

代尔夫特菌 PG-8 降解青霉素 G 的特性及分子机制

闵军^{1*}, 孙梦慧^{1,2}, 方素云¹, 徐凌雪¹, 张雅慧^{1,2}, 胡晓珂^{1*}

1 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台

2 中国科学院大学, 北京

闵军, 孙梦慧, 方素云, 徐凌雪, 张雅慧, 胡晓珂. 代尔夫特菌 PG-8 降解青霉素 G 的特性及分子机制[J]. 微生物学报, 2025, 65(11): 5152-5171.

MIN Jun, SUN Menghui, FANG Suyun, XU Lingxue, ZHANG Yahui, HU Xiaoke. Characteristics and molecular mechanisms of penicillin G degradation by *Delftia* sp. PG-8[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(11): 5152-5171.

摘要: 【目的】筛选青霉素 G (penicillin G, PENG)降解菌, 并解析其分解代谢的关键酶, 为青霉素菌渣的生物处理提供菌种和基因资源。【方法】以青霉素 G 钾(penicillin G potassium, PGK)为底物, 通过富集培养筛选能够利用其为唯一碳源生长的菌株; 结合基因组和转录组技术鉴定分解代谢的关键酶并分析其进化起源; 表达并纯化关键酶, 解析其酶促反应动力学参数; 通过基因敲除和回补实验揭示关键基因在细菌利用 PGK 生长过程中的生理功能。【结果】获得的代尔夫特菌属(*Delftia* sp.) PG-8 能够降解并利用 PGK 作为唯一碳源生长, 且在 pH 7.0、温度 35 °C、底物浓度为 10.00 mmol/L 时表现出最佳的底物降解效果和细菌生长状况。PgkA 能够催化 PGK 快速降解 [$K_m=(99.19\pm 19.45)\ \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}}/K_m=(1.96\pm 0.55)\times 10^5\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$], 并且与已完成功能鉴定的 β -内酰胺酶相比 PgkA 具有独特的进化起源。PgkB 也能够催化 PGK 降解, 但其对底物的亲和力仅为 PgkA 的 1/5, 且底物催化效率也较低。菌株 PG-8- ΔpgkA 和 PG-8- ΔpgkB 降解和利用 PGK 生长的能力均显著下降, 且 PG-8- ΔpgkA 能力下降更为明显。虽然同时敲除 *pgkA* 和 *pgkB* 的 PG-8- ΔpgkAB 仍能降解一定量的底物, 但无法利用 PGK 作为唯一碳源生长。【结论】PG-8 是代尔夫特菌属中第一株能够利用 PGK 作为唯一碳源生长的菌株, *pgkA* 和 *pgkB* 在 PG-8 利用 PGK 作为唯一碳源生长过程中均具有重要的生理功能, 但 *pgkA* 起主导作用。

关键词: 青霉素 G 降解; 代尔夫特菌; 筛选鉴定; 酶学分析; 降解机理

资助项目: 国家自然科学基金(32070102); 山东省泰山学者计划(tspd20210317)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070102) and the Taishan Scholar Project of Shandong Province (tspd20210317).

*Corresponding authors. E-mail: MIN Jun, jmin@yic.ac.cn; HU Xiaoke, xkhu@yic.ac.cn

Received: 2025-04-23; Accepted: 2025-05-17; Published online: 2025-06-27

Characteristics and molecular mechanisms of penicillin G degradation by *Delftia* sp. PG-8

MIN Jun^{1*}, SUN Menghui^{1,2}, FANG Suyun¹, XU Lingxue¹, ZHANG Yahui^{1,2}, HU Xiaoke^{1*}

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resource Industry, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Abstract: [Objective] To screen out a strain with the ability to degrade penicillin G (PENG) and identify the key enzymes involved in PENG catabolism, providing strain and gene resources for the biological treatment of penicillin waste. **[Methods]** Bacterial strains capable of utilizing penicillin G potassium (PGK) as the sole carbon source were screened by enrichment culture. Key enzymes involved in the catabolism of PGK were identified by genome and transcriptome analyses, and their evolutionary origins were examined. The key enzymes were expressed and purified, and their kinetics were analyzed. The physiological roles of the key genes in bacterial growth on PGK were revealed by gene knockout and complementation. **[Results]** The obtained strain *Delftia* sp. PG-8 can degrade PGK and utilize it as the sole carbon source for growth. The strain showed the best performance in PENG degradation and growth at pH 7.0, 35 °C, and 10.00 mmol/L PGK. P_{gkA} catalyzed the rapid degradation of PGK, with $K_m=(99.19\pm 19.45)\ \mu\text{mol/L}$ and $k_{\text{cat}}/K_m=(1.96\pm 0.55)\times 10^5\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$. Compared with the functionally characterized β -lactamases, P_{gkA} had a unique evolutionary origin. P_{gkB} also had the ability to catalyze the transformation of PGK, while its substrate affinity was only 1/5 that of P_{gkA}, in addition to the lower catalytic efficiency. The degradation and utilization of PGK for growth by strains PG-8- Δp_{gkA} and PG-8- Δp_{gkB} were significantly reduced, with PG-8- Δp_{gkA} showing a more pronounced decline. Although PG-8- Δp_{gkAB} , in which both *pgkA* and *pgkB* were knocked out, still degraded a certain amount of substrate, it was almost unable to use PGK as the sole carbon source for growth. **[Conclusion]** PG-8 is the first strain of *Delftia* capable of using PGK as the sole carbon source for growth. Both *pgkA* and *pgkB* play important physiological roles during PG-8 growth on PGK, with *pgkA* playing a dominant role.

Keywords: penicillin G degradation; *Delftia*; screening and identification; enzymatic analysis; degradation mechanism

青霉素的发现无疑是 20 世纪公共卫生领域最伟大的成就之一。随后, 人类进入了抗生素发展和利用的黄金时期, 各类抗生素在医疗、农业、畜牧业和生物科学研究领域均作出了巨大贡献^[1]。在给人类社会带来空前药物繁荣的同时抗生素在环境中的持续积累也引发了耐药细

菌的产生和耐药基因的传播, 给生态环境和人类健康造成了严重危害^[2-4]。调查显示, 全球 34 个国家的 287 条主要河流均受到不同程度的抗生素污染, 其中覆盖我国 58 个河流流域的污染情况较为严重^[5]。虽然抗生素耐药性是一种由来已久且在环境中普遍存在的现象^[6], 但环境中

抗生素的持续积累会加速耐药细菌的进化和耐药基因的传播, 进而导致全球出现严重的抗生素抗性危机^[7-8]。

在种类繁多的抗生素中 β -内酰胺类抗生素的生产和应用最为广泛, 占全球抗生素市场份额的 65% 左右^[9]。中国作为全球最大的抗生素生产国^[10], 青霉素年产量约占全球总产量的 75%, 其中 2020 年青霉素 G (penicillin G, PENG) 的全球消耗量占比高达 32.02%^[11]。研究显示青霉素 G 在全球沉积物中的最高浓度达 974 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12], 已成为严重的环境污染物, 该抗生素也被认为是导致全球性抗生素耐药性的重要因素之一。据估计, 每生产 1 t 抗生素会产生约 8–10 t 抗生素湿菌渣^[13-14]。以青霉菌发酵为例, 我国青霉素年产量约为 1.5 万 t, 其生产过程中会产生 15 万 t 青霉素菌渣^[15]。抗生素菌渣含有残留抗生素及众多有毒代谢产物, 例如青霉素菌渣中青霉素含量高达 0.90–1.10 g/kg ^[16], 因此青霉素菌渣的处理对抗生素生产企业而言是一个巨大的负担。此外, 菌渣中的残留青霉素进入土壤和水体后不仅会通过食物链危害人体和其他动植物健康^[17-19], 还会影响微生物群落, 进而诱导耐药菌出现^[20-22]。

对于抗生素菌渣的处置常规的吸附、膜分离、热化学处理技术费用极其高昂^[23-26], 因此经济有效的无害化处置策略亟待探索。微生物具有极强的环境适应能力, 面对种类繁多的抗生素污染, 细菌能通过进化出相应的分解代谢系统获得生存能力。自 2008 年 Dantas 等报道了降解 PENG 的纯培养微生物(未鉴定种属)后^[27], 该抗生素降解菌被陆续分离鉴定, 包括副球菌属(*Paracoccus*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、螯合球菌属(*Chelatococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等, 而且一些降解菌分解代谢 PENG 的代谢途径也有少许报道。*Paracoccus* sp. KDSPL-02 降解 PENG 时首先通过 β -内酰胺环水解生成青霉噻唑酸, 然后水解生成苯乙酸

和类似于 6-氨基青霉烷酸的中间产物, 随后进入下游未知代谢途径实现 PENG 降解, 但该途径相关的基因和酶尚未鉴定^[28]。Crofts 等^[29]研究 4 株土壤微生物通过共享策略降解 PENG 时, 推测这些微生物也是通过该途径完成 PENG 降解, 并鉴定了水解青霉噻唑酸酰胺键生成苯乙酸的酰胺酶。最近, Zhang 等^[30]在研究 *Sphingobacterium* sp. SQW1 时利用细胞和粗酶液生物转化 PENG 检测到多个疑似的中间产物, 推测该菌株降解 PENG 可能存在 3 条代谢途径。SQW1 菌株和粗酶液降解 PENG 均以 β -内酰胺酶起始降解, 然后通过 2 条不同的下游代谢途径实现 PENG 的完全矿化; 通过中间代谢产物推测该菌株降解 PENG 还可能存在第 3 条途径, 即由酰基转移酶起始 PENG 降解生成苯乙酸和 6-氨基青霉烷酸^[30]。然而, 该菌株中复杂的代谢途径网络均是基于代谢产物的推测, 缺乏直接的基因和酶学研究。

目前报道的青霉素降解菌中能够以 PENG 为唯一碳源生长的纯培养菌株较少。多数研究仅止步于降解功能的鉴定, 缺乏对 PENG 降解关键酶和基因的研究。本研究从青霉素菌渣中筛选到代尔夫特菌属中第一株能够降解 PENG 并利用其为唯一碳源生长的细菌 PG-8 (保藏号: CCTCC M 2024394); 进一步研究了 PG-8 降解 PENG 的特性, 并对参与 PENG 代谢的关键基因进行了克隆、表达纯化和酶学分析, 同时验证了关键基因的生理功能。本研究从分子、生化和遗传学层面系统阐释了细菌降解 PENG 的分子机制, 在抗生素菌渣微生物处理方面具有重要的应用前景。

1 材料与amp;方法

1.1 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母提取物 5.00, NaCl 5.00, 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。无机盐培养基(minimal medium, MM) (g/L): K_2HPO_4

0.76, KH₂PO₄ 0.19, (NH₄)₂SO₄ 1.00, MgSO₄ 1.00, 微量元素体积分数为 1.00%, 按需调节不同的 pH, 121 °C 灭菌 20 min。固体培养基是在液体培养基中加入琼脂粉, 其质量体积比为 1.50%。

1.2 引物、质粒、菌株与培养条件

本研究所用引物见表 1, 菌株和质粒见表 2。*Delftia* sp. PG-8 及其突变株在 LB 或添加不同浓度青霉素 G 钾 (penicillin G potassium, PGK) 的 MM 中培养。大肠杆菌在 LB 培养基中于 37 °C 培养。抗生素添加终浓度: 卡那霉素为 50.00 µg/mL, 氨苄青霉素为 100.00 µg/mL, 氯霉素为 34.00 µg/mL, 四环素为 20.00 µg/mL。

