



# 一株霍氏肠杆菌对四环素的降解作用及其降解产物的毒性评估

王思宇<sup>1</sup>, 葛紫怡<sup>1</sup>, 陈义轩<sup>1</sup>, 朱晓琳<sup>2</sup>, 刘赛男<sup>1</sup>, 孟军<sup>1\*</sup>

1 沈阳农业大学国家生物炭研究院 农业农村部生物炭与土壤改良重点实验室, 辽宁 沈阳 110866

2 辽宁省恒润农业有限公司, 辽宁 海城 114200

王思宇, 葛紫怡, 陈义轩, 朱晓琳, 刘赛男, 孟军. 一株霍氏肠杆菌对四环素的降解作用及其降解产物的毒性评估[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 826-839.

WANG Siyu, GE Ziyi, CHEN Yixuan, ZHU Xiaolin, LIU Sainan, MENG Jun. Biodegradation of tetracycline by an *Enterobacter hormaechei* strain and toxicity of degradation products[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 826-839.

**摘要:** 【目的】抗生素作为新兴污染物, 已经引起社会的极大关注。针对四环素有效降解菌株缺乏这一现状, 本研究旨在筛选和鉴定具有降解四环素功能的菌株, 分析其降解特性和降解作用类型、初步探讨其降解活性物质定位并评估其降解产物的生理毒性。【方法】以四环素为唯一碳源, 从受四环素污染的猪场污泥中筛选四环素降解菌株; 结合菌落形态学特征、生理生化特征、扫描电镜观察和 16S rRNA 基因测序鉴定菌株, 通过不同外源碳、pH 及去除动力学阐明菌株对四环素的降解特性, 提取菌株不同成分探讨其去除四环素的作用类型, 并进一步从细胞内液和细胞外液开展生物降解的活性物质定位, 最后评估降解产物的生理毒性。【结果】筛选鉴定得到一株霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) MEH2305, pH 为 7.0 和添加 10 g/L 外源碳胰蛋白胨是其发挥降解作用的最适条件。MEH2305 通过非生物降解和生物降解的共同作用, 在培养第 7 天对四环素总去除率达到 68% (对土霉素和盐酸强力霉素去除率分别为 53% 和 56%), 其分泌的细胞内液和细胞外液对四环素的去除率分别为 40.77% 和 31.18%。同时, 与未经 MEH2305 处理的四环素对照组比较, MEH2305 降解四环素的产物对革兰氏阴性大肠杆菌(*Escherichia coli*) K88 和革兰氏阳性枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 的生理毒性作用显著降低。【结论】MEH2305 可以作为一株潜在的有效且安全的四环素降解菌株, 应用于抗生素的环境治理领域。

资助项目: 中央地方科技发展指导基金(2023JH6/100100056); 沈阳市科技计划(22-317-2-08); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-01-51)

This work was supported by the Guiding Fund of the Central Government for Local Science and Technology Development (2023JH6/100100056), the Shenyang Science and Technology Project (22-317-2-08), and the Earmarked Fund for Modern Agroindustry Technology Research System (CARS-01-51).

\*Corresponding author. E-mail: mengjun1217@syau.edu.cn

Received: 2023-08-26; Accepted: 2023-11-09; Published online: 2023-11-17

关键词: 四环素; 霍氏肠杆菌; 生物降解; 生物吸附; 生理毒性

## Biodegradation of tetracycline by an *Enterobacter hormaechei* strain and toxicity of degradation products

WANG Siyu<sup>1</sup>, GE Ziyi<sup>1</sup>, CHEN Yixuan<sup>1</sup>, ZHU Xiaolin<sup>2</sup>, LIU Sainan<sup>1</sup>, MENG Jun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Biochar and Soil Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Institute of Biochar, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

<sup>2</sup> Liaoning Hengrun Agriculture Co., Ltd., Haicheng 114200, Liaoning, China

**Abstract:** [Objective] Antibiotics as emerging pollutants have aroused wide concern. In view of the shortage of effective tetracycline-degrading strains, this study aims to screen and identify the strains for tetracycline degradation, analyze degradation properties and type, pinpoint the localization of active substances for bio-degradation, and evaluate the physiological toxicity of degradation products. [Methods] Tetracycline was used as the sole carbon source to screen out the target strain from tetracycline-contaminated pig sludge. The strain was identified based on colony morphology, physiological and biochemical characteristics, scanning electron microscopy images, and the 16S rRNA gene sequence. Different carbon sources, pH, and removal kinetics were employed to characterize the degradation process of the strain. Different components of the strain were extracted to determine the degradation type of tetracycline by the strain. Furthermore, the intracellular and extracellular fluids of the strain were used to degrade tetracycline, so as to determine the location of the active substance for degradation. Finally, the toxicity of the degradation products was assessed. [Results] The strain MEH2305 was screened out and identified as *Enterobacter hormaechei*, which showed the best degradation performance at pH 7.0 and with tryptone as the carbon source. Strain MEH2305 showed a total tetracycline removal rate of 68% on the 7th day of culture *via* abiotic degradation and bio-degradation, and the removal rates of oxytetracycline and doxycycline hydrochloride were 53% and 56%, respectively. The tetracycline removal efficiency by the intracellular and extracellular fluids of MEH2305 was 40.77% and 31.18%, respectively. Compared with tetracycline control without MEH2305, the tetracycline degradation products of MEH2305 had reduced physiological toxicity on Gram-negative *Escherichia coli* K88 and Gram-positive *Bacillus subtilis* 168. [Conclusion] The strain MEH2305 can be used as an effective and safe tetracycline-degrading strain for the treatment of antibiotics in the environment.

**Keywords:** tetracycline; *Enterobacter hormaechei*; biodegradation; bioadsorption; physiological toxicity

四环素类抗生素 (tetracycline antibiotics, TCs) 可以通过抑制细菌蛋白质的合成, 从而阻止

氨酰基 tRNA 与细菌核糖体的结合, 是世界上广泛应用于人类、动物疾病预防和治疗的抗生素药

物<sup>[1]</sup>。TCs 在全球范围内使用量居第二位,在中国则是使用量最大的抗生素种类;作为一种持久性化合物,TCs 在自然环境中降解非常缓慢,其在水土中的持续累积会导致抗生素抗性细菌和抗生素抗性基因的产生,大量且频繁地使用 TCs 使其成为环境中新兴的污染物之一<sup>[2-3]</sup>。制药厂、家庭污水、畜牧业和养殖业都会排放 TCs 废水,过量的 TCs 残留会对水生生物产生慢性毒性作用,抑制它们的生长繁殖,甚至导致死亡<sup>[3]</sup>。人类和动物无法完全消化吸收 TCs,导致大约 50%–80% 的 TCs 残留物以亲代化合物的形式被排放到环境中<sup>[4]</sup>,进而破坏生态系统的平衡,危及人类健康,近年来残留四环素污染问题受到了广泛关注。因此,开发绿色高效的 TCs 去除技术对解决环境中 TCs 污染问题具有重要意义。

目前,四环素(tetracycline, TC)的降解作用类型主要包括非生物降解(如吸附、光解、氧化和水解)和生物降解<sup>[5-7]</sup>。其中,利用微生物降解菌株对环境中残留药物进行生物降解,从而修复受污染环境已成为环境修复领域的研究热点<sup>[8-9]</sup>。微生物在特定环境中通过代谢产生酶等物质,然后直接或间接地修饰和改变抗生素的结构,使其失活<sup>[7]</sup>。微生物降解因其对环境友好、高效、低成本、稳定可靠且不会造成二次污染等优势,在治理四环素污染方面得到了广泛的研究和应用<sup>[10]</sup>。

