**Abstract:** Tetracycline antibiotics are widely used all over the world because of their low cost and convenient use. In recent years, in order to improve economic efficiency, breeders often have the problem of excessive use of antibiotics, which not only causes harm to the organism itself, but also poses a major threat to the environment. How to quickly and effectively remove antibiotic residues in the environment has become a hot research topic. In this paper, taking Mushroom globulus as the research object, by studying the effects of medium components, inoculum amount, tetracycline antibiotic type, tetracycline concentration, culture time and other factors on the degradation of tetracycline, the characteristics and optimal methods of tetracycline degradation of *Oleurotus gigantea* were discussed. The degradation conditions were determined, the degradation efficiency of tetracycline was measured at different times, the degradation products of tetracycline were detected by high performance liquid chromatography, and degradation products were prepared. Degradation of tetracycline by Mushroom globulus enriches the microbial resources for fungal degradation of tetracycline, which has far-reaching significance for environmental protection.

**Key words:** Tetracycline hydrochloride; Tetracycline degradation; High performance liquid chromatography(HPLC);

# 目 录

1 文献综述.....	1
1.1 四环素概述.....	1
1.2 四环素过量使用危害.....	1
1.2.1 四环素过量使用对环境的危害.....	1
1.2.2 四环素过量使用对生物体的危害.....	2
1.3 四环素检测方法.....	2
1.4 四环素降解方法.....	2
2 材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.1.1 实验菌株.....	3
2.1.2 培养基.....	3
2.1.3 实验试剂.....	4
2.1.4 实验仪器.....	5
2.2 实验方法.....	5
2.2.1 活化菌株大球盖菇 GL0170.....	5
2.2.2 接种大肠杆菌.....	5
2.2.3 筛选大球盖菇生长的培养基.....	6
2.2.4 筛选大球盖菇可以降解的四环素类抗生素.....	6
2.2.5 筛选大球盖菇可以降解四环素的浓度.....	6
2.2.6 大球盖菇接种量对四环素降解的影响.....	6
2.2.7 不同时间加入四环素降解效率.....	7
2.2.8 超声萃取.....	7
2.2.9 旋蒸.....	7
2.2.10 高效液相色谱法检测降解产物.....	8
2.2.11 降解产物制备与检测.....	8
2.2.12 薄层层析法分离混合样品.....	9
3 结果.....	9
3.1 大肠杆菌生长曲线.....	9
3.2 大球盖菇生长适宜培养基.....	10

3.3 筛选大球盖菇可以降解的四环素类抗生素 .....	11
3.4 筛选大球盖菇可以降解四环素的浓度 .....	11
3.5 大球盖菇接种量对四环素降解的影响 .....	12
3.6 不同时间加入四环素降解效率 .....	13
3.7 高效液相色谱检测结果 .....	14
3.8 高效液相色谱检测降解制备结果 .....	16
3.9 薄层层析法结果 .....	17
4 分析与讨论 .....	18
4.1 不同条件大球盖菇对四环素降解的影响 .....	18
4.2 不同时间加入四环素降解效率 .....	18
5 结论 .....	18
参考文献 .....	20
致谢 .....	22

## 1 文献综述

### 1.1 四环素概述

四环素类抗生素（Tetracycline antibiotics, TCs）是一种广谱抗生素，包括第一代天然四环素类的四环素、土霉素、金霉素，第二代半合成四环素类的米诺环素、美他环素、多西环素和第三代半合成四环素类的替加环素等<sup>[1]</sup>。四环素类抗生素成本低廉、使用简便，在世界各国尤其是在发展中国家广泛使用。

盐酸四环素（Tetracycline, TC）本身及其盐类都是黄色或淡黄色的晶体，在干燥状态下极为稳定，对大多数革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌具有抑制作用。

土霉素（Oxytetracycline, OTC）是淡黄色结晶性粉末，广泛用于集约化养殖中治疗肠道和呼吸系统疾病<sup>[2]</sup>。A.A.Machado 等<sup>[3]</sup>研究土霉素被归类为对尼罗罗非鱼毒性极大，对小罗非鱼和罗非鱼毒性极强，并对所测试的三种生物构成环境中毒风险。根据这项研究，土霉素不应用于水产养殖，因为它具有剧毒并且对测试生物造成环境中毒风险。

盐酸多西环素(Doxycycline, DOX)是一种黄色结晶性粉末，易溶于水和甲醇。多西环素抗菌谱广，在胃肠道中具有良好的吸收能力、较强的组织渗透性、较长的生物半衰期，被广泛用于治疗细菌感染<sup>[4]</sup>。

### 1.2 四环素过量使用危害

#### 1.2.1 四环素过量使用对环境的危害

生态环境部在《新污染物治理行动方案（征求意见稿）》和《重点管控新污染物清单（2021年版）》中综合考虑新污染物的特点，国内外高度关注的抗生素类物质被列入新型污染物。从20世纪40年代，抗生素开始用作禽畜饲料添加剂<sup>[5]</sup>，用于防治禽畜类常见肠道感染疾病、促进禽畜生长和提高禽畜产品质量等方面，同时也被应用于水产养殖<sup>[6]</sup>中，来预防和治疗多种细菌性疾病。在禽畜生长过程中使用的抗生素有30%~90%以四环素原形随畜禽粪便排出<sup>[7]</sup>。抗生素大量地进入到环境中，造成环境污染问题。有研究表明，四环素抗生素排放到土壤中，会污染地下水和地表的水环境<sup>[7]</sup>。此外，其残留物还可能引起微生物的选择性遗

传变异，导致“超级细菌”的出现并破坏生态平衡<sup>[9]</sup>。抗生素的环境污染问题已经成为我国乃至全球所面临的主要环境问题之一。

### 1.2.2 四环素过量使用对生物体的危害

四环素类抗生素在畜禽饲养和水产养殖中使用频繁，饲养人为了提高经济效益，经常加大抗生素添加剂量，禽畜类不断地食用添加抗生素的饲料和饮用添加抗生素的水，大量的抗生素在动物体内蓄积，短期可能会影响动物的正常机能反应，长期使用引起慢性中毒，对动物的健康构成极大威胁<sup>[10]</sup>。而这些禽畜加工制品最终会被人类食用，这种威胁又转移到人身上。人们的日常生活离不开蛋、奶、肉和海产品等食品，而在这些含有不同浓度抗生素残留的食品<sup>[11]</sup>，对人体健康造成了很大威胁。

### 1.3 四环素检测方法

检测四环素的方法有很多，例如微生物学测定法<sup>[12]</sup>、酶联免疫测定法<sup>[13]</sup>、高效液相色谱法<sup>[14]</sup>、毛细管电泳法<sup>[15]</sup>和其他传统检测方法。

高效液相色谱法<sup>[16]</sup>（HPLC）采用高压输液系统，分离混合物中的成分，识别每种成分并量化每种成分。通常，该方法涉及使用液体溶剂使液体样品通过填充到柱中的固体吸附材料。原理基于组分在固定相（色谱柱）和流动相（溶剂）之间的分布。根据分子的化学结构，它们在通过固定相时会被延迟。用于样品混合物的分离、鉴定和定量。

近年由于固相萃取柱（SPE）结合液相色谱串联质谱仪<sup>[17]</sup>的普及，以及其高通量、高灵敏度、高效率的特性，越来越成为残留检测的主要手段。

### 1.4 四环素降解方法

现在国内外研究者针对四环素类抗生素的污染的防治主要集中在四环素及其抗性基因的毒性研究、四环素的光催化降解、化学氧化降解等物化处理法方面<sup>[18]</sup>，而四环素类抗生素的微生物降解方面的研究较少。

近几年，研究者不断从环境中分离筛选出可以降解四环素类抗生素的菌种。成洁等<sup>[19]</sup>从长期受四环素类抗生素污染的土壤中分离筛选到 6 株对四环素类抗生素具有降解能力的菌株，通过测序、序列比对等最终鉴定了 2 个菌株，一个为木糖氧化无色杆菌，一个为枯草芽孢杆菌。吴学玲等<sup>[20]</sup>从一家使用四环素抗生素作为饲料添加剂的养猪厂的底部泥浆中，筛选获得一株能够高效降解四环素的细菌。Wen 等<sup>[21]</sup>以黄孢原毛平革菌为原料，制备粗锰过氧化物酶（MnP）作为高效生物催化剂降解广泛使用的四环素（TC）和土霉素（OTC），取得了肯定的

