

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2021.0179

张星星 李司令 齐维晓,等.2021.锰氧化菌 *Pseudomonas* sp. QJX-1 对氧四环素的去除作用与机制[J].环境科学学报 41(11): 4494-4500

Zhang X X ,Li S L ,Qi W X , et al. 2021.Mechanism of oxytetracycline removal by a manganese-oxidizing bacteria *Pseudomonas* sp. QJX-1 [J].Acta Scientiae Circumstantiae 41(11): 4494-4500

# 锰氧化菌 *Pseudomonas* sp. QJX-1 对氧四环素的去除作用与机制

张星星<sup>1,2</sup> 李司令<sup>2</sup> 齐维晓<sup>2,\*</sup> 柏耀辉<sup>3</sup> 周丹丹<sup>1</sup> 刘会娟<sup>2</sup>

1. 东北师范大学环境学院, 长春 130117
2. 清华大学环境学院, 清华大学水质与水生态研究中心, 北京 100084
3. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

**摘要:** 氧四环素(Oxytetracycline, OTC)的大量使用可能导致环境中抗性基因的生成和传播.锰氧化菌及其催化产生的生物锰氧化物(Biogenic manganese oxides, BMO)在自然界中广泛存在,但对其去除 OTC 的过程与机制仍不明确.因此,本研究探讨了锰氧化菌 *Pseudomonas* sp. QJX-1 对微量( $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) OTC 的去除作用与机制.结果表明,微量的 OTC 可以促进 QJX-1 的生长及其对  $\text{Mn}^{2+}$  的氧化.QJX-1 及其催化生成的 BMO 对 OTC 的去除效果较好,在第 168 h 时对 OTC 的去除率达到 99%.转录组结果表明,OTC 会导致细菌的 *pstA*、*pstB*、*pstC*、*urtA* 和 *urtD* 等 ABC 转运蛋白编码基因表达上调,说明 OTC 可能是通过 ABC 转运蛋白泵出 QJX-1 体内进而让 BMO 更有效地接触 OTC,从而达到 OTC 被吸附、氧化去除的目的.RT-qPCR 结果表明,微量的 OTC 促进了细菌多铜氧化酶基因 *cumA* 的表达,提高了 BMO 的生成速率,增强了对 OTC 的去除效果.

**关键词:** 锰氧化菌;生物锰氧化物;氧四环素;去除;多铜氧化酶基因

文章编号: 0253-2468(2021)11-4494-07 中图分类号: X703, X172 文献标识码: A

## Mechanism of oxytetracycline removal by a manganese-oxidizing bacteria *Pseudomonas* sp. QJX-1

ZHANG Xingxing<sup>1,2</sup>, LI Siling<sup>2</sup>, QI Weixiao<sup>2,\*</sup>, BAI Yaohui<sup>3</sup>, ZHOU Dandan<sup>1</sup>, LIU Huijuan<sup>2</sup>

1. School of Environment, Northeast Normal University, Changchun 130117
2. Center for Water and Ecology, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084
3. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

**Abstract:** The wide use of Oxytetracycline (OTC) may cause the spread of antibiotic resistance genes in the environment. Manganese-oxidizing bacteria and their produced biogenic manganese oxides (BMO) are ubiquitous in natural ecosystem, but whether and how they remove OTC are still unclear. Therefore, the mechanism of manganese-oxidizing bacteria *Pseudomonas* sp. QJX-1 removing OTC at trace concentration ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was explored in this study. The results showed that trace amount of OTC could promote the growth of QJX-1 and the oxidation of  $\text{Mn}^{2+}$ . QJX-1 and BMO performed well on the removal of OTC, and the ratio accounted for 99% at 168 h. Trace OTC could result in the up-regulation of the expression *pstA*, *pstB*, *pstC*, *urtA*, *urtD*, and other ABC transporter-encoding genes, indicating that OTC might be pumped out of QJX-1 through ABC transporter to allow effective contact of OTC with BMO and thereby the removal of OTC by adsorption and oxidation. Besides, trace amount of OTC promoted the expression of multi-copper oxidase gene *cumA*, which increased the BMO production rate and enhanced the removal of OTC.