虽然从 TC 污染的污泥中能够分离出许多菌株,且这些菌株在添加 TC 的培养基中生长良好,但 99% 以上的菌株只是具有耐药性,不能有效地降低 TC 浓度<sup>[11]</sup>。因此,分离和筛选 TC 降解菌株是一项重要工作。有研究表明贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Al-Dhabi 140<sup>[12]</sup>、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) TR5<sup>[13]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) XS-18<sup>[14]</sup>、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) WW1<sup>[15]</sup>、产碱杆菌

(*Alcaligenes* sp.) T17<sup>[16]</sup>、水谷鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium mizutaii*) S121<sup>[17]</sup>、常州鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium changzhouense*) TC931<sup>[10]</sup>、烟草节杆菌(*Arthrobacter nicotianae*) OTC-16<sup>[18]</sup>、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) LZ01<sup>[19]</sup>和克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) SQY5<sup>[20-21]</sup>等都对 TC 具有降解能力。Shao 等<sup>[21]</sup>从城市污泥中分离出一株克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) SQY5,该菌株具有很强的降解 TC 能力和反硝化能力。烟草节杆菌(*Arthrobacter nicotianae*) OTC-16 通过还原土霉素(oxytetracycline, OTC)的水解产物和将 OTC 转化为低毒代谢产物,有效地降低了 OTC 转化产物的生物毒性<sup>[18]</sup>。

本研究以某长期被 TC 污染的猪场污泥为样品,分离、提纯出一株有效降解 TC 的菌株 MEH2305。通过形态观察、生理生化及 16S rRNA 基因测序等手段将其鉴定为霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)。通过不同外源碳、pH 及去除动力学阐明菌株对 TC 的降解特性,探讨非生物降解和生物降解在菌株对 TC 去除中的作用,提取菌株不同成分探讨其去除 TC 的作用类型,并进一步从细胞内液和细胞外液开展生物降解 TC 的活性物质定位,最后评估降解产物的生理毒性,旨在为生物治理四环素类抗生素提供理论和实践依据,并对未来开发功能性菌剂提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验药品和试剂

四环素( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ , 98%)、土霉素( $C_{22}H_{24}N_2O_9$ , 95%)、盐酸强力霉素( $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ , 98%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;色谱级甲醇和乙腈购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。试验使用的其他药

品均为分析纯及以上。

### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母提取物 5, pH 7.0, 固体培养基额外加入 15 g/L 琼脂。富集培养基: 灭菌 LB 培养基中加入不同浓度四环素(5、10、25、50、80、100 mg/L)。

基础盐培养基(minimal salt medium, MSM) (g/L):  $K_2HPO_4$  1.5,  $KH_2PO_4$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2, NaCl 1.0, pH 7.0, 固体培养基额外加入 15 g/L 琼脂。MSM-T 培养基: MSM 中添加 10 g/L 胰蛋白胨。MSM-S 培养基: MSM 中添加 10 g/L 柠檬酸钠。筛选培养基: 灭菌 MSM 培养基中加入不同浓度四环素(5、10、25、50、80、100 mg/L)。

以上培养基使用前均在 121 °C 灭菌 20 min 后冷却备用。

### 1.1.3 药品配制

Mcilvaine- $Na_2EDTA$  缓冲液: 0.1 mol/L 柠檬酸, 0.2 mol/L 磷酸氢二钠, 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠。

四环素母液: 甲醇溶解 5 mL, 四环素药品 1 g, 添加无菌蒸馏水定容到 100 mL, 得到浓度 10 g/L 的母液备用。

## 1.2 TC 降解菌的富集、分离及纯化

从中国辽宁省沈阳市某猪场收集的长期被 TC 污染的污泥中进行 TC 降解菌的富集纯化, 将收集的 1 g 样品置于含 5 mg/L TC 的 100 mL LB 培养基中, 30 °C、150 r/min 摇床避光振荡培养。每隔 2 d, 将 1 mL 预驯化培养物吸入含有 TC 的 100 mL 新鲜 LB 培养基中, 并逐次提高培养基中 TC 浓度至 10、25、50、80、100 mg/L, 重复上述步骤, 直至 TC 浓度达到 100 mg/L。使用接种针将最后一次富集培养液用条纹划线法接种在以 TC (100 mg/L) 为唯一碳源的 MSM 固体培养基上, 在 30 °C 暗处培养 3 d 后, 从培养皿中选取形状、大小和颜色不同的单个菌落, 在

新鲜 MSM 固体培养基上重复划线, 经过纯化培养, 将菌落形态规则、生长较快的菌株进行传代划线, 直到培养基上的菌落形态完全一致, 得到纯菌株。重复纯化 3 次后将菌株编号并保存在含有 20% 甘油的营养琼脂中, 在 -80 °C 保存。

## 1.3 TC 降解菌形态特征和生理生化鉴定

菌体形态学观察、生理生化试验及生长特性测定参照 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*<sup>[22]</sup> 进行。

挑取平板上的单菌落于含有 50 mg/L TC 的 100 mL LB 液体培养基, 以不加 TC 为对照, 30 °C、150 r/min 恒温振荡培养箱培养 18 h 至对数生长期, 离心收集菌体, 将收集的菌体经戊二醛固定、乙醇脱水、冷冻干燥以及表面喷金后, 进行扫描电镜观察细胞表面形态。

## 1.4 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

菌株测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 使用 DNA 提取试剂盒提取降解菌株基因组总 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 进行扩增, PCR 产物经电泳检验与 TA 克隆后进行测序, 得到降解细菌的 16S rRNA 基因序列, 该序列被提交到生物信息中心 GenBank, 获得登录号。菌株序列通过 NCBI 数据库中进行对比, 进行初步鉴定。采用 MEGA 7.0 软件, 邻接法(neighbor-joining)进行多序列比对分析并构建系统发育树。

## 1.5 TC 降解菌的降解特性分析

### 1.5.1 不同外源碳对降解菌去除 TC 能力的影响

将  $OD_{600}$  为 1.0 的预接种菌液按照 5% (体积分数) 分别接种于含有 10 mg/L TC 的 100 mL MSM 培养基、MSM-S 培养基、MSM-T 培养基中, 调节液体培养基 pH 至 7.0, 于 30 °C、150 r/min 避光振荡培养 7 d 后, 取样测定残余游离 TC 浓度、溶液 pH 值和细胞密度( $OD_{600}$ ), 每组样品分 3 个

重复制备用于测量。pH 采用 pH 计测量, 细菌生长  $OD_{600}$  采用紫外分光光度计测量。

MEH2305 对 TC 的去除分为细胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 生物吸附 (E-A)、细胞生物吸附 (C-A)、生物降解 (B) 和水解 (H) 4 个部分。(1) 残余游离 TC (R-T) 部分: 将 5 mL 细胞悬浮液在 4 °C、8 000×g 离心 15 min, 然后通过 0.22 μm 滤膜过滤, 收集上清。(2) 残余游离 TC (R-T)+EPS 生物吸附 TC (E-A)+细胞生物吸附 TC (C-A) 部分: 将 Mcilvaine- $Na_2EDTA$  缓冲液与细胞悬浮液等量混合, 4 °C、8 000×g 离心 15 min, 0.22 μm 滤膜过滤, 收集上清。(3) 残余游离 TC (R-T)+EPS 生物吸附 TC (E-A) 部分: 将 Mcilvaine- $Na_2EDTA$  缓冲液与(1)中上清液等量混合, 在 4 °C、8 000×g 离心 15 min, 通过 0.22 μm 滤膜过滤, 收集上清。(4) 设置培养基中不接种菌株 MEH2305 为对照组, 将 5 mL 样品在 4 °C、8 000×g 离心 15 min, 然后通过 0.22 μm 滤膜过滤, 收集上清。过滤后的样品保存在 -20 °C, 溶液当中残余游离 (R-T) TC 含量采用超高效液相色谱仪测量。通过差量加减法计算分别得出 EPS 生物吸附 (E-A) TC 含量、细胞生物吸附 (C-A) TC 含量、生物降解 (B) TC 含量和水解 (H) TC 含量。