结果。目前关于去除环境中抗生素的方法有很多，其中主要包括光化学处理、Fenton 法、深度氧化法和生物处理等<sup>[22]</sup>。因微生物代谢抗生素绿色环保、经济高效而引起大量研究者的关注。细菌、真菌降解四环素的研究均有报道，细菌如光合细菌、乳酸菌、芽孢杆菌、枯草杆菌等。细菌通常会通过一些具备底物特异性的四环素抗性基因将四环素进行修饰并转化为非活性状态，从而消除环境中的四环素污染。真菌降解四环素的报道较多的有酵母、发酵丝状菌等。真菌能够分泌一系列的胞外酶用来分解难降解的有机物例如木质纤维素、多环芳烃、农药等，这些胞外酶也是真菌降解四环素的主要酶系。真菌中降解四环素主要的酶是漆酶和过氧化物酶。漆酶和过氧化物酶能通过一系列的非特异性的氧化还原反应修饰四环素的活性基团或者分解四环素，使其失去活性。真菌降解四环素的效率高而广受研究，Ahumada-Rudolph 等<sup>[23]</sup>测试了 5 种真菌对于土霉素的降解能力，结果发现五种真菌都能够降解土霉素。自然界中存在大量可以降解四环素的真株，这些真菌在环境的四环素降解中可能扮演了十分关键的角色。

本研究以白腐真菌大球盖菇作为实验菌株，筛选了大球盖菇可以降解的四环素类的抗生素，筛选了大球盖菇可以降解的四环素的培养基种类，在最适培养条件下，进一步筛选了菌株接种量对四环素降解研究，进而研究了大球盖菇分泌蛋白可以降解四环素的浓度。在大球盖菇培养过程中，研究不同时间段加入四环素对大球盖菇生长和四环素降解的影响，运用高效液相色谱法检测四环素降解产物，并制备其降解产物。白腐菌降解法条件简单、易控制、危害较低、专一性强。利用白腐真菌降解四环素对于环境保护具有深远意义，具有更加广阔的发展前景。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验菌株

大球盖菇 GL0170（山东省农业应用真菌实验室保藏菌种）

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ （购买于北京擎科生物科技有限公司）

#### 2.1.2 培养基

##### （1）PDB 培养基

配制 PDB 培养基方法为：称取去皮的马铃薯 200 g，加入蒸馏水 1,000 mL，煮沸 15 min。用纱布过滤后加入 20 g 葡萄糖，终浓度为 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> 溶液，100

$\mu\text{M MgSO}_4$  溶液。搅拌均匀后分装在锥形瓶中，密封， $121^\circ\text{C}$  高温蒸汽灭菌 20 分钟。

#### (2) LB 液体培养基

配制 LB 液体培养基的方法为：10 g 胰蛋白胨，5 g 酵母粉，10 g NaCl，加水至 1,000 mL，分装在锥形瓶中密封， $121^\circ\text{C}$  高温蒸汽灭菌 20 分钟。

#### (3) 大球盖菇基础培养基 1

配制大球盖菇基础培养基 1 的方法为：10 g 麦芽糖，0.6 g 酵母粉，7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1,000 mL 蒸馏水。搅拌均匀后分装在锥形瓶中，密封， $121^\circ\text{C}$  高温蒸汽灭菌 20 分钟。

#### (4) 大球盖菇基础培养基 2

配制大球盖菇基础培养基 2 的方法为：10 g 葡萄糖，2 g 酵母粉，5 g 蛋白胨，0.5 g  $\text{MgSO}_4$ ，1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，1,000 mL 蒸馏水，搅拌均匀后分装在锥形瓶中，密封， $121^\circ\text{C}$  高温蒸汽灭菌 20 分钟。

### 2.1.3 实验试剂

乙酸乙酯、甲醇（色谱纯）、乙腈（高效液相色谱淋洗液）、甲酸（色谱级）、70% Methanol、10% Methanol、二氯甲烷（分析纯）、丙二酸-丙二酸钠缓冲液、漆酶检测液、锰过氧化物酶检测液、200 mM 硫酸铜溶液、200 mM 硫酸锰溶液、盐酸四环素（购买于北京索莱宝科技有限公司）、土霉素（购买于上海麦克林生化科技有限公司）、盐酸多西环素（购买于上海麦克林生化科技有限公司）。

漆酶检测液配制方法：0.5 mM ABTS，用 100 mM 丙二酸-丙二酸钠缓冲液（pH4.5）定容至所需体积。

锰过氧化物酶检测液配制方法：10 mM  $\text{MnSO}_4$ ，10 mM 2,6-DMP，10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ，用 100 mM 丙二酸-丙二酸钠缓冲液定容至所需体积，测定酶活时反应起始于 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  的加入。

100 mg/mL 盐酸四环素配制方法：称取 2 g 盐酸四环素粉末，加 14 mL 无水乙醇，6 mL 无菌水，等四环素溶解后，用 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到 2 mL 无菌离心管中， $-20^\circ\text{C}$  保存。

100 mg/mL 土霉素配制方法：称取 2 g 土霉素粉末，加入 20 mL 1 M HCl 溶解，等溶解后，用 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到 2 mL 无菌离心管中， $-20^\circ\text{C}$  保存。

100 mg/mL 盐酸多西环素配制方法：称取 2 g 盐酸多西环素，加入 20 mL 超纯水溶解，等溶解后，用 0.22  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤到 2 mL 无菌离心管中， $-20^\circ\text{C}$  保存。

## 2.1.4 实验仪器

表 2.1 实验仪器

仪器名称	仪器型号	仪器厂家
振荡培养箱	ZQZY-A8	上海知楚仪器有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	LT-CPS	立德泰勃（上海）科学仪器有限公司
超声波清洗器	KQ5200E	昆山市超声仪器有限公司
旋转蒸发器	LC-RE-501	上海力辰邦西仪器科技有限公司
高效液相色谱仪	e2695	美国 Waters 公司
循环水式多用真空泵	SHK-III	郑州科泰实验设备有限公司
核酸蛋白检测仪	BioPhotometerPlus	Eppendorf
微型旋涡混合仪	XW-80A	上海沪西分析仪器厂有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
低温冷却液循环泵	DLSK-1020	郑州科泰实验设备有限公司
紫外可见分光光度计	752	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
台式高速冷冻离心机	TGL-20M	长沙湘智离心机仪器有限公司
紫外分析仪	JY02S	北京君意东方电泳设备有限公司
微波炉	P70D20TLD4	广东格兰仕微波生活电器制造有限公司
台式高速微量小型离心机	D2012Plus	大龙兴创实验仪器有限公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 活化菌株大球盖菇 GL0170

配制 PDB 培养基, 接种大球盖菇 GL0170 当做种子液, 放入振荡培养箱 25℃、125 rpm/min 培养。

### 2.2.2 接种大肠杆菌

配制 LB 液体培养基, 接种 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 放入 37℃ 振荡培养箱培养。

制备大肠杆菌在 LB 液体培养基与 PDB 液体培养基中的生长曲线。具体操作方法如下: 取无菌离心管 36 个, 加入 300  $\mu$ L LB 液体培养基, 300  $\mu$ L PDB 培养基, 接入 20  $\mu$ L 大肠杆菌, 放入振荡培养箱 37℃、125 rpm 培养。每隔 1 小时取出 3 管测定 OD<sub>600</sub>, 共测 12 小时, 然后绘制大肠杆菌生长曲线, 分析大肠杆菌生长到达稳定期时间, 以便确定后续实验时间。

### 2.2.3 筛选大球盖菇生长的培养基

配制大球盖菇基础培养基 1、大球盖菇基础培养基 2 和 PDB 培养基，按照 8%接种量接种大球盖菇 GL0170，放入振荡培养箱 25℃、125 rpm/min 培养。培养 6 天后，每瓶取出 500  $\mu\text{L}$  用于酶活性测定，并且加入终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的盐酸四环素，继续摇瓶培养。每隔 12 h 取出 900  $\mu\text{L}$  测定酶活以及大肠杆菌生长实验。

大肠杆菌生长实验具体步骤如下：取出的 900  $\mu\text{L}$  离心，取 300  $\mu\text{L}$  上清到 1.5 mL 无菌离心管中，加入 300  $\mu\text{L}$  LB 培养基，接入 20  $\mu\text{L}$  大肠杆菌，放入振荡培养箱 37℃、125 rpm 培养，8 h 后测定 OD<sub>600</sub>。