1.3 菌株的筛选和鉴定

取 1.00 g 青霉素菌渣放入装有 100.00 mL MM 的锥形瓶中, 加入 5.00 mmol/L PGK 后, 于 150 r/min 摇床中培养 5 d。取 1 mL 培养液转接到新的培养基中, 重复此操作 3 次。取培养液按 10 倍梯度稀释, 并均匀涂布在以 PGK (5.00 mmol/L) 为唯一碳源的 MM 平板上, 30 °C 培养 3 d, 挑取单菌落进一步划线纯化。获得的纯培养细菌分别进行革兰氏染色、扫描电镜观察和 16S rRNA 基因序列分析。

菌株 PG-8 在 LB 培养基中培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 25 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 并用 MM 洗涤 3 次后悬浮, 然后转接至含

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')*	Purpose
27-F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	To amplify 16S rRNA gene
1492-R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
<i>pgkA</i> -F	CGCGGCAGCATGACGGGCGGCGCGGC	To amplify <i>pgkA</i> gene for expression
<i>pgkA</i> -R	CAAAACAGCCTCAGCCTTGACTGCTGCC	
<i>pgkB</i> -F	ATCACAGCAGCGGCCTGGTGATGTCACCGATGGTGGCGAAGG	To amplify <i>pgkB</i> gene for expression
<i>pgkB</i> -R	TCTCATCCGCCAAAACAGCCTTACAACCTCTTGACCAGGAC	
KO- <i>pgkA_u</i> -F	TATGACCATGATTACGAATTCGGGCGTCCGTGGCTATTG	To amplify upstream fragment of <i>pgkA</i> for gene knockout
KO- <i>pgkA_u</i> -R	CGTGCCGATCACAGAAAATCGCGTCTTTGCAT	
KO- <i>pgkA_d</i> -F	TATGTCTATTGCTGCGCCACCATGTCGC	To amplify downstream fragment of <i>pgkA</i> for gene knockout
KO- <i>pgkA_d</i> -R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGTCGCCCTTCGGCTTCTC	
KO- <i>pgkB_u</i> -F	TATGACCATGATTACGAATTCAAAAAACAGGGGGCTGC	To amplify upstream fragment of <i>pgkB</i> for gene knockout
KO- <i>pgkB_u</i> -R	AACCTCTTACGTGCCGATCACCCCTGAGGCGCTGTGC	
KO- <i>pgkB_d</i> -F	TGTCTATTACCACGCAAGGCGCCCC	To amplify downstream fragment of <i>pgkB</i> for gene knockout
KO- <i>pgkB_d</i> -R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGACCGGCGCAGCGCCTCCTG	
KO-Cmp <i>pgkA</i> -F	GATTTTCTGTGATCGGCACGTAAGAGGTTTC	To amplify chloramphenicol resistance gene of <i>pgkA</i> for gene knockout
KO-Cmp <i>pgkA</i> -R	GTGGCGCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGA	
KO-Cmp <i>pgkB</i> -F	TGATCGGCACGTAAGAGGTTTC	To amplify chloramphenicol resistance gene of <i>pgkB</i> for gene knockout
KO-Cmp <i>pgkB</i> -R	GCCTTGCGTGGTAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGA	
PRK- <i>pgkA</i> -F	AAAACGACGGCCAGTGAATTCATGACGGGCGGCGGGCC	To amplify <i>pgkA</i> for gene complementation
PRK- <i>pgkA</i> -R	GACCATGATTACGCCAAGCTTTCAGCCTTGACTGCTGCC	
PRK- <i>pgkB</i> -F	AAAACGACGGCCAGTGAATTCGTGACGAGGGCCGATTT	To amplify <i>pgkB</i> for gene complementation
PRK- <i>pgkB</i> -R	TGCCTGCAGGTCGACTCTAGATTACAACCTCTTGACCAGGACCTG	

表2 本研究所用菌株和质粒

Table 2 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristic(s)	Source
<i>Delftia</i> sp.		
PG-8	PGK utilizer, wild type	This study
PG-8- $\Delta pgkA$	PG-8 mutant with <i>pgkA</i> gene deleted	This study
PG-8- $\Delta pgkA$ [pRK- <i>pgkA</i>]	<i>pgkA</i> gene was complemented by pRK415- <i>pgkA</i> in PG-8- $\Delta pgkA$	This study
PG-8- $\Delta pgkB$	PG-8 mutant with <i>pgkB</i> gene deleted	This study
PG-8- $\Delta pgkB$ [pRK- <i>pgkB</i>]	<i>pgkB</i> gene was complemented by pRK415- <i>pgkB</i> in PG-8- $\Delta pgkB$	This study
PG-8- $\Delta pgkAB$	PG-8 mutant with <i>pgkAB</i> gene deleted	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> ($\phi 80lacZ\Delta M15$) <i>recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Novagen
WM3064	Donor strain for conjugation, 2,6-diaminopimelic acid auxotroph: <i>thrB1004 pro thirpsLhsdS lacZ\Delta M15 RP4-1360 \Delta(araBAD)567 \Delta dapA1341::[erm^{pir}(wt)]</i>	Lab stock
TOP10	Receptive state, protein expression	Lab stock
Plasmids		
pBAD18	Expression vector, Kan ^R	Novagen
pEX18Tc	Gene knockout vector, <i>oriT⁺</i> , <i>sacB⁺</i> , Tc ^R	Lab stock
pRK415	Broad host range vector, Tc ^R	Lab stock
pBAD- <i>pgkA</i>	<i>EcoR</i> I/ <i>Xba</i> I fragment containing <i>pgkA</i> cloned into pBAD18	This study
pBAD- <i>pgkB</i>	<i>EcoR</i> I/ <i>Xba</i> I fragment containing <i>pgkB</i> cloned into pBAD18	This study
pEX18Tc- <i>pgkA</i>	<i>pgkA</i> gene knockout vector containing two DNA fragments homologous to the upstream and downstream regions of the <i>pgkA</i>	This study
pEX18Tc- <i>pgkB</i>	<i>pgkB</i> gene knockout vector containing two DNA fragments homologous to the upstream and downstream regions of the <i>pgkB</i>	This study
pEX18Tc- <i>pgkAB</i>	<i>pgkAB</i> gene knockout vector containing two DNA fragments homologous to the upstream and downstream regions of the <i>pgkAB</i>	This study
pRK415- <i>pgkA</i>	<i>pgkA</i> gene complementation vector by cloning <i>pgkA</i> into the <i>Xba</i> I/ <i>EcoR</i> I restriction site of pRK415	This study
pRK415- <i>pgkB</i>	<i>pgkB</i> gene complementation vector by cloning <i>pgkB</i> into the <i>Xba</i> I/ <i>EcoR</i> I restriction site of pRK415	This study

有 5.00 mmol/L PGK 的 MM 中，使初始 OD_{600} 约为 0.1。接着在 30 °C、150 r/min 条件下培养 7 d，定时取样并测定 OD_{600} 和底物浓度。为优化菌株 PG-8 降解 PGK 的最佳条件，分别分析不同 pH (5.0–9.0)、温度(20–40 °C)、初始底物浓度(1.00–40.00 mmol/L)对菌株 PG-8 降解底物的影响。每组设置 3 组平行实验，并以只含有 PGK 的样品作为对照。

1.4 生物转化分析

菌株 PG-8 在含有 2.00 mmol/L 葡萄糖的 MM 中培养至 OD_{600} 为 0.3，加入 1.00 mmol/L PGK 诱导 3 h，以未加入底物的样品为对照，设置 3 组平行实验。离心收集菌体 (8 000×g, 5 min)，用 20.00 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗 2 次后悬浮，使 OD_{600} 为 2.0。加入 2.00 mmol/L 底物后定时取样(0.50 mL)，并加入等体积的甲

醇剧烈振荡 5 min 裂解细胞。然后高速离心 (15 000×g, 30 min), 取上清进行 HPLC 分析。通过 LC-MS 进行中间代谢产物的鉴定。

1.5 基因组和转录组测定

提取菌株 PG-8 基因组 DNA, 并在北京诺禾致源科技股份有限公司完成基因组测序。菌株 PG-8 在含有 2.00 mmol/L 葡萄糖的 MM 中培养至 OD_{600} 为 0.3, 加入 1.00 mmol/L 的 PGK 或葡萄糖(对照)诱导 3 h 后收集菌体, 经液氮速冻后进行转录组测序。

1.6 蛋白表达与纯化

采用表 1 中的引物分别扩增 *pgkA* 和 *pgkB* 基因, 使用 In-Fusion® HD Cloning Kit [宝生物工程(大连)有限公司]将目的片段与经过 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切的 pBAD18 载体进行连接, 并转化表达菌株 *E. coli* TOP10。将表达菌株接种至含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6, 加入终浓度 0.10% 的 L-阿拉伯糖 16 °C、120 r/min 诱导 8 h, 之后 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用预冷的 50.00 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗 2 次后重悬, 在冰水浴中超声破碎(破碎 5 s, 停 7 s) 20 min。细胞裂解液在 4 °C、20 000×g 离心 45 min 后, 上清液加入含有 Ni^{2+} -NTA 树脂的层析柱, 并用 50.00 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)清洗色谱柱, 除去未结合的蛋白和杂质。依次用含有不同浓度咪唑(40.00、80.00、120.00、250.00 mmol/L)的磷酸缓冲液进行洗脱。样品经 SDS-PAGE 分析后, 选择目的蛋白较为单一的样品透析过夜。透析后的蛋白用 Ultra-15 超滤管(截留分子量 10 kDa, Merck Millipore 公司)浓缩后用于酶活性分析。

1.7 酶学分析和产物鉴定

5.00 mL P_{gkA} 酶活性反应体系包括 50.00 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)、14.60 μg P_{gkA} (不添加 P_{gkA} 为对照), 加入 0.10 mmol/L 底物, 在 30 °C 启动反应。P_{gkA} 酶促反应动力

学体系: 在 5 mL 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)中加入 5.90 μg P_{gkA}, 随后加入不同浓度的底物 (15.00–285.00 μmol/L)启动反应, 30 s 取样 1 次, 并立即加入等体积甲醇终止反应, 25 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后通过 HPLC 进行检测。

5.00 mL P_{gkB} 酶活性反应体系包括 50.00 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.5)、40.40 μg P_{gkB} (不添加 P_{gkB} 为对照), 加入 0.50 mmol/L 底物, 在 30 °C 启动反应。P_{gkB} 酶促反应动力学体系: 在 5.00 mL 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)中加入 40.40 μg P_{gkB}, 随后加入底物(0.10–1.00 mmol/L)启动反应, 每 2 min 取 1 次样, 随后立即加入等体积的甲醇终止反应, 25 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后进行 HPLC 分析。

1.8 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 和液相色谱-质谱联用仪 (liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS) 分析

HPLC 分析采用的色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 column 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相组成: 流动相 A 为体积分数为 0.10% 的磷酸水溶液, 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0–20 min, 33% B 线性增加至 90% B, 并保持 20 min; 然后在 0.1 min 内重新回到 33% B, 持续保持 4.9 min 后结束。流速为 1.00 mL/min, 柱温保持在 30 °C, 进样量为 10.00 μL, 检测波长为 215 nm。