安捷伦超高效液相色谱仪, 配 DAD 检测器; 色谱柱: 安捷伦 Extend-C18 RRHD 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A: 甲醇; B: 0.1% 甲酸水溶液; C: 乙腈。梯度洗脱程序: 0–1 min: A 8%, B 84%, C 8%; 1–5 min: A 8%–40%, B 84%–20%, C 8%–40%; 5–6 min: A 40%–8%, B 20%–84%, C 40%–8%; 6–10 min: A 8%, B 84%, C 8%; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 30 °C, 进样量 3 μL, 检测波长: 355 nm。

$$\text{去除率}(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

式中,  $C_0$  为 0 d 样品中残余游离 TC 的浓度;  $C$  为不同时间点样品中残余游离 TC 的浓度。

### 1.5.2 pH 对降解菌去除 TC 能力的影响

使用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液将 MSM-T 液体培养基的初始 pH 分别调节为 5.0、7.0、9.0, 121 °C、30 min 高压灭菌后备用。pH 对降解菌生长及降解性能影响的试验于 100 mL 含 10 mg/L TC 的 MSM-T 液体培养基中进行。按 5% (体积分数) 比例添加  $OD_{600}$  为 1.0 的预接种菌液, 30 °C、150 r/min 避光振荡培养 7 d 后, 取样测定残余游离 TC 浓度、溶液 pH 值和细胞密度 ( $OD_{600}$ ), 每组样品分 3 个重复制备用于测量。测量条件同上。

### 1.5.3 降解菌 7 d 内对 TC 的去除动力学

MEH2305 在 LB 培养基中 30 °C、150 r/min 避光条件下培养至对数中期, 然后将 5% 的预接种菌液 ( $OD_{600}$  为 1.0) 接种到含有 10 mg/L TC 的 100 mL MSM-T 液体培养基 (pH 7.0) 中, 分别于 0、0.125、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7 d 采集样品, 测定残余游离 TC 浓度、溶液 pH 值和细胞密度 ( $OD_{600}$ ), 每组样品分 3 个重复制备用于测量。测量条件同上。

### 1.5.4 降解菌细胞内液和细胞外液对 TC 去除的影响

为了进一步确定细胞内液还是细胞外液在 TC 降解中起主要作用, 将 MEH2305 在 LB 液体培养基中培养至对数生长期。根据 Zhang 等<sup>[19]</sup> 描述的方法提取 MEH2305 产生的细胞内液和细胞外液。菌液 5 000×g 离心 10 min 后, 从菌悬液中提取细胞外液, 将离心后的细菌细胞破碎制备细胞内液。将两种样品加入含 10 mg/L TC 的 100 mL MSM-T 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 避光振荡培养, 定期测定残余游离 TC 浓度, 每组样品分 3 个重复制备用于测量。测量条件同上。

## 1.6 菌株对其他四环素类抗生素的去除效果

在分别含有 10 mg/L 的土霉素(oxytetracycline, OTC)和盐酸强力霉素(doxycycline hydrochloride, DCH)的 MSM-T 液体培养基(pH 7.0)中检测 MEH2305 降解 OTC 和 DCH 的能力, 设置未接种菌株 MEH2305 的空白培养基为对照, 30 °C、150 r/min 避光振荡培养, 收集培养 7 d 后的样品, 分别测定残余游离 OTC 和 DCH 浓度、溶液 pH 值和细胞密度( $OD_{600}$ ), 每组样品分 3 个重复制备用于测量。测量条件同上。

## 1.7 降解产物的生理毒性评估

以革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) K88 和革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 为生物学指标, 采用圆盘扩散法测定 TC 降解产物的抑菌活性<sup>[20]</sup>。大肠杆菌 K88 和枯草芽孢杆菌 168 分别在 LB 液体培养基中 30 °C、150 r/min 活化 18 h, 然后均匀涂于 LB 琼脂板上制备带菌平板。待培养基凝固后, 将牛津杯放置于平板上, 杯中分别装入 200  $\mu$ L 的 MEH2305 对 TC 不同降解时间的样品, 并加入无菌 TC 样品对照。在 30 °C 下培养 24 h 后测量抑菌圈直径, 每组样品分 3 个重复制备用于测量。

## 1.8 数据处理

使用 SPSS 26 软件进行数据的统计分析与计算, 用 Origin 2021 作图。试验数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。通过多重  $t$  检验(multiple  $t$ -test)分析不同处理之间的差异, 确定各处理间的显著性差异( $P < 0.05$ )。

# 2 结果与讨论

## 2.1 TC 降解菌的分离、形态特征、生理生化特性和分子生物学鉴定

设定 100 mg/L 的 TC 浓度是为了确保有效筛选能够高效降解 TC 的细菌<sup>[11,21]</sup>。经 TC 驯化

富集后, 获得菌株 MEH2305, 在添加 100 mg/L TC 的固体 MSM 培养基上生长良好。肉眼观察显示 MEH2305 的形态特征为乳白色半透明, 菌落呈规整圆形, 隆起, 表面光滑湿润, 边缘整齐, 易挑起(图 1)。革兰氏染色试验显示 MEH2305 为革兰氏阴性细菌; 接触酶试验显示为阳性; 甲基红试验显示为阴性。

扫描电镜照片显示(图 2), 正常状态下 MEH2305 菌体外形清晰, 呈杆状, 排列不规则, 可清晰看到菌体表面粗糙, 褶皱较多, 有大小不一的凸起, 这可以增大 TC 与菌体的接触面积, 为 TC 与菌体的结合提供更多的位点; 在 TC 浓度为 50 mg/L 的条件下, MEH2305 表面结构变化明显, 凸起褶皱变浅。

综合形态学、生理生化特征、16S rRNA 基因序列和系统发育树分析(图 3), 确定降解菌株为霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*), 将其命名为 *Enterobacter hormaechei* MEH2305 (GenBank 登录号: OQ555085)。肠杆菌因其对持久性有机污染物<sup>[23]</sup>、磺胺甲恶唑<sup>[24]</sup>、内源性碳氢化合物<sup>[25]</sup>、石油碳氢化合物<sup>[7]</sup>、纺织染料<sup>[26]</sup>、四溴双酚<sup>[27]</sup>和对二甲苯<sup>[28]</sup>等多种有机污染物具有显著的降解能力而被广泛应用于生物修复。



图 1 降解菌株 MEH2305 的形态特征  
Figure 1 Morphological characteristics of degrading strain MEH2305.