**Keywords:** manganese-oxidizing bacteria; biogenic manganese oxides; oxytetracycline; removal; multi-copper oxidase

### 1 引言(Introduction)

氧四环素(Oxytetracycline, OTC)是常用的四环素类抗生素之一,是一种复杂的两性离子大分子有机化合物.由于价格低廉,OTC 被广泛用于陆生牲畜

和水产养殖中.OTC 在动物肠道中的吸收率很低,其中 30%~90% 以母体化合物的形式排泄(Alcock *et al.*, 1999).而污水处理厂传统工艺无法完全去除 OTC 或其他抗生素,导致水环境中抗生素普遍检出,这可能会引起环境微生物产生抗药性(Arabpour

收稿日期: 2021-03-15 修回日期: 2021-04-25 录用日期: 2021-04-25

基金项目: 国家重点研发计划课题(No.2018YFE0204102);国家自然科学基金(No.51778608)

作者简介: 张星星(1994—)女, E-mail: zhangxx648@nenu.edu.cn; \* 责任作者, E-mail: wxqi@mail.tsinghua.edu.cn

*et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016; Belkacem *et al.*, 2017), 进而影响食品安全和人类健康 (Li *et al.*, 2019)。

混凝/絮凝技术是常用的水处理工艺, 由于絮凝胶体对抗生素的吸附作用很弱, 因此, 该技术对抗生素的去除效果较差 (Kooijman *et al.*, 2020)。高级氧化工艺对饮用水中抗生素的去除效果较好, 但成本较高 (Anjali *et al.*, 2019)。锰氧化菌在海洋、河流、湖泊、土壤及饮用水厂的生物滤池中广泛存在 (王冰清等, 2015), 其产生的生物氧化锰可对抗生素产生吸附和降解作用。生物滤池中的生物氧化锰通过覆盖在滤砂的表面可以很好地去除微量抗生素, 并且不会产生额外的抗性基因 (Cai *et al.*, 2020)。据报道, 锰氧化细菌能够利用天然有机物作为唯一的 C/N 源进行生长, 并将二价锰离子氧化为生物氧化锰, 有效去除生物滤池中的二苯甲酮 (BP-4) (Chang *et al.*, 2018);  $\text{KMnO}_4$  预氧化联合锰氧化细菌能够很好地去除饮用水中的 BP-4 (Jian *et al.*, 2019)。目前生物氧化锰对抗生素的降解机制及抗生素对锰氧化细菌的分子生物学影响机制尚不明确, 因此本研究拟探究锰氧化细菌及其催化产生的生物锰氧化物 (Biogenic manganese oxides, BMO) 对 OTC 的去除机制及 OTC 对该菌功能基因表达的影响, 以期在水处理工程中利用微生物强化去除抗生素等微量污染物奠定理论基础。

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 菌株和培养基

本研究使用的细菌菌株是从浙江嘉兴某湿地分离出的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. QJX-1 (QJX-1) (周娜娜等, 2014), 保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC), CGMCC 序列号为 6630。

本研究使用自制培养基培养菌株, 该培养基组成如下:  $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $11.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2$ 、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (国药集团化学试剂有限公司)、 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素  $\text{B}_1$  (上海迈瑞尔化学技术有限公司)、 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  维生素  $\text{B}_{12}$  和  $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  生物素 (中国甘肃养泰和生物科技有限公司)。培养基使用前加

入  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) (上海迈瑞尔化学技术有限公司) 将 pH 调节至 7.2。文中无特殊说明的化学试剂均为分析纯。

配制方法: 首先配制浓缩 40 倍的储备液 1 (含有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、浓缩 1000 倍的储备液 2 (含有维生素  $\text{B}_1$ 、维生素  $\text{B}_{12}$  和生物素) 和浓缩 50 倍的储备液 3 (含有  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 放于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中保存。储备液 3 配置方法如下: 在酸化 (盐酸调节 pH 到 3.0) 的超纯水中缓慢加入  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  以抑制  $\text{Fe}(\text{III})$  的水解, 然后添加其他金属元素, 并在添加每种金属元素之前确保其它已添加的金属元素已经充分溶解, 未发生沉淀。上述组分中葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  置于灭菌锅中进行高温灭菌 ( $115^\circ\text{C}$ , 25 min), 放置于室温后在洁净台中用  $\phi 25/0.22 \mu\text{m}$  孔径的一次性预灭菌针头式过滤器 (JETBIOFIL 洁特, 中国) 过滤添加储备液 1、储备液 2、储备液 3、 $\text{MnCl}_2$  和 HEPES。

### 2.2 QJX-1 的活化与培养

初始 QJX-1 菌种保存在固体培养基平板上 ( $4^\circ\text{C}$  冰箱), 使用时挑取单个菌落在自制培养基中活化。以下操作均在无菌洁净台中进行: 在 250 mL 锥形瓶中添加 100 mL 的自制培养基, 用接种环从固体培养基上挑取单个菌落接种到上述培养基中。将锥形瓶用无菌封口膜密封后置于摇床中振荡培养 48 h ( $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ), 然后取 10 mL 菌液接种到含 90 mL 新鲜自制培养基的锥形瓶中继续培养 24 h, 将该菌液用作后期培养的接种源, 接种量为 10% (V/V)。所有实验如无特殊说明均设 3 次重复。

