

## 研究报告

## 复苏促进因子耦合解鸟氨酸柔武氏菌 CC12 降解氯霉素废水及其微生物群落的演替规律

徐伟龙<sup>1</sup>, 徐展博<sup>1</sup>, 刘思涵<sup>1</sup>, 崔静<sup>1</sup>, 赵雷真<sup>1</sup>, 屈建航<sup>1</sup>, 周佳<sup>\*1,2</sup><sup>1</sup> 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450000<sup>2</sup> School of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales, Sydney 2052, Australia

徐伟龙, 徐展博, 刘思涵, 崔静, 赵雷真, 屈建航, 周佳. 复苏促进因子耦合解鸟氨酸柔武氏菌 CC12 降解氯霉素废水及其微生物群落的演替规律[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3058-3070.

XU Weilong, XU Zhanbo, LIU Sihan, CUI Jing, ZHAO Leizhen, QU Jianhang, ZHOU Jia. Coupling resuscitation-promoting factor (Rpf) with *Raoultella ornithinolytica* CC12 enhances degradation of chloramphenicol in wastewater: performance and microbial community succession[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3058-3070.

**摘要:**【背景】氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素,其胁迫作用可能会导致功能微生物进入活的但不可培养状态(viable but non-culturable, VBNC)而降低其对抗生素的降解能力。【目的】为了缓解这一状态,本研究利用复苏促进因子(resuscitation promoting factor, Rpf)与氯霉素降解菌解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*) CC12 联合活性污泥降解 CAP 废水,并解析该过程中微生物群落结构的演替规律。【方法】利用菌株 IAM 14879 制备 Rpf,通过在活性污泥中分别投加降解菌 CC12 与 Rpf,考察其对氯霉素的强化效果,进而采用高通量测序技术解析不同处理组中微生物群落的演替规律。【结果】在活性污泥中投加降解菌 CC12 后对 230 mg/L CAP 废水的降解率从 56.41%提高至 89.98%;而在活性污泥中投加 Rpf 则进一步将 CAP 降解率提升至 93.53%,并且其紧密结合胞外聚合物(tightly-bound extracellular polymeric substance, EPS-TB)的荧光峰强度最高。高通量测序结果表明在活性污泥中投加 Rpf 后微生物的多样性和相对丰度增加,红球菌属(*Rhodococcus*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、norank\_f\_AKYH767 在该系统内明显富集,尤其是 *Rhodococcus* 成为优势菌属。【结论】Rpf 的投加提高了 CAP 废水的降解效能,具有广阔的应用前景。

**关键词:** 复苏促进因子; 氯霉素; 降解菌; 微生物降解; 微生物群落

资助项目: 国家自然科学基金(42107139); 河南工业大学青年骨干教师培育计划(21421206); 国家留学基金委地方合作项目(202308410458)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42107139), the Cultivation Program for Young Backbone Teachers in Henan University of Technology (21421206), and the China Scholarship Council Local Cooperation Project (202308410458).

\*Corresponding author. E-mail: Jzhou@haut.edu.cn

Received: 2024-11-06; Accepted: 2024-12-14; Published online: 2024-12-31

## Coupling resuscitation-promoting factor (Rpf) with *Raoultella ornithinolytica* CC12 enhances degradation of chloramphenicol in wastewater: performance and microbial community succession

XU Weilong<sup>1</sup>, XU Zhanbo<sup>1</sup>, LIU Sihan<sup>1</sup>, CUI Jing<sup>1</sup>, ZHAO Leizhen<sup>1</sup>, QU Jianhang<sup>1</sup>, ZHOU Jia<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, Henan, China

<sup>2</sup> School of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales, Sydney 2052, Australia

**Abstract:** [Background] Chloramphenicol (CAP) is a broad-spectrum antibiotic that can induce stress in functional microorganisms, driving them into the viable but non-culturable (VBNC) state and diminishing their antibiotic degradation capacity. [Objective] To address this challenge, we coupled the resuscitation-promoting factor (Rpf) with the chloramphenicol-degrading bacterium *Raoultella ornithinolytica* CC12 and activated sludge to enhance the treatment of CAP-containing wastewater. Furthermore, we elucidated the microbial community succession during this process. [Methods] Rpf prepared using strain IAM 14879, and the Rpf and strain CC12 were added into activated sludge to evaluate its enhancement for CAP removal, and high-throughput sequencing technology was employed to analyze the succession of microbial communities in different treatment groups. [Results] The results indicated that the addition of strain CC12 to the activated sludge increased the degradation rate of 230 mg/L CAP in wastewater from 56.41% to 89.98%. The addition of Rpf into the activated sludge increased the degradation rate of CAP to 93.53% and resulted in the highest fluorescence peak intensity of tightly-bound extracellular polymeric substance (EPS-TB). The high-throughput sequencing results demonstrated that the diversity and abundance of microorganisms in the activated sludge increased after the addition of Rpf, with notable enrichment of *Rhodococcus*, *Cupriavidus*, and *norank\_f\_AKYH767*. Particularly, *Rhodococcus* became the dominant genus. [Conclusion] Rpf improved the degradation efficiency of CAP in wastewater, demonstrating the potential for broad application in antibiotic-containing wastewater treatment.