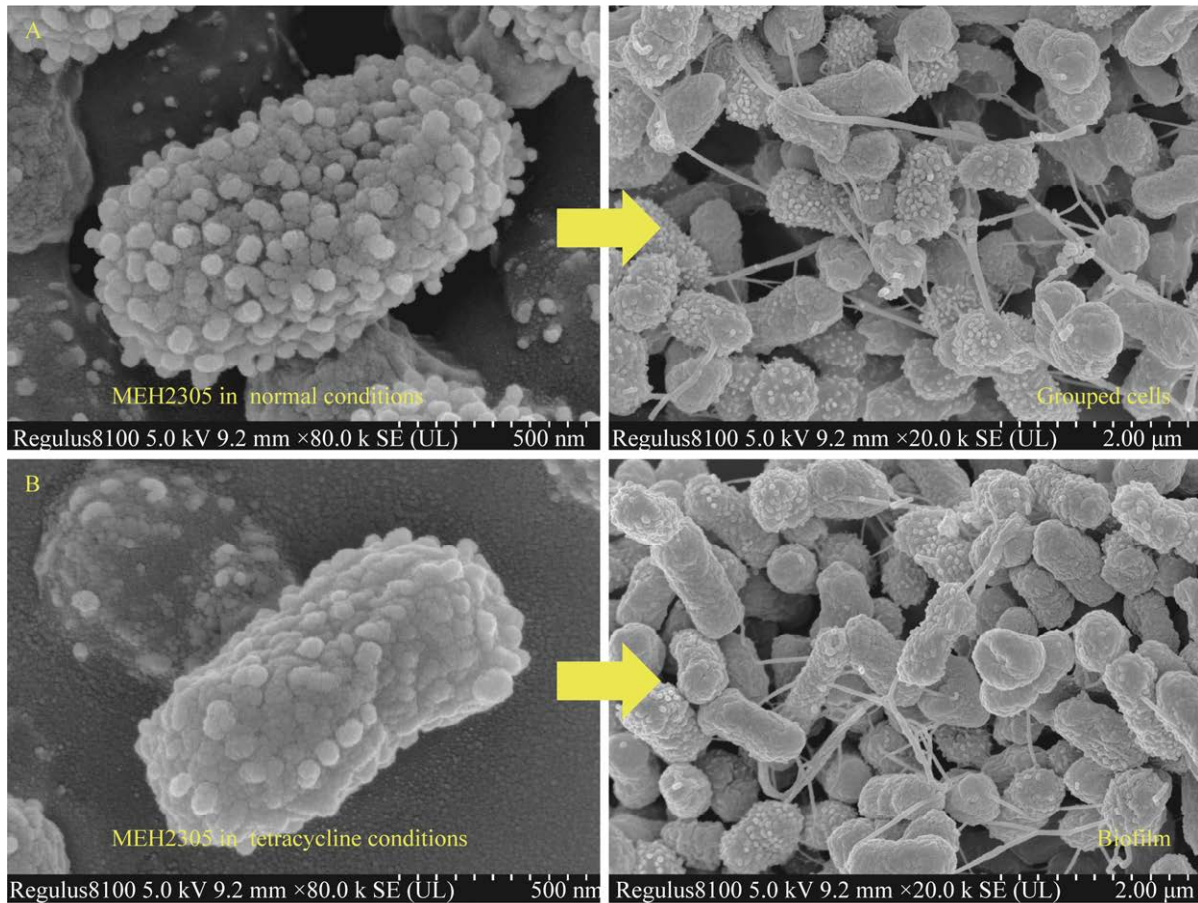


图 2 降解菌株 MEH2305 在正常状态下(A)和受 TC 胁迫条件下(B)的扫描电镜图

Figure 2 SEM images of degrading strain MEH2305 under normal condition (A) and TC stress (B).

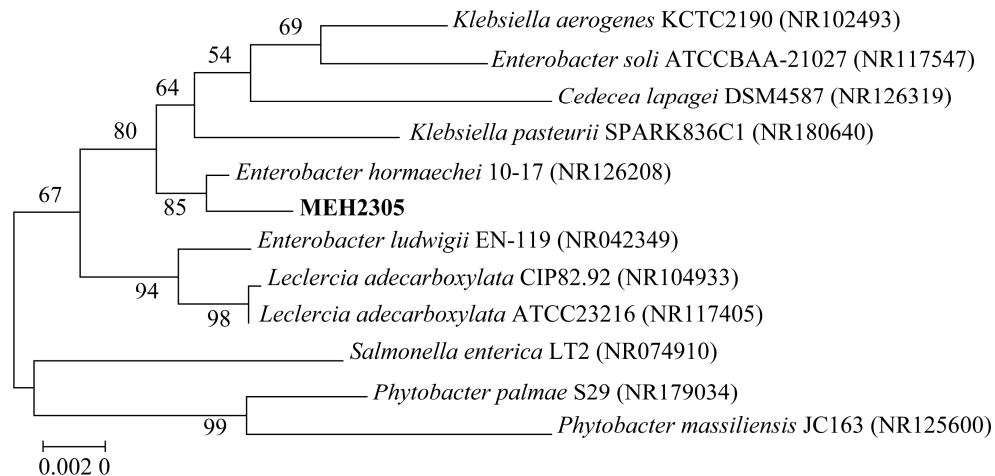


图 3 TC 降解菌株 MEH2305 基于 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of TC degrading strain MEH2305 based on 16S rRNA gene sequence homology. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Numbers at each branch point indicated the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. The scale bar represents 0.002 0 substitutions per nucleotide position.

## 2.2 降解菌 MEH2305 在不同外源碳条件下的生长和 TC 去除特性

由图 4 可知, 在 TC 为唯一碳源条件下, 细胞可以进行生长繁殖( $OD_{600}=0.457$ , pH 6.557), 说明 MEH2305 可以利用微量 TC 生长, 但降解效率较低, 整体去除率仅为 16%, 原因可能是 TC 的复杂结构使得降解菌很难直接大量利用 TC 作为唯一碳源进行生长繁殖。因此推测 TC 的生物降解主要通过共代谢进行, 添加外源碳既能为细菌生长提供额外的营养和能量, 也能以共代谢的方式参与生物降解四环素的酶的合成<sup>[29]</sup>。此外, MEH2305 可以利用柠檬酸钠生长繁殖( $OD_{600}=0.618$ , pH 7.543), 但是不能通过共代谢高效地生物降解 TC, 整体去除率仅为 19%。当添加 10 g/L 的胰蛋白胨时, 溶液中菌体密度增加( $OD_{600}=0.887$ , pH 8.463), 并且能够显著促进 TC 的共代谢和生物降解, 整体去除率达到 68%。综上所述, 不同外源碳可以影响微生物的代谢途径, 导致不同的细菌繁殖生长速率和 TC 的生物降解效率, 本研究中 MEH2305 的最适生长和降解的外源碳条件为 10 g/L 的胰蛋白胨。

据报道, 在序批式生物膜反应器中与葡萄糖共培养可以增强林可霉素的去除, 因为氧化还原电位发生了变化, 并为功能性细菌的生长提供了适宜的环境<sup>[30]</sup>。有研究单独使用乙酸钠(不含微生物)仅稍微降低环丙沙星浓度, 表明大部分环丙沙星的降解由微生物引起, 乙酸钠作为额外碳源既能促进细菌生长又可以作为非生长底物共代谢的电子供体<sup>[31-32]</sup>。Tan 等<sup>[33]</sup>报道了额外碳源(乙酸钠、甘油、蛋白胨和蔗糖)对细菌降解氯霉素生物转化的不同影响, 在没有额外碳源的情况下, 克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.) YB1 几乎没有生长( $OD_{600}$  为 0.05), 生物降解效率较低(4.40%), 而在补充外源碳蛋白胨后, 菌株生长( $OD_{600}$  为 0.80)和生物降解效率(22.41%)都显著提高。以上

