李佳美,康宗利,马骜雨,等.一株赖氨酸芽孢杆菌对盐酸土霉素降解效能及途径 [J]. 中国环境科学, 2026,46(2):868-879.
Li J M, Kang Z L, Ma A Y, et al. Degradation efficiency and pathways of oxytetracycline hydrochloride by *Lysinibacillus* sp. [J]. China Environmental Science, 2026,46(2):868-879.

# 一株赖氨酸芽孢杆菌对盐酸土霉素降解效能及途径

李佳美[1],康宗利[1],马骜雨[1],赵恩佑[1],王虹玲[2],杨玉红[1*],杜立宇[3*] (1.沈阳农业大学生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110866；2.沈阳科技学院化工与制药学院,辽宁 沈阳 113122；3.沈阳农业大学土地与环境学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘要**：从污染土壤中筛选出盐酸土霉素(OTC-HCl)高效降解菌株 OTC-L20,经 16S rDNA 鉴定并命名为 *Lysinibacillus* sp. OTC-L20,为目前已报道的 *Lysinibacillus* 属中具有高效降解 OTC-HCl 能力的菌株之一.基因组测序发现其染色体含四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素等多种耐药基因,可能参与 OTC-HCl 的生物转化.OTC-L20 在特定条件(外加碳源添加量 4g/L、pH = 8、接种量 3%、初始底物浓度 60mg/L)下,第 7d 对 OTC-HCl 的降解率达到 79.80%.利用 UPLC-HRMS 测定到 14 种主要中间降解产物,通过脱酰胺、烯醇酮异构化等 7 种方式,分为 4 条降解路径.与空白对照组相比,OTC-L20 降解产物对 *Escherichia coli* 和 *Staphylococcus aureus* 的生理毒性显著降低,表明其为高效安全盐酸土霉素降解菌.

**关键词**：盐酸土霉素；赖氨酸芽孢杆菌；微生物降解；降解途径
**中图分类号**：X53 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2026)02-0868-12

**Degradation efficiency and pathways of oxytetracycline hydrochloride by *Lysinibacillus* sp..** LI Jia-mei[1], KANG Zong-li[1], MA Ao-yu[1], ZHAO En-you[1], WANG Hong-ling[2], YANG Yu-hong[1*], DU Li-yu[3*] (1.College of Biosciences and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China；2.College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Science and Technology, Shenyang 113122, China；3.College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China). *China Environmental Science*, 2026,46(2)：868~879

**Abstract**：A highly efficient oxytetracycline hydrochloride (OTC-HCl)-degrading strain, designated as *Lysinibacillus* sp. OTC-L20, was isolated from contaminated soil. Its taxonomic status was confirmed via 16S rDNA sequencing, and it represent a highly efficient OTC-HCl-degrading strain within the genus *Lysinibacillus*. Genomic sequencing revealed that its chromosome harbors multiple antibiotic resistance genes, including those conferring resistance to tetracyclines and aminoglycosides, which may be involved in the biotransformation of OTC-HCl. Under specific culture conditions (supplemented carbon source at 4g/L, initial pH 8, inoculum size 3%, and initial substrate concentration 60mg/L), the strain achieved a degradation rate of 79.80% for OTC-HCl on the 7th day of incubation. Using ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS), a total of 14major intermediate metabolites were identified, and four distinct degradation pathways were proposed, involving seven reaction types such as deamidation and enol-keto isomerization. Compared with the blank control group, the degradation products of OTC-L20exhibited significantly reduced antibacterial toxicity to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, demonstrating that *Lysinibacillus* sp. OTC-L20is a highly efficient and environmentally safe OTC-HCl-degrading bacterium.

**Key words**：oxytetracycline hydrochloride；*Lysinibacillus* subtilis；microbial degradation；degradation pathway

盐酸土霉素(OTC-HCl)是链霉菌产生的四环素衍生物[1],性质稳定、易溶于水[2].OTC-HCl 在农业微生物病原体疾病防治[3]及畜禽养殖等多领域应用广泛,可有效控制各类细菌感染,某些情况下还能作为生长促进剂发挥作用[4].但由于 OTC-HCl 代谢周期长,它可能在机体中大量积累并诱导细菌耐药性的发展[5].一方面,动物常通过药物治疗等途径摄入 OTC-HCl[6],然而 OTC-HCl 在动物体内的代谢吸收效率并不高,大约仅有 10%的含量能被有效利用,其余部分最终会以母体或其代谢产物的形式,随着动物粪便等排放到环境中造成污染[6].

目前针对解决 OTC-HCl 污染问题已开展了大量研究,可分为非生物降解法(高级氧化[7-8]、吸附[9]、光催化[10-11]等)与生物降解法两大类.物理化学处理技术在抗生素废水处理净化等领域发挥重要作用,但其运行需额外能量输入或化学药剂消耗,既增加

**收稿日期**：2025-07-16
**基金项目**：辽宁省 2025 年度农业生态环境监测(019250312)
* 责任作者: 杨玉红, 副教授, 2001500032@syau.edu.cn; 杜立宇, 教授, duliyu2006@syau.edu.cn.

成本,又可能引发二次污染.生物降解方法因操作简便、高效环保,成本相对较低,是当前有效处理方法之一.Li 等[12]从酸性矿山废水中筛选到一株短芽孢杆菌 MM2,能够在高锰条件下快速降解 OTC,Mn(III)中间体以及活性氧在降解过程中起到关键作用.*Ochrobactrum* sp. KSS10 作为一种新型好氧反硝化降解菌株,高效去除氨氮和硝酸盐的同时,还参与 OTC 降解,去除率可达到 78.78%[13].Shang 等[14]利用解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* HM618)、产脯氨酸谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamate*) 和产乳酶毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)共同构建工程真菌−细菌共生菌群,可有效降解磺胺甲恶唑(SMX)和 OTC.可见土壤或水体中存在一些可以降解 OTC 的微生物,大多数是细菌,少量真菌[15].

目前对于 OTC−HCl 生物降解的研究主要集中在分离和鉴定上,对于降解过程中所产生的中间代谢产物、生物体内的转化机制的研究仍然不够深入.而且这些研究在实际应用中仍存在一些关键因素的限制.例如,较长的降解周期会限制降解效率[16],初始底物浓度偏低会影响处理规模[17],降解过程中底物降解不充分[18]等情况,都会影响在实际应用中的降解效果.有些抗生素的降解产物对生态系统的毒性可能高于其母体化合物,从而引发二次污染[19].因此,本研究从污染土壤中筛选出新菌株 *Lysinibacillus* sp. OTC−L20,研究该菌株的生理生化、基因组测序、生长特性和降解特性;利用高分辨质谱法分析其中间代谢产物,推测 OTC−HCl 的降解途径;对降解产物的毒性进行评估,旨在为生物降解法解决 OTC−HCl 污染问题提供参考.

## 1　材料与方法

### 1.1　试验材料

**1.1.1　样品采集**　从辽宁省某养殖场附近收集污染土样.采样时,选择地表 10cm 的土壤进行多点采样,以保证菌源的多样性.自然风干后过 20 目尼龙筛处理.于 4℃冰箱保存备用.

**1.1.2　化学试剂与培养基**　OTC−HCl(纯度≥97%)购自上海源叶生物科技有限公司.色谱级乙腈和甲醇购自天津市康科德科技有限公司.其余所有化学药品均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司.

LB 培养基由 1.0L $H_2O$、10.0g 蛋白胨、10.0g 氯化钠、5.0g 酵母浸出粉(琼脂 15.0g)组成;牛肉膏蛋白胨培养基由 1.0L $H_2O$、10.0g 蛋白胨、3.0g 牛肉膏、5.0g 氯化钠(琼脂 15.0g)组成;无机盐培养基由 1.0L $H_2O$、2.0g $(NH_4)_2SO_4$、0.5g $Na_2HPO_4{\cdot}12H_2O$、0.5g $KH_2PO_4$ 组成.降解试验培养基由经过添加相应浓度的葡萄糖和 OTC−HCl 的无机盐培养基所制备.