**Keywords:** resuscitation-promoting factor; chloramphenicol; degrading bacteria; microbial degradation; microbial community

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素,在各种细菌、真菌和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)引起的感染等治疗方面广泛应用,但其造成的极端副作用也不容忽视,如白血病、灰婴综合征、神经毒性反应<sup>[1-2]</sup>,虽然目前CAP的应用被加以限制,但由于其分子结构中有硝基苯环和二氯乙酰胺等难降解基团,因此仍然在水体环境中不断被检测出来,逐渐暴露出一系列环境与健康问题<sup>[3]</sup>,因此开发环境友好

型高效低成本的CAP废水处理方法迫在眉睫。

目前,CAP废水的处理方法主要包括物化法和生物法,但物化法成本较高,并且易带来二次污染。生物法则是利用微生物自身的新陈代谢过程分解转化CAP,具有条件温和、高效、无二次污染等优势<sup>[4]</sup>。徐超等<sup>[5]</sup>利用菌藻共生污泥处理CAP废水,对10 mg/L CAP去除率为74%。虽然活性污泥法处理抗生素废水时容易因为污泥的絮凝能力和脱水能力降低而导

致其降解效率降低<sup>[6-8]</sup>。因此, CAP 降解菌的分离筛选显得尤为重要。史可等<sup>[9]</sup>从 CAP 长期胁迫环境中分离了一株 CAP 降解菌 CAP-2, 24 h 对 50 mg/L 的 CAP 降解率为 36.3%。Zhao 等<sup>[10]</sup>从粪便中分离获得的厌氧 CAP 降解菌费氏埃希氏菌(*Escherichia fergusonii*), 12 d 对 55 mg/L CAP 的降解率为 84%。其他 CAP 降解菌还包括矿杆菌属(*Metallibacterium*)<sup>[11]</sup>、鞘氨醇胞菌属(*Sphingosinicella*)<sup>[12]</sup>等。但是, 目前已分离得到的 CAP 降解菌的种类和能力有限<sup>[13]</sup>, 这可能是因为 CAP 的胁迫导致那些具有降解功能的微生物处于活的但不可培养状态(viable but non-culturable, VBNC)。因此, 解除功能微生物的 VBNC 状态, 有助于挖掘新颖且高效的 CAP 降解菌种资源。

复苏促进因子(resuscitation promoting factor, Rpf)是最早被鉴定出来的一种原核生物自分泌生长因子, 具有恢复微生物生长繁殖的作用<sup>[14-15]</sup>, 可在一定程度上缓解 VBNC 状态。李欣怡等<sup>[16]</sup>发现其筛选的微杆菌属(*Microbacterium*)等 9 个属的菌株对 Rpf 响应明显。李鸿炫<sup>[17]</sup>发现 Rpf 可提高土壤中可培养菌总数, 并会影响土壤中微生物的菌群相对丰度和物种多样性, 并且能显著提高土壤中红球菌属(*Rhodococcus*)和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)的相对丰度, 同时可以促进部分处于 VBNC 状态的解联苯红球菌(*Rhodococcus biphenylivorans*)生长, 强化多氯联苯降解效果。同时, 以往研究通过添加 Rpf, 已从环境样品中分离到 *Rhodococcus*、节杆菌属(*Arthrobacter*)、*Microbacterium*、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)的有机污染降解菌<sup>[18-19]</sup>。因此, 本研究利用 Rpf 与实验室前期筛选的高效 CAP 降解菌解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*) CC12 耦合活性污泥, 探究不同组合对 CAP 废水的降解效果, 并分析其对微生物群落结构及降解效率的影响, 以期为 Rpf 强化微生物修复技术在 CAP 废水的应用提供理论基础, 并为 CAP

污染治理提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*) CC12 分离筛选于处理氯霉素废水的活性污泥中<sup>[20]</sup>。藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) IAM 14879 购于日本东京大学分子细胞生物学研究所菌种保藏中心。

### 1.2 培养基

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基(g/L): NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 琼脂 15.0, pH 7.2, 121 °C 灭菌 20 min。LMM 培养基参考文献[18]配制。基础培养基(minimal medium, MM) (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.50, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.50, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15, NaCl 1.00, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。模拟 CAP 废水(g/L): CAP (浓度依具体情况定), C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O 1.914, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 0.281, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.067, NH<sub>4</sub>Cl 0.229, CaCl<sub>2</sub> 0.023, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.049, 微量元素 0.5 mL/L, 121 °C 灭菌 20 min。微量元素成分(g/L): FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.50, MnCl<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.12, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.12, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.06, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.03, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.15, KI 0.03, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.15。CAP 储备液(5 000 mg/L): 称取 0.5 g CAP 于适量色谱级甲醇中, 蒸馏水定容至 100 mL, 采用无菌的 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装, -20 °C 贮存。