### 2.3 生物氧化锰对 OTC 的去除

锰氧化菌接种 48 h 时 (已出现锰氧化现象) 将 OTC (98%, 上海腾准生物科技有限公司) 加入培养基 ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中, 然后振荡培养 288 h ( $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )。在锰氧化菌接种后的 0、24、48、72、96、120、144、168 和 288 h 取样测定菌密度 ( $\text{OD}_{600}$ ), 取 200  $\mu\text{L}$  菌液于 96 孔透明酶标板 (JETBIOFIL 洁特, 中国) 中, 用 Spark™ 10M 酶标仪 (Tecan, 瑞士) 进行测定, 并通过流式细胞仪 (BD, 美国) 单染色法确定  $\text{Mn}^{2+}$  浓度利用电感耦合等离子体光谱仪 (G8015A, 安捷伦 5110 VDV) 测定。QJX-1 形貌采用 JSM7401 型场发射扫描电镜 (FE-SEM, 日本株式会社) 进行

表征. OTC 浓度的测定采用三重四极杆线性离子阱液质联用系统( QTRAP 5500 LC-MS/MS, AB Sciex 液质联用仪, 美国). 在相同条件下, 以不添加 OTC 的培养基作为对照.

为了确定 BMO 在 OTC 去除中的作用, 将 5 L 含  $Mn^{2+}$  的 QJX-1 菌液培养(  $170 r \cdot min^{-1}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}C$ ) 288 h 后离心, 收集 BMO 沉淀进行冷冻干燥. 将干燥后的 BMO 分别加入到含  $5 \mu g \cdot L^{-1}$  和  $50 \mu g \cdot L^{-1}$  OTC 的水溶液中进行培养(  $170 r \cdot min^{-1}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}C$ ) 288 h 后测定水溶液中 OTC 的浓度. 为了确定吸附和氧化作用在 BMO 去除 OTC 中的相对贡献, 在反应 288 h 后的 BMO 悬浮液中加入抗坏血酸, 待 BMO 完全溶解后再次测定水溶液中 OTC 的浓度. 此外, 将  $5 \mu g \cdot L^{-1}$  和  $50 \mu g \cdot L^{-1}$  的 OTC 与 QJX-1 (不含锰) 分别混合培养(  $170 r \cdot min^{-1}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}C$ ) 288 h 后测定 OTC 的浓度以确定活细菌对 OTC 的去除作用. 为了确定菌体吸附在 OTC 去除中的作用, 离心收集 QJX-1 细菌进行冷冻干燥, 分别加入到  $5 \mu g \cdot L^{-1}$  和  $50 \mu g \cdot L^{-1}$  的 OTC 水溶液(不含锰)中, 在  $170 r \cdot min^{-1}$  和  $30 \text{ }^{\circ}C$  条件下反应 288 h 后测定 OTC 浓度.

#### 2.4 RNA-Seq 测定和多铜氧化酶基因 *cumA* 的扩增

将 QJX-1 接种到(不)含  $5 \mu g \cdot L^{-1}$  OTC 的自制培养基(含  $5.0 mg \cdot L^{-1} Mn^{2+}$ ) 中培养. 以加入 OTC 的样品瓶作为实验组, 不加入 OTC 的样品瓶作为对照组, 每组 3 个生物学平行, 在 24、48、72、96、120 和 168 h 时分别取样. 每次取样后将样品离心(  $10000 r \cdot min^{-1}$ , 5 min), 然后将菌体沉淀放入液氮速冻, 之后放入  $-80 \text{ }^{\circ}C$  冰箱保存直至送样.

使用 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂( DP424, 北京天根生化科技有限公司) 提取细菌样品(  $n=3$ ) 总 RNA, 提取后的 RNA 样品检测合格后使用 NEB Next Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina 构建原核转录组文库. 文库检测合格后进行高通量测序( 擎科生物, 中国). 另外, 将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA, 然后对 *cumA* 进行扩增, 扩增引物为: CumA1dg2B, 5'-GAYGCCGGYAGCTACTGGTAYCACCC-3'; CumA1dgR, 5'-ACYTTGAARSYCATGCCRTGCARRTG-3' ( Sambrook *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2001). 实验数据采用 Friedman 检验和事后 LSD( Least significant difference) 检验等方法分析样品之间的差异性, RNA-Seq 测序数据的获取号为 PRJNA720575.