酶活性测定：另外的上清用于测定漆酶活性与锰过氧化物酶活性。测定体系为 2,850  $\mu\text{L}$  酶检测液、150  $\mu\text{L}$  样品上清，漆酶活性是运用紫外分光光度计在 420 nm 下测定 1 分钟吸光值变化值，锰过氧化物酶活性是运用紫外分光光度计在 468 nm 下测定 1 分钟吸光值变化值。大肠杆菌能生长说明加入的四环素被降解，通过分析三种培养基的酶活及大肠杆菌抑制率，筛选大球盖菇生长最适宜培养基。

### 2.2.4 筛选大球盖菇可以降解的四环素类抗生素

根据实验室现有的四环素类抗生素，筛选大球盖菇可以降解的四环素。配制 9 瓶 PDB 培养基，按照 8%接种量接种大球盖菇 GL0170，放入振荡培养箱 25℃、125 rpm/min 培养。培养 6 天后，每瓶取出 500  $\mu\text{L}$  用于酶活性测定，并且加入终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的盐酸四环素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的土霉素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的盐酸多西环素，每种做 3 个重复。每隔 12 h 取样测酶活以及大肠杆菌生长实验，通过分析加入 3 种四环素类抗生素后大肠杆菌抑制率，筛选大球盖菇可以降解的四环素类抗生素。

### 2.2.5 筛选大球盖菇可以降解四环素的浓度

配制 18 瓶 PDB 培养基，按照 8%的接种量接种大球盖菇 GL0170，放入振荡培养箱 25℃、125 rpm/min 培养。培养 6 天后，分别加入终浓度为 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的四环素，每种浓度做 3 个重复。每隔 12 小时取样测酶活以及大肠杆菌生长实验，通过分析加入 6 种浓度下的大肠杆菌抑制率，筛选大球盖菇可以降解四环素的浓度。

### 2.2.6 大球盖菇接种量对四环素降解的影响

配制 PDB 培养基，分别按照 4%、8%、12%的接种量接种大球盖菇 GL0170，放入振荡培养箱 25℃、125 rpm/min 培养，每个接种量做三个重复。培养 6 天后，

加入终浓度为 250  $\mu\text{g/mL}$  的盐酸四环素，每隔 12 小时取样测酶活以及大肠杆菌生长实验，通过分析 3 种接种量的酶活及大肠杆菌抑制率，分析大球盖菇接种量对四环素降解的影响。

### 2.2.7 不同时间加入四环素降解效率

(1) 配制 12 瓶 PDB 培养基，每瓶装量 200 mL，同时加入终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  硫酸铜溶液、100  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锰溶液。灭菌后按照 8% 接种量接种大球盖菇，放入振荡培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm/min 培养。

(2) 培养第 2 天后，从中取出 3 瓶（标记为第 1 批），每瓶取出 500  $\mu\text{L}$  用于酶活性测定，加入终浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的四环素，放入振荡培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 培养。同时设置对照，取 15 mL 无菌离心管，加入 10 mL PDB 培养基，不接种，加入终浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的四环素，放入振荡培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 培养。每天取样测酶活以及大肠杆菌生长实验。

(3) 培养第 4 天后，从中取出 3 瓶（标记为第 2 批），每瓶取出 500  $\mu\text{L}$  用于酶活性测定，加入终浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的四环素，放入振荡培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm/min 培养。同时设置对照，取 15 mL 无菌离心管，加入 10 mL PDB 培养基，加入终浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的四环素，放入振荡培养箱 25 $^{\circ}\text{C}$ 、125 rpm 培养。每天取样测酶活以及大肠杆菌生长实验。

(4) 培养第 6 天后，从中取出 3 瓶（标记为第 3 批），实验操作同前两批。在实验过程中一直有 3 瓶大球盖菇作为对照，不加四环素。

### 2.2.8 超声萃取

培养第 7 天后，将 12 瓶大球盖菇用 8 层纱布过滤，菌球分别烘干称干重，将每个批次的 3 瓶滤液合并到一起，加入等体积乙酸乙酯利用超声波清洗器超声萃取 30 min，之后用分液漏斗静置 5 min，待液面分层，此时有机相在上方，水相在下方，分离水相和有机相，将水相再加入等体积乙酸乙酯，超声萃取 30 min，重复萃取三次，最后将三次所得有机相合并到一起。

### 2.2.9 旋蒸

运用旋转蒸发器旋蒸有机相，目的是浓缩样品，蒸出乙酸乙酯，具体操作步骤如下：

(1) 打开低温冷却液循环泵，按下制冷和循环键。打开加热水浴锅，调温度到 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 打开水泵循环水。

(3) 将有机相倒入蒸馏烧瓶，安装好蒸馏烧瓶。打开循环水式多用真空泵，待压力升高时，让蒸馏烧瓶旋转，开始旋蒸。

(4) 旋蒸完毕，先让蒸馏烧瓶停止旋转，通大气，然后关闭水泵循环水，最后取下蒸馏烧瓶。

(5) 停低温冷却液循环泵，停止水浴加热，倒出蒸馏烧瓶内溶剂，将转接头和蒸馏烧瓶清洗干净，烘干后再接着旋蒸下一种有机相。刚开始有机相偏多，用 2 L 蒸馏烧瓶旋蒸，等有机相快蒸干时，换用 250 mL 蒸馏烧瓶继续旋蒸，直至蒸干。

## 2.2.10 高效液相色谱法检测降解产物

蒸干之后，用 5 mL 甲醇冲洗蒸馏烧瓶内壁，转移到试管中。用 1 mL 注射器和 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到液相小瓶中。使用高效液相液相 Waters e2695 检测四环素降解产物，使用 WelchC18Xtimate™4.6 mm $\times$ 250 mm 色谱柱，流动相为甲醇、乙腈、含 1%甲酸水溶液。实验前，根据查阅资料，对于流动相比比例进行评估，测试的流动相及比例（体积比）如下：

(1) 甲醇：乙腈：1%甲酸水溶液=25:25:50

(2) 甲醇：乙腈：1%甲酸水溶液=30:30:40

(3) 甲醇：乙腈：1%甲酸水溶液=35:35:30

(4) 甲醇：乙腈：1%甲酸水溶液=39.5:39.5:21

经过测试，选用流动相 39.5%甲醇、39.5%乙腈、21%甲酸水溶液（体积比）进行 HPLC 检测。流速 0.8 mL/min，色谱柱温度设为 40 $^{\circ}\text{C}$ ，样品温度设为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，进样 20  $\mu\text{L}$ 。将 100 mg/mL 的盐酸四环素母液稀释 100 倍后作为标准品上样，设置样品组依次进样检测，分析 3 批降解产物是否相同。

## 2.2.11 降解产物制备与检测

分析不同批次的液相结果，分别制备降解产物。用高效液相制备色谱分离纯化降解产物，流动相为甲醇：乙腈：1%甲酸水溶液=39.5:39.5:21，色谱柱温度设为 40 $^{\circ}\text{C}$ ，样品温度设为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，每次进样 200  $\mu\text{L}$ ，在 273nm 的紫外波长下测定数据，每个吸收峰中的物质分别收集到试管中。将收集到的样品用旋转蒸发器浓缩，浓缩至 3 mL，将浓缩的样品用 1 mL 注射器和 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到液相小瓶中，继续用 HPLC 检测，根据吸收峰判断是否为较纯的物质，是否含有其他杂质。

## 2.2.12 薄层层析法分离混合样品

薄层色谱法(TLC)这一过程是由流动相和固定相组成,以适宜的溶剂为流动相,对混合样品进行分离、鉴定的一种层析分离技术。具体操作步骤如下:将适宜样品溶液用毛细管点在硅胶板的一端,放置于密闭槽中,加入合适流动相。因为各组分极性不同,在流动相的带领下渐渐往前移动,在不同位置出现条带,将板取出、干燥并使用紫外光进行可视化。