### 1.3 主要试剂和仪器

氯霉素、磷酸盐缓冲液(PBS), 北京索莱宝科技有限公司, 纯度≥99%; 细菌基因组提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒及土壤基因组提取试剂盒(Rapid Soil DNA Isolation Kit), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 分析纯试剂, 天津市科密欧化学试剂有限公司。恒温振荡培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 分析液相色谱仪和荧光分光光度计, 岛津公司。

## 1.4 Rpf 的制备

挑取适量新鲜的菌株 IAM 14879 接种于 NA 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 24 h 后 8 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液。用 LMM 液体培养基洗涤菌体, 8 000 r/min 再次离心 5 min, 倒去上清液, 利用 LMM 液体培养基重悬菌体, 调整其  $OD_{600}$  为 1.0, 按照 5% 的接种量接种于 LMM 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 24 h 后 10 000 r/min 离心 10 min, 抽提除去菌体, 用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤除菌后于 -20 °C 贮存备用, 即为 Rpf。

## 1.5 菌株 CC12 菌悬液的制备

挑取适量新鲜的菌株 CC12 接种于 NA 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 24 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液。用 MM 液体培养基洗涤菌体, 8 000 r/min 再次离心 5 min, 倒去上清液。重复 3 次后利用无菌 MM 液体培养基调整  $OD_{600}$  为 1.0, 即为菌株 CC12 菌悬液。

## 1.6 活性污泥耦合菌株 CC12 与 Rpf 降解 CAP 废水

分别设置 4 组不同的组合。空白对照组 (C1): 活性污泥+CAP 废水; 污泥+优势菌组 (C2): 活性污泥+菌株 CC12+CAP 废水; 污泥+优势菌+Rpf 组 (C3): 活性污泥+菌株 CC12+Rpf+CAP 废水; 污泥+Rpf 组 (C4): 活性污泥+Rpf+CAP 废水。

活性污泥收集自郑州市五龙口污水处理厂, 每个体系的总体积为 800 mL, 体系中活性污泥浓度均为 4 000 mg/L, 体系内 CAP 浓度逐步从初始的 50 mg/L 逐渐增加到 90、140、230 mg/L。每次增加 CAP 浓度后分别投加菌株 CC12 和 Rpf, 其中菌株 CC12 的投加量为 5%, Rpf 投加量为 1%, 溶解氧为 7 mg/L, 在室温 25 °C 运行。每曝气 8 h, 停止曝气 1 h, 48 h 时收集上清液, 在 8 000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min, 采用高效液相色谱法测定不同体系中 CAP 的含量。

高效液相色谱法采用 Agilent ZORBAX SB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 检测波长为 278 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 10.00  $\mu$ L, 流速为 1.00 mL/min, 流动相 A 相为甲醇, B 相为纯净水, 采用等度洗脱 (A:B=65:35), 所有测定均设置 3 个平行。

## 1.7 胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)提取与三维荧光光谱分析

分别收集活性污泥 40 mL 于离心管中, 6 000 r/min 离心 5 min。采用热提取法提取活性污泥中的 EPS, 将磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4) 预热至 70 °C, 补充 PBS 到 40 mL, 升温至 50 °C, 涡旋 60 s, 再次 6 000 r/min 离心 10 min, 此时上清液为疏松结合胞外聚合物 (loosely-bound extracellular polymeric substances, EPS-LB)。补充 PBS 到 40 mL, 60 °C 水浴 30 min, 6 000 r/min 离心 30 min, 得到紧密结合胞外聚合物 (tightly-bound extracellular polymeric substance, EPS-TB)。将 EPS-LB、EPS-TB 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后进行荧光扫描<sup>[21]</sup>。激发光源为氙灯, 光电倍增管电压为 700 mV, 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm。激发光 (excitation, Ex) 与发射光 (emission, Em) 扫描范围均为 250–550 nm, 数据间隔均为 5 nm, 扫描速度为 6 000 nm/min。采用 Origin 软件进行绘图。

## 1.8 不同处理体系中微生物群落结构的变化

分别收集原始接种污泥和实验结束后 C1、C2、C3、C4 体系末期的污泥样品进行显微镜观察, 同时送至上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。使用 Rapid Soil DNA Isolation Kit 提取样本的 DNA, 选用 5'端带有特异性识别序列 (barcode) 的 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 16S rRNA 基因的 V3–V4 区域。测序后, 从 5 个样本中分别获得了 43 243–76 359 条有效序列。为了比较不同样品间的操作分类单元 (operational taxonomic

units, OTUs)相对丰度, 将每个样品的测序深度归一化至 43 243, 这些有效序列被聚类为 OTU, 序列相似性为 97%, 根据核糖体数据库项目(ribosomal database project, RDP)进行分类学分类, 利用 Mothur 计算出 Simpson、Shannon、Chao1、ACE 指数和覆盖率。使用费舍尔精确检验对 2 个样本间物种的相对丰度差异进行比较, 获得物种在 2 个对比样本中的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同体系对不同浓度 CAP 废水的处理效果