结果和本研究结果一致, 可以归因于共代谢机制, 生物降解效率的提高不仅是因为刺激了生物量生长, 还因为细菌中关键的降解酶在利用共代谢底物的过程中被激活。然而, 由于碳分解代谢物的抑制, 不同的碳源对细菌酶促反应和生长有不同的影响<sup>[34-35]</sup>。有研究认为额外碳源和氮源都不能显著促进鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.) CL 5.1 的繁殖, 也不能加速硫霉素的生物降解<sup>[36]</sup>。因此, 环境中多种共存的碳源对抗生素的生物降解产生了不可忽视的影响, 未来需要更多的试验来阐明共代谢效应的潜在机制。

## 2.3 降解菌 MEH2305 在不同 pH 条件下的生长和 TC 去除特性

pH 值是影响微生物降解四环素的重要因素之一, 不仅影响菌株生长和稳定性, 还影响细胞膜蛋白及胞外水解酶的活性, 从而影响营养物质的正常吸收和转运, 进而影响微生物对目标污染物的降解能力<sup>[37-38]</sup>。图 5 显示培养 7 d 后, MEH2305 在 pH 5.0 和 pH 9.0 条件下的 TC 去除

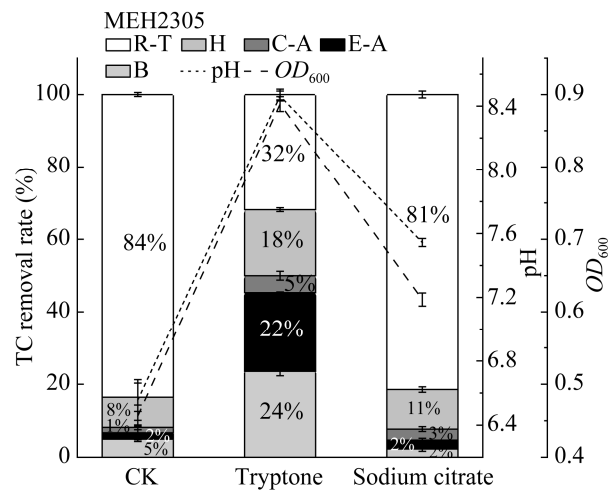


图 4 不同外源碳条件下菌株 MEH2305 对 TC 去除的影响

Figure 4 Effects of strain MEH2305 on TC removal under different exogenous carbon conditions. Error bars represent the standard deviations of the mean. R-T: Residual TC; H: Hydrolysis; C-A: Cell biosorption; E-A: Extracellular polymeric substance biosorption; B: Biodegradation.



率分别为 56% 和 52%，与 pH 7.0 中性条件下 68% 去除率相比，去除率显著降低。值得注意的是，MEH2305 在不同 pH 值下去除 TC 的途径不同，酸性和碱性环境会促进四环素水解，显著抑制生物降解和生物吸附。同时，MEH2305 在酸性和碱性条件下，菌体生长受到显著抑制，初始 pH 为 5.0、7.0、9.0 时， $OD_{600}$  值分别为 0.166、0.887、0.224；溶液最终 pH 从 5.0、7.0、9.0 分别转变为 6.03、8.46、8.67。这些结果表明 pH 对菌株生长和生物降解有显著性影响。本研究中 MEH2305 对 TC 的最适降解 pH 为 7.0。

Halling-Sørensen 等的研究表明，在酸性环境中，四环素容易发生脱水反应和差向异构化，而在偏碱性环境中，其 C 环则更容易被打开，从而转化为无活性的内酯型异构体，而在中性环境中则表现出相对的稳定性<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>从污水处理厂的活性污泥中分离出一株不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)，在中性 pH 下对磺胺甲恶唑的降解效果最好，而碱性和酸性 pH 分别延缓和抑制了磺胺甲恶唑的生物降解，与本研究结果一致。

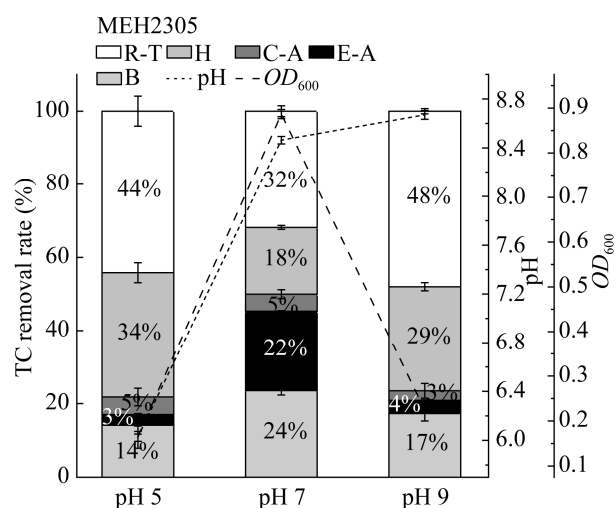


图 5 不同 pH 条件下菌株 MEH2305 对 TC 去除的影响

Figure 5 Effect of strain MEH2305 on TC removal under different pH conditions. Error bars represent the standard deviations of the mean.

## 2.4 降解菌 MEH2305 的生物去除动力学

动力学试验结果显示(图 6A)，对照组在没有菌株存在情况下，TC 浓度也会发生变化，表明 TC 在水中存在非生物自然水解作用。随着反应时间的增加，MEH2305 降解组 TC 的去除量远高于水解对照组。动力学模型可以预测有毒化学物质在环境中的持久性，研究表明许多有机污染物的微生物降解动力学与一阶动力学模型拟合良好<sup>[41]</sup>，本研究确定 MEH2305 对 TC 的生物去除过程与一阶动力学模型  $\{c=k \times [1 - \exp(-b t)]\}$  拟合较好，相关系数  $R^2=0.935$ ，去除动力学速率常数  $k=3.554$ ，以上结果表明了菌株 MEH2305 在环境中四环素生物修复中的去除效率。

接种 MEH2305 可以有效地利用 TC 作为共代谢生长底物，伴随着细菌生长开始 TC 被降解，没有滞后阶段(图 6C)。在 0–2 d 内，培养基中的营养成分更加丰富，使 MEH2305 的生长和代谢速度更快， $OD_{600}$  值从 0.056 迅速增加到 1.632，细菌处于对数生长期，产物积累迅速，对 TC 的降解也迅速增加，在 2 d 内去除率达到 50%，溶液的 pH 值呈现出先降低然后增加的趋势。在 2–7 d 期间，培养基中的营养物质耗尽，MEH2305 生长缓慢， $OD_{600}$  值从 1.384 降低到 0.895，pH 值维持在 8.5 左右，并在第 7 天时 TC 总去除率达到 68%。pH 变化表明降解菌生长过程中产生了某些碱性代谢物，与 Tan 等的研究结果一致<sup>[10]</sup>。其他研究认为当添加胰蛋白胍作为外源碳时，在 TC 生物降解过程中也观察到了 pH 值升高，可能是由于胰蛋白胍中  $NH_4^+$  的释放<sup>[42]</sup>。

细菌对抗生素的降解作用类型主要包括水解、生物吸附(细胞吸附、胞外分泌物 EPS 吸附)和生物降解<sup>[32]</sup>。本研究通过使用 Mcilvaine- $Na_2EDTA$  缓冲液从细胞表面或 EPS 释放 TC，推断出 TC 的去除途径<sup>[10]</sup>。MEH2305 对 TC 的去除主要通过生物降解、EPS 吸附和细胞吸附(图 6B)。