## 3 结果与讨论( Results and discussion)

### 3.1 QJX-1 的生长与适应

菌密度(  $OD_{600}$ ) 变化规律如图 1a 所示, 在 48 h 之前, 未加入 OTC 时, 实验组与对照组的 QJX-1 生长趋势无较大差异. 在 0~24 h 内, QJX-1 的数量急剧增加; 24~48 h 期间, 实验组与对照组的 QJX-1 数量略有下降. 实验组中加入 OTC 后, QJX-1 数量再次增加. 为了排除细菌外泌物对菌密度测定的干扰, 通过流式细胞仪对实验组与对照组的细菌进行直接计数( 图 1b). 结果表明, 添加 OTC 后实验组中的细菌数量增加, 并且大于对照组中的细菌数量, 这说明  $OD_{600}$  再次上升不是外泌物增加导致的. 该结果表明微量的 OTC 对 QJX-1 没有毒害作用, 反而促进了细菌的生长, 这与 Chang 等( 2018) 报道的 BP-4 对 QJX-1 没有毒害作用, 反而促进了细菌的生长现象相似. 该研究指出 BP-4 通过刺激酪氨酸的代谢, 加快 QJX-1 对酪氨酸的消耗, 进而促进 QJX-1 的生长. 另外,  $Mn^{2+}$  浓度的结果表明( 图 1c), 在对照组中, 120 h 时  $Mn^{2+}$  的浓度由初始的  $5 mg \cdot L^{-1}$  降至  $0 mg \cdot L^{-1}$ ; 而实验组中  $Mn^{2+}$  浓度在 72 h 时已经降至  $0 mg \cdot L^{-1}$ , 表明实验组中  $Mn^{2+}$  氧化速率显著提高, 进一步证明微量 OTC 的添加促进了 QJX-1 的生长, 进而促进了  $Mn^{2+}$  转化为 BMO. 卢腾飞( 2010) 报道, 锰氧化菌氧化  $Mn^{2+}$  的过程不是简单的生物直接氧化或者化学间接氧化, 而是生物化学耦合作用, 微生物的生长调控了溶液中的氧化还原环境, 促进了锰氧化物的生成. 常洋洋( 2017) 在 BP-4 促进 QJX-1 锰氧化的机理研究中表明, BP-4 加速了酪氨酸的消耗, 导致超氧化物的上调, 导致机体对饥饿效应的响应提前发生, 可能是 BP-4 加速  $Mn^{2+}$  氧化的原因.

### 3.2 QJX-1 及其生物氧化锰对 OTC 的去除

为探究 QJX-1 及其生物氧化锰对 OTC 的去除情况, 将 OTC 于 48 h 时分别添加到(不)含有  $Mn^{2+}$  的培养基中, 利用 LC-MS/MS 对不同时间点样品的 OTC 浓度进行测定, 结果如图 2a 所示. 在有生物氧化锰生成的实验组中, 48~72 h 期间 OTC 的去除速率最快, 该阶段 QJX-1 数量增多,  $Mn^{2+}$  被完全氧化; 72~144 h 期间 OTC 浓度稳定下降, 同时 QJX-1 数量逐渐下降; 288 h 时 OTC 被完全去除. 在无  $Mn^{2+}$  的对照组中, OTC 浓度基本不变, 表明 QJX-1 细菌本身对微量的 OTC 的去除效果不明显, 这与常洋洋( 2017) 关于 QJX-1 及其生物氧化锰对 BP-4 的去除