不同组合对不同浓度 CAP 废水的降解效果如图 1 所示, 当 CAP 浓度为 50 mg/L 时, 其对 CAP 废水的降解能力相近, CAP 降解率均在 70.00%左右(图 1A)。当 CAP 浓度增加到 90 mg/L 时, 活性污泥+Rpf 组(C4)的 CAP 降解

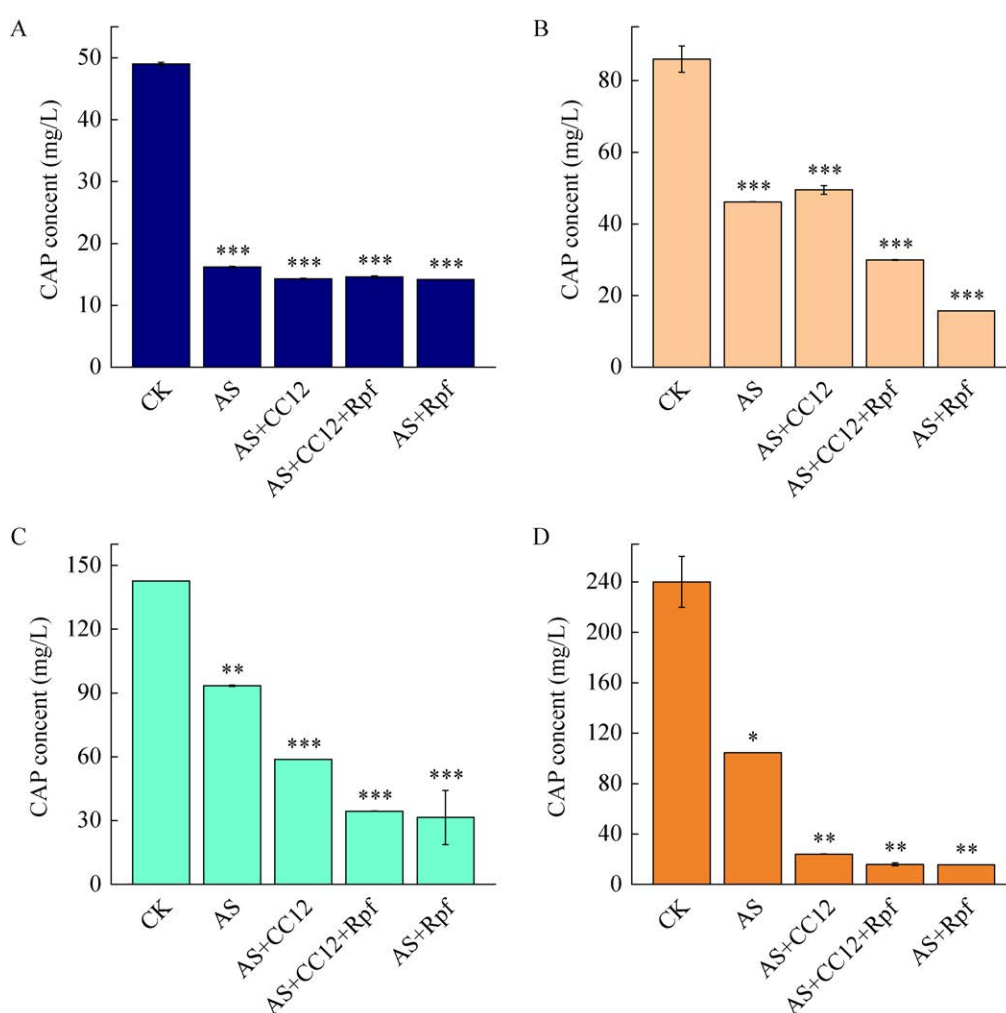


图 1 不同处理组对不同浓度氯霉素废水的降解效果 A: 50 mg/L; B: 90 mg/L; C: 140 mg/L; D: 230 mg/L. CK: 原始接种污泥; AS: 活性污泥(C1 组); AS+CC12 (C2 组); AS+CC12+Rpf (C3 组); AS+Rpf (C4 组)。

Figure 1 Degradation performance of chloramphenicol wastewater under different treatment groups. A: 50 mg/L; B: 90 mg/L; C: 140 mg/L; D: 230 mg/L. CK: Original inoculated sludge; AS: Activated sludge (C1); AS+CC12 (C2); AS+CC12+Rpf (C3); AS+Rpf (C4). \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

效果最优(图 1B)。当 CAP 浓度进一步增加至 140 mg/L, 仍然是 C4 组对 CAP 废水的降解效果最佳, 其次是活性污泥+CC12+Rpf 组(C3)(图 1C)。当 CAP 浓度提高至 230 mg/L 时, 此时 C1 组对 CAP 降解率最低, 为 56.41%, 添加高效 CAP 降解菌 CC12 的 C2 组对 CAP 降解率为 89.98%, 而 C4 组对 CAP 降解率最高, 为 93.53% (图 1D)。

