

• 研究报告 •

梁斌 哈尔滨工业大学(深圳)土木与环境工程学院、教授。研究方向为水生态风险识别与阻控,在风险有机污染物(如抗生素/抗菌剂)微生物降解转化原理、生态风险识别方法与绿色阻控技术方面开展了系统工作。主持国家自然科学基金项目2项,发表SCI论文80余篇,总引用2 860余次(Google Scholar),H-index为32;以(共同)第一/通讯作者在环境领域主流期刊*Environ Sci Technol*、*Water Res*、*Appl Environ Microbiol*等发表SCI论文32篇,合著英文著作1部(Springer),2020年入选中国科学院青年创新促进会,2020年获国家技术发明奖二等奖和2017年环境保护科学技术奖一等奖(均排名第四)。



一株氯霉素降解细菌的分离鉴定与代谢特性研究

史可^{1*}, 郭晨蕾^{1*}, 马晓丹¹, 梁斌¹, 王爱杰^{1,2}

1 哈尔滨工业大学(深圳)土木与环境工程学院 城市水资源与水环境国家重点实验室,广东 深圳 518055

2 中国科学院生态环境研究中心,中国科学院环境生物技术重点实验室,北京 100085

史可,郭晨蕾,马晓丹,等.一株氯霉素降解细菌的分离鉴定与代谢特性研究.生物工程学报,2021,37(10):3653-3662.
Shi K, Guo CL, Ma XD, et al. Isolation, identification and characterization of a chloramphenicol-degrading bacterium. Chin J Biotech, 2021, 37(10): 3653-3662.

摘要:微生物是介导环境中氯霉素降解转化的主要驱动者,但高效降解矿化菌株资源匮乏,氧化反应介导的代谢途径不清。为研究微生物介导下氯霉素的环境归趋过程,为氯霉素污染环境强化修复提供菌株资源,文中以受氯霉素污染的活性污泥为接种源,首先富集获得一个由红球菌 *Rhodococcus* 主导(相对丰度>70%)的氯霉素高效降解菌群,并从中分离获得一株能够高效降解氯霉素的菌株 CAP-2,通过 16S rRNA 基因分析鉴定为红球菌 *Rhodococcus* sp. 菌株 CAP-2 能在不同营养条件下高效降解氯霉素。基于菌株 CAP-2 对检测到的代谢产物对硝基苯甲酸和已报道的代谢产物对硝基苯甲醛和原儿茶酸的生物转化特征,提出其降解途径是由氯霉素侧链氧化断裂生成对硝基苯甲醛,进一步氧化为对硝基苯甲酸的新型氧化降解途径。该菌株对于氯霉素分解代谢的分子机制研究以及受氯霉素污染环境的原位生物修复应用具有巨大潜力。

关键词: 氯霉素, 生物降解, 红球菌, 代谢特性, 氧化降解途径

Received: June 7, 2021; **Accepted:** August 30, 2021

Supported by: NSFC-EU Environmental Biotechnology Joint Program (Nos. 31861133001, 31861133002), National Natural Science Foundation of China (No. 31870102).

Corresponding author: Bin Liang. Tel/Fax: +86-755-26033506; E-mail: liangbin1214@hit.edu.cn, liangbin1214@163.com

*These authors contributed equally to this work.

国家自然科学基金(中-欧国际合作研究项目)(Nos. 31861133001, 31861133002), 国家自然科学基金(No. 31870102) 资助。

网络出版时间: 2021-09-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210902.1552.001.html>

Isolation, identification and characterization of a chloramphenicol-degrading bacterium

Ke Shi^{1*}, Chenlei Guo^{1*}, Xiaodan Ma¹, Bin Liang¹, and Aijie Wang^{1,2}

¹ School of Civil & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology in Shenzhen, Shenzhen 518055, Guangdong, China

² Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract: Microorganisms are the dominant players driving the degradation and transformation of chloramphenicol (CAP) in the environment. However, little bacterial strains are able to efficiently degrade and mineralize CAP, and the CAP degrading pathways mediated by oxidative reactions remain unclear. In this study, a highly efficient CAP-degrading microbial consortium, which mainly consists of *Rhodococcus* (relative abundance >70%), was obtained through an enrichment process using CAP-contaminated activated sludge as the inoculum. A bacterial strain CAP-2 capable of efficiently degrading CAP was isolated from the consortium and identified as *Rhodococcus* sp. by 16S rRNA gene analysis. Strain CAP-2 can efficiently degrade CAP under different nutrient conditions. Based on the biotransformation characteristics of the detected metabolite *p*-nitrobenzoic acid and the reported metabolites *p*-nitrobenzaldehyde and protocatechuate by strain CAP-2, a new oxidative pathway for the degradation of CAP was proposed. The side chain of CAP was oxidized and broken to generate *p*-nitrobenzaldehyde, which was further oxidized to *p*-nitrobenzoic acid. Strain CAP-2 can be used to further study the molecular mechanism of CAP catabolism, and has the potential to be used in *in situ* bioremediation of CAP-contaminated environment.