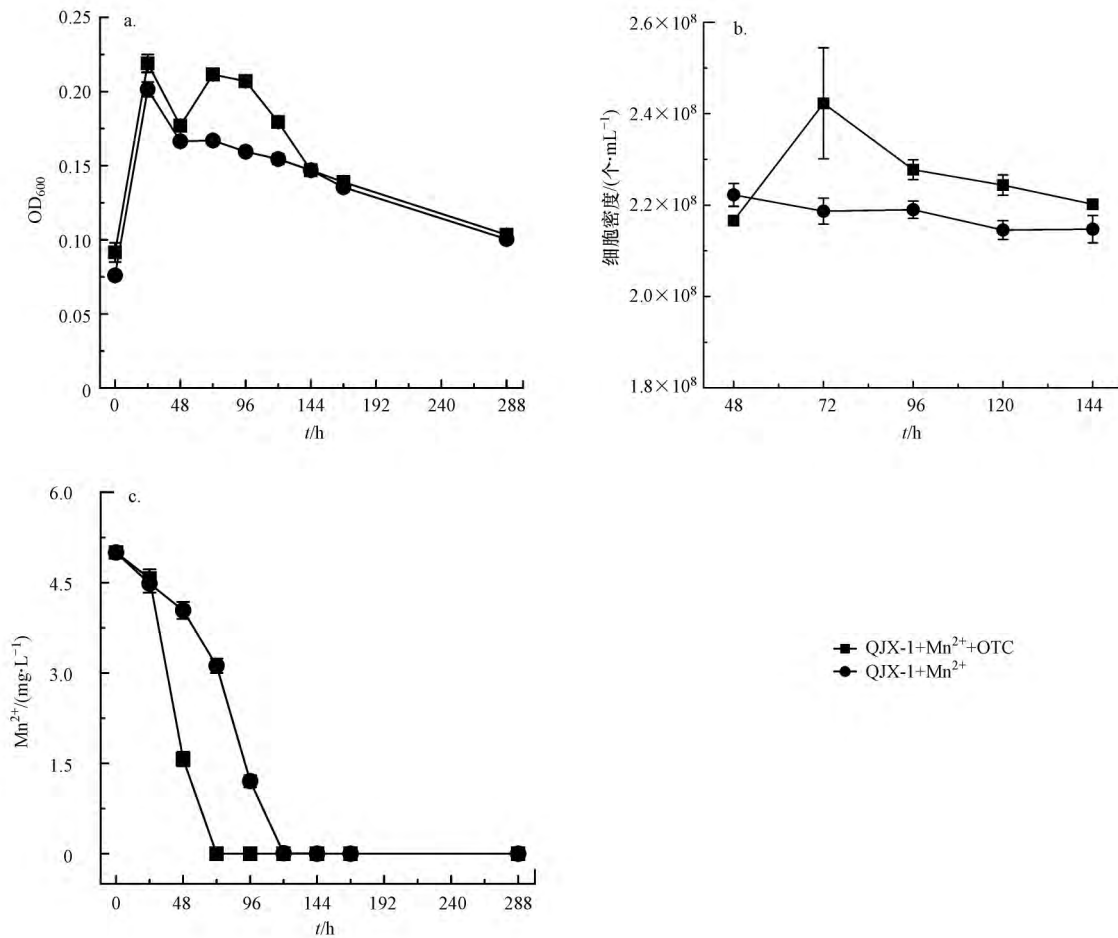


图1 OTC对QJX-1生长(a)、数量(b)的影响及添加OTC对QJX-1诱导锰氧化过程的影响(c) (pH=7.2, 温度(30.0±0.2) °C, 反应时间288 h)

Fig.1 The effect of OTC on the growth (a) and quantity (b) of QJX-1 and the effect of adding OTC on the process of QJX-1 induced manganese oxidation (c) (pH=7.2,  $T=(30.0\pm 0.2)$  °C,  $t=288$  h)

作用结果一致,表明BMO在去除OTC中发挥了重要作用,这与Fungal等(2015)报道“BMO在污染物去除过程中起着很大的作用,BMO可以完全去除污水中的类固醇激素雌酮和17- $\alpha$ 炔雌二醇”的结论相符。

BMO具有很好的吸附氧化能力,为了确认吸附和氧化作用在去除OTC过程中分别发挥的作用,本研究从培养基中分离了BMO单独考察其对OTC的去除(图2b)。结果表明,初始浓度为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的OTC分别与1.0 g的BMO反应288 h后,溶液中OTC浓度分别为 $0.015\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $11.155\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,经计算得BMO对OTC的去除量分别为 $0.4985\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $3.8845\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。加入抗坏血酸溶解BMO后的OTC浓度分别为 $4.765\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $38.165\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

(图2b),经计算得BMO对OTC的吸附量分别为 $0.475\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $2.701\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,对OTC的氧化去除量分别为 $0.0235\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1.1835\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在OTC浓度较高( $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )时,吸附和氧化作用都扮演着重要角色;在OTC浓度较低( $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )时,吸附作用占主导。无论OTC浓度高低与否,活/死细菌对OTC的去除作用均很小。综上可得,QJX-1及其生物氧化锰对不同浓度OTC的去除效果存在差异,该研究结果与田雨等(2018)的结果类似,田雨等(2018)在锰氧化菌对双氯芬酸、萘普生、乙炔基雌二醇的去除研究中发现,当去除率分别为100%、65.5%和100%时,其中生物氧化锰吸附贡献的去除率分别为75.5%、35.7%和78.3%,表明吸附与氧化均发挥作用,但贡献比例与物质结构及浓度有关。