## 2.2 不同 CAP 降解体系的三维荧光光谱分析

由图 2 可知, 不同处理体系中 EPS-TB 均有 1 个特征峰 A, 特征峰中心位于  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280\text{ nm}/340\text{ nm}$ , 荧光强度在 200 000–270 000 a.u.。其中 C4 组荧光峰强度最高; 而在 EPS-LB 中, 特征峰中心位于  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280\text{ nm}/335\text{ nm}$ , 荧光强度在 90 000–180 000 a.u., 这说明 EPS-TB 和 EPS-LB 虽分别位于污泥的内层和外层, 但其组分和物质结构相似, 主要是类溶解性微生物代谢产物, 由于 EPS-TB 的荧光强度更高, 说明其具有更高的物质浓度, 活性污泥主要通过分泌类溶解性微生物代谢产物以抵抗 CAP 的胁迫。

## 2.3 不同处理系统内微生物群落演替规律

### 2.3.1 微生物群落的丰富度和多样性

微生物是活性污泥的重要组成部分, 在生物降解 CAP 的过程中发挥着重要作用。高通量测序结果表明原始接种污泥(CK), 空白对照组(C1); 污泥+优势菌组(C2); 污泥+优势菌+Rpf 组(C3); 污泥+Rpf 组(C4)中微生物的覆盖率为 98.86%–99.23% (表 1), 表明此次测序几乎覆盖了大部分的微生物。CK 的 Shannon 指数最高, Simpson 指数最低, 说明原始接种污泥中微生物的多样性最高。Chao1 指数和 ACE 指数与微生物的相对丰度呈正相关, 由此可以看出, 在 CAP 胁迫下 Rpf 的投加能够促进复苏原始污泥中部分微生物, 使其多样性和相对丰度增加, 表明 Rpf 蛋白对降解功能微生物具有一定的复苏促进作用。由图 3 看出, CK 组中

OTU 数目最多, 说明在 CAP 抑制下不同处理体系中活性污泥样品的 OTU 数目明显降低, C4 中独有的 OTU 数目最多, 说明仅投加 Rpf 后提高了微生物的 OTU 数量。此外, 这些样品共有的 OTU 仅有 190 个, 在各组独有的 OTU 中, C1 组中 *norank\_f\_\_norank\_o\_\_Defluviicoccales* 占比最高, 为 23.08%; C2 组芽殖球菌属(*Blastococcus*)和棒杆菌属(*Corynebacterium*)各占 25.00%; C3 组漠河杆菌属(*Moheibacter*)占比最高, 为 33.33%; C4 组中肠球菌属(*Enterococcus*)、伊丽莎白金菌属(*Elizabethkingia*)和 *norank\_f\_\_Mitochondria* 占比较高, 均为 13.64%, 说明不同组合在 CAP 的作用下微生物的群落结构发生了明显的变化。

### 2.3.2 微生物群落结构组成

在门水平上(图 4), 原始接种污泥样品中变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、放线菌门(*Actinomycetota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)为优势菌门, 分别占 33.96%、19.83%、12.41%、8.75%, 其中变形菌门和拟杆菌门在不同 CAP 废水组合中的相对丰度均呈增加趋势, 而绿弯菌门则相反。相较于原始污泥, 拟杆菌门的相对丰度在 C1 中基本保持不变, 而在其他 3 组中呈增加趋势, 尤其是在 C4 组中; 此外, 放线菌门在 C1、C2 和 C3 组中均呈降低趋势, 而在 C4 组中的相对丰度与原始接种污泥中基本一致, 说明 Rpf 的投加促进了拟杆菌门和放线菌门微生物的生长。

在属水平上, CK 组的优势菌属为 *norank\_f\_\_JG30-KF-CM45* (6.97%)、安泰英菌属(*Ahniella*) (9.79%)、*norank\_f\_\_Caldilineaceae* (5.85%) (图 5A), 然而 *Ahniella* 在不同 CAP 废水处理系统中几乎无法检测到, 说明其无法适应 CAP 废水的环境。相较于 C1 组, 投加优势降解菌的 C2 组中丛毛单胞菌属(*Comamonas*)的相对丰度显著降低, 但是生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、*unclassified\_f\_\_Comamonadaceae*、贪铜菌属(*Cupriavidus*)的相对丰度显著增加(图 5B);