### 1.2　盐酸土霉素降解菌株的筛选及降解能力验证

**1.2.1　富集驯化**　称取 10g 污染土壤添加到 250mL 锥形瓶中,加入无菌水 100mL,制成土壤悬液,摇床转速 150r/min 振荡培养 1~2d.取上述 5mL 土壤菌悬液接种到 100mL 的 LB 液体培养基中,进行菌种富集.振荡培养 5d 后,取 5mL 培养悬浮液转移到含有 20mg/L OTC−HCl 的 LB 液体培养基中进行驯化.之后每间隔 5d,提高 1 倍 OTC−HCl 浓度,直至培养基中 OTC−HCl 的最终浓度达到 100mg/L(每次间隔 5d,共 6 次转移).因 OTC−HCl 具有见光分解特性,期间所有试验均在黑暗条件下进行.

**1.2.2　涂布分离**　驯化 30d 后,将最后收集到的菌种悬浮液采用十倍稀释法稀释,得到 4 个浓度梯度($10^{-3}$、$10^{-4}$、$10^{-5}$、$10^{-6}$)的菌悬液,再分别取 300 μL 的菌悬液均匀涂布于 LB 固体培养基上,30℃恒温培养 48h.

**1.2.3　划线纯化**　观察平板表面菌落生长情况,将外观特征及颜色不同的菌落分别挑出,取长势优越的菌落转接至新的 LB 固体培养基上,用平板划线法反复纯化 4~5 次,分别编号(例如,OTC−L1)后冷藏保存.

**1.2.4　降解能力验证**　在前期降解浓度筛选优化的基础上,将分离纯化后的菌株分别接种于 50mg/L 降解试验培养基中,30℃、150r/min 条件下进行振荡培养.采用高效液相色谱(HPLC)对降解过程中 OTC−HCl 浓度变化进行测定并计算 OTC−HCl 的降解率,以此筛选出 OTC−HCl 高效降解菌株.

### 1.3　菌株鉴定及基因组测序

**1.3.1　目的菌株形态学观察及生理生化鉴定**　将筛选得到的 OTC−HCl 高效降解菌株接种至 LB 固体培养基上 30℃条件下恒温培养 24h,待长出单菌落后观察菌落形态,显微镜观察革兰氏染色情况,参照《常见细菌系统鉴定手册》进行生理生化指

标鉴定.

1.3.2 分子鉴定 将 OTC−L20,按照细菌 DNA 提取试剂盒说明方法进行提取,然后进行 16S rDNA 序列扩增:以高效降解菌的总 DNA 为模板,扩增其 16S rDNA 序列.引物细菌 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R.PCR 扩增完成后,取 3μL PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳检测,以确定 PCR 扩增片段.PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒回收.将未纯化的 PCR 产物,送至公司(生工生物工程上海股份有限公司)进行测序.根据测序结果,使用 Blast 将基因预测得到的 16S rDNA 序列与 NCBI 数据库进行比对,采用 MEGA 软件构建系统发育树.

1.3.3 基因组测序 将 OTC−L20 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因组测序(Illumina™二代测序平台).针对基因组 DNA 进行文库构建,并根据测序结果将菌株的基因序列保存在 NCBI GenBank,登录号为 JBHFHC000000000.

1.4 降解试验

选择外加碳源添加量、pH 值、接种量以及初始底物浓度 4 个主要环境因素,考察其对 OTC−HCl 降解效率的影响.首先在 30℃、150r/min 条件下将降解菌活化后($OD_{600}$=0.6)收集菌液,于 4000r/min 条件下离心 5min.用无菌水洗涤菌体 2 次.最后将处理后的菌体接种到降解试验培养基中进行 OTC−HCl 生物降解.

在预实验的基础上,最终设计实验如下:(1)5 组外加碳源添加量(2,4,6,8,10g/L),pH = 7,接种量为 3%,初始底物浓度为 40mg/L;(2)5 组初始 pH 值(5,6,7,8,9),外加碳源添加量 4g/L,接种量为 3%,初始底物浓度为 40mg/L;(3)5 组接种量(1%,3%,5%,7%,9%,v/v),外加碳源添加量 4g/L,pH = 7,初始底物浓度为 40mg/L;(4) 初始底物浓度(20,40,60,80,100mg/L),外加碳源添加量 4g/L,pH = 7,接种量为 3%.

所有实验均在黑暗条件下进行且设置 3 组平行试验.使用 Origin 2021 软件绘制图表,使用 SPSS 18.0 数据软件,选择单因素 ANOVA 方差分析对数据进行显著性分析.

1.5 盐酸土霉素浓度及降解产物的测定

采用高效液相色谱(HPLC)对降解过程中 OTC−HCl 浓度变化进行检测并计算 OTC−HCl 降解率.将降解 7d 后的培养液以 12000r/min,离心 10min.弃去沉淀物,收集上清液,过 $C_{18}$ 柱并用甲醇洗脱,反复 3 遍,收集洗脱液使用旋转蒸发仪蒸干后用溶于 1mL 甲醇,最后过 0.22μm 滤膜密封于液相样品瓶中,−20℃冻藏待测.HPLC 配备 $C_{18}$ 色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm),在 30℃下操作,进样量为 20μL.以乙腈和 0.01%甲酸(体积比 2:8)为流动相,流速为 1.0mL/min,进样体积为 10μL,检测波长为 355nm.

$$\text{OTC-HCl降解率}\ (\%)=\frac{C_0-C_t}{C_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中:$C_0$ 表示的是初始时刻下 OTC−HCl 的含量,mg/L;$C_t$ 表示的是第 $t$ 时刻下 OTC−HCl 的含量,mg/L.

采用超高效液相色谱−静电场轨道阱高分辨质谱联用仪(UPLC−HRMS)测定 OTC−HCl 的降解产物,推测其降解路径.洗脱液 A 为 0.1%甲酸水溶液,洗脱液 B 为 0.1%甲酸乙腈,进行梯度洗脱,流速 0.3mL/min.洗脱梯度从 15%的洗脱液 B 开始,在前 8 分钟线性下降到 95% B,在 95% B 保持 1min,接下来 0.1min 内再恢复到 15% B.梯度洗脱后,柱平衡 2min 后再进样.所有分析的进样量均为 1ml.采用电喷雾电离(ESI),干燥气体温度为 320℃,干燥气体流量为 8L/min,碰撞能量为 25eV,在正离子模式下分析质谱(*m*/*z* 30e500).

1.6 降解产物毒性评估

选取 *Escherichia coli*(*E. coli*)和 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)作为毒性指示菌,对 OTC−HCl 降解产物毒性进行评估.分别将 *E. coli* 和 *S. aureus* 在 LB 液体培养基中 30℃培养 10h,然后均匀地涂布于 LB 固体培养皿上.在培养皿上放置牛津杯,装入 250μL 的处理后的样品溶液(将上述试验中每间隔 1d 得到的不同 OTC−HCl 降解阶段的样品进行离心,收集上清液并使用 0.22μm 滤膜过滤除菌,冷藏保存).将培养皿密封于 30℃培养 48h,用游标卡尺以 mm 为单位测量抑制圈.每个样品分 3 次重复制备.

## 2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

2.1.1 OTC−L20 降解能力验证 经过 30d 的富集驯化,共从污染土壤中分离出 8 株 OTC−HCl 抗性菌株,如图 1 所示,OTC−L20 生物降解能力最强,

OTC-HCl 降解率最高,因此选择 OTC-L20 菌株进行后续试验.OTC-HCl 自身水解降解率远低于 OTC-L20 生物降解组,这是因为本研究是在水溶液中进行,OTC-HCl 发生了水解反应,但根据水解组数据发现,OTC-HCl 降解率随着时间的推移逐渐缓慢增加,第 7d 空白对照组仅达到 9.93%,与加菌生物降解组存在显著差异,这与其他结果相似[20],OTC-HCl 可以进行自发进行水解,但降解速度较慢,说明化学性质稳定,在环境中难以自身代谢降解[21].因此,在后续分析中,忽略 OTC-HCl 自身水解所导致的降解效果.