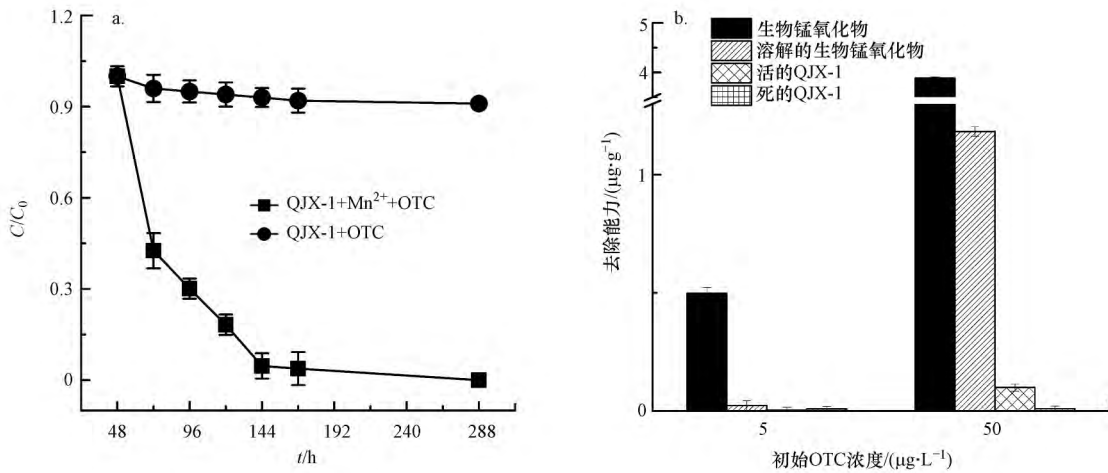


图2 QJX-1 及其生物氧化锰对 OTC 的去除 (a) 及去除机制 (b) ( pH=7.2 , 温度( 30.0±0.2) °C , 反应时间 288 h)

Fig.2 Removal of OTC by QJX-1 and its biogenic manganese oxides ( a) and removal mechanism ( b) ( pH=7.2 ,  $T=( 30.0 \pm 0.2)$  °C ,  $t=288$  h)

### 3.3 QJX-1 中 ABC 转运蛋白相关基因表达的改变

在革兰氏阴性菌中,ABC( ATP-binding cassette) 转运蛋白是形成外排泵的一部分和跨越整个细胞膜并介导外膜转运的组件,它能排出菌体中的抗生素并从革兰氏阴性菌中输出毒力因子( Greene *et al.* , 2018). 在分析不同培养时间( 未) 添加 OTC 的 QJX-1 基因表达水平差异时,发现 *pstA*、*pstB*、

*pstC*、*urtA* 和 *urtD* 等 ABC 转运蛋白基因的丰度发生了显著变化( 图 3). *pstA*、*pstB* 和 *pstC* 基因在 72 h 和 96 h 时显著升高(  $p < 0.001$  ,  $n=3$ ) , *urtA* 和 *urtD* 基因在 96、120 和 168 h 时呈显著升高的趋势(  $p < 0.001$  ,  $n=3$ ) ,说明这些基因在排出细胞内的 OTC 时起着重要作用. Guillaume 等( 2015) 的研究表明,转运蛋白形成的外排泵可以以牺牲一个质子为代价从细

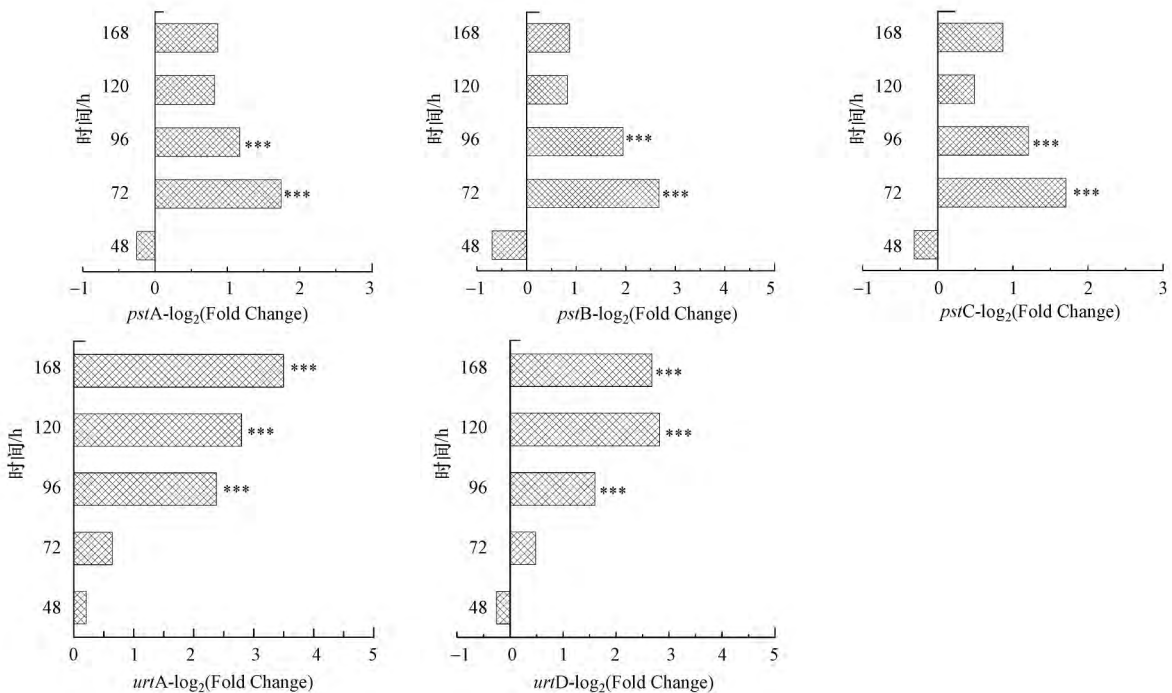


图3 不同培养时间的 ABC 转运蛋白基因转录水平差异( OTC 添加与未添加时基因表达水平比值, 采用 Friedman 检验和事后 LSD 检验方法计算  $p$  值, \*\*  $p < 0.01$  , \*\*\*  $p < 0.001$  , 无显著差异(  $p \geq 0.05$ ) 的数据未显示)