高效液相色谱法检测制备的化合物时,发现有几个样品有两个吸收峰或多个吸收峰,采用薄层色谱法分离化合物。薄层板用硅胶板,展开剂为极性较大的二氯甲烷和甲醇。根据查阅文献,测试 TLC 条件,确定 TLC 展层剂条件为二氯甲烷:甲醇=10:1。样品在展层剂中出现 2 个条带,分别用刀片将硅胶板有条带的硅胶刮下来。使用甲醇溶解,然后使用微型旋涡混合仪涡旋混匀,再用超声波清洗器超声萃取 30 min,重复 5 次,充分提取化合物。将上清浓缩,将浓缩的样品用 1 mL 注射器和 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到液相小瓶中,继续用 HPLC 检测。

## 3 结果

### 3.1 大肠杆菌生长曲线

每小时测定大肠杆菌在 LB 液体培养基与 PDB 液体培养基中生长的  $\text{OD}_{600}$ ,共测 12 小时,将  $\text{OD}_{600}$  取平均值后作图,如图 3.1 所示,可以看出,在 8 小时大肠杆菌生长进入稳定期,后续做大肠杆菌生长实验时在 8 小时测定  $\text{OD}_{600}$ 。

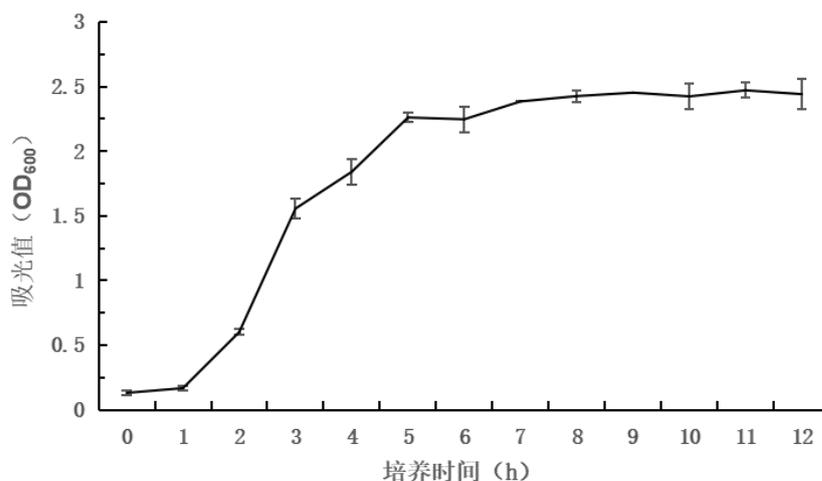


图 3.1 大肠杆菌生长曲线

### 3.2 大球盖菇生长适宜培养基

使用大球盖菇基础培养基 1、大球盖菇基础培养基 2 和 PDB 培养基培养大球盖菇 GL0170，每隔 12 小时做大肠杆菌生长实验，测定 OD<sub>600</sub>，如图 3.2 所示，可以看出，大球盖菇基础培养基 1 菌球数量较少，圆润，大球盖菇基础培养基 2 菌球数量较多，PDB 培养基大球盖菇菌球数量最多。

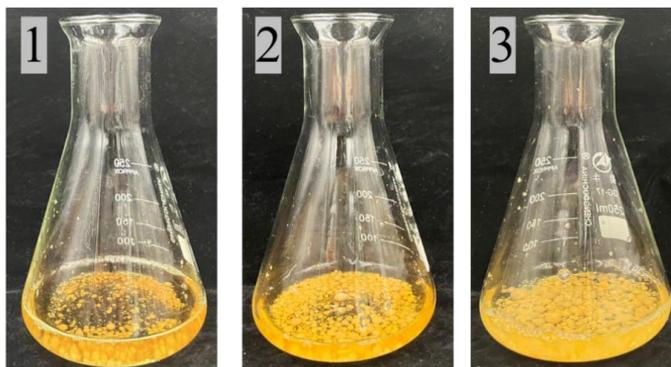


图 3.2 不同培养基菌球生长状态

注：1：大球盖菇基础培养基 1；2：大球盖菇基础培养基 2；3：PDB 培养基

如图 3.3 所示，大球盖菇基础培养基 1 大肠杆菌抑制率很高，说明大肠杆菌基本不生长，盐酸四环素没有被降解。而使用大球盖菇基础培养基 2 和 PDB 培养基培养大球盖菇做大肠杆菌生长实验结果显示大肠杆菌抑制率不断下降，随着时间推移，四环素被降解，PDB 培养基对四环素的降解效率最好，因此我们选用 PDB 培养基进行后续四环素降解实验。

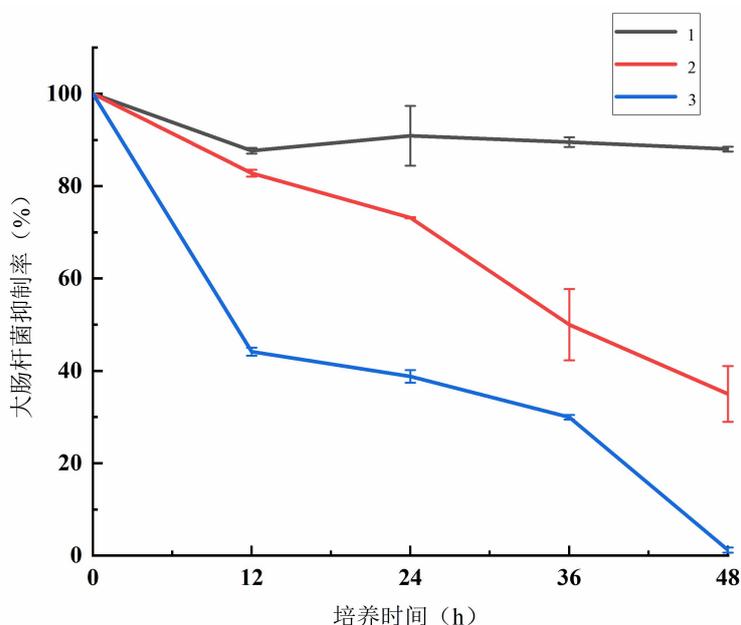


图 3.3 不同培养基大肠杆菌抑制率

注：1：大球盖菇基础培养基 1；2：大球盖菇基础培养基 2；3：PDB 培养基

### 3.3 筛选大球盖菇可以降解的四环素类抗生素

大球盖菇在培养 6 天后加入盐酸四环素、土霉素、盐酸多西环素，每隔 12 小时做大肠杆菌生长实验，测定 OD<sub>600</sub>。由图 3.4 大肠杆菌抑制率可以看出，随着时间推移，这三种抗生素的大肠杆菌抑制率不断下降，说明三种四环素类抗生素都可以被降解，土霉素在 48 h 还没有降解完全，大球盖菇对于土霉素的降解效果比对其他两种的效果差。

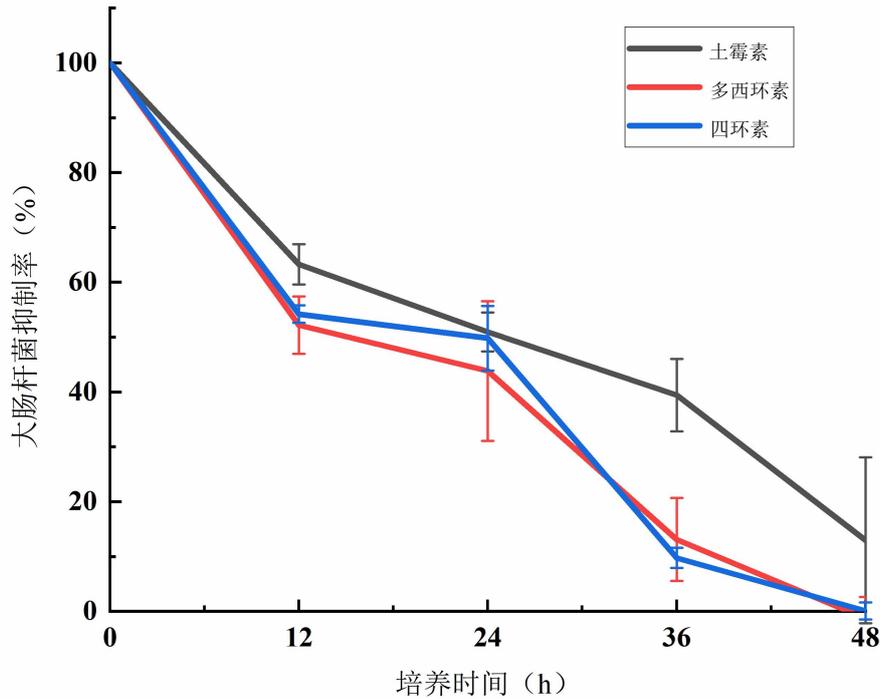


图 3.4 不同抗生素大肠杆菌抑制率

### 3.4 筛选大球盖菇可以降解四环素的浓度

筛选 5 个盐酸四环素的浓度，如图 3.5 不同四环素浓度下大肠杆菌生长抑制率所示，盐酸四环素浓度为 2,000  $\mu\text{g/mL}$  时大肠杆菌抑制率最高，而且随着时间变化，抑制率有很小程度降低，而加入其他 4 种浓度的四环素随着时间变化大肠杆菌抑制率不断下降，说明四环素被降解。48 h 后只有终浓度为 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 、2,000  $\mu\text{g/mL}$  的四环素没有被降解完。