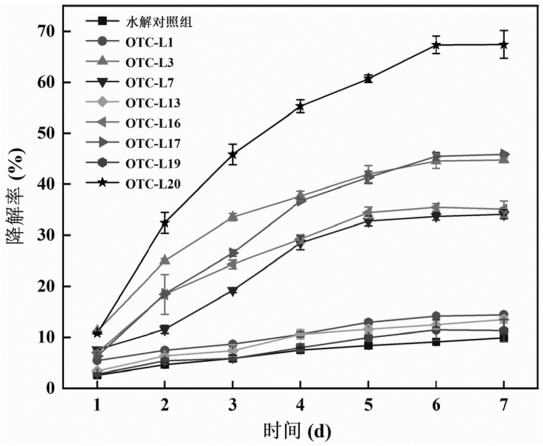



图 1　8 株菌株降解 OTC-HCl 及自身水解结果

Fig.1　Degradation of OTC-HCl and self hydrolysis results by 8 strains of bacteria

2.1.2　OTC-L20 形态学观察及生理生化鉴定　OTC-L20 在 LB 固体培养基上生长迅速,如图 2 所示,菌落形状为圆形,呈乳白色,不透明,表面隆起,光滑有光泽,边缘整齐,革兰氏染色后菌体呈紫色,表明 OTC-L20 是革兰氏阳性杆状菌.

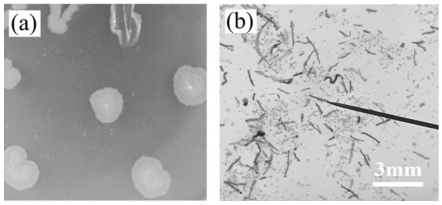



图 2　OTC-L20 形态学图片

Fig.2　Morphological image of OTC-L20

a OTC-L20 菌落形态;b OTC-L20 革兰氏染色图

如表 1 所示,OTC-L20 菌株接触酶结果为阳性;能分解淀粉;V-P 试验溶液呈红色为阳性;明胶液化试验为阳性;柠檬酸盐试验为阴性;吲哚反应与硝酸盐结果均为阴性;过氧化氢酶试验为阳性.另外预实验(深层琼脂法)实验结果显示 OTC-L20 属于好氧性菌株.

表 1　OTC-L20 的生理生化特征

Table 1　Physiological and biochemical characteristics of OTC-L20

| 试验项目 | OTC-L20 |
|---|---|
| 接触酶 | + |
| 淀粉水解 | + |
| V-P | + |
| 明胶液化 | + |
| 柠檬酸盐 | + |
| 吲哚 | - |
| 硝酸盐还原 | - |
| 过氧化氢酶 | + |

注:“+”为阳性,“-”为阴性.

2.1.3　OTC-L20 分子生物学鉴定　以目的菌种 DNA 为模板,使用 27F/1492R 通用引物进行 PCR 扩增.OTC-L20 的 PCR 电泳检测结果如图 3 所示,菌株 DNA 的特异性条带说明成功提取到菌株 DNA,并扩增出一条长度 1500bp 左右的条带.

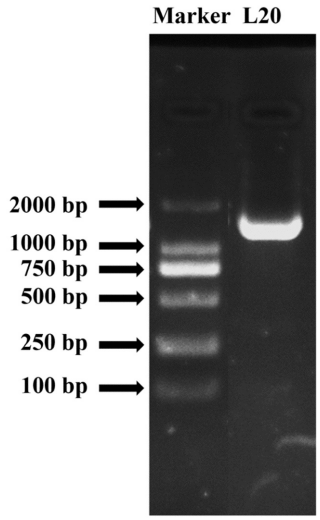



图 3　OTC-L20 电泳检测结果

Fig.3　Results of OTC-L20 electrophoresis detection

根据 16S rDNA 测序结果,将序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析,结果表明 OTC-L20 属于赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*),并命名为 *Lysinibacillus* sp. OTC-L20.采用 MEGA 软件构建系统发育树(图 4),最后将 OTC-L20 菌株的 16S rDNA 序列上传至

NCBI GenBank,登录号为 JBHFHC000000000.

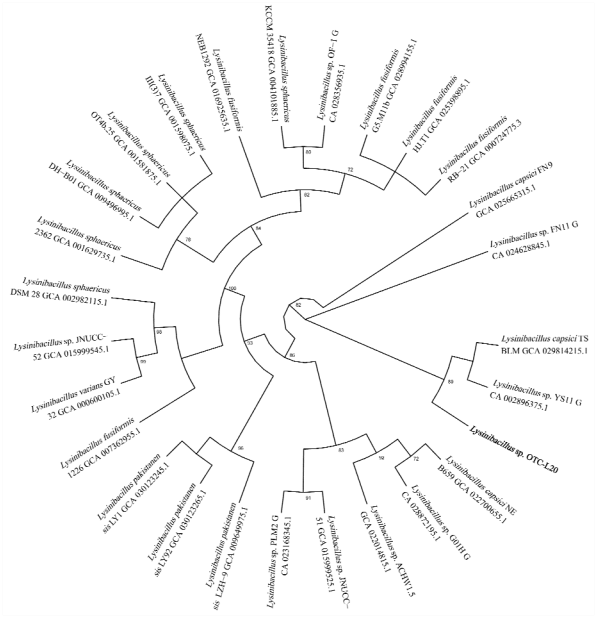



图 4 基于 16S rDNA 序列同源性构建 OTC−L20 和亲缘性相近的其他微生物的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree construction of OTC−L20 bacterium and other closely related microorganisms based on 16S rDNA sequence homology

关于 *Lysinibacillus* 属在有机污染物、石油、重金属等方面的降解有诸多报道,Jeon 等[22]分离并鉴定出一种新型赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus* sp. JJY0216)用于分解聚乙烯和聚丙烯,26d 后分别将聚丙烯和聚乙烯的重量降低了约 4%和 9%.Pathiraja 等[23]从土壤和沉积物中发现的 4 种细菌可有效修复多氯联苯(PCB)混合物污染,其中就有 *Lysinibacillus* sp. NP05,在厌氧−好氧条件下,对氯去除达到(9.16 ± 0.8)mg/L,对 PCB 达到(14.7 ± 0.93)mg/L.马拉硫磷是一种广谱有机磷农药,具有高选择性毒性的有机磷杀虫剂.有报道称从土壤中分离出一种赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus* sp. KB1)能耐受高达 0.15%的马拉硫磷,并在有氧条件下将其作为唯一的碳源快速降解[24].因此,说明 *Lysinibacillus* 属细菌存在恶劣环境下生存的能力,并具备降解烷烃化合物及芳香族化合物等有机污染物或无机物的潜力.然而,关于 *Lysinibacillus* 属在降解 OTC−HCl 方面鲜有发现.所以 *Lysinibacillus* sp. OTC−L20 的成功分离丰富了菌种资源库.

2.1.4 OTC−L20 基因组测序结果 *Lysinibacillus* sp. OTC−L20 的基因组含有 4490 个基因,总长度为 1,544,131,846bp,平均序列长度为 147.26bp.CDS 为 4410 个,rRNA 为 11 个,tRNA 为 68 个,non−coding RNA 1 个.GC 含量为 0.37(图 5),图形中点呈现为集中的分布模式,颜色越深,表示 bins 分布越多.对得到的基因进行 GO 分类,GO 数据库注释的基因被分为 3 组:细胞组成、生物过程、分子功能(图 6).GO 注释结果表明,*Lysinibacillus* sp. OTC−L20 基因组中预测的大量蛋白质可分为抗氧化活性、催化活性、电子转移活性、结构分子活性、翻译调节活性、转运活性、酶调节活性等,这可能为营养物质利用、运输及结合提供优势,为生产能量、抵御外界侵害提供保障.