Keywords: chloramphenicol (CAP), biodegradation, *Rhodococcus* sp., metabolic characteristics, oxidative degradation pathway

据报道全世界 228 个国家和地区 2010 年兽用抗生素的使用量约为 63 151 t, 预计 2030 年用量将增加 67%, 尤其是我国、美国、印度、巴西和德国等国用量较大^[1]。未有效利用的抗生素主要汇入污水处理厂, 而污水处理厂通常旨在去除常规污染物, 难以有效地去除抗生素类难降解污染物和耐药细菌^[2-4]。令人担忧的是, 我国污水处理厂每年排放约 53 800 t 抗生素进入环境生态系统, 污染极其严重^[5]。氯霉素(Chloramphenicol, CAP)自 1949 年以来被全世界广泛应用于人类疾病治疗和畜禽养殖产业发展, 属于广谱抗生素^[6-9]。尽管其对人类具有明显的致再生障碍性贫血和潜在的致癌性、遗传毒性^[10-11], 而且已被许多国家(包括美国、中国、澳大利亚等)禁止使用^[12], 但是目前在不同国家和地区, 特别是在中国, 市政、医院、畜禽和水产养殖废水以及地表水中都普遍检测出 CAP 残留 (ng-μg/L 水平)^[13]。此外, 城市

污泥、畜禽粪便、土壤和河流沉积物中的 CAP 残留浓度可能高达 mg/kg 水平, 这将促进环境微生物的耐药性进化与传播^[14], 对人类与环境健康产生潜在威胁。因此, 在传统的污(废)水生物处理过程中如何深度消减抗生素残留和阻控抗生素抗性基因传播风险至关重要。

生物降解法具有绿色、运行成本低、环境友好等优势^[15]。CAP 乙酰化是导致其失活的重要细菌耐药机制^[16], 硝基还原是厌氧微生物脱毒转化 CAP 的主要代谢过程^[17], 然而生成的芳香胺物质在厌氧环境中难以进一步降解。一些好氧菌株如克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp. 和埃希氏菌 *Escherichia* sp. 已经被证明能够通过水解 CAP 侧链酰胺键将其转化为对硝基苯基丝氨酸^[18] (*p*-nitrophenylserinol, 1-对硝基苯-2-氨基-1,3-丙二醇), 但其仍无法对形成的产物进一步降解。最近报道了一株从污水处理厂活性污泥中分离获得的鞘脂菌 *Sphingobium*

sp. CAP-1, 首先将 CAP 氧化脱毒为对硝基苯甲醛 (*p*-nitrobenzaldehyde, *p*-NBZ) 或氧化 CAP 产物 (CAP 的侧链 C₃ 位羟基氧合产物, O-CAP), 接着两者均被依次降解为对硝基苯甲酸 (*p*-nitrobenzoic acid, *p*-NBA) 和原儿茶酸 (Protocatechuic acid, PCA), 然后进入三羧酸循环实现 CAP 的完全分解代谢^[19]。此外, 从活性污泥中分离获得的 CAP 降解菌鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp. CL5.1, 在 CAP 降解过程中除了检测到乙酰化 CAP 产物, 也检测到菌株 CAP-1 研究中发现的 O-CAP 和 *p*-NBA^[20]。综上所述, 亟待发掘新的 CAP 高效降解菌株资源, 并解析其降解特性与代谢路径, 丰富细菌代谢抗生素的基础理论。

基于 CAP 在环境中的普遍存在性和生态风险控制必要性, 本研究从长期受抗生素毒性选择的活性污泥中分离培养了一株 CAP 高效降解细菌, 研究了该菌株的降解特性, 解析了其降解途径。这些研究结果将为 CAP 在实际环境中 (如污水处理厂活性污泥体系和畜禽/水产养殖/制药园区环境等) 由微生物介导的归趋与转化过程提供新见解, 为 CAP 污染典型环境 (尤其是制药和畜禽养殖废水) 的微生物强化处理提供高效降解菌株资源。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药品与试剂

实验所用 CAP (纯度 99%)、对硝基苯甲酸 *p*-NBA (纯度 99%)、对硝基苯甲醛 *p*-NBZ (纯度 97%) 和原儿茶酸 PCA (纯度 97%) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。其余使用的药品均为分析纯及以上。

1.1.2 实验所用培养基

Luria-Bertani (LB) 培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 调节 pH 为 7.0。

无机盐培养基 (MSM) (g/L): K₂HPO₄ 1.50,

KH₂PO₄ 0.50, Mg₂SO₄·7H₂O 0.20, NaCl 1.00, 调节 pH 为 7.0。

固体培养基: 分别在以上培养基的基础上加入 2% (W/V) 琼脂。

以上培养基使用前均在 121 °C 下高温灭菌 30 min 后冷却备用。

1.2 实验方法

1.2.1 CAP 降解菌的富集与分离

以某制药厂二沉池污泥作为分离 CAP 降解菌的接种源, 取 5 g 污泥接入含 100 mL MSM 的 250 mL 锥形瓶中 (CAP 浓度为 50 mg/L)。将锥形瓶放置于恒温振荡培养箱, 在 30 °C、150 r/min 条件下进行富集培养, 每隔 7 d 从富集液中以 5% (V/V) 的接种量转接至新的含 CAP 无机盐培养基中。连续转接 3 次后, 通过超高效液相色谱测试 CAP 的浓度, 确定富集液是否具有 CAP 降解效果。将有降解活性的富集液进行梯度稀释, 采用平板划线法纯化培养。将分离得到的 CAP 降解菌株与已灭菌的 50% 甘油按 1:1 混合, -80 °C 保存。

1.2.2 CAP 降解菌形态特征鉴定

将 CAP 降解菌接种于含 50 mg/L CAP 的无机盐固体培养基上, 30 °C 恒温培养 5 d 后观察菌落形态。挑取平板上的单菌于含有 4 mL LB 液体培养基的试管中, 置于 30 °C、150 r/min 的恒温振荡培养箱中培养至对数期, 将分散后的菌体用磷钨酸染色再通过透射扫描电子显微镜 (HT7650, HITACHI, Japan) 观察菌体显微结构。

1.2.3 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

使用 DNA 提取试剂盒 (DP302, Tiangen, Beijing) 提取 CAP 降解菌基因组总 DNA, 采用细菌通用引物 27F/1492R 进行扩增, PCR 产物经电泳检验与 TA 克隆后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。将测序结果在 NCBI 和 EzBioCloud 数据库中进行比对, 通过 MEGA7.0 构建系统发育树, 该降解菌株 16S rRNA 序列的 GenBank 登录号为 MZ314676。