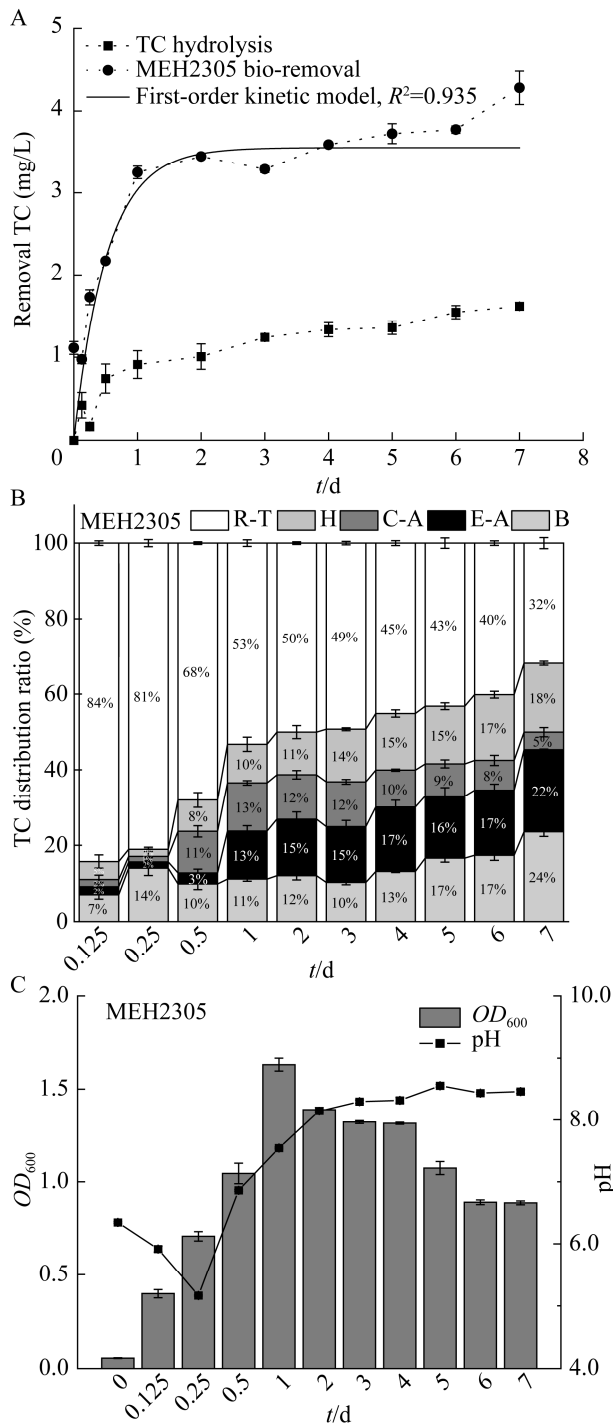


图 6 菌株 MEH2305 对 TC 的生物去除动力学曲线(A)、TC 分布占比(B)和降解过程中  $OD_{600}$  和 pH 变化(C)

Figure 6 TC removal kinetics curve of strain MEH2305 (A), TC distribution ratio (B), and  $OD_{600}$  and pH changes (C) during degradation. Error bars represent the standard deviations of the mean.

生物降解的量显著高于其他途径(0-0.25 d), 表明生物降解是此阶段主要的去除过程, 几乎没有细胞吸附和 EPS 吸附。从 0.5-1 d, 细菌处于指数繁殖阶段, 随着细菌数量的增长, EPS 分泌丰富, 因此, 细胞吸附和 EPS 吸附的量变大。随着反应时间延长到 2-7 d, TC 水解占比变高, 生物降解占比缓慢增加, 细菌从稳定生长期达到衰亡期, 所以细胞吸附占比缓慢降低, 然而, EPS 吸附占比基本不变, 可能因为 EPS 作为微生物与外界环境进行物质和能量交换的通道, 微生物通过分泌大量的 EPS 来抵御外界不利环境的影响<sup>[42-43]</sup>。

### 2.5 降解菌 MEH2305 细胞内液和细胞外液对 TC 去除的影响

有机污染物的生物降解主要是通过细胞内外的酶促反应来实现的, 降解细菌会产生细胞内液和细胞外液。由于酶活性随着时间的推移逐渐降低, MEH2305 产生的细胞内液和细胞外液对 TC 的降解增加在 1 d 后逐渐减弱(图 7)。细胞外液可以直接与 TC 接触, 并在系统中发生酶促反

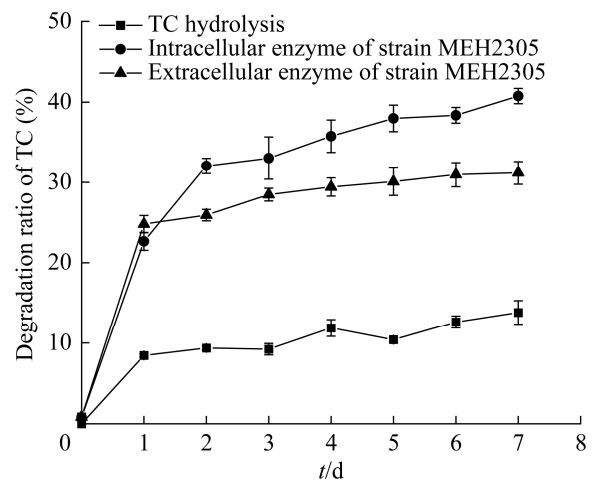


图 7 菌株 MEH2305 细胞内液和细胞外液对 TC 的降解作用

Figure 7 Degradation of TC by intracellular and extracellular material in strain MEH2305. Error bars represent the standard deviations of the mean.

应以促进 TC 降解；细胞内液通过吸附、跨膜转运等作用降解 TC。细胞内液比细胞外液更好地降解 TC，可能是因为存在一些修复内切酶和蛋白质活性的机制，从而使细胞内液能够更好地分解 TC<sup>[20]</sup>。综上所述，TC 的生物降解是细胞内液和细胞外液的协同作用，且细胞内液对 TC 的降解效果更好，7 d 最高去除率为 40.77%，而细胞外液对 TC 的 7 d 最高去除率为 31.18%。

## 2.6 降解菌 MEH2305 对 TC 的降解产物的生理毒性评估

尽管环境微生物有效地生物降解 TC，但一些中间产物可能比母体化合物毒性更大，因此，TC 降解并不一定意味解毒<sup>[44-45]</sup>。TC 降解产物在不同降解时间对大肠杆菌 K88 和枯草芽孢杆菌 168 的抑菌圈结果表明(图 8)，TC 生物降解产物的抑菌效果低于对照组，生物降解组的抑制能力随着降解时间的增加而降低(大肠杆菌抑制区直径从 21.72 mm 减小到 12.59 mm，枯草芽孢杆菌的抑制区直径从 13.93 mm 减小到 11.37 mm)，而对照组产物在第 7 天(大肠杆菌组 18.63 mm，枯

草芽孢杆菌组 12.67 mm)的抑制区直径仍相对于第 0 天(大肠杆菌组 21.94 mm，枯草芽孢杆菌组 14.13 mm)较大。与对照相比，菌株 MEH2305 的生物降解可以有效降低抗生素的生物毒性。与曹欢等<sup>[46]</sup>的研究结果一致，其在 *Providencia sp. 2* 与 *Proteus sp. 1* 对四环素类抗生素的生物降解过程中发现生物降解通过减少四环素类抗生素的水解产物的积累，将四环素类抗生素转化为毒性较低的代谢产物。

## 2.7 降解菌 MEH2305 对其他四环素类抗生素的降解效果

菌株 MEH2305 同时具有降解四环素(TC)、土霉素(OTC)和盐酸强力霉素(DCH)的能力(图 9)，在这 3 种四环素类抗生素药物的去除试验中，培养 7 d 后，菌株 MEH2305 对 TC 的去除效率最高为 69%，而 DCH 和 OTC 的去除效率分别为 53%和 56%。菌株 MEH2305 降解去除不同类型四环素类抗生素的能力可能归因于四环素类抗生素相似的化学结构，但不同的降解能力也反映了它们对菌株 MEH2305 的不同毒性。