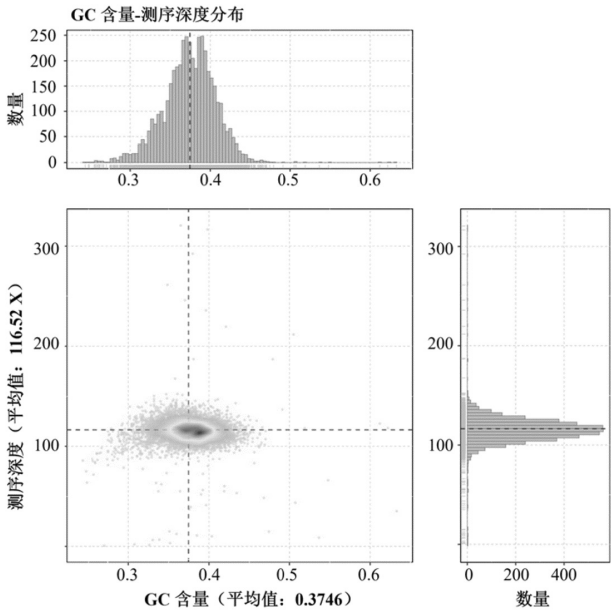



图 5 GC 含量与 depth 关联分析统计

Fig.5 Statistical chart of GC content and depth correlation analysis

对菌株进行 COG 功能分类注释分析(图 7),OTC−L20 的预测蛋白被划分为 20 种 COG 功能基因,共 3335 类.其中具有氨基酸转运和代谢功能的蛋白质 361 个,具有转录功能蛋白质 322 个,主要功能以及未知功能各 378、311 个.对基因做 KO 注释后,根据 KO 与路径的联系对其进行 KEGG 代谢通路分类.路径分为 5 个分支:细胞过程(A),环境信息处理(B),遗传信息处理(C),代谢(D),有机系统(E).如图 8 可知,与代谢相关的途径有氨基酸代谢(202 个基因),其他次生代谢物的生物合成(16 个基因),糖代谢(163

个基因),能量代谢(118 个基因),聚糖生物合成和代谢(29 个基因),脂代谢(72 个基因),辅因子和维生素的代谢(160 个基因),其他氨基酸代谢(48 个基因),萜类化合物和聚酮类化合物的代谢(36 个基因),核苷酸代谢(95 个基因),外源生物的生物降解和代谢(30 个)等;在环境信息方面有跨膜运输相关基因 193 个,信号传导相关基因 141 个.有机系统中与环境适应相关基因 3 个.

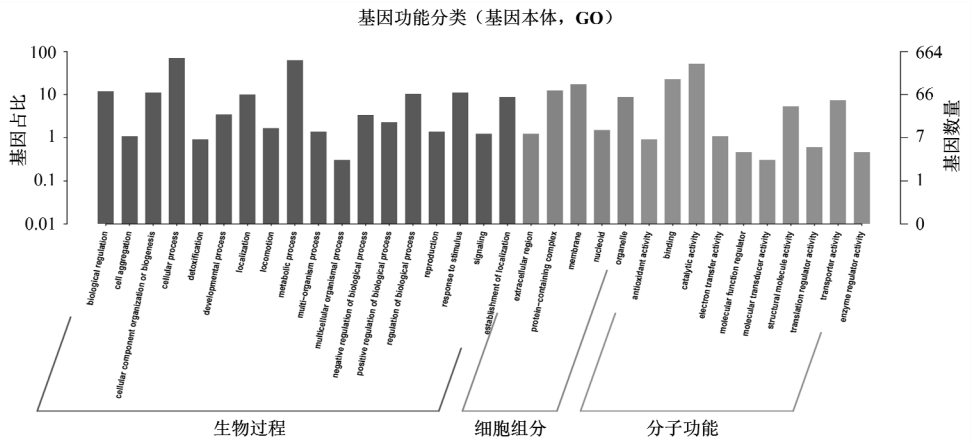



图 6　GO 注释分布

Fig.6　GO annotation distribution bar chart

横轴为 GO 的二级分类,纵轴为该分类内基因个数(右)及其占被注释上基因总数的百分比(左)

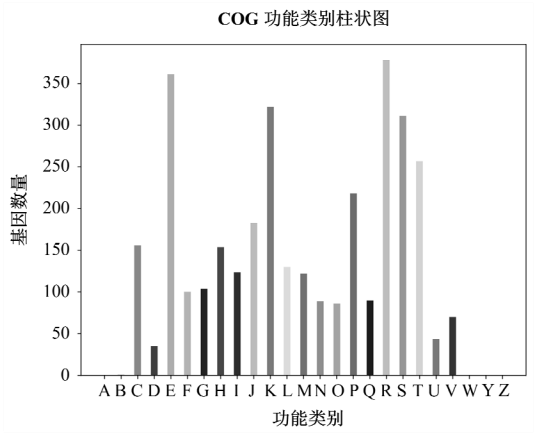



图 7　COG 分类柱状图

Fig.7　COG classification bar chart

A RNA 加工与修饰; B 染色质结构与动力学; C 能量产生与转化; D 细胞周期控制、细胞分裂与染色体分配; E 氨基酸转运与代谢; F 核苷酸转运与代谢; G 碳水化合物转运与代谢; H 辅酶转运与代谢; I 脂质转运与代谢; J 翻译、核糖体结构与生物发生; K 转录; L 复制、重组与修复; M 细胞壁/细胞膜/包膜生物发生; N 细胞运动性; O 翻译后修饰; 蛋白质周转与分子伴侣; P 无机离子转运与代谢; Q 次级代谢物生物合成、转运与分解代谢; R 仅一般功能预测; S 功能未知; T 信号转导机制; U 细胞内运输; 分泌与囊泡转运; V 防御机制; W 细胞外结构; Y 核结构; Z 细胞骨架

使用 BLAST 把基因蛋白序列与 CARD 数据库进行比对,把基因和其相对应的耐药功能注释信息结合起来发现,OTC−L20 染色体中含有诸多耐药基因,对许多抗生素具有耐药性,例如氨基糖苷类抗生素、大环内酯类抗生素、四环素类抗生素、碳青霉烯抗生素、头孢菌素、氟喹诺酮类抗生素、利福霉素抗生素、林可酰胺类抗生素、恶唑烷酮类抗生素、链菌素抗生素、硝基咪唑类抗生素等.这些 ARGs 具有多种耐药机制,其中大多数属于抗生素外排.正是这些耐药基因的存在,才保证了 OTC−L20 细菌在 OTC−HCl 液体培养基中存活并利用其进行自身代谢并逐步降解.