1.2.4 CAP 降解菌的代谢特性研究

降解菌在 LB 液体培养基中活化至对数生长期,离心弃上清,用灭菌后的 MSM 洗涤 3 次,之后用等体积 MSM 重悬菌体,4 °C 保存备用。分别以葡萄糖和硝酸铵作为外加碳源和氮源,在 MSM 的基础上配置 4 种不同条件的培养基:CAP 分别作为唯一碳氮源(记为 C⁻N⁻)、唯一碳源(外加硝酸铵,记为 C⁻N⁺)、唯一氮源(外加葡萄糖,记为 C⁺N⁻)和非唯一碳氮源(同时添加葡萄糖和硝酸铵,记为 C⁺N⁺),探究降解菌株在不同营养条件下对 CAP 的降解效能。此外分别以 50 mg/L *p*-NBZ、*p*-NBA、PCA 为唯一碳源添加到 MSM,探究降解菌株 CAP-2 的代谢途径。以上实验每组设置 3 个重复。接入一定体积的降解菌悬液使其终浓度为 OD₆₀₀=0.003,30 °C、150 r/min 恒温振荡培养,每隔一定时间取样 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤后-20 °C 保存待测。

CAP 及其中间产物浓度通过超高效液相色谱检测(Agilent 1290A, Agilent Co., USA),色谱柱为 C18 柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm, 186002854 ACQUITY BEH, Waters Co., USA),进样量为 5 μL,流动相为甲醇和 0.1%的甲酸水(V:V=25:75),流速为 0.2 mL/min,检测波长为 275 nm,柱温为 30 °C,根据样品出峰时间鉴定为不同物质,使用峰面积定量物质浓度。总有机碳(TOC)浓度通过 TOC 分析仪测定(N5-665-N, Jena, Germany)。

2 结果与分析

2.1 CAP 降解富集液性能与微生物群落组成分析

以受抗生素毒性选择的活性污泥作为初始接种源,CAP 作为唯一碳氮源,经过 20 d 的驯化富集后,获得了一瓶 CAP 降解富集液,并通过连续传代培养提高了富集液对 CAP 的降解效能和矿化程度。对第 5 代富集液(5th)的降解性能进行测试(图 1A),初始 CAP 浓度为 50 mg/L,24 h

后 CAP 降解率为 36.29%±2.72%,且 48 h 内完全降解,TOC 去除率为 29.71%±1.55%。对于第 35 代富集液(35th),24 h 后 CAP 降解率为 69.62%±6.18%,48 h 后 TOC 去除率达到 76.57%±1.08%。

将第 5 代和第 35 代 CAP 降解富集液进行基于 16S rRNA 基因的高通量测序(引物为 338F/806R),解析其中微生物群落组成(图 1B)。第 5 代富集液中主要菌属包括丛毛单胞菌属 *Comamonas*(相对丰度 54.18%)、红球菌属 *Rhodococcus*(相对丰度 6.8%)、贪铜菌属 *Cupriavidus*(相对丰度 5.01%)。已有报道表明,丛毛单胞菌属对多种芳烃如对硝基苯甲酸和硝基苯等有矿化能力^[21-24];贪铜菌属可代谢多种(氯代)芳烃,如硝基酚、氯酚和卤代苯甲酸盐等^[25];红球菌属可降解持久性有机污染物,如多氯联苯等;此外由于 4,5-双加氧酶的作用,*Rhodopseudomonas* sp.可以在好氧条件下,以 3,4-二羟基苯甲酸和对羟基苯甲酸为碳源进行生长^[26]。第 35 代富集液中相对丰度最高的菌属为红球菌属(相对丰度 71.41%),其次是 *Cupriavidus*、*Castellaniella* 和 *Hyphomicrobium*,相对丰度分别为 9.54%、4.24%和 1.60%。经过长期驯化富集,CAP 降解菌群中红球菌属的相对丰度明显增加,表明该菌属在 CAP 降解过程中发挥关键作用。

2.2 CAP 降解细菌的分离与鉴定

对已获得的 CAP 降解富集液通过梯度稀释与平板划线的方法,分离得到一株 CAP 降解细菌,菌命名为 CAP-2。其菌落呈浅褐色,不透明,形态呈规整圆形,表面干涩,中部微微凸起(图 2A)。经透射电镜观察,该菌株无芽孢、鞭毛及胞外聚合物,呈细杆状(图 2B)。

对该菌株提取基因组 DNA,经 16S rRNA 基因测序,在 NCBI 和 EzBioCloud 数据库中进行在线比对分析,发现该菌株的 16S rRNA 基因序列与模式菌株 *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567^T