LC-MS 分析采用 Waters BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 进行分析, 柱温维持在 30 °C。流动相由体积分数为 0.10% 的磷酸水溶液(A 相)和甲醇(B 相)组成, 流速 1.00 mL/min。采用梯度洗脱程序: 0–20 min 内 A 相从 67% 线性降至 10%, 20–25 min 恢复至 67% A 相。进样体积为 10.00 μL。样品经 UPLC 流出后, 在正离子模式下通过电喷雾电离(ESI)进入质谱仪。

ESI-MS 条件设置：毛细管电压 3.00 kV，源温度 150 °C，脱溶剂气温度 400 °C，氮气(纯度 99.90%)作为脱溶剂气，流速 800 L/h。

1.9 *pgkA* 和 *pgkB* 的基因敲除和回补

基因敲除实验采用 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 将目的基因的上游和下游约 1 kb 的片段以及氯霉素抗性基因连接到 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切的 pEX18Tc 上，转化 *E. coli* DH5 α ，得到敲除质粒(表 2)。将敲除载体转化至 2,6-二氨基庚二酸(2,6-DAP)营养缺陷型的 *E. coli* WM3064 中。含有敲除质粒的 WM3064 在含有 0.30 mmol/L 2,6-DAP 的 LB 培养基中培养至 OD_{600} 为 0.6，然后与 PG-8 菌株接合，在含 2,6-DAP 的 LB 培养基平板上培养过夜。用 LB 清洗混合菌体 2 次，稀释涂布至含 34.00 μ g/mL 氯霉素和质量体积比为 10% 的蔗糖的 LB 培养基平板上，挑取具有抗性的菌落，并利用 PCR 和测序鉴定突变株。

基因互补采用广宿主质粒 pRK415 实现。将 *pgkA* 和 *pgkB* 基因分别连接到 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切的 pRK415 上构建互补质粒(表 2)，电转化至 PG-8 突变株中，利用测序方法鉴定阳性克隆。

1.10 菌株和基因序列编号

菌株 PG-8 保藏于中国典型培养物保藏中心，编号为 CCTCC M 2024394。菌株 PG-8 的 16S rRNA 基因、*pgkA*、*pgkB* 序列已在 NCBI 的 GenBank 数据库中存储，序列号分别为 PP077309、PV522064 和 PV522065。

2 结果与分析

2.1 *Delftia* sp. PG-8 的筛选和鉴定

通过富集培养，从青霉素菌渣中筛选出一株能降解 PGK 的菌株。革兰氏染色显示该菌株为革兰氏阴性细菌，扫描电子显微镜观察其形态为杆状(图 1A)。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树分析表明，该细菌属于代尔夫特菌(*Delftia*) (图 1B)，将其命名为 PG-8，并保藏于

中国典型培养物保藏中心(编号为 CCTCC M 2024394)。将菌株 PG-8 接种于以 PGK 为唯一碳源的无机盐培养基中，底物被快速降解；生物量(OD_{600})在接种后的 12 h 内下降明显，推测这是由于底物及其代谢产物对细菌具有毒性效应。然而，随着底物的进一步降解和培养时间的延长，细菌生物量明显增加，这充分说明 PG-8 能利用 PGK 作为唯一碳源进行生长(图 1C)。本研究发现，PG-8 是代尔夫特菌属细菌中第一株能够降解 PGK 并利用其为唯一碳源生长的细菌。

2.2 PG-8 对 PGK 的降解特性研究

考虑到 PG-8 是代尔夫特菌属中第一株能够降解 PGK 并利用其为唯一碳源生长的细菌，且该属细菌降解 PGK 的现有数据较少。因此，本研究进一步分析了不同 pH、温度、底物浓度对菌株 PG-8 降解 PGK 的影响，并优化了底物降解和细菌生长的最适条件，为后续生物修复提供数据支撑。

2.2.1 不同 pH 对底物降解和细菌生长的影响

当无机盐培养基的 pH 在 5.0–9.0 范围时菌株 PG-8 均能快速降解 PGK，但 pH 在 7.0、8.0、9.0 时的降解速率明显高于 pH 5.0 和 6.0 时的降解速率(图 2A)。当 pH 为 8.0 时菌株 PG-8 降解 PGK 的速率最快，12 h 内能完全降解初始浓度为 5.00 mmol/L 的 PGK。当 pH 为 5.0 时底物自发降解比较明显，说明 PGK 在酸性环境中不稳定，会发生自发水解。与底物降解不同，菌株 PG-8 在 pH 5.0 和 6.0 条件下的生长情况优于 pH 7.0、8.0、9.0 条件下的生长情况(图 2B)，该现象与 Zhang 等^[30]的研究结果相似，推测可能是酸性条件下 PGK 的自发降解会减弱抗生素对细菌的毒性，从而有利于细菌生长。因此，综合考虑细菌生长情况和底物自降解干扰，后续在 pH 7.0 进行底物降解和细菌生长研究。

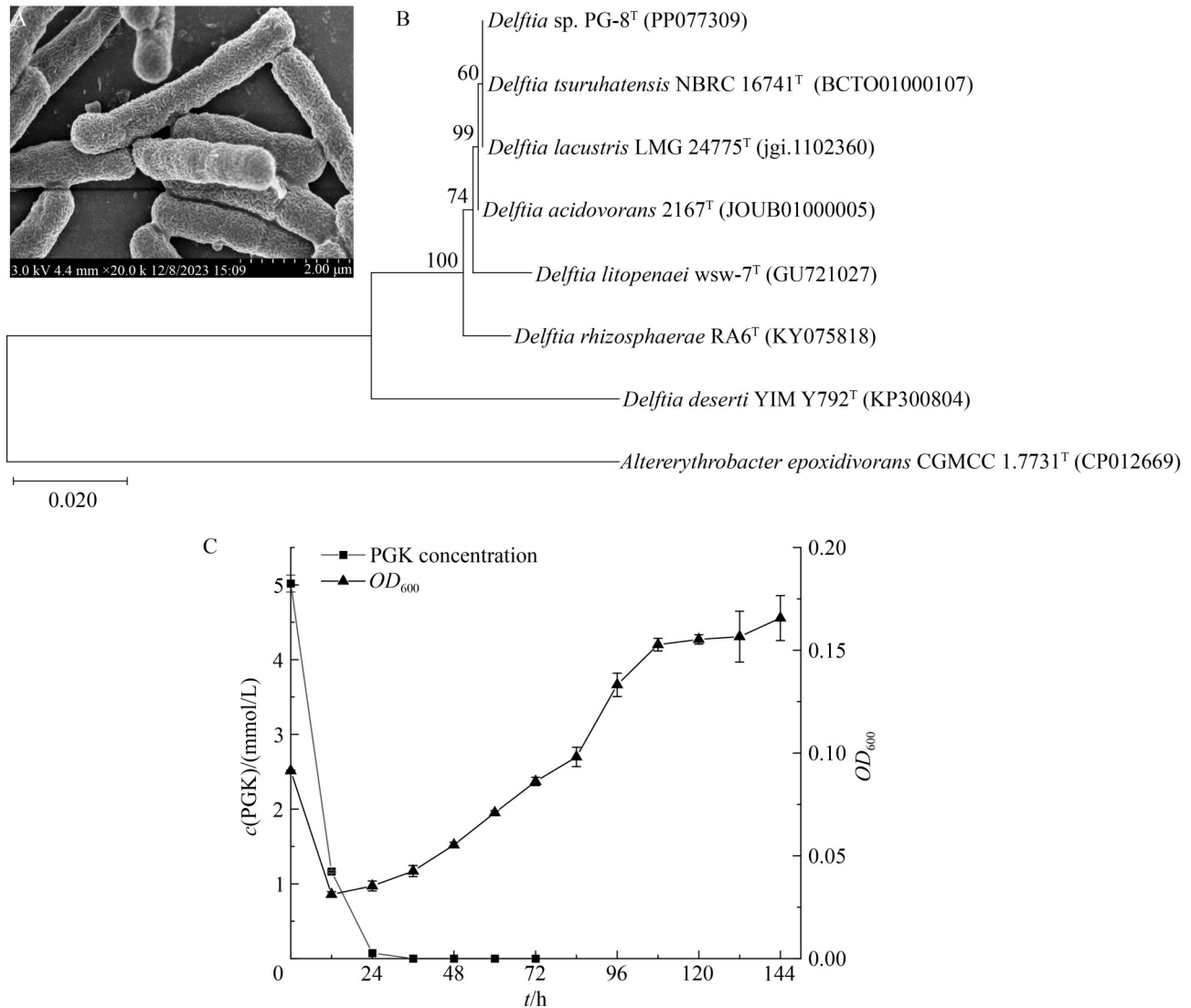


图1 菌株PG-8的筛选和鉴定。 A: 菌株PG-8的扫描电镜; B: 菌株PG-8基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树[括号中的序号为细菌的基因组序列号, 分支点上的数字为支持值, 代表该分支的可信程度(值越高, 可信程度越高), 标尺表示遗传距离]; C: 菌株PG-8利用PGK为唯一碳源生长。

Figure 1 Screening and identification of strain PG-8. A: Scanning electron microscope image of strain PG-8; B: Phylogenetic tree of strain PG-8 based on 16S rRNA gene sequence [The serial numbers in parentheses are the genomic serial numbers of the bacteria; The numbers on the branch points are support values representing the credibility of the branch (the higher the value, the higher the credibility), and the scale indicates the genetic distance]; C: Growth of strain PG-8 using penicillin G as the sole carbon source.

2.2.2 不同温度对菌株 PG-8 降解 PGK 的影响结果

在 pH 7.0 条件下设置不同温度(20、25、30、35、40 °C), 研究菌株 PG-8 在以 PGK 为唯

一碳源生长过程中的底物降解和细菌生长情况。结果显示, 当培养温度在 20–35 °C时随着温度升高菌株 PG-8 降解 PGK 的速率逐渐加快; 当温度进一步提升至 40 °C时降解速率减缓(图 3A)。

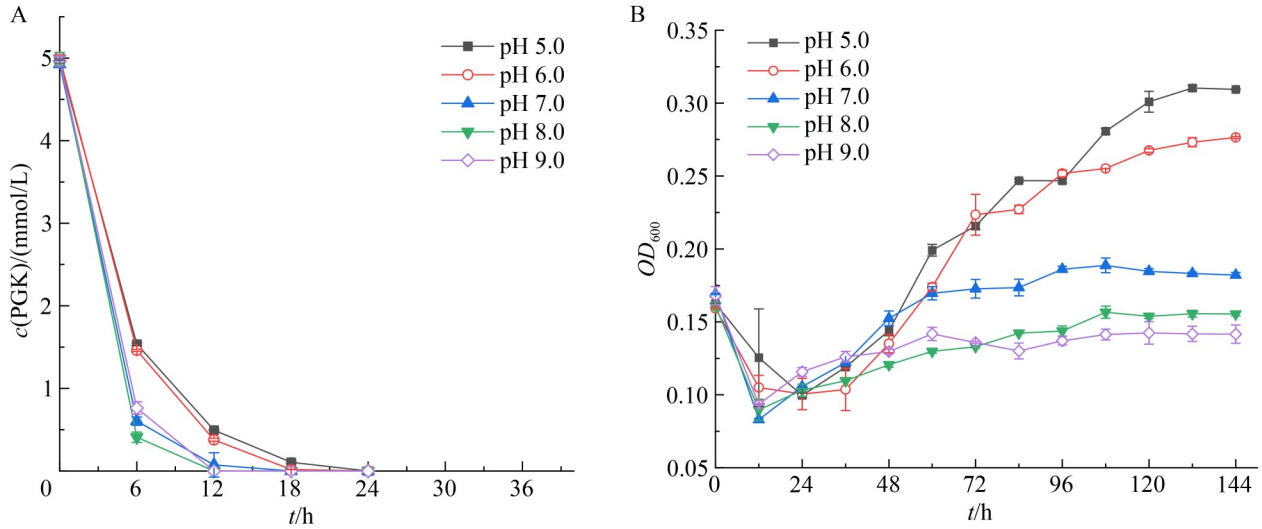


图2 不同pH对底物降解和细菌生长的影响。A: 不同pH对菌株PG-8降解PGK的影响; B: 不同pH对菌株PG-8生长的影响。

Figure 2 Effects of different pH on substrate degradation and bacterial growth. A: Effect of different pH on the degradation of penicillin G by strain PG-8; B: Effect of different pH on the growth of strain PG-8.