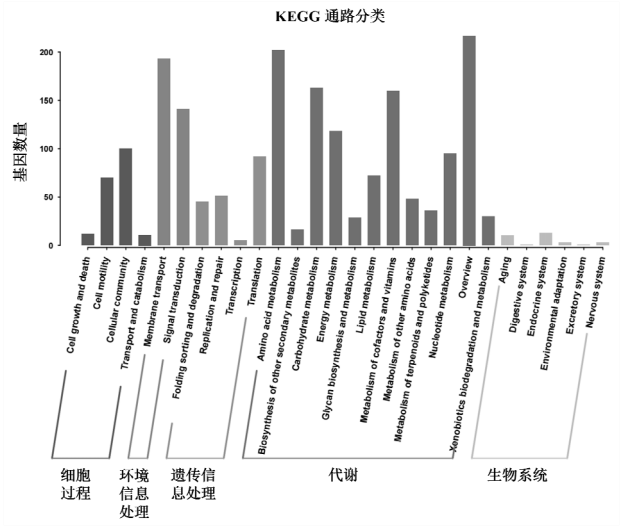



图 8　KEGG Pathway 分类

Fig.8　KEGG pathway classification bar chart

横轴是参与的代谢通路名称,纵轴是注释到该通路下的基因数目

对 OTC-L20 菌株的基因组分析发现,其对 OTC-HCl 的降解可能与注释的多种耐药基因和多种氧化酶有关.通过与 CAZy 数据库进行对比发现,OTC-L20 菌株内含有多种氧化酶与酯酶:铁氧化酶(ferroxidase)、葡萄糖 1-氧化酶(glucose 1-oxidase)、香草醇氧化酶(vanillyl-alcohol oxidase)、乙酰木聚糖酯酶(acetyl xylan esterase)等.其中芳醇氧化酶(aryl alcohol oxidase)、乙醇氧化酶(alcohol oxidase)、吡喃糖氧化酶(pyranose oxidase)可催化各种氧化还原反应,对木质素、纤维素有明显降解作用[25].壳寡糖氧化酶(chitooligosaccharide oxidase)可以催化壳寡糖($C_{12}H_{24}N_2O_9$,动物性纤维素)的氧化[26].有研究发现阿魏酸酯酶(feruloyl esterase)可通过共同或协同作用将木聚糖完全水解成其单体[27],在农业食品和制药行业等领域中都有潜在的用途.另外,OTC-L20 中发现漆酶样多铜氧化酶(Laccase-like multicopper oxidase),Adigüzel 等[28]从 *Bacillus mojavensis* TH309 中同样发现漆酶样多铜氧化酶,发现其在降解酚类污染物、生物修复方面存在巨大潜力.*Lysinibacillus fusiformis*(Lyfu-Lac)体内含有一种新型漆酶对磺胺类、四环素类抗生素有显著去除率[29].据报道漆酶与纤维二糖脱氢酶(cellobiose dehydrogenase)可有效针对木质素-碳水化合物底物的降解[30],因此推测此酶在 OTC-HCl 降解过程中起到关键作用.

### 2.2 环境因素对 OTC-L20 降解效果的影响

葡萄糖是一种单糖,其分子结构简单,易于被细菌细胞吸收和利用,短时间内能快速供应能量,从而促进细菌生长、繁殖和代谢.与其他碳源相比,葡萄糖具有较低的成本,使得其在污染降解方面作为外加碳源时具有更高的成本效益.冯玉雪等[31]在利用 *Methylovorus* sp. XLL03 降解 DDT(有机氯农药)时同样选择葡萄糖作为外加碳源.在不同碳源添加量条件影响下(图 9a),OTC-L20 第 7d OTC-HCl 的平均降解率分别为 62.66%、69.23%、67.42%、61.63%和 62.74%,说明葡萄糖作为外加碳源在菌株生长及降解过程中起到一定辅助作用并在 4g/L 条件下降解率达到峰值,这与于浩等[32]报道的短波单胞菌 YH1 降解 OTC 时添加量相似.OTC-L20 生物降解体系对 pH 值变化敏感(图 9b).底物 OTC-HCl 的稳定性易受 pH 值调控:在 pH5、7 和 9 时,半衰期分别为 7.6,5,4.2d,且降解符合一级动力学,造成此差异性是由于 OTC 与二价和三价离子的螯合作用[33],因此偏酸条件(pH≤6)下,OTC-HCl 稳定性更强,偏碱条件(pH≥7)下,更易水解[34].除底物稳定性外,pH 值还通过调控菌株体内关键降解酶活性间接影响 OTC-HCl 降解效率[35].OTC-L20 降解 OTC-HCl 依赖漆酶样多铜氧化酶等关键降解酶,其最适 pH 值大部分为中性偏碱;当 pH > 7 时,菌株代谢、繁殖等功能加快,关键酶表达量也同步增加,进而显著提升降解率,并在 pH=8 时达到最大值(72.55%),表明该菌更适应在中性偏碱性环境中生长并发挥降解作用.但过酸(pH≤6)或过碱(pH≥9)条件会破坏酶活性中心结构并损伤细胞膜,影响菌株正常生长、代谢与繁殖,最终造成降解效率降低;因此当 pH≥8 时,降解率开始明显降低.同一种属的 *Lysinibacillus* sp. NDSe-7 作为亚硒酸盐还原细菌可以在高碱性条件下(pH=10)还原亚硒酸盐并产生硒纳米球,在 pH=6~8 等条件下可将 80mg/L 的亚硒酸盐还原为元素硒[36].说明 *Lysinibacillus* 属耐碱性普遍较强,在实际治理抗生素污染时具有较强的适应性和灵活性.接种量也是影响 OTC-HCl 降解的重要因素之一,随着细菌初始接种量的增加,OTC-L20 对 OTC-HCl 的降解率也逐步增加(图 9c).

当接种量为 5%时,第 7d 的平均降解率达到峰值(71.43%),其次为 9%(68.79%)、3%(67.46%)、2%(59.78%)、和 1%(57.47%).说明接种量并非越高越好,一旦接种量过大,菌体对营养物质的需求量便会急剧上升,进而引发菌体间的激烈竞争,产生抑制效应,从而减缓对 OTC-HCl 的降解速率[37].图 9d 中第 7d 当初始底物浓度为 100mg/L 时,降解体系的降解率均达到最低值为 68.95%,这可能是因为过高浓度 OTC-HCl 对降解菌存在抑制作用,其毒性使细菌处于生长延滞期,导致降解能力受到极大限制.当初始底物浓度为 20~80mg/L 时,降解率为 70.00%~79.80%,在 60mg/L 条件下,降解率最大(79.80%).与已报道的菌种进行对比, *Ochrobactrum* sp. KSS10 在 120h 内对 25mg/L 的 OTC 降解率为 78.78%[13].相比之下,OTC-L20 虽然降解所需时间相对较长,但在降解底物浓度方面实现了较大提高.也高于文献中的其他菌种[38],证明 OTC-L20 具备高效的降解性能.

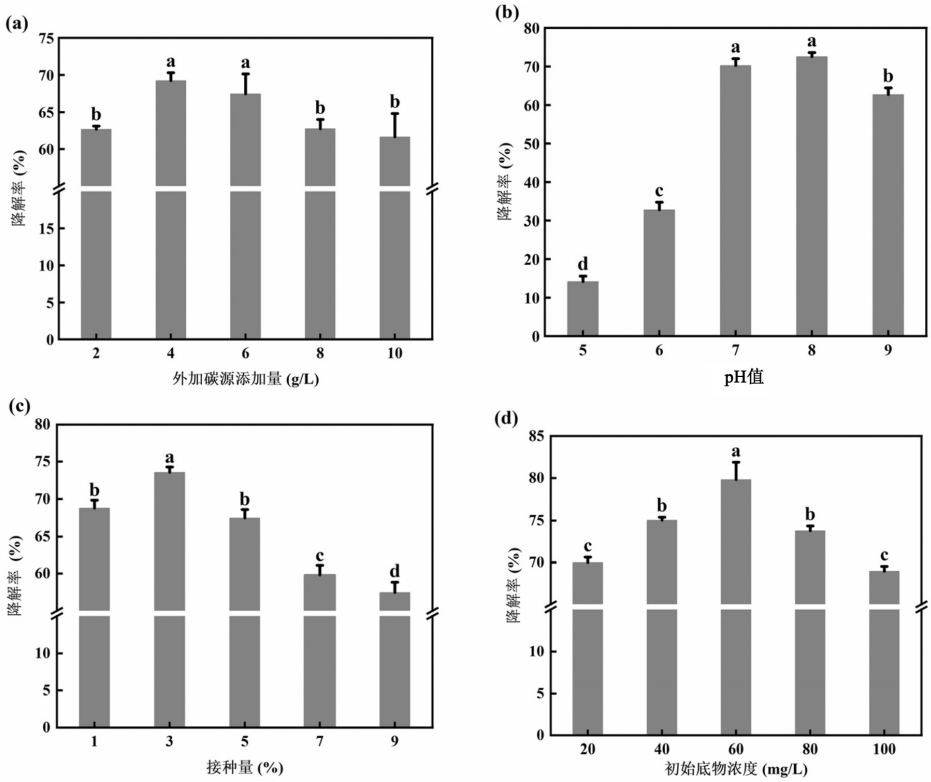



图 9　不同环境因素对 OTC−L20 降解 OTC HCl 的影响

Fig.9　The influence of different environmental factors on the degradation of OTC−HCl by OTC−L20

a 外加碳源添加量,b pH 值,c 接种量,d 初始底物浓度;不同的小写字母表示组间存在统计学上的显著差异,$P<0.05$

## 2.3　盐酸土霉素降解产物分析及降解路径预测

如图 10 所示,以 0d 为空白对照(此时培养液中仅含 60mg/L OTC−HCl),OTC−HCl 母体峰保留时间为 12min.从第 1d 起,随着降解天数的增加,OTC−HCl 峰面积逐渐减少,与此同时新的峰陆续产生,表明 OTC−HCl 浓度逐渐降低,且逐步被分解为其他小分子物质,体现了 OTC−L20 在降解 OTC−HCl 方面的有效性.