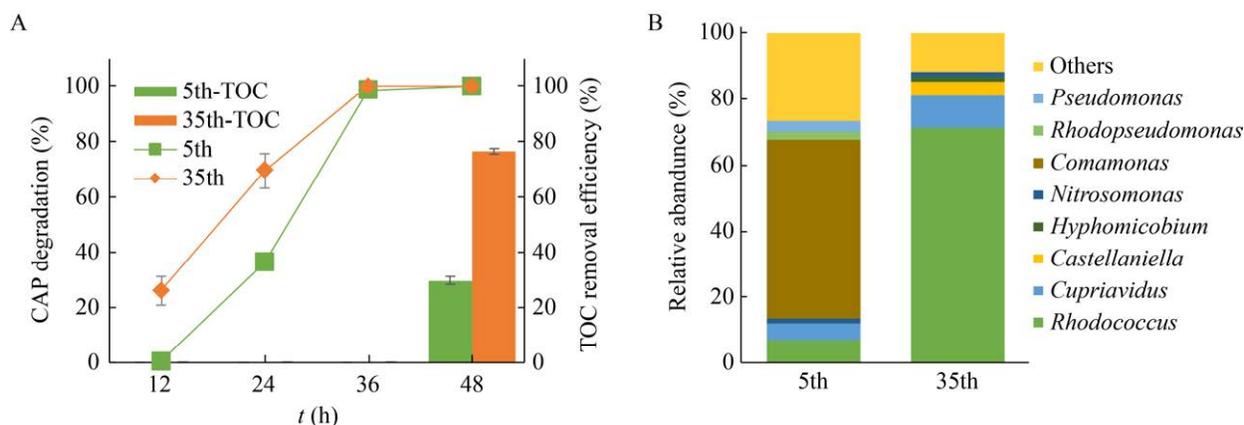


图1 富集液降解CAP效率(A)与微生物群落组成分析(B)

Fig. 1 The analysis of CAP biodegradation and mineralization efficiencies using enrichment (A) and the corresponding microbial community composition (B).

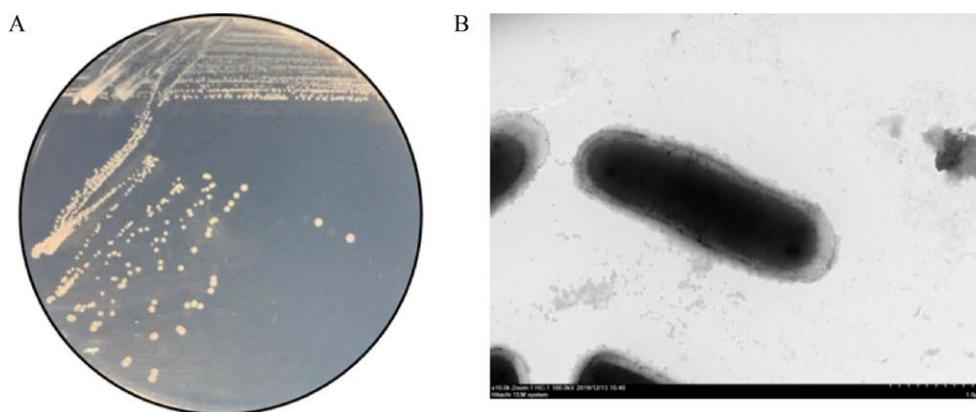


图2 氯霉素降解细菌形态(A)和透射电镜图(B)

Fig. 2 Morphology observation (A) and transmission electron micrograph (B) of strain CAP-2.

(BCRM01000055)、*Rhodococcus qingshengii* JCM 15477^T (LRRJ01000016) 和 *Rhodococcus baikonurensis* GTC1041^T (AB071951) 的相似性分别达到了 99.93%、99.31% 和 99.04%，并结合菌株形态特征，将降解菌株 CAP-2 鉴定为 *Rhodococcus* sp.，应用 MEGA 7.0 软件将该菌株的 16S rRNA 基因序列与其他高度同源的模式红球菌属菌株构建系统发育树，如图 3 所示。

2.3 菌株 CAP-2 的代谢特性研究

2.3.1 不同营养条件下的降解效能

通过设置不同的营养条件，探究菌株 CAP-2 对

CAP 的降解效能 (图 4)。当 CAP 作为唯一碳氮源时 (图 4A)，24 h 后 CAP 降解率为 $50.77\% \pm 2.27\%$ ，42 h 后为 $99.61\% \pm 0.03\%$ ，代谢产物 *p*-NBA 在 30 h 后达到最大生成浓度 (10.90 ± 0.08) mg/L，120 h 后其降解至 (4.48 ± 0.07) mg/L。外加碳源加快了 CAP 的降解速率 (图 4B)，24 h 后降解率达到 100%，同时中间产物 *p*-NBA 在 42 h 后降解至 (1.25 ± 0.008) mg/L。

外加氮源对 CAP 降解速率影响较小 (图 4C)，24 h 后降解率为 $53.11\% \pm 2.75\%$ ，42 h 后降解率达到 $89.41\% \pm 7.16\%$ ，*p*-NBA 在 30 h 后达到最