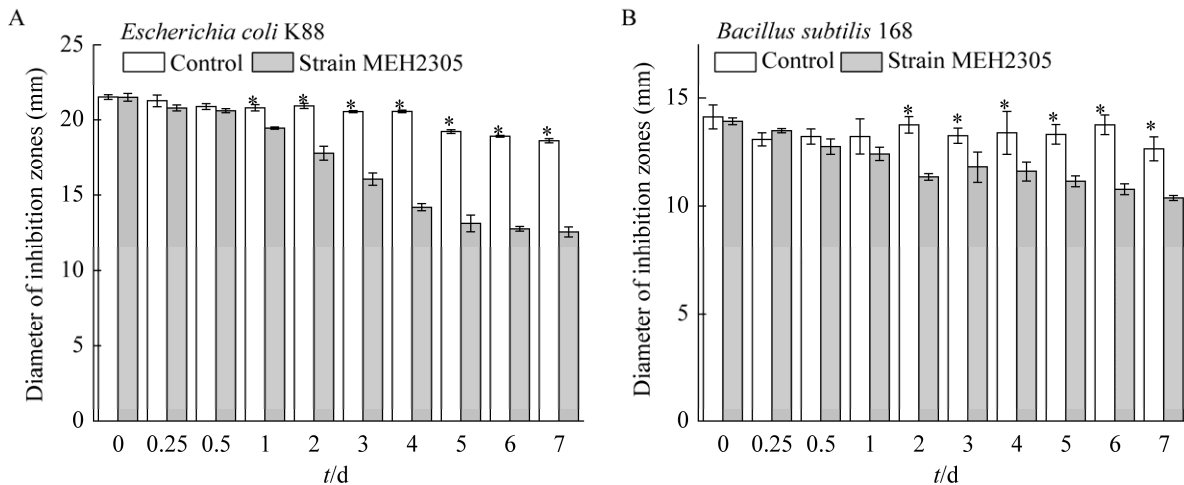


图 8 菌株 MEH2305 对 TC 的降解产物对大肠杆菌 K88 (A)和枯草芽孢杆菌 168 (B)的毒害作用

Figure 8 Toxic effects of TC degradation products of strain MEH2305 on *Escherichia coli* K88 (A) and *Bacillus subtilis* 168 (B). Error bars represent the standard deviations of the mean. \* indicates significant differences between treatments at the 0.05 level.

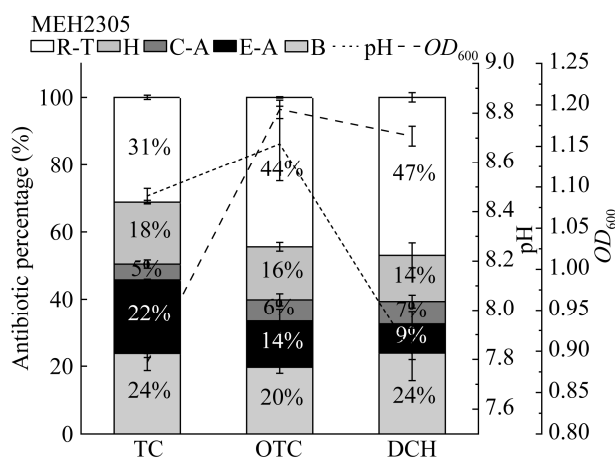


图9 菌株 MEH2305 对不同四环素类抗生素的去除作用

Figure 9 Removal effect of strain MEH2305 on different tetracycline antibiotics. Error bars represent the standard deviations of the mean.

### 3 结论

本研究从一个长期使用四环素的猪场活性污泥中分离得到一株四环素有效降解菌 MEH2305, 经生理生化反应鉴定、革兰氏染色鉴定和 16S rRNA 基因测序鉴定为霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) (GenBank 登录号: OQ555085)。该菌株不仅能良好降解并去除四环素, 还对土霉素和盐酸强力霉素具有一定的去除作用。

MEH2305 去除 TC 依靠非生物降解和生物降解的共同作用, 在本研究中去除率最高为 69%; MEH2305 分泌的细胞内液和细胞外液对 TC 的去除效率分别为 40.77%和 31.18%; 生理毒性试验显示 MEH2305 对 TC 的生物降解产物毒性显著低于无菌处理的四环素对照组, 证明了 MEH2305 在实际应用中具有较高的生物安全性。

MEH2305 能有效降解 TCs, 在治理抗生素污染方面具有很好的应用价值, 可为进一步处理实际 TCs 污染奠定基础, 后续可进行更多菌株降解 TCs 影响因素及降解机制的研究, 以期为四环素类抗生素的生物降解提供可用依据。

### 参考文献

- [1] CHOPRA I, ROBERTS M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232-260.
- [2] CHEN XL, YANG YY, KE YC, CHEN C, XIE SG. A comprehensive review on biodegradation of tetracyclines: current research progress and prospect[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 814: 152852.
- [3] HU Y, CHENG HF. Health risk from veterinary antimicrobial use in China's food animal production and its reduction[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 219: 993-997.
- [4] MAHAMALLIK P, SAHA S, PAL A. Tetracycline degradation in aquatic environment by highly porous MnO<sub>2</sub> nanosheet assembly[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 276: 155-165.
- [5] CHANG BV, REN YL. Biodegradation of three tetracyclines in river sediment[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 75: 272-277.
- [6] NOLWENN P, JUAN O, ABDEL TIF A. Biodegradation and biosorption of tetracycline and tylosin antibiotics in activated sludge system[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(11): 1302-1306.
- [7] MIRJAM P, RACHEL C, UTE H, JOHANNES H, CELINE P, GUENOLA P, MICHIEL R. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services—an overview of European approaches[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2012, 4(5): 529-538.
- [8] SILVA VP, MOREIRA-SANTOS M, MATEUS C, TEIXEIRA T, RIBEIRO R, VIEGAS CA. Evaluation of *Arthrobacter aurescens* strain TC1 as bioaugmentation bacterium in soils contaminated with the herbicidal substance terbuthylazine[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144978.
- [9] JULIANA S, CLAUDIA SB, MARÍA JA. Lindane removal by pure and mixed cultures of immobilized actinobacteria[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(8): 982-987.
- [10] TAN ZW, CHEN JC, LIU YL, CHEN L, XU YQ, ZOU YX, LI YT, GONG BN. The survival and removal mechanism of *Sphingobacterium changzhouense* TC931 under tetracycline stress and its' ecological safety after application[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 333: 125067.