基于高分辨质谱技术捕捉到的 14 种 OTC− HCl 降解产物并推测出可能的降解路径,结果如图 11 所示.本研究所有试验均在水介质下进行,因此 OTC−HCl 先通过水解转化为 OTC,与 Qi 等[20]报道的第一步降解途径一致.OTC 在 OTC−L20 降解体系中的降解路径分为 4 条.路径 1:OTC (*m*/*z*=461)通过脱酰胺以及去羟基,得到 P1(*m*/*z*=359),P1 通过一系列氧化开环,去羟基化等反应分别生成 P2(*m*/*z*=211)、P3(*m*/*z*=281).路径 2:P1 通过氧化开环、去甲基化得到 P4(*m*/*z*=261),P4 通过脱羟基生成 P5(*m*/*z*=243),P5 发生去甲基化、羟基化生成 P6(*m*/*z*=212),P6 先脱环得到 P7(*m*/*z*=164),P7 再脱掉一个环最终生成小分子物质 P10(*m*/*z*= 114).

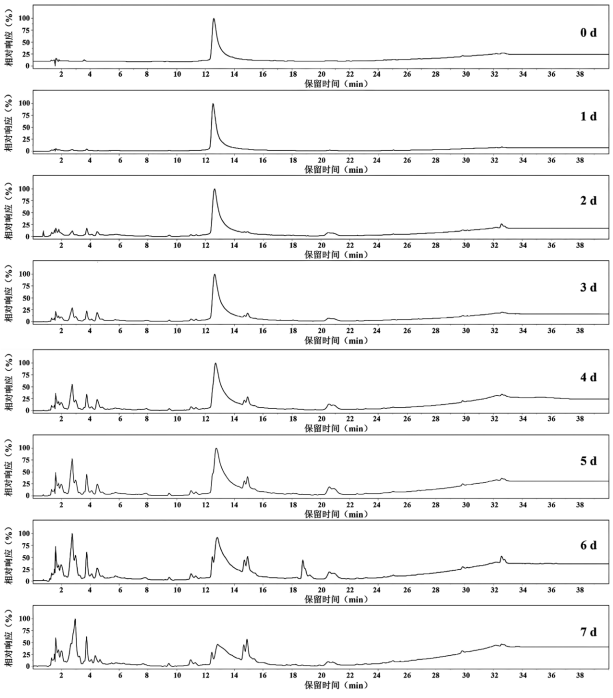



图 10　OTC−L20 生物降解体系的高效液相色谱图

Fig.10　High performance liquid chromatogram of OTC−L20 biodegradation system

路径 1、2 主要通过脱酰胺、去甲基化、羟基、氨基等官能团,在自由基的作用下,破碎的苯环被逐渐打开,母体化合物被逐步降解成小分子物质,这与 Liu 等[39]结果相似.路径 3:OTC 发生脱环以及烯醇酮异构化得到 P8(*m*/*z*=279),P8 通过氧化开环、脱环得到 P9(*m*/*z*=205),最终也逐步被降解形成 P10(*m*/*z*=114).烯醇酮的异构化是由于烯醇型结构具有较高的活性和不稳定性,容易转化成更为稳定的酮型结构[40],Qi 等[20]在探究 $Fe^{3+}$ 对假单胞菌(T4)降解 OTC 实验中也出现此现象.路径 4:通过脱去两个羟基和一个甲基生成 P11(*m*/*z*=415),P11 通过脱氨基、羟基得到 P12(*m*/*z*=387),P12 通过氧化开环、脱羟基等反应得到 P13(*m*/*z*=284),最后 P13 发生开环反应生成 P14(*m*/*z*=149).贺东辉等[41]发现 AgI/ZSH 复合物对于水中 OTC 的展现出良好的光催化活性,其中路径 3 中间产物(*m*/*z*=413)与本研究中 P11 较为相似.OTC 降解第 7d 的总离子流及主要产物质谱图见图 12.