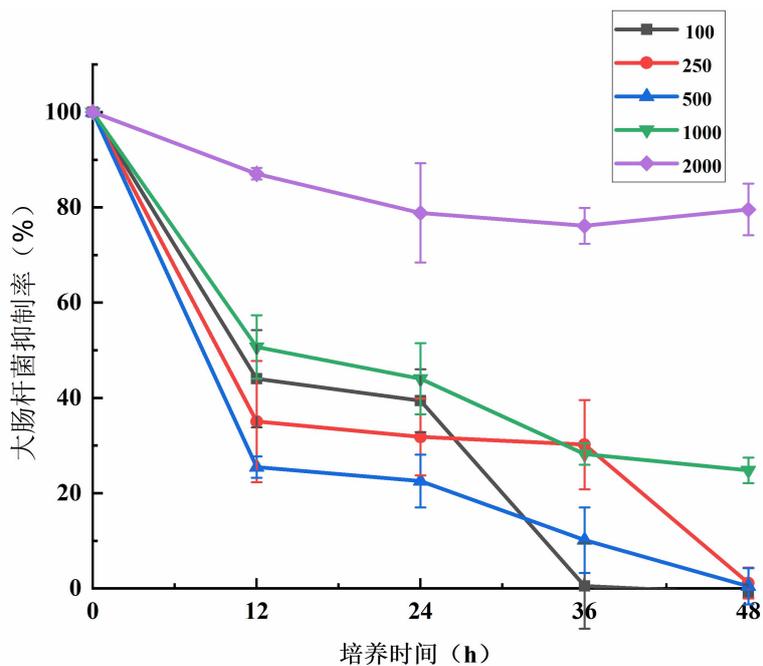


图 3.5 不同四环素浓度下大肠杆菌生长抑制率

### 3.5 大球盖菇接种量对四环素降解的影响

如图 3.6 不同接种量大肠杆菌生长抑制率所示，随着时间推移，大肠杆菌抑制率逐渐下降，接种量为 8%和 12%的大球盖菇在 48 h 四环素已经降解完全，接种量为 4%的大球盖菇在 48 h 四环素没有被降解完全。

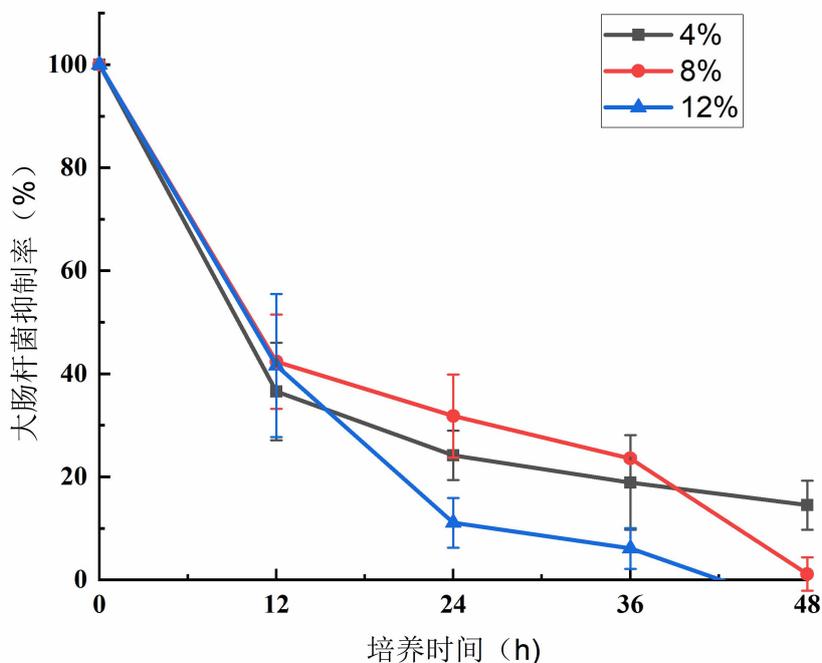


图 3.6 不同接种量大肠杆菌生长抑制率

### 3.6 不同时间加入四环素降解效率

不同时间加入四环素的3批在加入四环素2 d后测定大球盖菇 GL0170 胞外酶活。从图 3.7 胞外酶活测定结果，发现加入四环素可以促进胞外漆酶、锰过氧化物酶的活力，当第 6 d 加入四环素时，两种酶酶活增加幅度最大，猜测漆酶或锰过氧化物酶与四环素的降解有关。

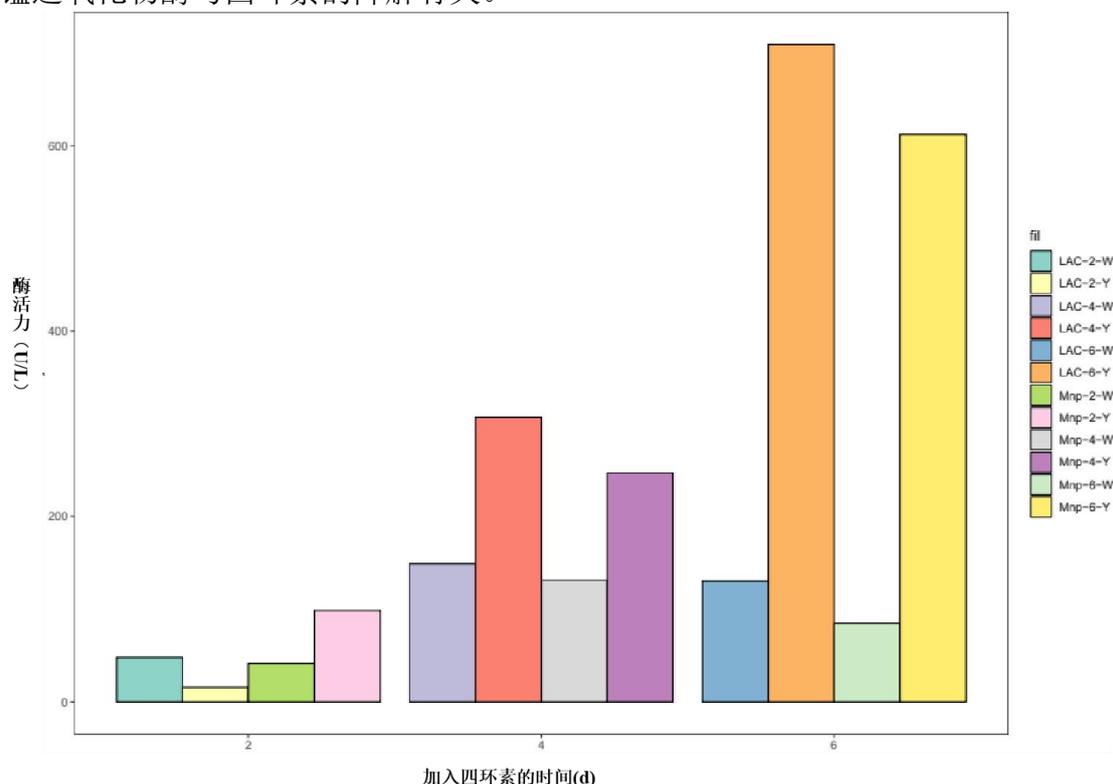


图 3.7 不同时间加入四环素大球盖菇胞外酶活力测定

注：LAC-2/4/6-W 表没有加四环素胞外漆酶活力；LAC-2/4/6-Y 表加四环素胞外漆酶活力；Mnp-2/4/6-W 表没有加四环素胞外锰过氧化物酶活力；Mnp-2/4/6-Y 表加四环素胞外锰过氧化物酶活力。