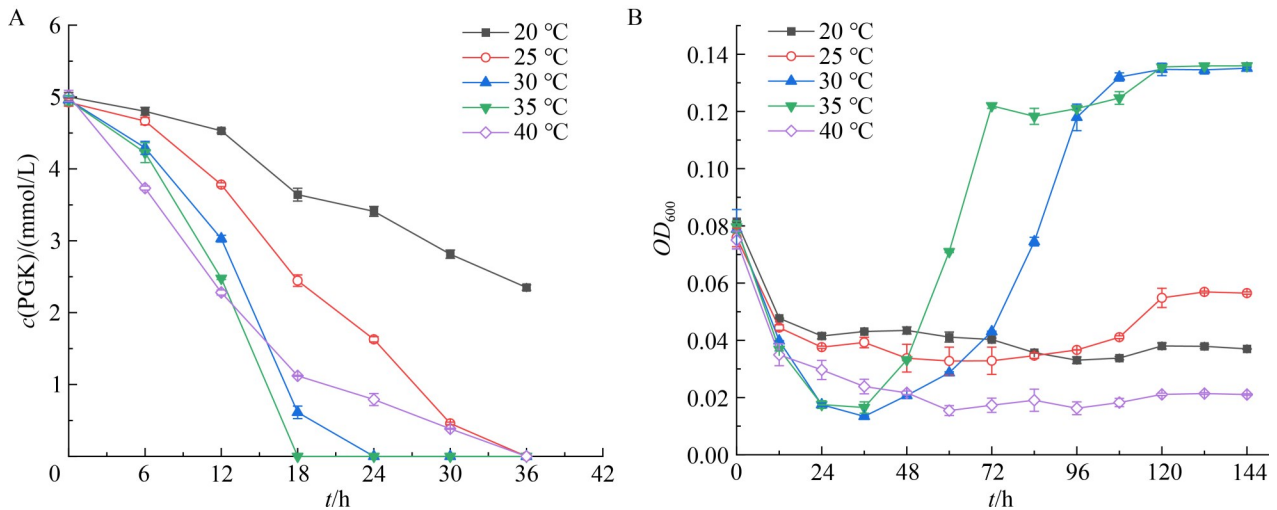


图3 不同温度对底物降解和细菌生长的影响。A: 不同温度对菌株PG-8降解PGK的影响; B: 不同温度对菌株PG-8生长的影响。

Figure 3 Effects of different temperatures on substrate degradation and bacterial growth. A: Effect of different temperatures on the degradation of penicillin G by strain PG-8; B: Effect of different temperatures on the growth of strain PG-8.

在温度为 35 °C 时菌株 PG-8 在 18 h 内能完全降解 5.00 mmol/L 的 PGK。在细菌生长方面, 菌株在 30 °C 和 35 °C 时生长状态较好, 且在

35 °C 时生长速率最快(图 3B)。因此, 菌株 PG-8 在以 PGK 为唯一碳源生长的最适温度为 35 °C。

2.2.3 不同 PGK 初始浓度对底物降解和细菌生长的影响

在培养温度 35 °C、培养基 pH 7.0 条件下, 设置不同底物浓度(1.00、5.00、10.00、20.00、40.00 mmol/L), 研究菌株 PG-8 在以 PGK 为唯一碳源生长过程中的底物降解和细菌生长情况。结果显示, 在上述条件下菌株 PG-8 在 24 h 内能完全降解 20.00 mmol/L 的 PGK; 当底物浓度增加到 40.00 mmol/L 时 48 h 内能降解 95.20% 的底物, 随后底物浓度不再发生变化(图 4A)。细菌生长结果显示, 细菌 OD_{600} 在 12 h 内先下降随后逐渐上升, 而且在 36 h 后细菌开始快速生长(图 4B)。这些结果表明, 初始底物浓度对 PGK 的降解和菌株 PG-8 的生长有显著影响, 且底物降解和细菌生长并非同步, 推测菌株 PG-8 是利用 PGK 的代谢产物进一步作为碳源生长。

2.3 生物转化和中间代谢产物的鉴定

为研究菌株 PG-8 中参与 PGK 降解的酶是否为诱导型, 本研究进行了生物转化试验分析。结果显示, 经过 PGK 诱导的 PG-8 ($OD_{600}=2.0$)能快

速降解底物(图 5A), 随着底物浓度的降低生物转化速率逐渐减缓, 最后 2.00 mmol/L 的 PGK 能在 30 min 内被完全降解。在此期间, 未经诱导的 PG-8 细胞未检测到 PGK 的明显降解, 表明菌株 PG-8 中负责起始 PGK 降解的酶是受底物诱导的。

结合 HPLC 和 LC-MS 解析菌株 PG-8 分解代谢 PGK 的中间代谢产物, 并进行产物结构鉴定。PGK 被降解过程中共检测到 4 个主要的中间代谢产物(图 5B)。根据 LC-MS 产物鉴定结果, 本研究推测青霉素 G 首先在 β -内酰胺酶作用下生成青霉噻唑酸(产物 1)(图 5C), 随后脱羧生成(5,5-二甲基-2-[(2-苯乙酰)氨基]甲基)-1,3-噻唑烯-4-羧酸(产物 2, 去羧基青霉素噻唑酸)(图 5D), 产物 2 再通过顺序脱甲基生成产物 3(图 5E)和产物 4(图 5F), 随后进一步降解进入三羧酸循环, 为菌株 PG-8 生长提供碳源。

2.4 参与 PGK 降解的基因的鉴定及进化分析

生物转化实验证实起始 PGK 分解代谢的酶是受底物诱导的, 因此本研究结合基因组和转

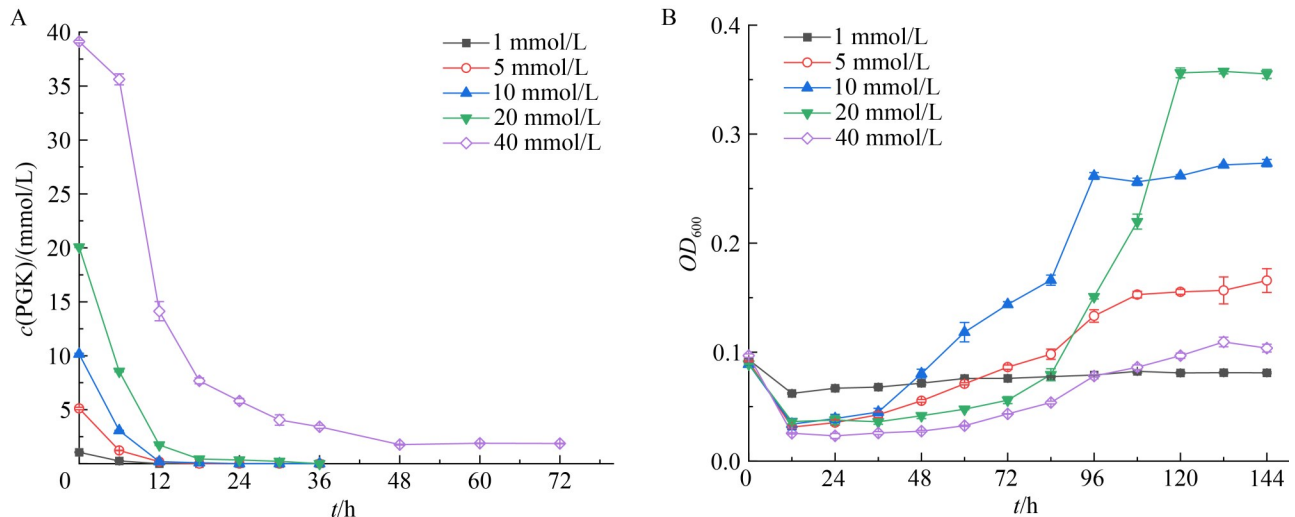


图4 不同PGK初始浓度对底物降解和细菌生长的影响。A: 不同底物浓度对菌株PG-8降解PGK的影响; B: 不同底物浓度对菌株PG-8生长的影响。

Figure 4 Effects of different initial concentrations of penicillin G on substrate degradation and bacterial growth. A: Effect of different substrate concentrations on the degradation of penicillin G by strain PG-8; B: Effect of different substrate concentrations on the growth of strain PG-8.

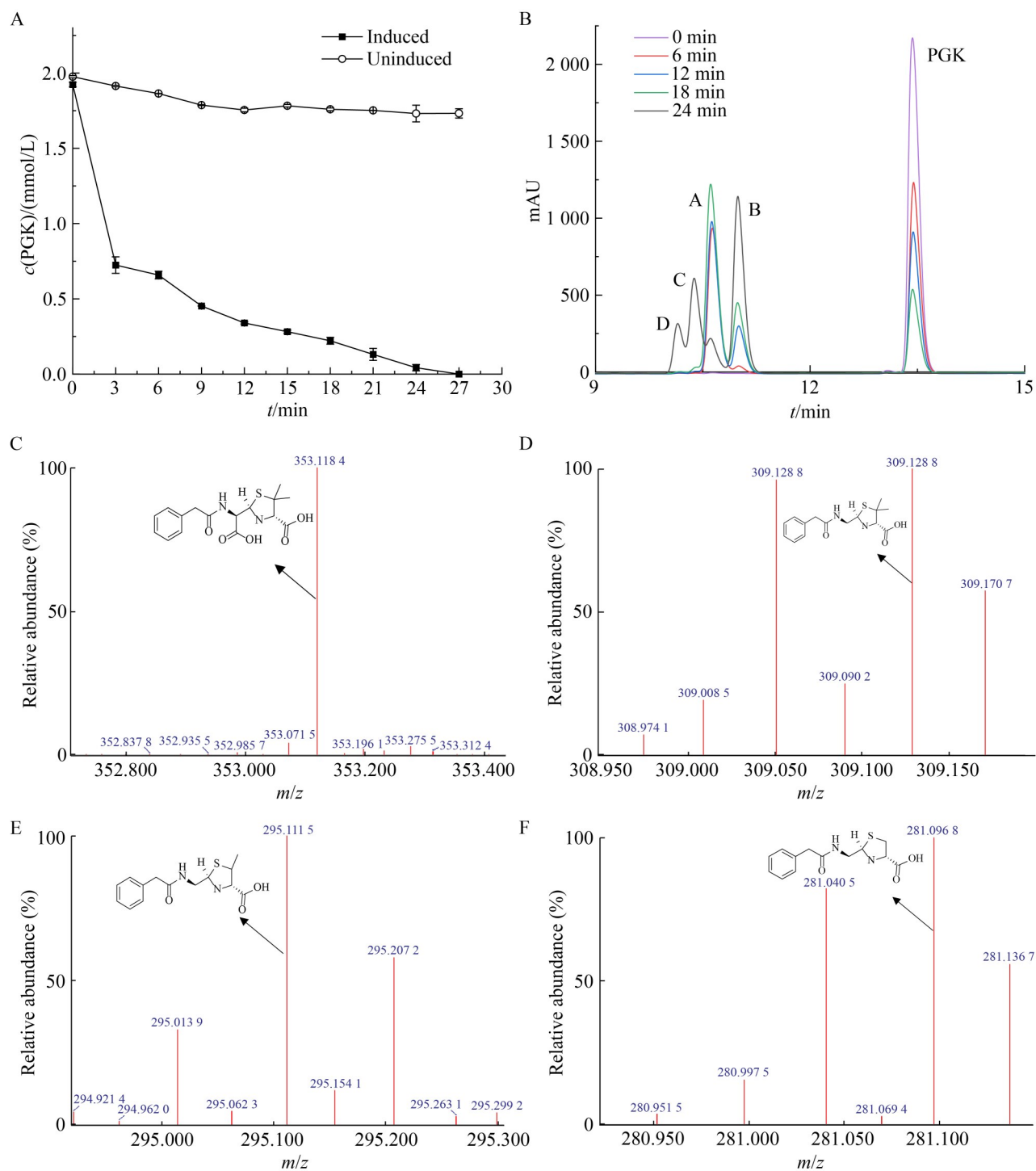


图5 PG-8生物转化PGK及中间代谢产物的鉴定。 A: 底物诱导和非诱导菌株对PGK的降解; B: HPLC检测中间代谢产物; C-F: 中间代谢产物的质谱图。