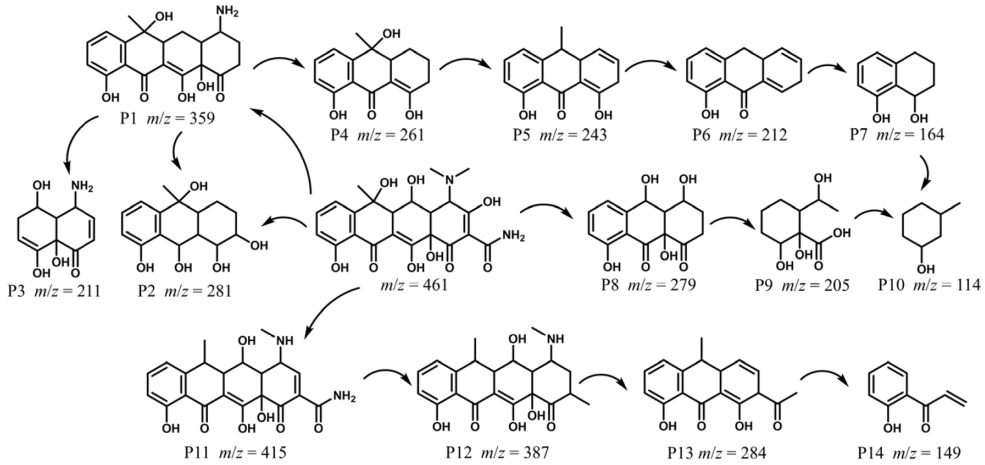



图 11 OTC-L20 降解 OTC-HCl 的生物途径

Fig.11 Biological pathways of OTC-L20 degradation of OTC-HCl

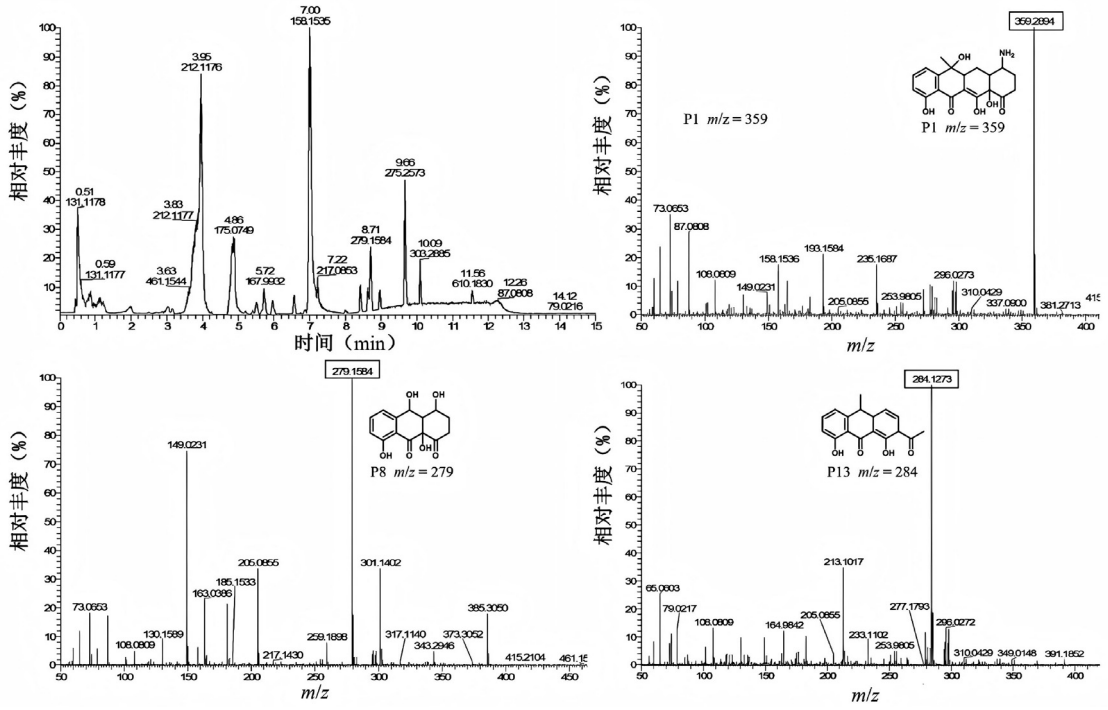



图 12 OTC-L20 降解 OTC-HCl 的总离子流图及主要产物质谱图

Fig.12 Total ion chromatogram and main product mass spectrometry of OTC-L20 degradation of OTC-HCl

### 2.4　降解产物毒性评估

在 OTC−HCl 生物降解过程中,一些研究表明高效菌降解法在有效解决抗生素遗留问题的同时还能够保证产物不会造成二次污染,但仍有部分研究发现其中间体毒性高于母体化合物,例如 *Bacillus* sp. DLY−11 在去除磺胺类抗生素污染物 Sulfachloropyridazine (SCP)时,生成 1,4−苯醌新产物致使毒性增加[19].因此,本次试验选取了环境中应用广泛的 *E. coli* 以及 *S. aureus* 作为毒性指示菌.空白对照(水解组)以及接种 OTC−L20 的生物降解组两种途径下的降解产物的抗菌活性如图 13 所示.与空白对照组相比,生物降解组产物的抑菌效力较低.以 *E. coli* 作为毒性指示菌的试验中,生物降解产物的牛津杯平均抑制圈直径从第 0d 的 15.43mm 减小到第 7d 的 8.37mm,而水解产物的抑制圈直径在第 7d 为 14.17mm,较第 0d 仅降低 1.33mm.另外以 *S. aureus* 作为毒性指示菌试验中,生物降解平均抑制圈直径从第 0d 的 15.63mm 减小到第 7d 的 9.80mm,而水解产物的抑制圈直径在第 7d 为 14.23mm,较第 0d 仅降低 1.43mm,说明经过 OTC−L20 菌株的生物降解处理后,降解液的毒性得到了明显的降低.图 14 可观察到生物降解组(降解第 7d)与对照组(第 0d,即 OTC−HCl 浓度为 60mg/L)、水解组(水解第 7d)的抑制圈大小差异.这表明,原始的母体化合物已被逐步转化为毒性较低甚至无毒的小分子物质,这一结果证实了 OTC−L20 菌株所构建的生物降解体系在实际应用中可行,不会造成二次污染.

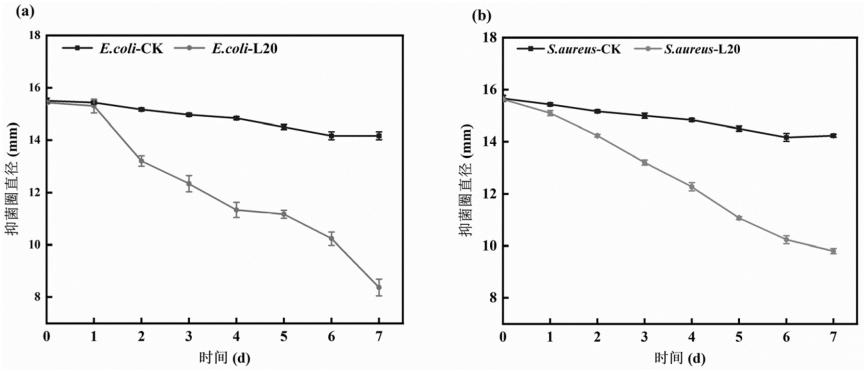



图 13　OTC−HCl 降解产物毒性评估

Fig.13　Antibacterial experiment results of OTC−HCl degradation products

(a) *E. coli*, (b) *S. aureus*

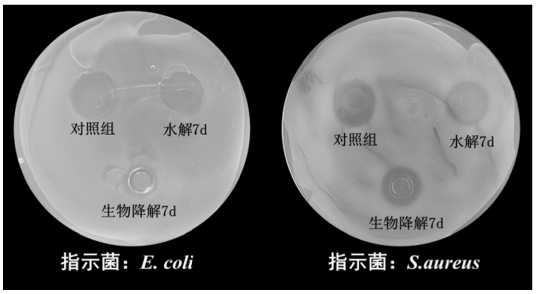



图 14　OTC−HCl 降解产物毒性抑菌圈

Fig.14　Toxic inhibition zone diagram of OTC−HCl degradation products

## 3　结论

3.1　从污染土壤中筛选分离出一株能高效降解盐酸土霉素的新菌株,经鉴定并命名为 *Lysinibacillus* sp. OTC−L20(GanBank 登录号为 JBHFHC0000−00000).基因组测序分析发现 OTC−L20 染色体中含有四环素类抗生素、氨基糖苷类抗生素等诸多耐药基因,这些基因可能与 OTC−HCl 的生物代谢相关.

3.2　OTC−L20 降解 OTC−HCl 主要通过生物降解,在外加碳源添加量为 4g/L、pH = 8、接种量为 3%、初始底物浓度 60mg/L 条件下,第 7d 的降解率最高,达到 79.80%.

3.3　利用 UPLC−HRMS 分析中间代谢产物,推测 OTC−L20 主要通过脱酰胺、脱羟基、氧化开环、去甲基化、烯醇酮异构化、脱氨基等 7 种方式,分为 4 条路径,共生成 14 种主要中间代谢产物.

3.4　降解产物毒性评估结果表明,与 OTC−HCl 自然水解后的产物相比,经过 OTC−L20 生物降解处理

得到的降解产物,对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的毒性影响显著减弱.

**参考文献:**


[1] Petković H, Cullum J, Hranueli D, et al. Genetics of streptomyces rimosus, the oxytetracycline producer [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006,70(3):704−728.

[2] Nagarajan V, Chandiramouli R. Sorption studies and removal of chlortetracycline and oxytetracycline using theta phosphorene nanoribbon−A DFT outlook [J]. Journal of Molecular Liquids, 2022, 346:117070.

[3] Hijaz F, Killiny N. Evaluation of oxytetracycline metabolites cross−reactivity with oxytetracycline enzyme−linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Antibiotics, 2020,9(4):183.

[4] Arriagada G, Vásquez F, Montt R, et al. Quantifying antimicrobial consumption in the chilean salmon industry using standardized metrics and indicators: The case of florfenicol and oxytetracycline [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2024,233:106331.

[5] Wang J, Zhou B, Ge R, et al. Degradation characterization and pathway analysis of chlortetracycline and oxytetracycline in a microbial fuel cell [J]. RSC Advances, 2018,8(50):28613−28624.

[6] Yin F, Dong H, Ji C, et al. Effects of anaerobic digestion on chlortetracycline and oxytetracycline degradation efficiency for swine manure [J]. Waste Management, 2016,56:540−546.

[7] 胡 虹,潘承欢,刘义青. Fe(Ⅲ)联合过氧乙酸降解水中土霉素 [J]. 中国环境科学, 2025,45(3):1272−1279.
Hu H, Pan C H, Liu Y Q. Degradation of oxytetracycline in water by Fe(Ⅲ) combined with peracetic acid [J]. China Environmental Science, 2025,45(3):1272−1279.