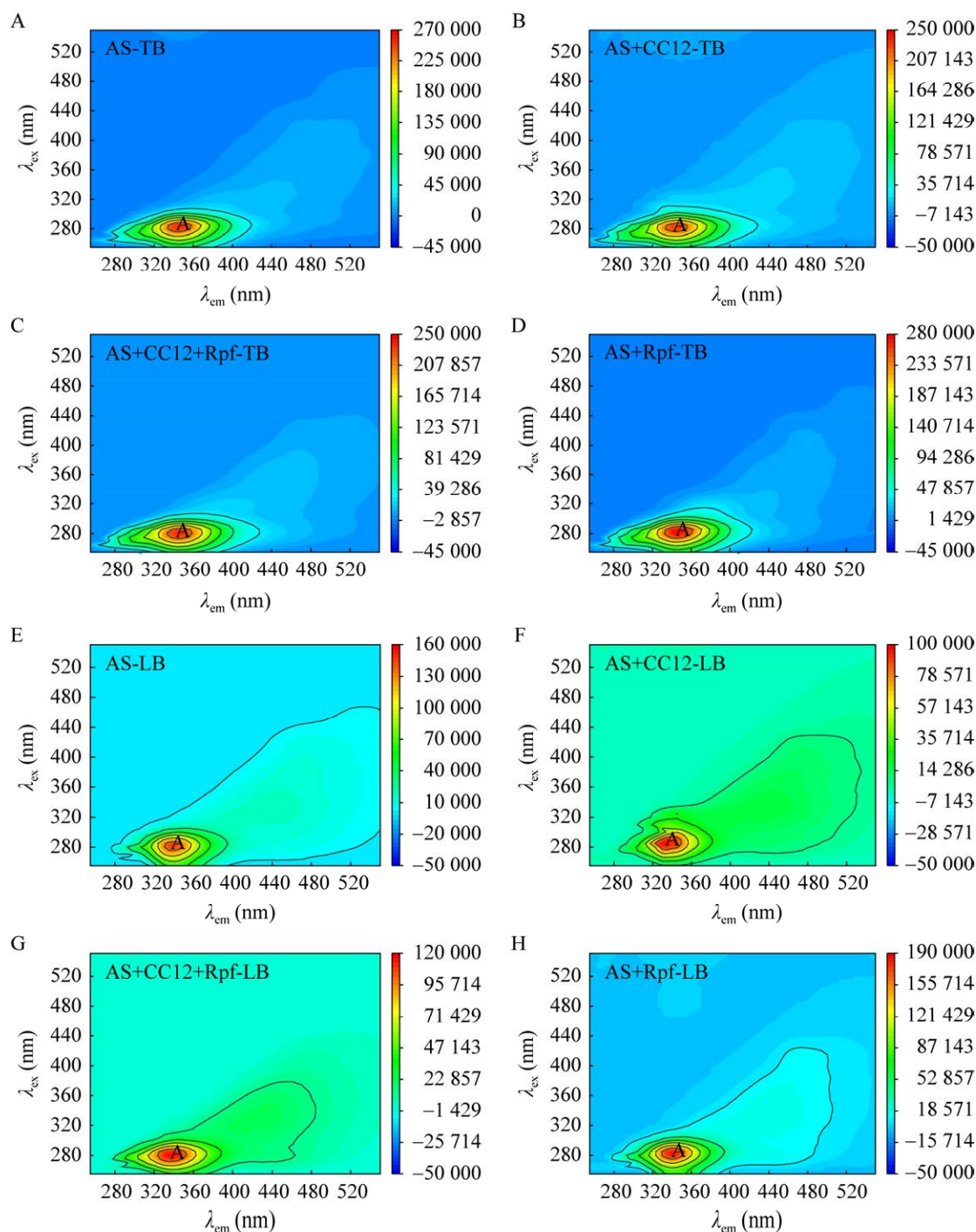


图 2 不同处理体系内活性污泥中胞外聚合物的三维荧光图谱 A-D: 紧密结合胞外聚合物峰图; E-H: 疏松结合胞外聚合物峰图。A 和 E: AS 活性污泥(C1 组); B 和 F: AS+CC12 (C2 组); C 和 G: AS+CC12+Rpf (C3 组); D 和 H: AS+Rpf (C4 组)。

Figure 2 Three-dimensional fluorescence spectra of extracellular polymeric substances in activated sludge under different treatment systems. A-D: Tightly-bound extracellular polymeric substance; E-H: Loosely-bound extracellular polymeric substances. A and E: AS (C1); B and F: AS+CC12 (C2); C and G: AS+CC12+Rpf (C3); D and H: AS+Rpf (C4).

表 1 不同活性污泥样品中的多样性指数  
Table 1 Diversity indices in different activated sludge samples

| Sample | Shannon index | Simpson index | Chao1 index | ACE index   | Coverage |
|--------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------|
| CK     | 5.090 8       | 0.023 2       | 1 398.776 6 | 1 489.394 6 | 0.988 6  |
| C1     | 3.503 1       | 0.129 0       | 1 000.005 6 | 1 084.295 4 | 0.989 7  |
| C2     | 4.006 7       | 0.053 1       | 932.857 1   | 968.817 2   | 0.991 7  |
| C3     | 3.764 6       | 0.095 4       | 888.326 1   | 928.937 9   | 0.992 3  |
| C4     | 3.648 0       | 0.118 9       | 1 053.279 1 | 1 144.225 3 | 0.989 5  |