Figure 5 Biotransformation of PGK by strain PG-8 and the identification of intermediate metabolites. A: Degradation of PGK by induced and non-induced strains; B: HPLC detection of intermediate metabolites; C-F: Mass spectrometry analysis of intermediate metabolites.

录组分析来探究可能负责 PGK 降解的基因。转录结果显示, 与未诱导细胞相比, PGK 诱导的 PG-8 中编码一个 class A 家族 β -内酰胺酶的基因(基因组编号为 PG.8_GM002194, NCBI 序列号: PV522064, 命名为 *pgkA*)上调达 196.60 倍。在已完成功能鉴定的细菌 β -内酰胺酶中, *PgkA* 与皮疽诺卡氏菌(*Nocardia farcinica*) IFM10152 的降解青霉素 G 的 FAR-1 一致性最高, 为 47.39%。系统进化分析显示, 这些功能鉴定的 β -内酰胺酶共分为 3 个大的分支, 且 *PgkA* 独立组成一个分支, 暗示菌株 PG-8 中起始青霉素 G 分解代谢的酶可能具有其独特的进化起源(图 6A)。紧挨 *pgkA* 的基因(基因组编号为 PG.8_GM002195, NCBI 序列号: PV522065, 命名为 *pgkB*)转录上调 112.10 倍。序列分析显示, 该基因编码一个氨基酸 N-乙酰转移酶。*PgkB* 与 NCBI Swiss-Prot 数据库中假茄科罗尔斯通氏菌(*Ralstonia pseudosolanacearum*) GMI1000 的 N-乙酰谷氨酸合成酶序列相似性最高, 为 59.00%。系统进化分析显示, *PgkB* 与该酶的进化关系最近, 并且这 2 个酶与其他细菌属的 N-乙酰谷氨酸合成酶位于完全不同的进化分支(图 6B), 暗示它们与其他属细菌中的酶具有不同的进化起源。

基因组上紧挨 *pgkAB* 的 PG.8_GM002196 和 PG.8_GM002198 分别编码一个 TolC 家族的外膜孔蛋白(命名为 *PgkM*)和一个 MFS 家族转运蛋白(命名为 *PgkT*) (图 6C)。据报道, 革兰氏阴性细菌独特的细胞膜结构是亲水性抗生素的物理屏障, 外膜孔蛋白可以通过非特异性渗透作用使这类抗生素穿透细胞外膜, 而细菌跨内膜外泵和摄取抗生素则需要转运蛋白来实现^[29]。因此, 本研究推测 *PgkM* 可能是负责将青霉素 G 从细胞外渗透进入周质空间的外膜孔蛋白, *PgkT* 则负责进一步跨内膜转运抗生素进入细胞质, 随后由代谢酶系完成其降解。革兰氏阴性细菌跨外膜渗透抗生素已被广泛报道, 但是利用抗生素为唯一碳源生长的细菌跨内膜转运底物的转运蛋白尚未鉴定, 转运机制也尚不明确。

因此, *PgkT* 确切的转运功能和机制还需进一步验证。*pgkA* 上游的 PG.8_GM002193 编码一个 LysR 家族的转录调控因子 *PgkR*, 推测其可能参与了青霉素代谢相关基因的转录调控, 其功能也有待进一步证实。此外, 该菌株基因组中还包含一段完整的苯乙酸代谢基因簇(PG.8_GM006000-PG.8_GM006007)。根据青霉素 G 的分子结构和文献报道, 推测这段基因簇可能也参与了 PGK 的下游代谢。基因组进一步分析显示, *pgkAB* 上下游无疑似的可转移元件, 推测这 2 个基因在细菌间发生基因转移的可能性不大, 这也暗示 *pgkAB* 不会因为基因转移使环境中的其他细菌获得耐药性。因此推测, 在利用 PG-8 进行青霉素 G 污染环境修复过程时其潜在的扩散风险较小。

2.5 *PgkA* 和 *PgkB* 的表达纯化和酶活性分析

将 *pgkA* 和 *pgkB* 基因插入到 pBAD18 质粒上构建表达载体, 转化大肠杆菌 TOP10, 并用 0.1% 的 L-阿拉伯糖诱导进行蛋白的异源表达。SDS-PAGE 分析显示, *PgkA* 和 *PgkB* 的分子量分别约为 30.80 kDa 和 52.10 kDa (图 7), 与基于它们的氨基酸序列推导的分子质量一致。通过 HPLC 和 LC-MS 分析 *PgkA* 和 *PgkB* 的活性并鉴定其催化反应产物。结果显示, *PgkA* 能催化 PGK 快速降解生成青霉噻唑酸, 而且酶的比活为 33.90 U/mg。酶促反应动力学结果显示, *PgkA* 催化 PGK 降解的 $K_m=(99.19\pm 19.45)\ \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}}=(19.40\pm 1.44)\ \text{s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m=(1.96\pm 0.55)\times 10^5\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$, 米氏常数动力学曲线如图 7A 所示。对于 *PgkB*, 原本推测它可能催化 *PgkA* 的产物青霉噻唑酸的进一步降解。本研究发现, *PgkB* 并不能催化商业化的青霉噻唑酸的降解, 却能催化 PGK 的有效降解生成青霉噻唑酸, 催化反应时酶的比活为 6.06 U/mg。酶促反应动力学结果显示, *PgkB* 催化 PGK 降解的 $K_m=(533.76\pm 90.57)\ \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}}=(6.44\pm 0.51)\ \text{s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m=(1.21\pm 0.31)\times 10^4\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{s})$,

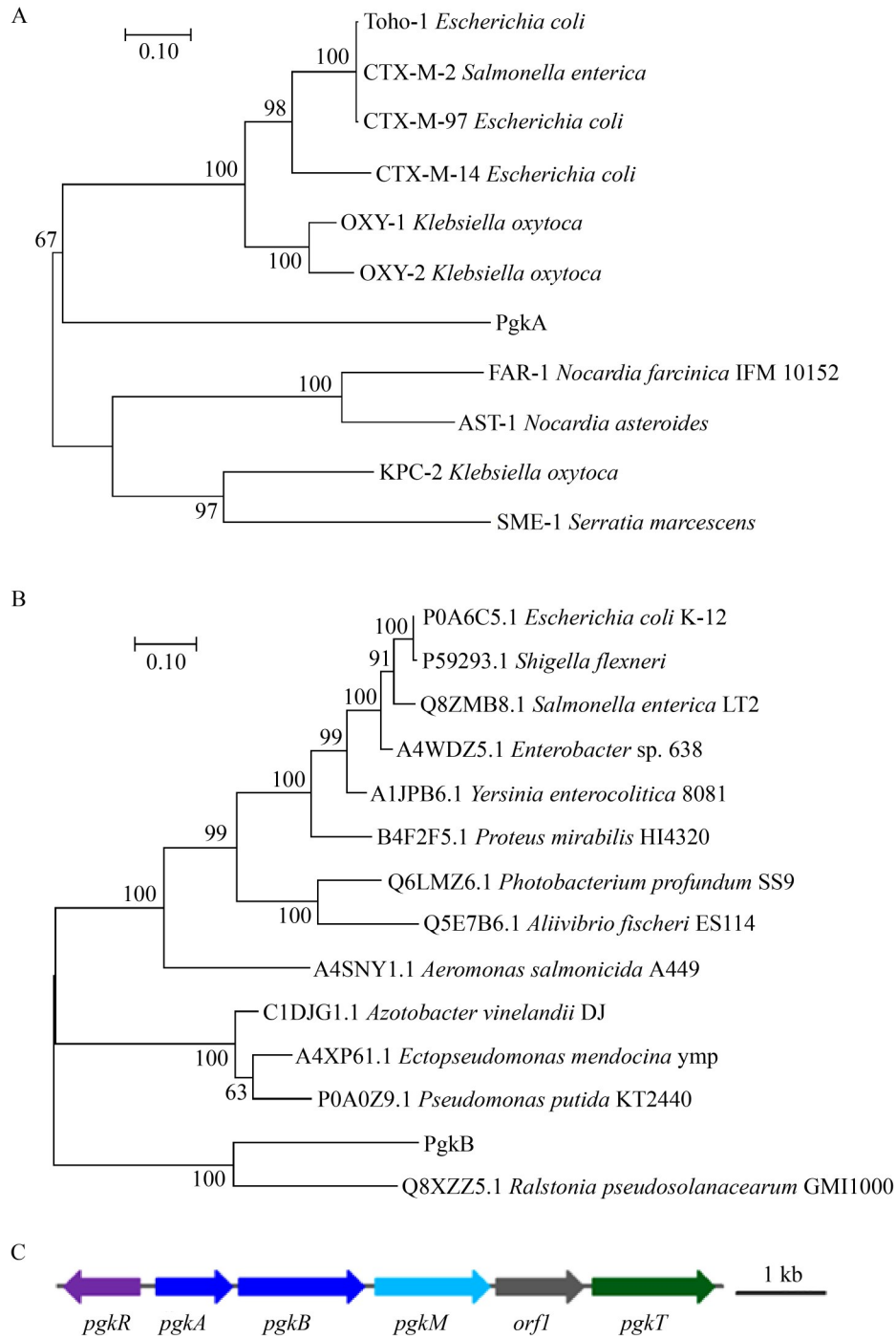


图6 PgkA和PgkB的系统发育分析及菌株PG-8中的pgk基因簇。 A: PgkA与其他已验证功能的β-内酰胺酶的系统发育关系; B: PgkB与其他属细菌中氨基酸N-乙酰转移酶的系统发育关系; C: *pgk*基因簇。
 Figure 6 Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of PgkA and PgkB their homologous proteins. A: Phylogenetic relationship of PgkA with other functionally validated β-lactamases; B: Phylogenetic relationship of PgkB with the amino acid N-acetyltransferases from other bacterial genera; C: Organization of the *pgk* gene cluster.