[8] 林嘉伟,苏冰琴,李兴发,等.NTA−Fe@PDA/$H_2O_2$ 氧化去除废水中盐酸土霉素 [J]. 中国环境科学, 2024,44(5):2680−2692.
Lin J W, Su B Q, Li X F, et al. Oxidative removal of oxytetracycline hydrochloride from wastewater by NTA−Fe@PDA/$H_2O_2$ [J]. China Environmental Science, 2024,44(5):2680−2692.

[9] 余 剑,丁 恒,张智霖,等.改性菱角壳生物炭吸附水中土霉素性能与机理 [J]. 中国环境科学, 2021,41(12):5688−5700.
Yu J, Ding H, Zhang Z L, et al. Adsorption performance and mechanism of modified water chestnut shell biochar for oxytetracycline in water [J]. China Environmental Science, 2021, 41(12):5688−5700.

[10] Liu J, Yu X, Wang L, et al. Photocatalytic degradation of oxytetracycline hydrochloride pollutants in marine aquaculture wastewater under visible light [J]. Journal of Environmental Science and Health, 2019,54(14):1423−1429.

[11] Sun X, Wang C, Zhao Y, et al. High−efficiency decontamination of pharmaceutical wastewater: synergistic effects from NaGdF4: Tm,Yb@Mn−MOFs composite photocatalysts [J]. Catalysis Communications, 2024,187:106912.

[12] Li Z, Wang J, Deng R, et al. Mechanisms of manganese−tolerant *bacillus* brevis MM2 mediated oxytetracycline biodegradation process [J]. Environmental Pollution, 2024,363(Pt 1):125060.

[13] Shao S, Hu Y, Cheng J, et al. Degradation of oxytetracycline (OTC) and nitrogen conversion characteristics using a novel strain [J]. Chemical Engineering Journal, 2018,354:758−766.

[14] Shang W, Zhang Y, Ding M, et al. Improved engineered fungal−bacterial commensal consortia simultaneously degrade multiantibiotics and biotransform food waste into lipopeptides [J]. Journal of Environmental Management, 2024,371:123177.

[15] 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.

[16] Ahumada−Rudolph R, Novoa V, Sáez K, et al. Marine fungi isolated from chilean fjord sediments can degrade oxytetracycline [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2016,188(8):468.

[17] Kumar Subramani A, Rani P, Wang P−H, et al. Performance assessment of the combined treatment for oxytetracycline antibiotics removal by sonocatalysis and degradation using Pseudomonas aeruginosa [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2019, 7(4):103215.

[18] Shao S, Hu Y, Cheng J, et al. Degradation of oxytetracycline (OTC) and nitrogen conversion characteristics using a novel strain [J]. Chemical Engineering Journal, 2018,354:758−766.

[19] Lin X, Zhang J, Luo Z, et al. Optimization of degradation conditions for sulfachlorpyridazine by *Bacillus* sp. DLY−11and analysis of biodegradation mechanisms [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 479:135755.

[20] Qi W, Long J, Feng C, et al. $Fe^{3+}$ enhanced degradation of oxytetracycline in water by pseudomonas [J]. Water Research, 2019, 160:361−370.

[21] Berger M, Ford J, Goldfarb J L. Modeling aqueous contaminant removal due to combined hydrolysis and adsorption: oxytetracycline in the presence of biomass−based activated carbons [J]. Separation Science and Technology, 2018,54(5):705−721.

[22] Jeon J, Park S, Choi T, et al. Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216isolated from soil grove [J]. Polymer Degradation and Stability, 2021,191:109662.

[23] Pathiraja G, Egodawatta P, Goonetilleke A, et al. Solubilization and degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by naturally occurring facultative anaerobic bacteria [J]. Science of The Total Environment, 2019,651:2197−2207.

[24] Singh B, Kaur J, Singh K. Transformation of malathion by *Lysinibacillus* sp. isolated from soil [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(5):863−867.

[25] Sützl L, Laurent CVFP, Abrera AT, et al. Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3family [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018,102(6):2477−2492.

[26] Savino S, Jensen S, Terwisscha van Scheltinga A, et al. Analysis of the structure and substrate scope of chitooligosaccharide oxidase reveals high affinity for C2−modified glucosamines [J]. FEBS Letters, 2020,594(17):2819−2828.

[27] Wong D W. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006,133(2),87−112.

[28] Adigüzel A O, Könen−Adigüzel S, Cilmeli S, et al. Heterologous expression, purification, and characterization of thermo− and alkali−

tolerant laccase-like multicopper oxidase from *Bacillus mojavensis* TH309and determination of its antibiotic removal potential [J]. Archives of Microbiology, 2023,205(8):287.

[29] Ouyang B, Xu W, Zhang W, et al. Efficient removal of sulfonamides and tetracyclines residues by the laccase-mediator system employing a novel laccase from *Lysinibacillus fusiformis* [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022,10(6):108809.

[30] Koyappayil A, Kim H T, Lee M H. 'Laccase-like' properties of coral-like silver citrate micro-structures for the degradation and determination of phenolic pollutants and adrenaline [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021,412:125211.

[31] 冯玉雪,毛　缜,吕蒙蒙.一株 DDT 降解菌的筛选及其降解特性 [J]. 中国环境科学, 2018,38(5):1935-1942.
Feng Y X, Mao Z, Lü M M. Screening of a DDT-degrading bacterium and its degradation characteristics [J]. China Environmental Science, 2018,38(5):1935-1942.

[32] 于　浩,李　晔,程全国.土霉素降解菌的筛选及其降解条件优化 [J]. 沈阳大学学报(自然科学版), 2017,29(1):21-25.
Yu H, Li Y, Cheng Q G. Screening of oxytetracycline- degrading bacteria and optimization of their degradation conditions [J]. Journal of Shenyang University (Natural Science Edition), 2017,29(1):21-25.

[33] Saraswathy R, Kumararaja P, Patil P K, et al. Effect of abiotic factors on the degradation of oxytetracycline in water [J]. Aquaculture Research, 2021,52:4008-4011.

[34] Xuan R, Arisi L, Wang Q, et al. Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution [J]. Journal of Environmental Science and Health, 2009,45(1):73-81.

[35] Chen X, Ke Y, Zhu Y, et al. Enrichment of tetracycline-degrading bacterial consortia: microbial community succession and degradation characteristics and mechanism [J]. Journal of Hazardous Materials 2023,448:130984.

[36] Won S, Ha M, Nguyen D, et al. Biological selenite removal and recovery of selenium nanoparticles by haloalkaliphilic bacteria isolated from the Nakdong River [J]. Environmental Pollution, 2021, 280:117001.

[37] Zhao Z, Zhou X, Zhuo S, et al. Study on degradation characteristics of the strain high-effectively degrading PCBs [J]. International Conference on Energy and Environment Technology, 2009:546-549.

[38] 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.
Cheng J, Du H L, Zhang T B, et al. Isolation and Identification of Tetracycline Antibiotic-Resistant Bacteria [J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2017,31(5):884-888.

[39] Liu C, Shi B, Guo Y, et al. Characteristics of biological manganese oxides produced by manganese-oxidizing bacteria H38 and its removal mechanism of oxytetracycline [J]. Environmental Pollution, 345:123432.

[40] Tao Y, He Y, Ye J, et al. Cochineal quinone carbon dot synthesis via a keto-enol tautomerism strategy and their intermolecular photo-induced cross-redox interactions with tetracycline [J]. New Journal of Chemistry, 45(34):15336-15343.

[41] 贺东辉.AgI/ZnSn(OH)$_6$ 中空立方体光催化材料降解盐酸土霉素的行为与机理研究 [D]. 长沙:湖南大学, 2021.
He D H. Study on the degradation behavior and mechanism of AgI/ZnSn(OH)6hollow cubic photocatalytic materials for hydrochloric acid oxytetracycline [D]. Changsha: Hunan University, 2021.

**作者简介：**李佳美(2000-),女,辽宁大连人,沈阳农业大学博士研究生,主要从事微生物降解环境污染物相关研究.lijiamei0925@stu.syau.edu.cn.