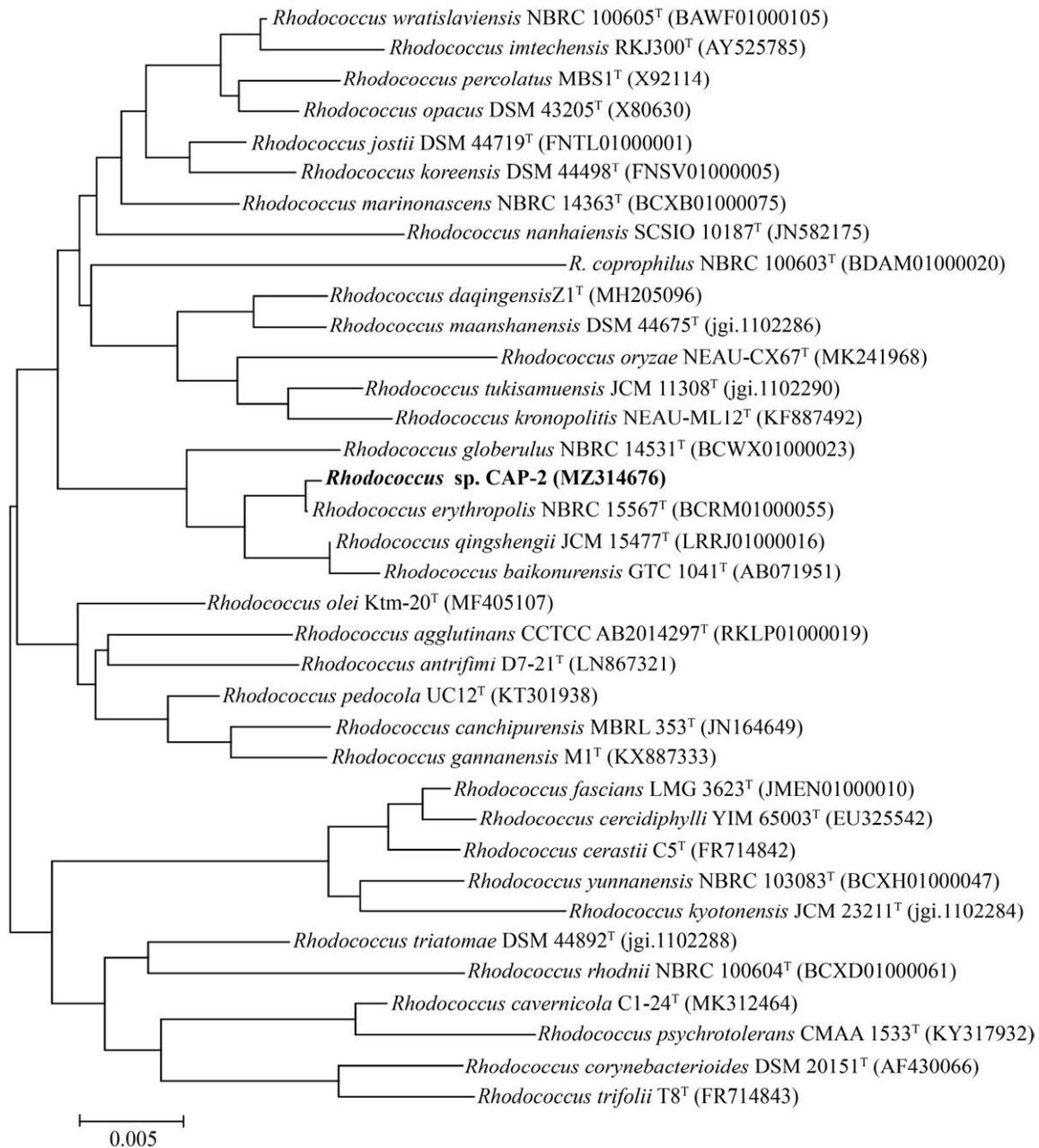


图3 菌株 CAP-2 基于 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of strain CAP-2 and related *Rhodococcus* type strains by neighbor joining approach. Bootstrap values obtained with 1 000 resamplings are indicated as percentages at all branches. The scale bars represent 0.005 substitutions per nucleotide position.

大累积浓度, 120 h 后降解至 (5.75 ± 0.67) mg/L; 同时外加碳氮源, CAP 降解速率没有增加 (图 4D), 24 h 后降解率为 $41.34\% \pm 11.56\%$, 42 h 后为 $86.29\% \pm 0.11\%$, *p*-NBA 在 30 h 后生成浓度达到最

大值, 120 h 后降解至 (1.15 ± 0.01) mg/L。

CAP 作为唯一碳源时, NH_4^+ 释放浓度随着 CAP 的降解逐渐升高 (图 4E), 168 h 后达到 (2.90 ± 0.15) mg/L, 表明菌株 CAP-2 能够以 CAP

作为氮源生长；外加碳源时， NH_4^+ 在6 h后的生成量为 (1.00 ± 0.08) mg/L，之后在较短时间 (24 h) 内被消耗，表明碳源引入提高了菌株 CAP-2 对 CAP 的降解效率。通过测试 TOC 含量评估菌株 CAP-2 对 CAP 的矿化程度 (图 4F)，在 CAP 作为唯一碳氮源时，96 h 后的 TOC 去除率为 $48.55\% \pm 4.43\%$ ，

168 h 后为 $60.02\% \pm 1.22\%$ ；外加氮源时，TOC 在 168 h 后的去除率为 $53.70\% \pm 2.44\%$ ，表明外加氮源对 CAP 矿化程度影响较小。