- [11] LI Z, SUN YQ, YANG Y, HAN YT, WANG TS, CHEN JW, TSANG DCW. Comparing biochar- and bentonite-supported Fe-based catalysts for selective degradation of antibiotics: mechanisms and pathway[J]. *Environmental Research*, 2020, 183: 109156.
- [12] NAIF ABDULLAH A, GALAL ALI E, MARIADHAS VALAN A. Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing *Bacillus velezensis* strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor[J]. *Chemosphere*, 2021, 268: 128726.
- [13] YIN ZF, XIA D, SHEN M, ZHU DW, CAI HJ, WU M, ZHU QR, KANG YJ. Tetracycline degradation by *Klebsiella* sp. strain TR5: proposed degradation pathway and possible genes involved[J]. *Chemosphere*, 2020, 253: 126729.
- [14] YANG MY, YIN MY, ZHENG YQ, JIANG JS, WANG CX, LIU S, YAN LL. Performance and mechanism of tetracycline removal by the aerobic nitrate-reducing strain *Pseudomonas* sp. XS-18 with auto-aggregation[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127442.
- [15] BHATT P, JEON CH, KIM W. Tetracycline bioremediation using the novel *Serratia marcescens* strain WW1 isolated from a wastewater treatment plant[J]. *Chemosphere*, 2022, 298: 134344.
- [16] CHEN XL, SHEN W, CHEN JF, ZHU Y, CHEN C, XIE SG. Tetracycline biotransformation by a novel bacterial strain *Alcaligenes* sp. T17[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 832: 115130.
- [17] TAN H, KONG DL, LI QQ, ZHOU YQ, JIANG X, WANG ZY, PARALES RE, RUAN ZY. Metabolomics reveals the mechanism of tetracycline biodegradation by a *Sphingobacterium mizutaii* S121[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 305: 119299.
- [18] SHI YK, LIN H, MA JW, ZHU RR, SUN WC, LIN XY, ZHANG J, ZHENG HB, ZHANG X. Degradation of tetracycline antibiotics by *Arthrobacter nicotianae* OTC-16[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123996.
- [19] ZHANG SN, WANG JH. Biodegradation of chlortetracycline by *Bacillus cereus* LZ01: performance, degradative pathway and possible genes involved[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 434: 128941.
- [20] SHAO SC, HU YY, CHENG JH, CHEN YC. Biodegradation mechanism of tetracycline (TEC) by strain *Klebsiella* sp. SQY5 as revealed through products analysis and genomics[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 185: 109676.
- [21] SHAO SC, HU YY, CHENG C, CHENG JH, CHEN YC. Simultaneous degradation of tetracycline and denitrification by a novel bacterium, *Klebsiella* sp. SQY5[J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 35-43.
- [22] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8 th ed. Beijing: Science Press, 1984.
- [23] SONAM T, SANGEETA Y, DIANE P, KAMAN S, HIND A, RAM C. Characterization of persistent organic pollutants and culturable and non-culturable bacterial communities in pulp and paper sludge after secondary treatment[J]. *Chemosphere*, 2022, 295: 133892.
- [24] SATHYA PM, MOHAN H, VENKATACHALAM J, SERALATHAN K. A hybrid technique for sulfamethoxazole (SFM) removal using *Enterobacter hormaechei* HaG-7: bio-electrokinetic degradation, pathway and toxicity[J]. *Chemosphere*, 2023, 313: 137485.
- [25] SUN S, SU YH, CHEN SQ, CUI W, ZHAO CC, LIU QY. Bioremediation of oil-contaminated soil: exploring the potential of endogenous hydrocarbon degrader *Enterobacter* sp. SAVR S-1[J]. *Applied Soil Ecology*, 2022, 173: 104387.
- [26] EDOAMODU CE, NWODO UU. *Enterobacter* sp. A11 produced a thermo-acidic-tolerant laccase with a high potential for textile dyes degradation[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 38: 102206.
- [27] PENG XX, ZHENG QH, LIU L, HE YZ, LI TY, JIA XS. Efficient biodegradation of tetrabromobisphenol A by the novel strain *Enterobacter* sp. T2 with good environmental adaptation: kinetics, pathways and genomic characteristics[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 429: 128335.
- [28] WANG Y, WAN SG, YU WL, YUAN D, SUN L. Newly isolated *Enterobacter cloacae* sp. HN01 and *Klebsiella pneumoniae* sp. HN02 collaborate with self-secreted biosurfactant to improve solubility and bioavailability for the biodegradation of hydrophobic and toxic gaseous para-xylene[J]. *Chemosphere*, 2022, 304: 135328.
- [29] ZHANG JY, ZHAO RX, CAO LJ, LEI YS, LIU J, FENG J, FU WJ, LI XY, LI B. High-efficiency biodegradation of chloramphenicol by enriched

- bacterial consortia: kinetics study and bacterial community characterization[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121344.
- [30] LI YC, ZHOU J, GONG BZ, WANG YM, HE Q. Cometabolic degradation of lincomycin in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) and its microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 214: 589-595.
- [31] LUO W, ZHAO YH, DING HT, LIN XY, ZHENG HB. Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158(1): 208-214.
- [32] PAN LJ, LI J, LI CX, TANG XD, YU GW, WANG Y. Study of ciprofloxacin biodegradation by a *Thermus* sp. isolated from pharmaceutical sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 343: 59-67.
- [33] TAN ZW, YANG XY, LIU YL, CHEN L, XU HJ, LI YT, GONG BN. The capability of chloramphenicol biotransformation of *Klebsiella* sp. YB1 under cadmium stress and its genome analysis[J]. *Chemosphere*, 2023, 313: 137375.
- [34] JOHNSEN AR, WICK LY, HARMS H. Principles of microbial PAH-degradation in soil[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 133(1): 71-84.
- [35] FISCHER K, MAJEWSKY M. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(15): 6583-6597.
- [36] PINHAL S, ROPERS D, GEISELMANN J, de JONG H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(13): e00147-e00119.
- [37] 张小红, 王亚娟, 陶红, 张锐, 马志义. 一株同时降解 4 种四环素类抗生素降解菌的筛选及降解特性[J]. *环境化学*, 2022, 41(8): 2761-2770.
- ZHANG XH, WANG YJ, TAO H, ZHANG R, MA ZY. Screened and degradation characteristics of a four tetracycline antibiotics degrading bacterium[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(8): 2761-2770 (in Chinese).
- [38] HE W, MEGHARAJ M, WU CY, SUBASHCHANDRABOSE SR, DAI CC. Endophyte-assisted phytoremediation: mechanisms and current application strategies for soil mixed pollutants[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(1): 31-45.
- [39] HALLING-SØRENSEN B, LYKKEBERG A, INGERSLEV F, BLACKWELL P, Tjørnelund J. Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(10): 1331-1342.
- [40] WANG SZ, WANG JL. Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by a novel strain *Acinetobacter* sp.[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(1): 425-432.
- [41] LENG YF, BAO JG, CHANG GF, ZHENG H, LI XX, DU JK, SNOW D, LI X. Biotransformation of tetracycline by a novel bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* DT1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318:125-133.
- [42] ZHANG HQ, JIA YY, KHANAL SK, LU H, FANG HT, ZHAO Q. Understanding the role of extracellular polymeric substances on ciprofloxacin adsorption in aerobic sludge, anaerobic sludge, and sulfate-reducing bacteria sludge systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(11): 6476-6486.
- [43] XU J, SHENG GP. Microbial extracellular polymeric substances (EPS) acted as a potential reservoir in responding to high concentrations of sulfonamides shocks during biological wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123654.
- [44] XU DM, XIOA YP, PAN H, MEI Y. Toxic effects of tetracycline and its degradation products on freshwater green algae[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174: 43-47.
- [45] DU YQ, CHENG QL, QIAN MG, LIU YZ, WANG F, MA JW, ZHANG X, LIN H. Biodegradation of sulfametoxydiazine by *Alcaligenes aquatillis* FA: performance, degradation pathways, and mechanisms[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 452: 131186.
- [46] 曹欢, 黄泽昊, 苏彩萍, 任宇红. 四环素类抗生素降解菌的筛选及降解特性探究[J]. *环境科学与技术*, 2022, 45(12): 19-28.
- CAO H, HUANG ZH, SU CP, REN YH. Screening and degradation characteristics of tetracyclines degrading bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 45(12): 19-28 (in Chinese).