米氏常数动力学曲线如图 7B 所示。酶学反应结果显示, 虽然 P_{gkA} 和 P_{gkB} 都能催化 PGK 降解生成青霉噻唑酸, 但是 P_{gkA} 对 PGK 的亲合力是 P_{gkB} 的 5.4 倍, 催化效率是 P_{gkB} 的 10 倍左右, 说明 P_{gkA} 在 PG-8 降解 PGK 过程中起主要作用。

2.6 基因敲除和回补验证 *pgkA* 和 *pgkB* 在 PG-8 降解并利用 PGK 生长中的作用

为进一步验证 *pgkA* 和 *pgkB* 的生理功能,

分别构建了 *pgkA* 和 *pgkB* 的缺失突变菌株 PG-8- Δ *pgkA* 和 PG-8- Δ *pgkB*, 以及同时敲除 *pgkAB* 的突变株 PG-8- Δ *pgkAB*。与野生型 PG-8 相比, PG-8- Δ *pgkA* 和 PG-8- Δ *pgkAB* 降解青霉素 G 的能力显著下降, 且无法将青霉素 G 完全降解, 回补菌株的底物降解能力基本恢复至野生型水平。虽然 PG-8- Δ *pgkB* 仍能有效降解青霉素 G, 但降解速率明显慢于野生株(图 8A)。在细菌生长方面, 分别敲除 *pgkA* 和 *pgkB* 的 PG-8 仍能利用青

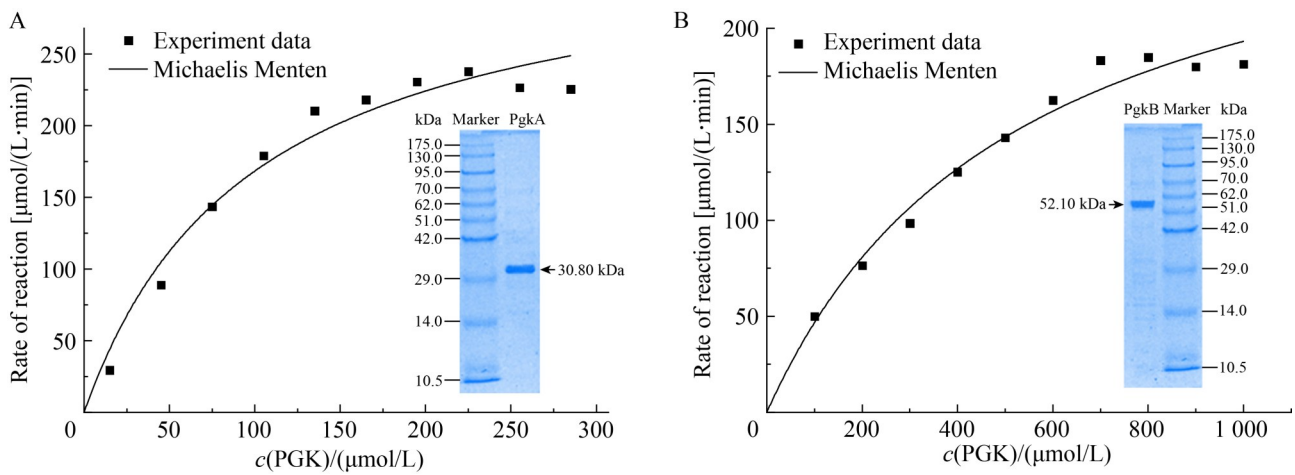


图7 P_{gkA} (A)和P_{gkB} (B)的纯化及其酶促反应动力学分析

Figure 7 Purification and enzyme kinetics analysis of P_{gkA} (A) and P_{gkB} (B).

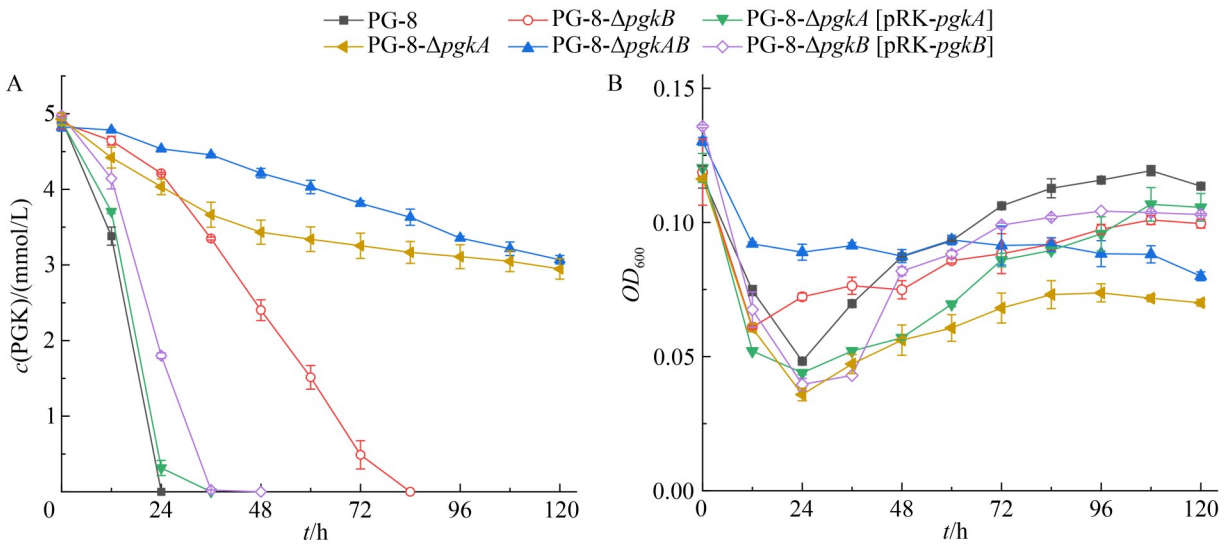


图8 菌株PG-8及其突变株降解(A)并利用PGK为唯一碳源(B)的生长情况

Figure 8 Degradation by strain PG-8 and its mutants (A) and growth using PGK as the sole carbon source (B).

霉素 G 为唯一碳源生长, 但生长状况明显弱于野生型, 且 PG-8- $\Delta pgkA$ 的生长速率比 PG-8- $\Delta pgkB$ 更慢, 同时敲除 $pgkA$ 和 $pgkB$ 的双敲除菌株 PG-8- $\Delta pgkAB$ 基本无法利用青霉素 G 生长 (图 8B)。因此, 结合酶学分析和基因敲除实验证实 $pgkA$ 和 $pgkB$ 共同起始青霉素 G 的代谢, 但 $pgkA$ 起主导作用。

3 讨论

青霉素 G (PENG) 是一种典型的 β -内酰胺类抗生素, 其在医疗、畜牧、养殖业等领域的大量使用对环境 and 人类健康造成了严重危害。自从 Dantas 等报道了降解 PENG 的纯培养微生物 (未鉴定种属) 后^[27], 各种降解菌陆续被分离鉴定。目前能降解 PENG 的细菌有 11 株 (表 3), 但仅有少数几株细菌能够利用 PENG 为唯一碳源生长。例如, *Paracoccus* sp. KDSPL-02^[28]、*Sphingobacterium* sp. SQW1^[30]、霍氏肠杆菌 (*E. hormaechei*) WM1^[32] 和肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) Z1^[33] 在利用 PENG 生长过程中能分别在 24、12、9、24 h 完全降解 800.00–1 200.00、632.92、10.00、300.00 mg/L

的底物。*Chelatococcus* sp. PC-2 能在以青霉素 G 钠作为唯一碳源的培养基中生长, 且在补充碳氮源条件下对 400.00 mg/L 青霉素钠的降解率达 98.00%^[31]。此外, 目前多数报道的菌株需要补充额外碳氮源才能有效降解 PENG。例如, 新洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia*) JZ6 几乎不降解 300.00 mg/L 的 PENG, 但补充碳氮源后 24 h 降解率可达 99.98%^[35]。胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 3060 在添加碳氮源的情况下能够将 1.00 mg/L 浓度的 PENG 彻底降解^[36]。还有几株细菌在添加额外碳源条件下能降解 PENG, 但无法将底物完全降解 (表 3)。本研究从青霉素菌渣中筛选得到的 *Delftia* sp. PG-8 能高效降解青霉素 G 钾, 并以其为唯一碳源进行生长, 且在 pH 5.0–9.0、25–40 °C 条件下能完全降解青霉素 G 钾, 说明该菌株具有极强的环境适应性。此外, PG-8 在高浓度底物条件下仍保持较高代谢活性。当初始青霉素 G 钾浓度为 20.00 mmol/L (7 450.00 mg/L) 时, 该菌株能完全降解底物并实现细菌生长; 即使在底物浓度 40.00 mmol/L (14 900.00 mg/L) 条件下仍具有 95.20% 的降解效

表3 不同细菌对青霉素G的降解情况

Table 3 Degradation of PENG by different strains

Strain	Substrate concentration (mg/L)	Degradation time (h)	Degradation rate (%)
<i>Delftia</i> sp. PG-8*	7 450.00 (14 900.00)	18 (48)	100.00 (95.20)
<i>Paracoccus</i> sp. KDSPL-02* ^[28]	800.00–1 200.00	24	100.00
<i>Sphingobacterium</i> sp. SQW1* ^[30]	632.92	12	97.04
<i>Chelatococcus</i> sp. PC-2* ^[31]	400.00	6	98.00
<i>Enterobacter hormaechei</i> WM1* ^[32]	10.00	9	100.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Z1* ^[33]	300.00	24	99.90
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Anti-Pen20 ^[34]	20 000.00	24	85.00
<i>Burkholderia cenocepacia</i> JZ6 ^[35]	300.00	24	99.98
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> 3060 ^[36]	1.00	–	100.00
<i>Serratia</i> sp. R ^[37]	10.00	336	84.03
<i>Pseudomonas putida</i> ^[38]	3.00	960	36.00
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ^[39]	1 500.00	72	70.00–80.00

*: Strains capable of utilizing penicillin G as the sole carbon source; –: The degradation time is unknown.