综上所述，外加碳源 (葡萄糖) 提高了菌株 CAP-2 对 CAP 与代谢产物 *p*-NBA 的降解效率，外加氮源 (硝酸铵) 对 CAP 降解效能影响较小。

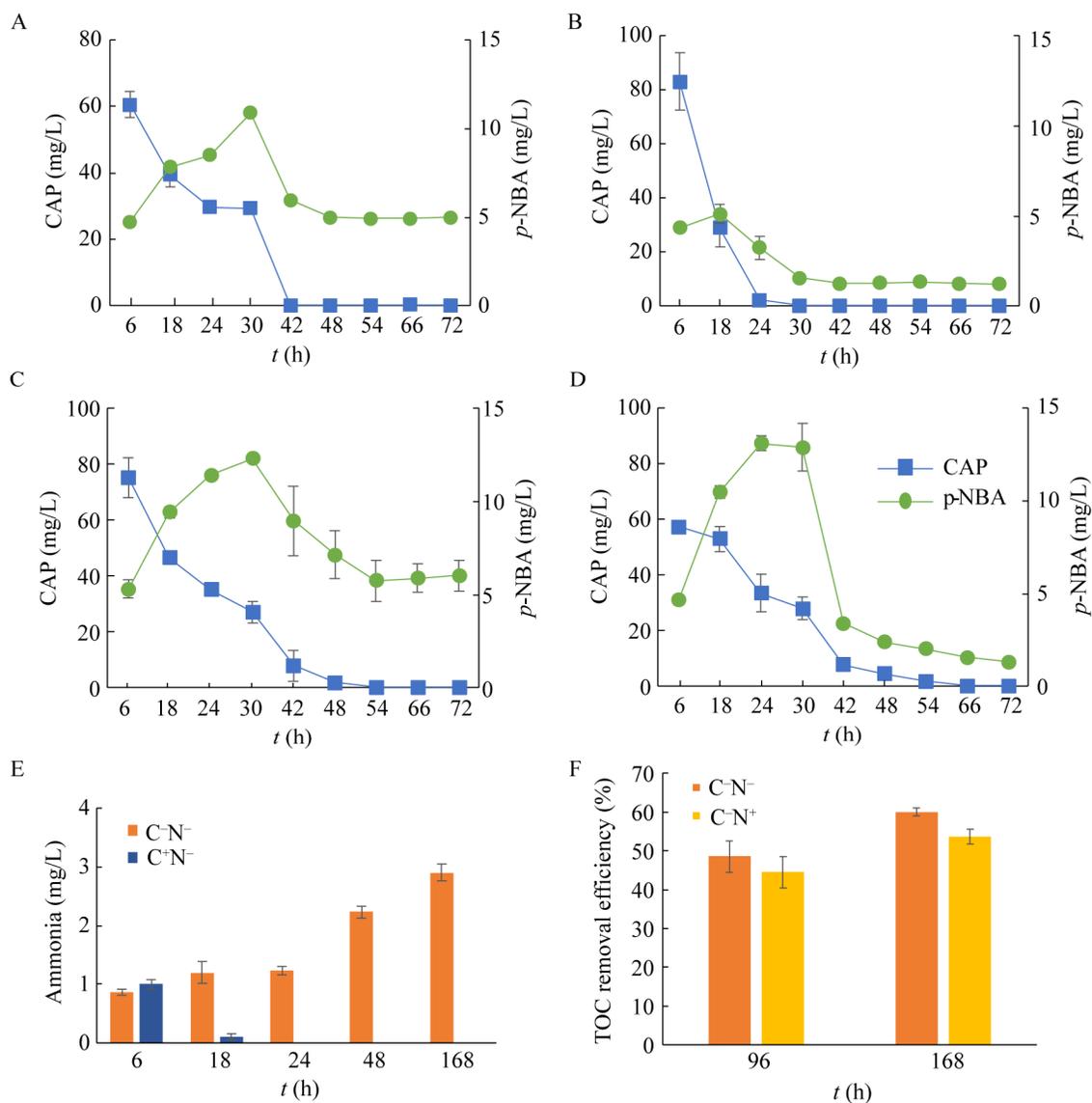


图 4 不同营养条件下菌株 CAP-2 降解 CAP 的特征 (A: CAP 作为唯一碳氮源; B: CAP 作为唯一氮源; C: CAP 作为唯一碳源; D: 非唯一碳氮源; E: 不同营养条件下 CAP 降解过程中氨氮释放; F: TOC 去除特征)

Fig. 4 The CAP degradation characteristics of strain CAP-2 under C⁻N⁻ (A), C⁻N⁺ (B), C⁺N⁻ (C) and C⁺N⁺ (D) four nutrient conditions. The characteristics of NH_4^+ -N release (E) and TOC removal efficiencies during CAP degradation under different nutrient conditions (F). C⁻: free of carbon source. N⁻: free of nitrogen source. C⁺: with carbon source. N⁺: with nitrogen source.

2.3.2 菌株 CAP-2 降解 CAP 途径解析

菌株 CAP-2 在不同营养条件下降解 CAP 均伴随有 *p*-NBA 生成, 并且该产物能够被进一步降解。根据目前已有文献报道, CAP 好氧生物降解主要代谢产物包括 *p*-NBZ、*p*-NBA 和 PCA^[19], 分别以上述中间产物作为底物, 对菌株 CAP-2 降解 CAP 的途径进行初步解析。

菌株 CAP-2 降解 *p*-NBZ 速率较快 (图 5A), 24 h 内 90% 以上 *p*-NBZ 被转化为 *p*-NBA, 且 96 h 后将产生的 *p*-NBA 降解至 (2.48±0.45) mg/L, TOC 去除率达到 58.65%±0.87%; 菌株 CAP-2 降解 *p*-NBA 的速率较慢 (图 5B), 24 h 后其降解率为 55.81%±4.77%, 48 h 后降解率明显升高, 达到 87.95%±1.18%, 96 h 后 *p*-NBA 降解率为 93.09%±0.80%, 120 h 后 TOC 去除率为 25.88%±1.70%,

表明其降解过程可能存在未检测到的代谢产物; PCA 通常是 *p*-NBA 好氧生物降解过程中的代谢产物, 也是芳香烃开环矿化的重要中间产物^[14], 由于 *p*-NBA 转化为 PCA 后能够迅速被降解, 故本研究尚未检测到 PCA 的积累。为了证明菌株 CAP-2 能够降解 PCA, 进一步地以 PCA 为底物研究了菌株 CAP-2 对其降解效能 (图 5C), 24 h 后 PCA 降解率为 96.48%±0.82%, TOC 去除率达到 63.64%±0.58%。以上结果表明菌株 CAP-2 首先可能将 CAP 的侧链氧化转化为 *p*-NBZ, 其再被进一步氧化为 *p*-NBA, 之后通过已报道的 *p*-NBA 部分硝基还原过程生成对羟基氨基苯甲酸, 经其裂解酶作用进一步转化为 PCA, 进而通过双加氧酶初始介导的一套酶系最终进入三羧酸循环而开环矿化^[19] (图 6)。