漆酶酶活公式： $A \cdot B \cdot 10^6 / C$

(A: 1 min 吸光值差值/36,000; B: 酶活试剂加酶液的总体积; C: 酶液的体积)

锰过氧化物酶酶活公式： $A \cdot B \cdot 10^6 / C$

(A: 1 min 吸光值差值/49,600; B: 酶活试剂加酶液的总体积; C: 酶液的体积)

由图 3.8 不同批次加入四环素大球盖菇菌球形态可以看出，第 2 天加入四环素的菌球数量较少，颜色较深。

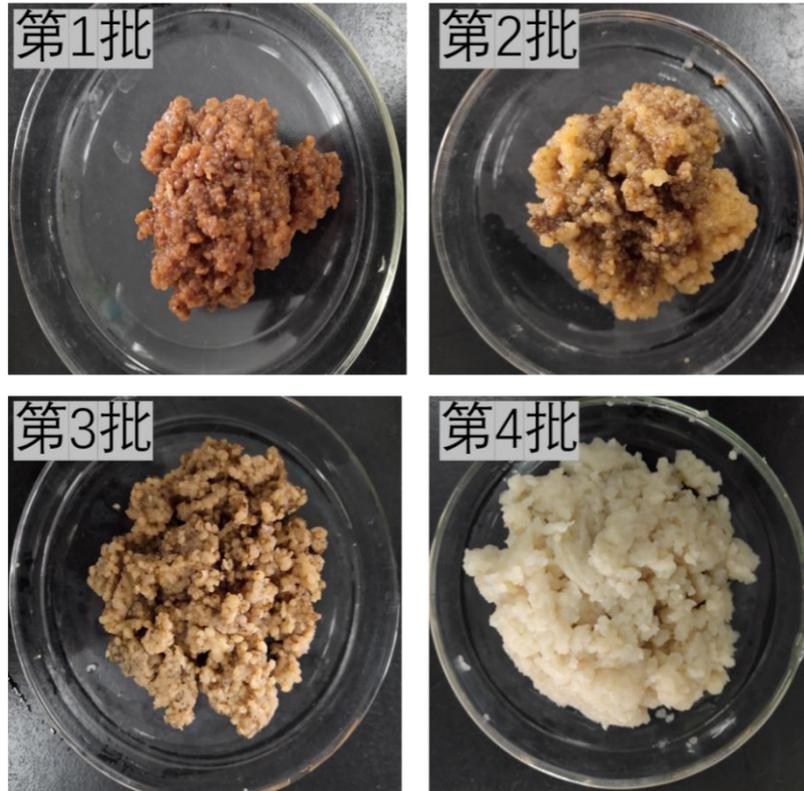


图 3.8 不同时间加入四环素菌球形态

注：第 1 批：第 2 天加入盐酸四环素；第 2 批：第 4 天加入盐酸四环素；第 3 批：第 6 天加入盐酸四环素；第 4 批：未加盐酸四环素对照

表 3.1 不同时间加入四环素大球盖菇 GL0170 菌球干重

未加四环素菌球干重 (g)	第 2 天加四环素菌球干重 (g)	第 4 天加四环素菌球干重 (g)	第 6 天加四环素菌球干重 (g)
0.453	0.257	0.377	0.387

由表 3.1 可以看出，加入四环素会抑制大球盖菇 GL0170 菌球生长，第 2 天加入四环素时，由于菌球生长量较少，对于四环素降解效果不明显，反而四环素抑制了菌球的生长。第 4 天和第 6 天加入四环素时菌球已经大量生长，但干重比未加四环素的大球盖菇菌球干重小，说明四环素对菌球生长还是有影响。

### 3.7 高效液相色谱检测结果

根据查阅文献，测试 4 种高效液相色谱流动相条件，如图 3.9 流动相测试结果，经过测试，选用流动相 39.5%甲醇、39.5%乙腈、21%甲酸水溶液（体积比）进行 HPLC 检测。

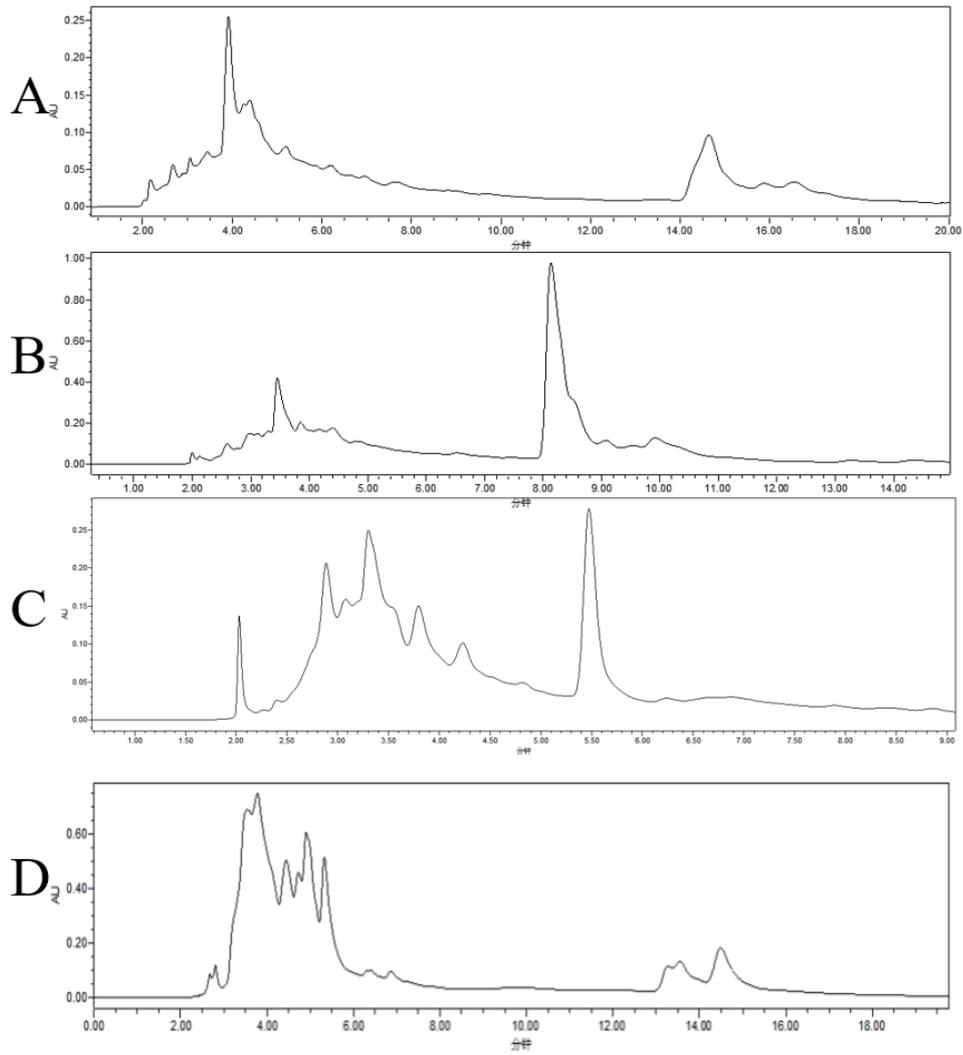


图 3.9 流动相测试结果

注: A: 甲醇: 乙腈: 1%甲酸水溶液=30:30:40; B: 甲醇: 乙腈: 1%甲酸水溶液=25:25:50;  
C: 甲醇: 乙腈: 1%甲酸水溶液=35:35:30; D: 甲醇: 乙腈: 1%甲酸水溶液=39.5:39.5:21

培养第 7 天 HPLC 检测大球盖菇 GL0170 降解四环素的产物, 发现第 2 天加入四环素时的降解产物与第 4 天和第 6 天加入四环素的降解产物不同, 第 2 天加入四环素的图谱中缺少保留时间 13min、15min 的化合物, HPLC 结果如图 3.10 所示