率。此外, 有些代尔夫特菌属的细菌被报道对β-内酰胺类抗生素不具备抗药性^[40], 本研究发现, PG-8 是代尔夫特菌属中第一株能够利用PENG 为唯一碳源生长的菌株。

目前关于 PENG 的分解代谢报道了多条不同的代谢途径。细菌 β-内酰胺酶是绝大多数抗性细菌对 β-内酰胺类抗生素产生耐药性的主要机制, 因此青霉素噻唑酸被认为是 PENG 降解的主要代谢物之一^[41]。菌株 *Paracoccus* sp. KDSPL-02 降解 PENG 时首先通过 β-内酰胺环水解生成青霉噻唑酸, 然后进一步水解生成苯乙酸和类似于 6-氨基青霉烷酸的中间产物, 随后进入下游未知代谢途径(图 9 中途径 2)^[28]。Crofts 等^[29]研究 4 株土壤微生物通过共享策略降解 PENG 时, 推测 *Paracoccus* sp. ABC07 也是通过该途径完成 PENG 降解。推测 *Sphingobacterium* sp. SQW1 降解 PENG 时可能存在 3 条代谢途径: 菌株 SQW1 先通过 β-内酰胺酶起始 PENG 的降解生成青霉噻唑酸, 然后通过 2 条不同的下游代谢途径实现 PENG 的完全矿化(起始反应分别类似于途径 3 和 4)^[30]。该菌株降解 PENG

还可能存在第 3 条途径(图 9 中途径 5), 即由酰基转移酶起始 PENG 降解生成苯乙酸和 6-氨基青霉烷酸, 这 2 个产物分别进行下游代谢完成 PENG 的矿化^[30]。然而, 菌株 SQW1 降解 PENG 的复杂代谢途径网络都只是基于可能的中间代谢产物的鉴定, 缺乏必要的基因和酶学证据。*K. pneumoniae* Z1^[33]代谢过程前两步中间产物与 PG-8 相同, 但第 3 步中间产物有所不同(图 9 中途径 6), 而且该菌株分解代谢青霉素 G 的基因和酶未见报道。本研究通过中间代谢产物鉴定和酶学分析推测了 PG-8 分解代谢 PENG 的代谢途径(图 9 中途径 1)。PENG 首先在 PgkA 和 PgkB 作用下裂解 β-内酰胺环生成青霉噻唑酸, 青霉噻唑酸随后脱羧转化为去羧基青霉噻唑酸(产物 2); 产物 2 再经过连续地去甲基化生成产物 3 和产物 4。中间产物鉴定过程中还鉴定到了苯乙酸(phenylacetic acid, PAA)的结构类似物 1-苯基-2-丙酮, 而且在 PG-8 的基因组中确实有完整的 PAA 代谢基因簇, 也有研究显示细菌在降解 PENG 过程中会形成 PAA^[29,42]。因此, 推测 PG-8 降解 PENG 可能也是通过下游

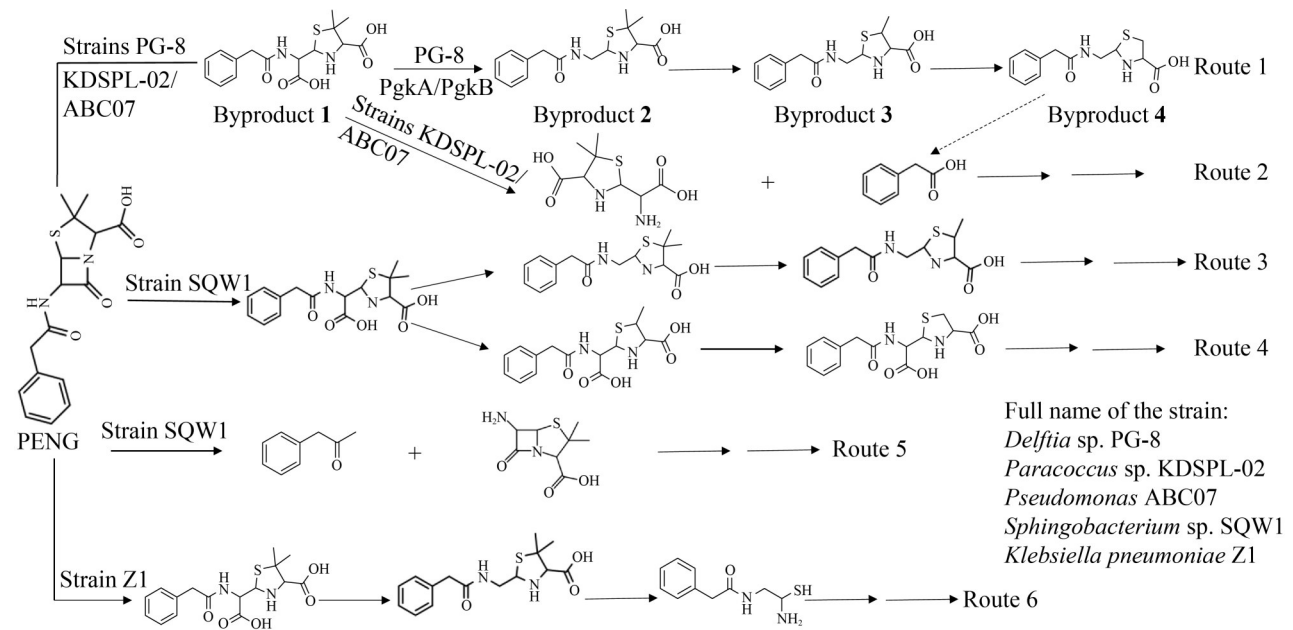


图9 菌株分解代谢PENG的代谢途径

Figure 9 The metabolic pathway of PENG in the catabolism of the strain.

PAA 途径完成底物的矿化。

β -内酰胺酶是一种广谱的水解酶，能催化各种不同的 β -内酰胺抗生素的水解。目前报道的 β -内酰胺酶分为 A-D 4 类。A 类、C 类和 D 类属于丝氨酸 β -内酰胺酶，它们的活性位点均有丝氨酸，需要利用丝氨酸进行 β -内酰胺类药物的水解^[43]。B 类属于金属- β -内酰胺酶，一般需要利用二价锌离子进行药物的水解^[43]。本研究鉴定的 P_{gkA} 经过系统发育分析属于 A 类 β -内酰胺酶，与已完成功能鉴定的 β -内酰胺酶的一致性最高为 47.39%。这些 A 类 β -内酰胺酶的系统发育树分为 3 个主要的分支，而 P_{gkA} 独立组成一个分支，这说明菌株 PG-8 中的 P_{gkA} 可能具有其独特的进化起源。通过比较酶促动力学参数，P_{gkA} 对 PGK 的亲合力与巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)^[44]、小麦苍白杆菌(*Ochrobactrum tritici*)^[45]和蔗糖小浴氏菌(*Kosakonia sacchari*)^[46]中的 β -内酰胺酶类似。P_{gkB} 虽然也能催化 PGK 生成青霉噻唑酸，但其底物亲和力只有 P_{gkA} 的 1/5，催化效率相较 P_{gkA} 也很低。此外，P_{gkB} 与 P_{gkA} 属于完全不同的蛋白家族，系统发育分析显示 P_{gkB} 属于氨基酸 N-乙酰转移酶家族，目前尚未见该家族中的酶催化 PGK 降解的报道。这些都说明 P_{gkB} 催化青霉素 G 降解的机制可能与 P_{gkA} 完全不同。

分别敲除 *pgkA* 和 *pgkB* 后的 PG-8 突变株无论是底物降解还是细菌生长速率都比野生株明显减弱，说明它们在体内都参与了青霉素 G 的分解代谢。PG-8- Δ *pgkA* 不能将 PGK 完全降解，说明 *pgkA* 在 PGK 降解过程中起着主导作用，这也与酶学分析结果相互验证。将 *pgkAB* 同时敲除后的突变株 PG-8- Δ *pgkAB* 仍能降解 PGK，且与 PG-8- Δ *pgkA* 的底物降解速率差不多，但 PG-8- Δ *pgkAB* 却丧失了利用 PGK 为唯一碳源生长的能力。因此，本研究推测在菌株 PG-8 中可

能还存在其他的酶能起始 PENG 的降解，由于酶活力不够而达不到足够的解毒作用，或者其催化的产物不能被进一步降解，所以才导致 PG-8- Δ *pgkAB* 虽然能够降解底物，但不能利用其为唯一碳源生长。

4 结论

本研究从青霉素菌渣中获得代尔夫特菌属中第一株能高效降解 PENG 并利用其为唯一碳源生长的菌株，命名为 PG-8 (CCTCC M 2024394)。该菌株在 pH 为 7.0、温度为 35 °C、底物浓度为 10.00 mmol/L 时表现出最佳的 PGK 降解和细菌生长效果。结合组学分析、中间代谢产物、酶学和遗传学鉴定推测了菌株 PG-8 分解代谢底物的代谢途径。P_{gkA} 能催化 PGK 快速降解生成青霉噻唑酸，而且系统发育分析暗示该酶与已完成功能鉴定的其他 β -内酰胺酶具有不同的进化起源。虽然 P_{gkB} 也能催化 PGK 降解，但其底物亲和力和催化效率显著低于 P_{gkA}。基因敲除和回补说明 *pgkA* 和 *pgkB* 都参与了菌株起始 PENG 的降解，但 *pgkA* 起主要作用。本研究不仅从分子、生化和遗传学层面系统阐述了细菌降解青霉素 G 的分子机制，也对实现青霉素菌渣废弃物的修复利用具有重要意义。