Fig.3 Differences in ABC transporter gene transcriptional levels at different culture times( Use Friedman test and post-mortem LSD test to calculate the  $p$  value , \*\*  $p < 0.01$  , \*\*\*  $p < 0.001$  , Data with no significant difference (  $p$  value  $\geq 0.05$ ) is not shown)

胞内部排出四环素.因此,OTC 可能是通过 ABC 转运蛋白泵出 QJX-1 体内,进而让 BMO 更有效地接触 OTC,达到 OTC 被吸附、氧化去除的目的.

### 3.4 多铜氧化酶基因的扩增分析

多铜氧化酶被认为是锰氧化模式菌锰氧化活性的必需成分 (Corstjens *et al.*, 1997; Brouwers *et al.*, 1999; Tebo *et al.*, 2001; Ridge *et al.*, 2007; Dick *et al.*, 2008). 因为编码多铜氧化酶的基因受损会导致其丧失锰氧化活性.未添加 OTC 和添加 OTC 后 QJX-1 中多铜氧化酶相关的基因 (*cumA*) 表达丰度如图 4 所示.*cumA* 基因在 48、72、96 和 120 h 时显著升高 ( $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ),表明 OTC 的添加促进了 *cumA* 基因的表达,增强了锰氧化活性,进而加速了 BMO 的生成.常洋洋等 (2017) 的研究表明, BP-4 的加入并没有明显提高 *cumA* 基因的相对丰度,但促进了超氧化物和过氧化氢的产生,这可能是锰氧化提前发生的原因.由此可见, BP-4 和 OTC 促进 QJX-1 锰氧化的作用机理不同,不同结构类型微量有机污染物对锰氧化细菌的生长和作用机理还待深入研究.

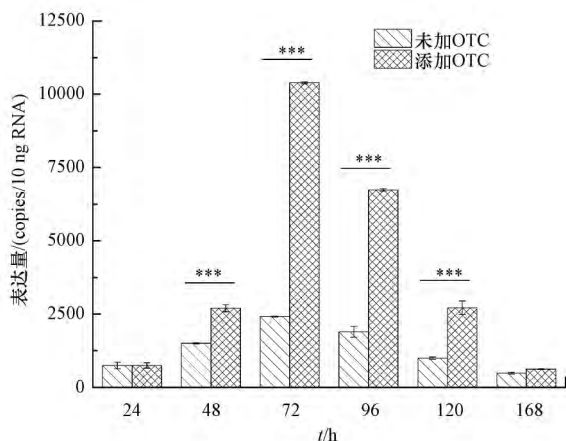


图 4 OTC 对 QJX-1 *cumA* 基因表达量的影响 (采用双尾非配对 T 检验方法计算  $p$  值, \*\*\*  $p < 0.001$ )

Fig.4 Copy number of *cumA* gene at different time points in QJX-1 with and without OTC (Two-tailed unpaired T test method was used to calculate the  $p$  value, \*\*\*  $p < 0.001$ )

## 4 结论 (Conclusions)

1) 微量 OTC 的添加可促进 QJX-1 的生长及其对  $Mn^{2+}$  的氧化, QJX-1 及其生物氧化锰在第 288 h 时可 100% 去除 OTC.

2) 微量 OTC 的加入导致细菌中 *pstA*、*pstB*、*pstC*、*urtA* 和 *urtD* 等 ABC 转运蛋白基因表达上调,

表明这些基因在泵出 QJX-1 细胞内的 OTC 时起着重要的作用, OTC 可能是通过 ABC 转运蛋白泵出 QJX-1 体内.

3) 微量 OTC 的添加促进了 QJX-1 中多铜氧化酶基因的表达, 进一步证明了微量的 OTC 可促进细菌对  $Mn^{2+}$  的氧化和生物氧化锰的形成, 进而有利于 OTC 的去除.