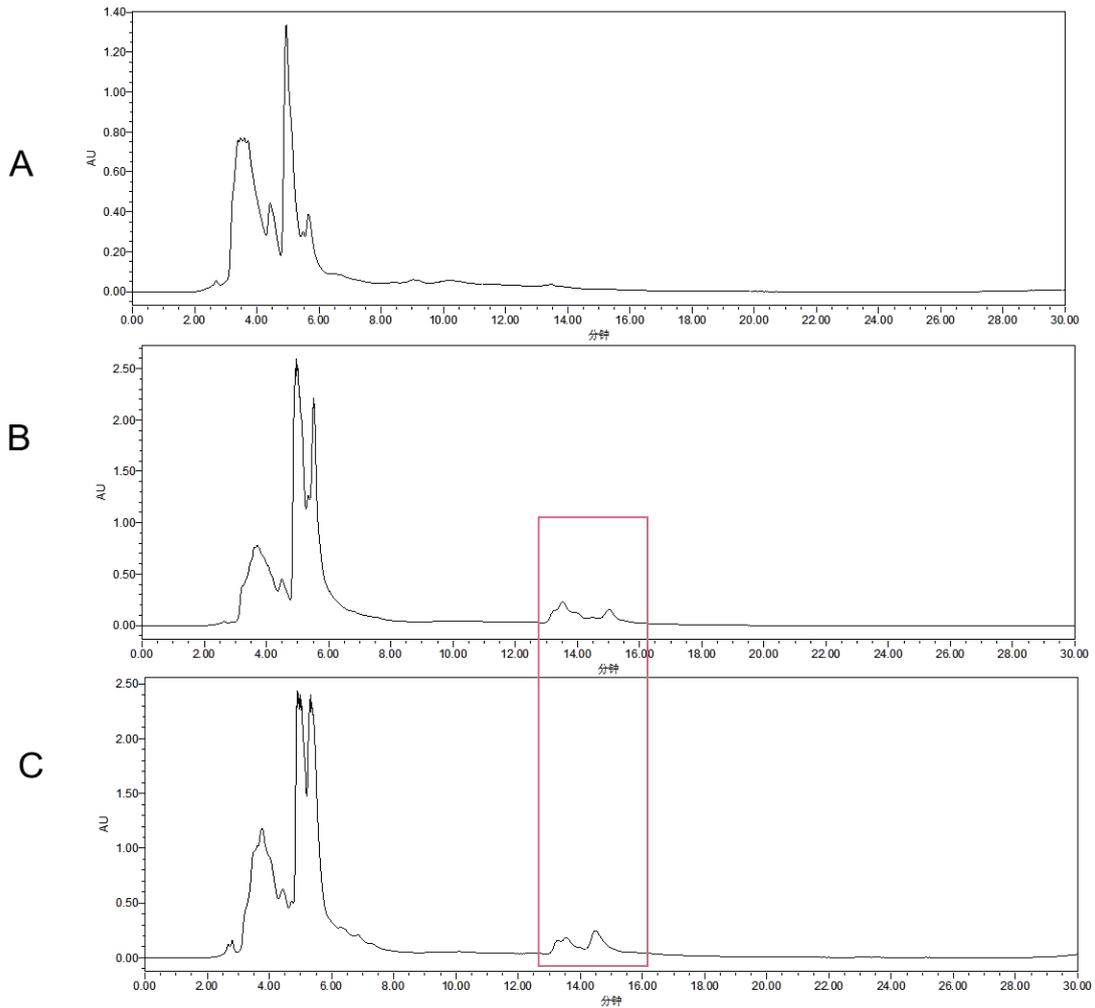


图 3.10 大球盖菇对不同时间加入四环素的降解 HPLC 检测

注：A：第 2 天加入四环素；B：第 4 天加入四环素；C：第 6 天加入四环素

### 3.8 高效液相色谱检测降解制备结果

分析不同批次的液相结果，大球盖菇对四环素降解含有多个吸收峰，分别制备降解产物。对制备的降解产物进行 HPLC 检测，发现有几个较纯的产物，如图 3.11 所示，这两个化合物只有一个吸收峰。

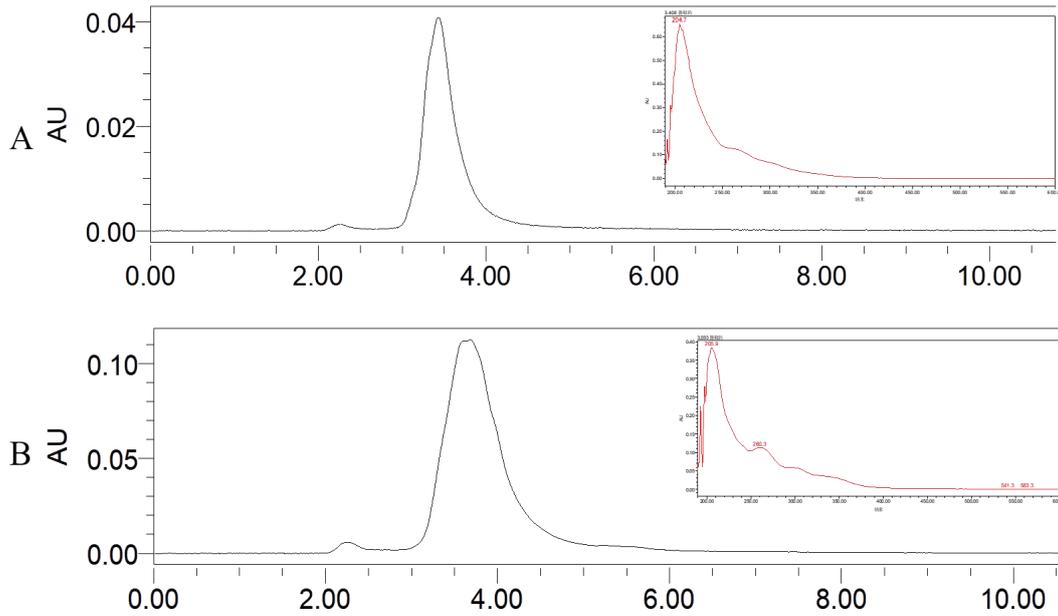


图 3.11 较纯的降解产物检测结果

### 3.9 薄层层析法结果

制备的降解产物在进行 HPLC 检测时，发现几种产物有多个吸收峰，采用薄层层析法对混合样品进行分离。如图 3.12 所示，是 100  $\mu\text{L}$  点板结果图，显示有 2 个条带，加大点样量，进行刮板，将刮板的粉末用甲醇溶解然后使用微型旋涡混合仪涡旋混匀，再用超声波清洗器超声萃取 30 min，重复 5 次，充分提取化合物。将上清浓缩，将浓缩的样品用 1 mL 注射器和 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤到液相小瓶中，继续用 HPLC 检测。

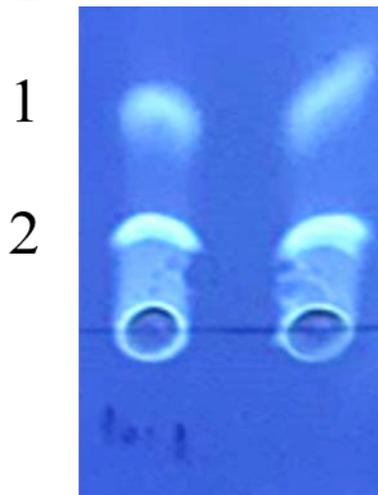


图 3.12 薄层层析法结果

## 4 分析与讨论

### 4.1 不同条件大球盖菇对四环素降解的影响

在本实验中,以大球盖菇为研究对象,研究不同培养基对四环素降解的影响,发现使用大球盖菇基础培养基 1 培养大球盖菇大肠杆菌抑制率很高,说明大肠杆菌基本不生长,盐酸四环素没有被降解,而使用大球盖菇基础培养基 2 和 PDB 培养基培养大球盖菇做大肠杆菌生长实验结果显示大肠杆菌抑制率不断下降,随着时间推移,四环素被降解,PDB 培养基对四环素的降解效率最好。筛选了大球盖菇可以降解的四环素类抗生素,发现大球盖菇可以降解土霉素、盐酸四环素、盐酸多西环素,对土霉素降解效果较差;筛选了大球盖菇可以降解的四环素浓度,当加入盐酸四环素浓度为 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,降解效率缓慢,而加入其他 4 种浓度的盐酸四环素随着时间变化大肠杆菌抑制率不断下降,说明四环素被降解,48 h 后只有 2 种较高浓度的四环素没有被降解完。接种量对于四环素降解影响较小,接种量为 12%时四环素降解效果最好。