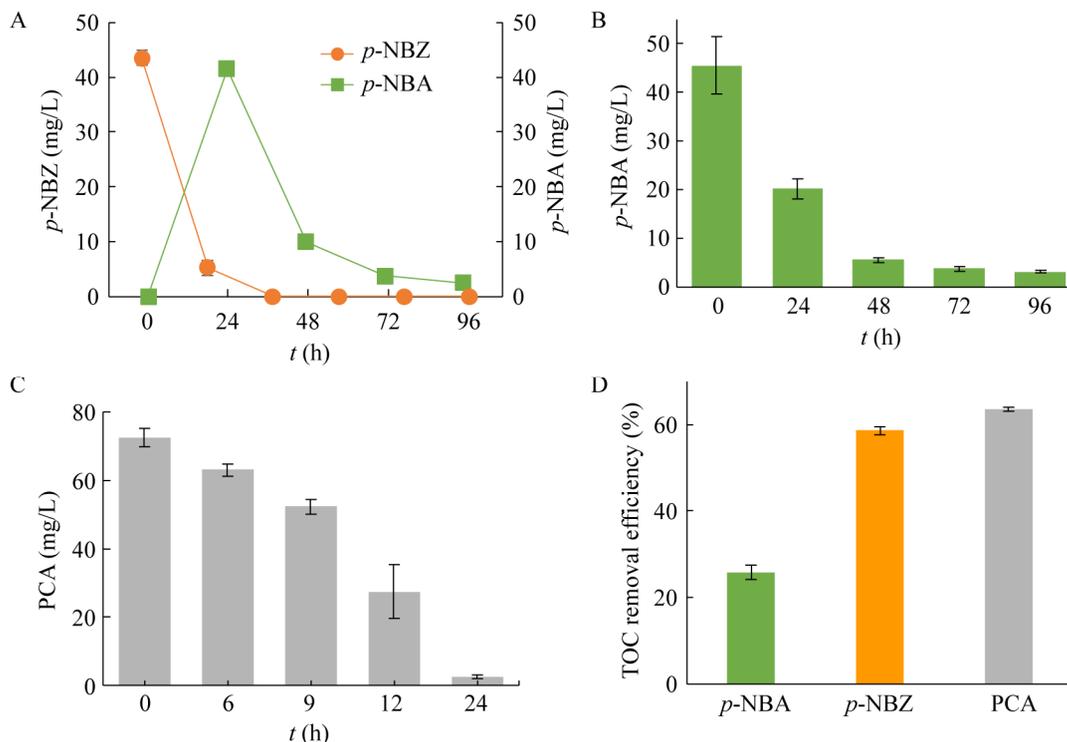


图 5 菌株 CAP-2 对 CAP 降解中间产物的降解特征 (A: 以 *p*-NBZ 为底物; B: 以 *p*-NBA 为底物; C: 以 PCA 为底物; D: 菌株 CAP-2 对不同中间产物的矿化率)

Fig. 5 The degradation characteristics of strain CAP-2 using CAP degradation intermediates (as the substrate *p*-NBZ (A), *p*-NBA (B), PCA (C) and the mineralization efficiency of strain CAP-2 on different intermediates (D)).

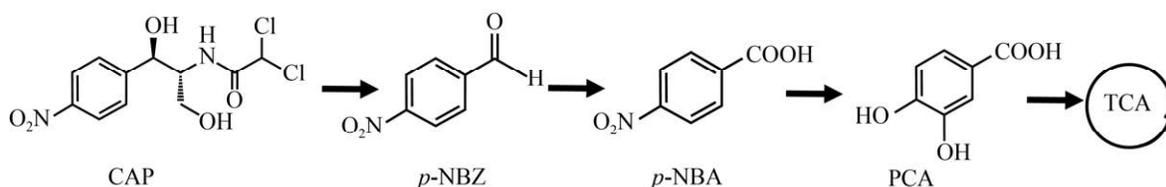


图 6 *Rhodococcus* sp. CAP-2 降解氯霉素途径推测

Fig. 6 Putative CAP catabolic pathway in *Rhodococcus* sp. CAP-2.

3 总结

本研究以受 CAP 污染的活性污泥为接种源首先富集获得一个由红球菌 *Rhodococcus* 主导 (相对丰度为 71.41%) 的 CAP 高效降解菌群, 经过连续传代培养, 24 h 后 CAP 降解率为 $69.62\% \pm 6.18\%$, 48 h 后 TOC 去除率达到 $76.57\% \pm 1.08\%$, 进一步从该富集液中分离培养了一株 CAP 高效降解菌 CAP-2, 通过 16S rRNA 基因鉴定为红球菌属, 其能够以 CAP 作为唯一碳氮源实现 60% 以上的矿化效率, 外加碳源 (葡萄糖) 能够提升其对 CAP 及其关键降解产物 *p*-NBA 的降解效率。菌株 CAP-2 对 CAP 代谢中间产物具有降解能力, 提出其降解途径为: 首先 CAP 侧链被氧化断裂转化为 *p*-NBZ, 再被氧化为 *p*-NBA, 之后进一步转化为 PCA 进而开环矿化。与 CAP 侧链酰胺键水解细菌 *Klebsiella* sp.、*Escherichia* sp.、*Streptomyces venezuelae* 13s 和 *Streptomyces lividans* RM3 相比, 菌株 CAP-2 能将 CAP 降解矿化且没有芳香烃类产物的积累^[18,27-28]; 菌株 CAP-2 的 TOC 去除率与已报道的 CAP 降解菌 *Sphingomonas* sp. CL5.1 相比高出 3%, 且在 CAP 降解过程中并不涉及 *Sphingomonas* sp. CL5.1 中乙酰化和脱水的降解过程^[20,29]。此外, 菌株 CAP-2 降解 CAP 的过程中也不生成氧化 CAP 的产物 O-CAP (*Sphingobium* sp. CAP-1 和 *Sphingomonas* sp. CL5.1 初始氧化降解 CAP 的关键产物)^[9-20]。因此, 推测菌株 CAP-2 初始氧化降解 CAP 的途径区别于上述报道, 而是一个由 CAP 侧链氧化断裂生成 *p*-NBZ 和 *p*-NBA 主导的新型降解途径。