### 参考文献 (References):

- Alcock R E, Sweetman A, Jones K C. 1999. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties [J]. *Chemosphere*, 38 (10): 2247-2262
- Anjali R, Shanthakumar S. 2019. Insights on the current status of occurrence and removal of antibiotics in wastewater by advanced oxidation processes [J]. *Journal of Environmental Management*, 246: 51-62
- Belkacem S, Souad B, Malika C. 2017. Study of oxytetracycline degradation by means of anodic oxidation process using platinumized titanium (Ti/Pt) anode and modeling by artificial neural networks [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 111: 170-179
- Brambilla G, Patrizi M, Filippis S, *et al.* 2007. Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands [J]. *Analytica Chimica Acta*, 586: 326-329
- Brouwers G J, de Vrind J P M, Corstjens P, *et al.* 1999. *cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in  $Mn^{2+}$  oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 65(4): 1762-1768
- Brouwers G J, Vrijenboom P L. 2000. Bacterial  $Mn^{2+}$  oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions [J]. *Geomicrobiology Journal*, 17(1): 1-24
- Cai Y, He J, Zhang J, *et al.* 2020. Antibiotic contamination control mediated by manganese oxidizing bacteria in a lab-scale biofilter [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 98: 47-54
- Chang Y, Bai Y, Yang H, *et al.* 2018. Benzophenone-4 promotes the growth of a *Pseudomonas* sp. and biogenic oxidation of  $Mn(II)$  [J]. *Environmental Science & Technology*, 52(3): 1262-1269
- 常洋洋. 2017. 饮用水源水化合物的氯化复合致毒机制与控制 [D]. 北京: 中国科学院大学
- Corstjens P L A M, De Vrind J P M, Goosen T, *et al.* 1997. Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 *mofA* gene, a gene putatively encoding a manganese-oxidizing protein with copper domains [J]. *Geomicrobiology Journal*, 14(2): 91-108
- Dick G J, Torpey J W, Beveridge T J, *et al.* 2008. Direct identification of a bacterial Manganese (II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5): 1527-1534
- Francis C A, Tebo B M. 2001. *cumA* multicopper oxidase genes from diverse  $Mn(II)$ -oxidizing and non- $Mn(II)$ -oxidizing *Pseudomonas* strains [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 67(9): 3333-3341

- 4272-4278
- Furgal K M , Meyer R L , Bester K. 2015. Removing selected steroid hormones biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles in situ at ppb levels [J]. *Chemosphere* ,136: 321-326
- Green M R , Sambrook J. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual [J]. *Analytica Biochemistry* ,186( 1) : 182-183
- Greene N P , Elise K , Allister C , *et al.* 2018. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective [J]. *Frontiers in Microbiology* 9( 950) : 950-953
- Guillaume G , Ledent V , Moens W , *et al.* 2004. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited [J]. *Microbial Drug Resistance* ,10( 1) : 11-26
- Jian Z , Bai Y , Chang Y , *et al.* 2018. Removal of micropollutants and cyanobacteria from drinking water using  $\text{KMnO}_4$  pre-oxidation coupled with bioaugmentation [J]. *Chemosphere* 215: 1-7
- Kooijman G , Kreuk M , Houtman C , *et al.* 2020. Perspectives of coagulation/flocculation for the removal of pharmaceuticals from domestic wastewater: A critical view at experimental procedures [J]. *Journal of Water Process Engineering* 34: 101161
- Li Z J , Qi W N , Feng Y , *et al.* 2019. Degradation mechanisms of oxytetracycline in the environment [J]. *Journal of Integrative Agriculture* 9: 1953-1960
- 卢腾飞. 2010. 土壤中锰氧化菌的筛选及氧化  $\text{Mn}^{2+}$  的特性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学
- Narges A , Nezamzadeh-Ejehieh A. 2016. Photodegradation of cotrimaxazole by clinoptilolite-supported nickel oxide [J]. *Process Safety & Environmental Protection* ,102: 431-440
- Patkari M , Kumbhar C , Nag A , *et al.* 2018. Distinct transcriptomic response of *S. coelicolor* to ciprofloxacin in a nutrient-rich environment [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 10623-10643
- Ridge J P , Lin M , Larsen E I , *et al.* 2007. A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 [J]. *Environmental Microbiology* , 9( 4) : 944-953
- Thaker M , Spanogiannopoulos P , Wright G D. 2010. The tetracycline resistome [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls* ,67( 3) : 419-431
- 田雨. 2018. 锰氧化菌的激活及生物氧化锰去除有机药物效果的研究 [D]. 重庆: 重庆大学
- 王冰清, 张丽梅, 于丹婷, 等. 2015 土壤及铁锰结核中锰氧化菌的氧化特性分析 [J]. *环境科学学报* 35( 1) : 262-269
- Xu Y , Guo C , Luo Y , *et al.* 2016. Occurrence and distribution of antibiotics antibiotic resistance genes in the urban rivers in Beijing , China [J]. *Environmental Pollution* 213: 833-840
- 周娜娜, 柏耀辉, 梁金松, 等. 2014. *Pseudomonas* sp. QJX-1 的锰氧化特性研究 [J]. *环境科学* 35( 2) : 740-745