### 4.2 不同时间加入四环素降解效率

在大球盖菇培养不同天数加入盐酸四环素测定酶活,发现加入四环素可以促进胞外漆酶、锰过氧化酶的活力,当第 6 d 加入四环素时,两种酶酶活增加幅度最大,此时菌球生长状态达到最佳,猜测漆酶或过氧化物酶与四环素的降解有关。在高效液相色谱检测四环素降解产物时,也发现第 2 d 加入四环素时的降解产物与第 4 d 和第 6 d 加入四环素的降解产物不同。分别制备降解产物,制备产物浓缩后,先 HPLC 检测,确定为较纯物质后,进行 LC-MS。

## 5 结论

本研究以大球盖菇为实验菌株,筛选了大球盖菇可以降解的四环素类的抗生素,选用的三种四环素类抗生素都可以被降解;筛选了大球盖菇可以降解的四环素的培养基种类,PDB 培养基培养大球盖菇对四环素降解效果最好。在最适培养条件下,进一步筛选了菌株接种量对四环素降解研究,进而研究了大球盖菇分泌蛋白可以降解四环素的浓度。在大球盖菇培养过程中,不同时间段加入四环素对大球盖菇生长和四环素降解的影响,利用高效液相色谱法检测四环素降解产物,并制备其降解产物。

本实验取得了一定的研究结果，丰富了四环素真菌降解的微生物资源，为该降解菌株的实际应用提供了一些理论依据。由于时间原因，还存在不完善之处。以后的研究，可以从以下几方面着手：

（1）通过 LC-MS 分析四环素降解产物的分子量，通过核磁共振解析物质结构，从而得知降解产物是什么化合物；

（2）研究盐酸四环素的降解途径；

（3）在禽畜生长过程中使用的抗生素有 30%~90%以四环素原形随畜禽粪便排出，而食用菌栽培后的废菌棒再利用已成为食用菌科技攻关的重要课题之一，将畜禽粪便和大球盖菇菌糠结合发酵有机肥能够有效地解决上述问题，实现废弃物无害化和资源最大化利用<sup>[24]</sup>。

## 参考文献

- [1] 陶美.四环素降解菌筛选及其降解特性研究[D].成都:西南交通大学,2015.
- [2] Migliore, L.; Fiori, M.; Spadoni, A. et al. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium:a mycoremediation technique[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 215-216:227-232.
- [3] Machado, A.A.; JHP, A.P.; Carraschi, S.P. et al. Toxicidade aguda e risco ambiental do antibiótico oxitetraciclina para tilápia ( *Oreochromis niloticus* ), *Daphnia magna* e *Lemna minor*[J]. *Arq.bras.med.vet.zootec*, 2016, 68(5):1244-1250.
- [4] Xu, X.; Ma, W.; An, B. et al. Adsorption/desorption and degradation of doxycycline in three agricultural soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224(13):1-9.
- [5] 贺德春,许振成,吴根义.四环素类抗生素的环境行为研究进展[J].动物医学进展,2011,32(4):98-102.
- [6] 詹杰,魏树和.四环素在土壤和水环境中的分布及其生态毒性与降解[J].生态学报,2015(9):2819-2825.
- [7] 冷一非.微生物降解四环素特性及降解机理研究[D].武汉:中国地质大学,2017.
- [8] 赵月春,洪夏晓.一种四环素类抗生素降解菌及其在土壤污染修复中的应用:CN110904015A[P].2020-03-24.
- [9] Lei, J.A.; Rc, A.; Jx, A. et al. A stick-like intelligent multicolor nano-sensor for the detection of tetracycline: the integration of nano-clay and carbon dots-Science Direct[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 413(6):125296.
- [10] 韩艳.鸡粪便中土霉素的 HPLC 检测及降解规律[D].扬州:扬州大学,2010.
- [11] 张崇威,李华岑,陈蕾,等.鸡蛋及牛奶中四环素类药物残留量的液相色谱-串联质谱测定法[J].中国兽药杂志,2022,56(3):35-45.
- [12] Fagbamila, I.; Kabir, J.; Abdu, P. et al. Antimicrobial screening of commercial eggs and determination of tetracycline residue using two microbiological methods[J]. *International Journal of Poultry Science*, 2010, 9(10):959-962.
- [13] Zhang, Y.D.; Zheng, N.; Han, R.W.; et al. Occurrence of tetracyclines, sulfonamides, sulfamethazine and quinolones in pasteurized milk and UHT milk in China's market[J].*Food Control*, 2014, 36(1):238-242.
- [14] Moudgil, P.; Bedi, J.S.; Aulakh, R.S.; et al. Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(2):338-346.

- [15] Israel, S.; Jose, A.; Jose, M. et al. Miranda; Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(16):2196-2202.
- [16] Tsepo, R.; Lubanza, N.; Modupeade, A. et al. Evaluation of antibiotic residues in raw meat using different analytical methods[J]. *Antibiotics*, 2017, 6(4):1-17.
- [17] 樊成,杜安,樊子便,等.分散固相萃取结合超高效液相色谱-串联高分辨质谱法快速测定羊乳中磺胺类药物[J].食品安全质量检测学报,2021,12(16):6349-6355.
- [18] 曾巧云,丁丹,檀笑.中国农业土壤中四环素类抗生素污染现状及来源研究进展[J].生态环境学报,2018,27(9):1774-1782.
- [19] 成洁,杜慧玲,张天宝,等.四环素类抗生素降解菌的分离与鉴定[J].核农学报,2017,31(5):884-888.
- [20] 吴学玲,吴晓燕,李交昆.一株四环素高效降解菌的分离及降解特性[J].生物技术通报, 2018, 34(5):172-178.
- [21] Wen, X.; Jia, Y.; Li, J. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete Chrysosporium*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177(1-3):924-928.
- [22] 曹国民,杨林燕,刘勇弟.一种在畜禽养殖污水生物处理过程中既保留氨氮又去除抗生素的方法:CN110240262A[P].2019.
- [23] Ahumada-Rudolph, R.; Novoa, V.; Becerra, J. et al. Mycoremediation of oxytetracycline by marine fungi mycelium isolated from salmon farming areas in the south of Chile[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 152(468):112198.
- [24] 李杨,桓明辉,高晓梅,等.杏鲍菇菌糠促进畜禽粪便发酵过程的研究[J].中国土壤与肥料,2014(2):97-100.

## 致谢

伴随毕业设计的完成，我的大学四年时光也接近尾声。回望这段时光，有欢乐有失落，有煎熬有惊喜。四年时间，我不仅学习到很多生物专业方面的知识，进一步扩充了眼界，更重要的是提升了自身能力。

首先对我的导师表示感谢，郭立忠老师学识渊博、为人宽厚、严于律己，在实验和生活中给予我支持与帮助。感谢于浩副教授对实验的指导，在于浩老师的指导下，我确立了实验的研究方向。他严肃的科学态度，严谨的治学精神，渊博的专业知识，深深地感染和激励着我。

其次感谢山东省农业应用真菌实验室的师兄师姐们，因为他们的帮助，我的毕业设计得以顺利完成。特别感谢赵书雪师姐，从大三跟着师姐学习实验技能，师姐丰富的实验经历、精益求精的工作态度深深地影响着我。师姐没有嫌弃我是实验小白，一点点教我实验操作方法，教会我使用多个仪器。在我实验遇到困难时，师姐总会及时帮我想办法，引导我，赵书雪师姐可以说是我科研道路开始的引路人，跟着师姐做实验，不仅学到实验操作知识与技能，也培养了我各方面能力，我何其有幸，在本科阶段可以跟着博士生做实验。

同时感谢山东省农业应用真菌实验室为我的实验提供了广阔的平台。

最后感谢我的家人，这几十年的求学路上，充满了你们的艰辛和汗水，是你们给了我物质和精神上支持，你们的关心与爱护一直是我学习的动力，我要回报你们。感谢我的男朋友赵董对我的付出，备战考研期间、考教师资格证期间，因为我做实验空闲时间较少，他积极帮我收集资料，帮我提前准备好很多东西；在我考研调剂压力很大每天焦虑不安时，他不断安慰我，陪伴我，希望我们各自努力，终点相见。

路漫漫其修远兮，吾将上下而求索。毕业是终点，也是起点，愿我在下一站也能这么幸运，遇到众多良师益友，争做优秀科研人！