菌株 CAP-2 的获得丰富了 CAP 降解的生物资源, 一方面能够以其作为模式菌株研究 CAP 在实际环境中由微生物介导的归趋转化, 明晰其完整的降解途径与分子机理, 挖掘并克隆表征其初始氧化降解的关键基因; 另一方面将其作为降解菌株, 研究在不同环境条件下的代谢能力并结合多孔生物炭材料和 3D 打印等新兴技术制备固定化菌剂应用于 CAP 污染场地的生物强化修复。这对于消除环境中 CAP 残留导致的微生物耐药性问题、保障人类与环境健康安全具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(18): 5649-5654.
- [2] Guo J, Li J, Chen H, et al. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res*, 2017, 123: 468-478.
- [3] Karkman A, Do TT, Walsh F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends Microbiol*, 2018, 26(3): 220-228.
- [4] Michael I, Rizzo L, McArdeall CS, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res*, 2013, 47(3): 957-995.
- [5] Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [6] Balbi HJ. Chloramphenicol: a review. *Pediatr Rev*, 2004, 25(8): 284-288.
- [7] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, et al. Molecular basis of bacterial resistance to

- chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev, 2004, 28(5): 519-542.
- [8] Scarzella M, Migazzo C, Cappio M. Typhoid fever treated with aureomycin and chloramphenicol. South Med J, 1949, 42(11): 983-985.
- [9] Liang B, Cheng HY, Kong DY, et al. Accelerated reduction of chlorinated nitroaromatic antibiotic chloramphenicol by biocathode. Environ Sci Technol, 2013, 47(10): 5353-5361.
- [10] 吴昕. 临床应用氯霉素的不良反应. 临床合理用药杂志, 2008, 1(1): 36-37.
Wu X. Adverse reactions of clinical application of chloramphenicol. Chin J Clinical Rational Drug Use, 2008, 1(1): 36-37 (in Chinese).
- [11] Gross BJ, Branchflower RV, Burke TR, et al. Bone marrow toxicity *in vitro* of chloramphenicol and its metabolites. Toxicol Appl Pharmacol, 1982, 64(3): 557-565.
- [12] Klein EY, van Boeckel TP, Martinez EM, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(15): E3463-E3470.
- [13] Xu JY, Sangthong R, McNeil E, et al. Antibiotic use in chicken farms in northwestern China. Antimicrob Resist Infect Control, 2020, 9(1): 1-9.
- [14] Basu S, Pal Chowdhury P, Deb S, et al. Degradation pathways of 2- and 4-nitrobenzoates in *Cupriavidus* sp. strain ST-14 and construction of a recombinant strain, ST-14: 3NBA, capable of degrading 3-nitrobenzoate. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(14): 4253-4263.
- [15] Yun H, Liang B, Qiu JG, et al. Functional characterization of a novel amidase involved in biotransformation of triclocarban and its dehalogenated congeners in *Ochrobactrum* sp. TCC-2. Environ Sci Technol, 2017, 51(1): 291-300.
- [16] Reis AC, Reis AC, Kolvenbach BA, et al. Biodegradation of antibiotics: the new resistance determinants-part II. N Biotechnol, 2020, 54: 13-27.
- [17] Smith AL, Erwin AL, Kline T, et al. Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(8): 2820-2829.
- [18] Xin Z, Fengwei T, Gang W, et al. Isolation, identification and characterization of human intestinal bacteria with the ability to utilize chloramphenicol as the sole source of carbon and energy. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 82(3): 703-712.
- [19] Ma XD, Liang B, Qi MY, et al. Novel pathway for chloramphenicol catabolism in the activated sludge bacterial isolate *Sphingobium* sp. CAP-1. Environ Sci Technol, 2020, 54(12): 7591-7600.
- [20] Zhang J, Gan W, Zhao R, et al. Chloramphenicol biodegradation by enriched bacterial consortia and isolated strain *Sphingomonas* sp. CL5.1: the reconstruction of a novel biodegradation pathway. Water Res, 2020, 187: 116397.
- [21] Groenewegen PEJ, Bont JAM. Degradation of 4-nitrobenzoate via 4-hydroxylaminobenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. Arch Microbiol, 1992, 158(5): 381-386.
- [22] Nishino SF, Spain JC. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(8): 2520-2525.
- [23] Nishino SF, Spain JC. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(6): 2308-2313.
- [24] Yabannavar AV, Zylstra GJ. Cloning and characterization of the genes for *p*-nitrobenzoate degradation from *Pseudomonas pickettii* YH105. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(12): 4284-4290.
- [25] Kurosumi A, Kaneko E, Nakamura Y. Degradation of reactive dyes by ozonation and oxalic acid-assimilating bacteria isolated from soil. Biodegradation, 2008, 19(4): 489-494.
- [26] Dutton PL, Evans WC. The metabolism of aromatic compounds by *Rhodospseudomonas palustris*. A new, reductive, method of aromatic ring metabolism. Biochem J, 1969, 113(3): 525-536.
- [27] Malik VS, Vining LC. Metabolism of chloramphenicol by the producing organism. Some properties of chloramphenicol hydrolase. Can J Microbiol, 1971, 17(10): 1287-1290.
- [28] Mosher RH, Ranade NP, Schrempf H, et al. Chloramphenicol resistance in *Streptomyces*: cloning and characterization of a chloramphenicol hydrolase gene from *Streptomyces venezuelae*. J Gen Microbiol, 1990, 136(2): 293-301.
- [29] Zhang J, Zhao R, Cao L, et al. High-efficiency biodegradation of chloramphenicol by enriched bacterial consortia: kinetics study and bacterial community characterization. J Hazard Mater, 2020, 384: 121344.

(本文责编 郝丽芳)