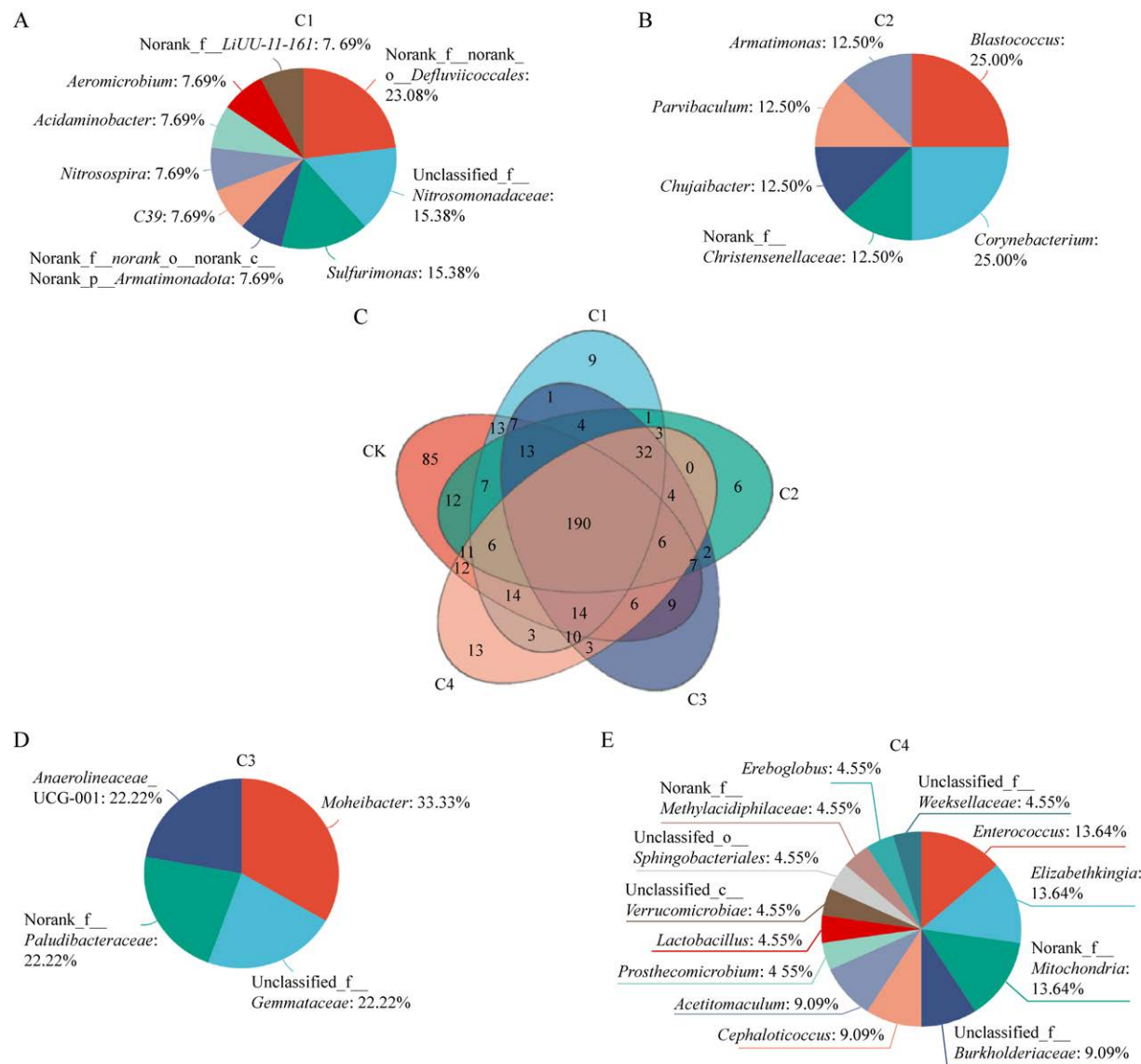


图 3 属水平上 C1 组(A)、C2 组(B)、C3 组(D)、C4 组(E)的微生物群落组成及不同样品中的 OTU 分类单元(C) CK: 原始接种污泥; C1: 活性污泥; C2: 活性污泥+CC12; C3: 活性污泥+CC12+Rpf; C4: 活性污泥+Rpf。  
Figure 3 Microbial community composition of group C1 (A), group C2 (B), group C3 (D) and group C4 (E) at the genus level; OTUs in different samples (C). CK: Original inoculum sludge; C1: Activated sludge; C2: Activated sludge+CC12; C3: Activated sludge+CC12+Rpf; C4: Activated sludge+Rpf.