作者贡献声明

闵军：提出概念，数据收集与监管，数据分析，撰写文章，完成呈现；孙梦慧：数据分析，验证；方素云：执行调研；徐凌雪：软件程序；张雅慧：软件程序；胡晓珂：监督管理，获取基金，编辑、撰写、审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 袁钰龙, 刘冬梅, 向荣程, 李真真, 张盟, 赵建, 樊博, 李春雨, 牛东泽, 任建军. 大环内酯类抗生素微生物降解的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3129-3141. YUAN YL, LIU DM, XIANG RC, LI ZZ, ZHANG M, ZHAO J, FAN B, LI CY, NIU DZ, REN JJ. Advances in biodegradation of macrolide antibiotics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(9): 3129-3141 (in Chinese).
- [2] 李虎良, 张蕾. 抗生素耐药性的分子机制及抑菌策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(6): 759-769. LI HL, ZHANG L. Molecular mechanisms and antibacterial strategies of antibiotic resistance[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2024, 40(6): 759-769 (in Chinese).
- [3] 王丹萍, 李尚民, 赵华轩, 蒋一秀, 王洪志, 荆丽珍. 畜禽养殖环境抗生素抗性基因污染研究进展[J]. 家畜生态学报, 2023, 44(8): 1-7. WANG DP, LI SM, ZHAO HX, JIANG YX, WANG HZ, JING LZ. Progress on antibiotic resistance genes contamination in livestock and poultry farming environments[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2023, 44(8): 1-7 (in Chinese).
- [4] CHEN ZY, ZHANG W, YANG LX, STEDTFELD RD, PENG AP, GU C, BOYD SA, LI H. Antibiotic resistance genes and bacterial communities in cornfield and pasture soils receiving swine and dairy manures[J]. Environmental Pollution, 2019, 248: 947-957.
- [5] LI SY, HOFSTRA N, van de SCHANS MGM, YANG J, LI YN, ZHANG Q, MA L, STROKAL M, KROEZE C, CHEN XP, CHEN XJ, ZHANG FS. Riverine antibiotics from animal production and wastewater[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2023, 10(11): 1059-1067.
- [6] D' COSTA VM, KING CE, KALAN L, MORAR M, SUNG WWL, SCHWARZ C, FROESE D, ZAZULA G, CALMELS F, DEBRUYNE R, GOLDING GB, POINAR HN, WRIGHT GD. Antibiotic resistance is ancient[J]. Nature, 2011, 477(7365): 457-461.
- [7] 马悦, 赵若男, 陈朱淑怡, 童文彬, 王美. 畜禽粪便中抗生素耐药基因的污染现状及其防控研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2025, 61(5): 117-121. MA Y, ZHAO RN, CHEN ZSY, TONG WB, WANG M. Progress research on present situation of antibiotic resistance genes contamination in livestock and poultry manure and its prevention and control[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2025, 61(5): 117-121 (in Chinese).
- [8] 孙盘龙. 抗生素在畜牧业中的使用及其对人类健康的影响[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2023, 43(5): 94-97.
- [9] ELANDER RP. Industrial production of β -lactam antibiotics[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 61(5): 385-392.
- [10] CHEMTAI C, KENGARA FO, NGIGI AN. Levels and ecological risk of pharmaceuticals in River Sosiani, Kenya[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2023, 195(3): 431.
- [11] 宋恒宇. 青霉素残留物对土壤微生物的影响分析[J]. 资源节约与环保, 2022(6): 9-11.
- [12] CHEMTAI C, KENGARA FO, NGIGI AN. Levels and ecological risk of pharmaceuticals in River Sosiani, Kenya[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2023, 195(3): 431.
- [13] 李再兴, 田宝阔, 左剑恶, 余忻, 沈洪艳, 王勇军, 赵秀梅. 抗生素菌渣处理处置技术进展[J]. 环境工程, 2012, 30(2): 72-75. LI ZX, TIAN BK, ZUO JE, YU X, SHEN HY, WANG YJ, ZHAO XM. Progress in treatment and disposal technology of antibiotic bacterial residues[J]. Environmental Engineering, 2012, 30(2): 72-75 (in Chinese).
- [14] 平然, 任爱玲, 田书磊, 马双, 刘宏博, 孙艳梅, 王彬彬. 两种抗生素菌渣经 SEA-CBS 技术处理后的肥料特性[J]. 环境科学研究, 2019, 32(11): 1945-1951. PING R, REN AL, TIAN SL, MA S, LIU HB, SUN YM, WANG BB. Fertilizer characteristics of two kinds of antibiotic bacterial residues treated by SEA-CBS technology[J]. Research of Environmental Sciences, 2019, 32(11): 1945-1951 (in Chinese).
- [15] WANG B, YAN JQ, LI GM, ZHANG J, ZHANG LH, LI Z, CHEN HH. Risk of penicillin fermentation dreg: increase of antibiotic resistance genes after soil discharge[J]. Environmental Pollution, 2020, 259: 113956.
- [16] ZHANG QQ, YING GG, PAN CG, LIU YS, ZHAO JL. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [17] 马双, 许继飞, 刘宏博, 吴昊, 崔思嘉, 周睫雅, 王旭明, 田书磊. 菌渣中青霉素对蔬菜种子萌发的生态毒性效应[J]. 环境科学研究, 2020, 33(7): 1721-1728. MA S, XU JF, LIU HB, WU H, CUI SJ, ZHOU JY, WANG XM, TIAN SL. Ecotoxicity of penicillin in mycelial residues on germination of vegetable seeds[J]. Research of Environmental Sciences, 2020, 33(7): 1721-1728 (in Chinese).
- [18] 方楠, 程辉彩, 吴健, 单胜道, 张丽萍, 董仁杰. 青霉素菌渣厌氧发酵沼液对红三叶种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 环境污染与防治, 2019, 41(7): 762-766. FANG N, CHENG HC, WU J, SHAN SD, ZHANG LP, DONG RJ. The effects of biogas slurry of penicillin fermentation residues on seed germination and growth of *Trifolium pratense*[J]. Environmental Pollution & Control, 2019, 41(7): 762-766 (in Chinese).
- [19] 昌桂英, 陈红, 陈德健, 杜文建, 王越. 青霉素少见的不良反应[J]. 中国误诊学杂志, 2003(3): 354-355.
- [20] 石礼虎, 吴昊, 田书磊, 周睫雅, 吴宗儒, 李潇鼎, 吴睿, 周秀艳. β -内酰胺类菌渣肥对生菜根际土壤细菌及抗性基因的影响[J]. 环境科学研究, 2023, 36(4): 773-782. SHI LH, WU H, TIAN SL, ZHOU JY, WU ZR, LI XD, WU Q, ZHOU XY. Effect of β -lactam-based bacterial

- residue fertilizer on lettuce rhizosphere soil bacteria and antibiotic resistance genes[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2023, 36(4): 773-782 (in Chinese).
- [21] 孙全文, 张丹参, 薛桂平, 李凤学, 吴淑琴, 乔健. 青霉素菌渣残留降解物的蓄积毒性研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(13): 6731-6734.
SUN QW, ZHANG DS, XUE GP, LI FX, WU SQ, QIAO J. Sub-acute toxicity test of residue degradation products of penicillin bacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(13): 6731-6734 (in Chinese).
- [22] 罗湘蓉, 王和. 青霉素对金黄色葡萄球菌耐药性及 β -内酰胺酶活性的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(3): 319-321.
LUO XR, WANG H. Penicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and β -lactamase activity[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2009, 19(3): 319-321 (in Chinese).
- [23] 李玥. 抗生素废水处理技术进展综述[J]. *广东化工*, 2023, 50(15): 137-138, 130.
LI Y. Review on the progress of antibiotic wastewater treatment technology[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2023, 50(15): 137-138, 130 (in Chinese).
- [24] 王金荣, 王志高, 亓秀莹, 彭文博, 张宏. 膜分离技术深度处理抗生素废水的研究[J]. *水处理技术*, 2014, 40(3): 118-121.
WANG JR, WANG ZG, QI XY, PENG WB, ZHANG H. Study on treating fermentation wastewater from antibiotic product[J]. *Technology of Water Treatment*, 2014, 40(3): 118-121 (in Chinese).
- [25] 李超, 杨彩娟, 韦惠民, 吕永涛, 杨永会, 王勇军. 催化臭氧氧化法处理抗生素废水生化出水[J]. *化工环保*, 2017, 37(1): 79-82.
LI C, YANG CJ, WEI HM, LÜ YT, YANG YH, WANG YJ. Treatment of biochemical effluent of antibiotic wastewater by catalytic ozone oxidation process[J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 2017, 37(1): 79-82 (in Chinese).
- [26] 杨腊祥, 李日强, 王爱英. 青霉素生产废水的 TiO_2 光催化降解[J]. *水处理技术*, 2014, 40(3): 98-102.
YANG LX, LI RQ, WANG AY. Degradation of penicillin production wastewater by TiO_2 photocatalysis[J]. *Technology of Water Treatment*, 2014, 40(3): 98-102 (in Chinese).
- [27] DANTAS G, SOMMER MOA, OLUWASEGUN RD, CHURCH GM. Bacteria subsisting on antibiotics[J]. *Science*, 2008, 320(5872): 100-103.
- [28] WANG P, LIU SX, WANG XC, CONG QQ, LU JL. Assessment of the efficiency of synergistic photocatalysis on penicillin G biodegradation by whole cell *Paracoccus* sp.[J]. *Journal of Biological Engineering*, 2021, 15(1): 25.
- [29] CROFTS TS, WANG B, SPIVAK A, GIANOULIS TA, FORSBERG KJ, GIBSON MK, JOHNSKY LA, BROOMALL SM, ROSENZWEIG CN, SKOWRONSKI EW, GIBBONS HS, SOMMER MOA, DANTAS G. Shared strategies for β -lactam catabolism in the soil microbiome[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(6): 556-564.
- [30] ZHANG SN, LIU YX, MOHISN A, ZHANG GH, WANG ZJ, WU SY. Biodegradation of penicillin G sodium by *Sphingobacterium* sp. SQW1: performance, degradation mechanism, and key enzymes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 468: 133485.
- [31] 赵娟, 张振华, 段会英, 余冉, 刘燕, 王长永. 青霉素菌渣堆肥过程中青霉素钠降解菌的分离与鉴定[J]. *环境科学研究*, 2016, 29(2): 271-278.
ZHAO J, ZHANG ZH, DUAN HY, YU R, LIU Y, WANG CY. Isolation and identification of a penicillin-degrading strain during composting of penicillin bacteria residue[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2016, 29(2): 271-278 (in Chinese).
- [32] 岳喜庆, 王桐, 单提波, 李丽. 一株青霉素钠降解菌的分离与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(6): 169-171, 175.
YUE XQ, WANG T, SHAN TB, LI L. Isolation and identification of a penicillin-degrading bacterial strain[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(6): 169-171, 175 (in Chinese).
- [33] WANG P, LIU HL, FU H, CHENG XW, WANG B, CHENG QH, ZHANG J, ZOU P. Characterization and mechanism analysis of penicillin G biodegradation with *Klebsiella pneumoniae* Z1 isolated from waste penicillin bacterial residue[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, 27: 50-58.
- [34] 王礼君, 冯丽妍, 徐建中, 张伟国. 一株高效降解青霉素菌的筛选及鉴定[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(5): 89-94.
WANG LJ, FENG LY, XU JZ, ZHANG WG. Screening and identification of a high-efficiency penicillin sodium-degrading strain[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(5): 89-94 (in Chinese).
- [35] 付欢, 刘惠玲, 王璞. 高效降解青霉素菌的筛选鉴定及降解效果研究[J]. *环境保护科学*, 2015, 41(1): 42-45.
FU H, LIU HL, WANG P. Screening and identification of penicillin-degrading bacteria and its degradation effects[J]. *Environmental Protection Science*, 2015, 41(1): 42-45 (in Chinese).
- [36] HATHROUBI S, FONTAINE-GOSSELIN SÈ, TREMBLAY YDN, LABRIE J, JACQUES M. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(3/4): 277-286.
- [37] KUMAR M, SODHI KK, SINGH DK. Bioremediation of Penicillin G by *Serratia* sp. R1, and enzymatic study through molecular docking[J]. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2019, 12: 100246.
- [38] AL-AHMAD A, DASCHNER FD, KÜMMERER K. Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 37(2): 158-163.
- [39] HAMMARSTRÖM S, STROMINGER JL. Degradation of penicillin G to phenylacetyl-glycine by D-alanine

- carboxypeptidase from *Bacillus stearothersophilus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72(9): 3463-3467.
- [40] ZHANG L, ZHANG X, BAI HH, LI T, ZHANG Z, ZONG XN, SHANG X, LIU ZH, FAN LY. Characterization and genome analysis of the *Delftia lacustris* strain LzhVag01 isolated from vaginal discharge[J]. Current Microbiology, 2024, 81(8): 232.
- [41] LI D, YANG M, HU JY, ZHANG Y, CHANG H, JIN F. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river[J]. Water Research, 2008, 42(1/2): 307-317.
- [42] PEREIRA JHOS, REIS AC, HOMEM V, SILVA JA, ALVES A, BORGES MT, BOAVENTURA RAR, VILAR VJP, NUNES OC. Solar photocatalytic oxidation of recalcitrant natural metabolic by-products of amoxicillin biodegradation[J]. Water Research, 2014, 65: 307-320.
- [43] FARHAT N, GUPTA D, ALI A, KUMAR Y, AKHTAR F, KULANTHAIVEL S, MISHRA P, KHAN F, KHAN AU. Broad-spectrum inhibitors against class A, B, and C type β -lactamases to block the hydrolysis against antibiotics: kinetics and structural characterization[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): e0045022.
- [44] SONGO A, JACQUIER H, DANJEAN M, COMPAIN F, DORCHÈNE D, EDOO Z, WOERTHER PL, ARTHUR M, LEBEAUX D. Analysis of two *Nocardia brasiliensis* class A β -lactamases (BRA-1 and BRS-1) and related resistance to β -lactam antibiotics[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2025, 42: 135-141.
- [45] WANG P, SHEN C, XU KL, CONG QQ, DONG Z, LI LW, GUO JF, LU JL, LIU SX. Isolation and characterization of *Ochrobactrum tritici* for penicillin V potassium degradation[J]. mSphere, 2020, 5(2): e00058-20.
- [46] FOURNIER C, NORDMANN P, de la ROSA JO, KUSAKSIZOGLU A, POIREL L. KSA-1, a naturally occurring Ambler class A extended spectrum β -lactamase from the enterobacterial species *Kosakonia sacchari*[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2024, 39: 6-11.