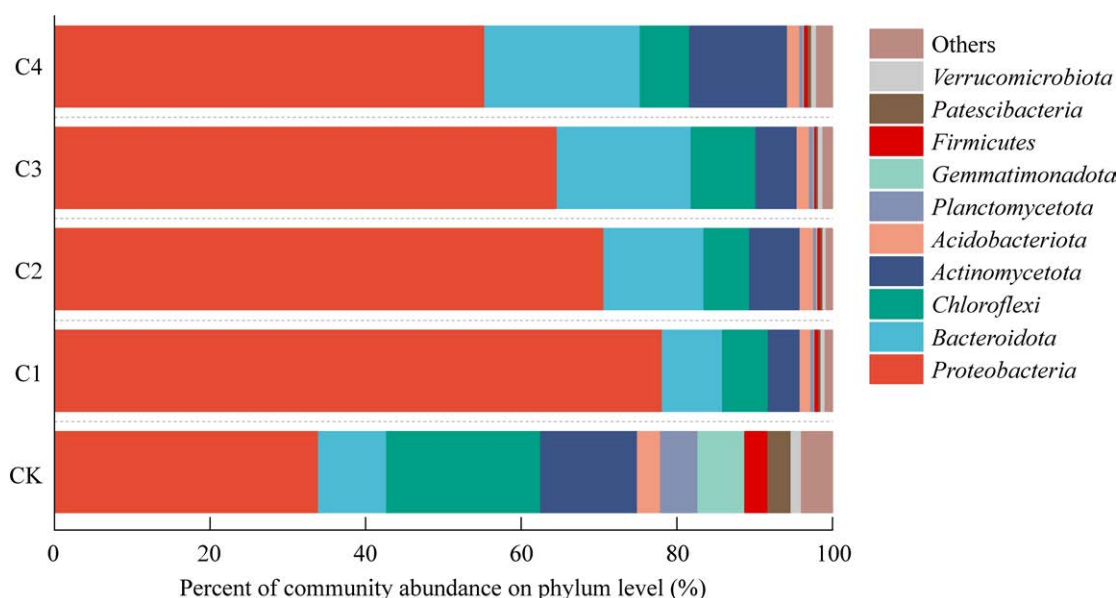


图4 门水平上不同样品中微生物群落的变化 相对丰度排名超过10的被定义为“others”。CK: 原始接种污泥; C1: 活性污泥(AS); C2: 活性污泥+CC12; C3: 活性污泥(AS)+CC12+Rpf; C4: 活性污泥(AS)+Rpf。

Figure 4 Microbial community composition at the phylum level across different samples. Those with an abundance ranking higher than 10 are defined as “others”. CK: Original inoculated sludge; C1: Activated sludge (AS); C2: AS+CC12; C3: AS+CC12+Rpf; C4: AS+Rpf.

投加 Rpf 的 C4 组中甲基杆菌属-甲基红杆菌属 (*Methylobacterium-Methylorubrum*) 相对丰度降低 11.48%, 但是 *norank\_f\_AKYH767* 和 *Rhodococcus* 的相对丰度分别显著增加了 8.64% 和 6.96% (图 5C); 相较于仅投加优势降解菌的 C2 组, 同时投加了优势菌和 Rpf 的 C3 组中 *Comamonas* 相对丰度显著增加(图 5D); 相较于 C3 组, C4 组中 *Rhodococcus* 相对丰度增加 7.16% (图 5E)。由此可见, CAP 胁迫对活性污泥中的原始微生物群落产生明显的影响, 在活性污泥中添加 CAP 降解优势菌 CC12 后, *Hyphomicrobium* 的相对丰度增加, 并成为优势属; 而投加 Rpf 后, *Rhodococcus* 在系统内明显富集, 而不同体系内微生物群落的差异则进一步影响了 CAP 废水的处理效率。

### 3 讨论

生物法处理抗生素废水, 重点在于保持活性污泥中微生物的活性, 进而保证降解效率。

陈研<sup>[22]</sup>利用生物接触氧化反应器处理抗生素废水, 随着磺胺二甲嘧啶浓度由 1 mg/L 增至 3 mg/L, 其去除率由 90.00% 降至 39.36%, 由此可见, 常规的活性污泥处理高浓度抗生素废水存在降解效率易受抗生素浓度影响的情况。本研究通过向活性污泥中投加优势降解菌株 CC12 后, 对 230 mg/L CAP 废水降解率提高至 89.98%, 均高于以往研究报道的 *Rhodococcus* sp. CAP-2 对 50 mg/L CAP 的 36.30% 降解率<sup>[9]</sup>、*Escherichia fergusonii* 对 55 mg/L CAP 的 84.00% 降解率<sup>[10]</sup> 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 对 300 mg/L CAP 的 73.15% 降解率<sup>[23]</sup>, 说明在 CAP 废水处理系统中投加优势降解菌可与活性污泥共同作用提升降解效率。而且, 本研究在活性污泥中投加 Rpf 后能够将 CAP 降解率进一步提升至 93.53%, 表明在较高强度的 CAP 胁迫作用下, Rpf 的添加能够促进优势菌株及活性污泥中原始微生物的活性和降解酶的表达, 缓解 VBNC 状态, 从而提高了降解能力。

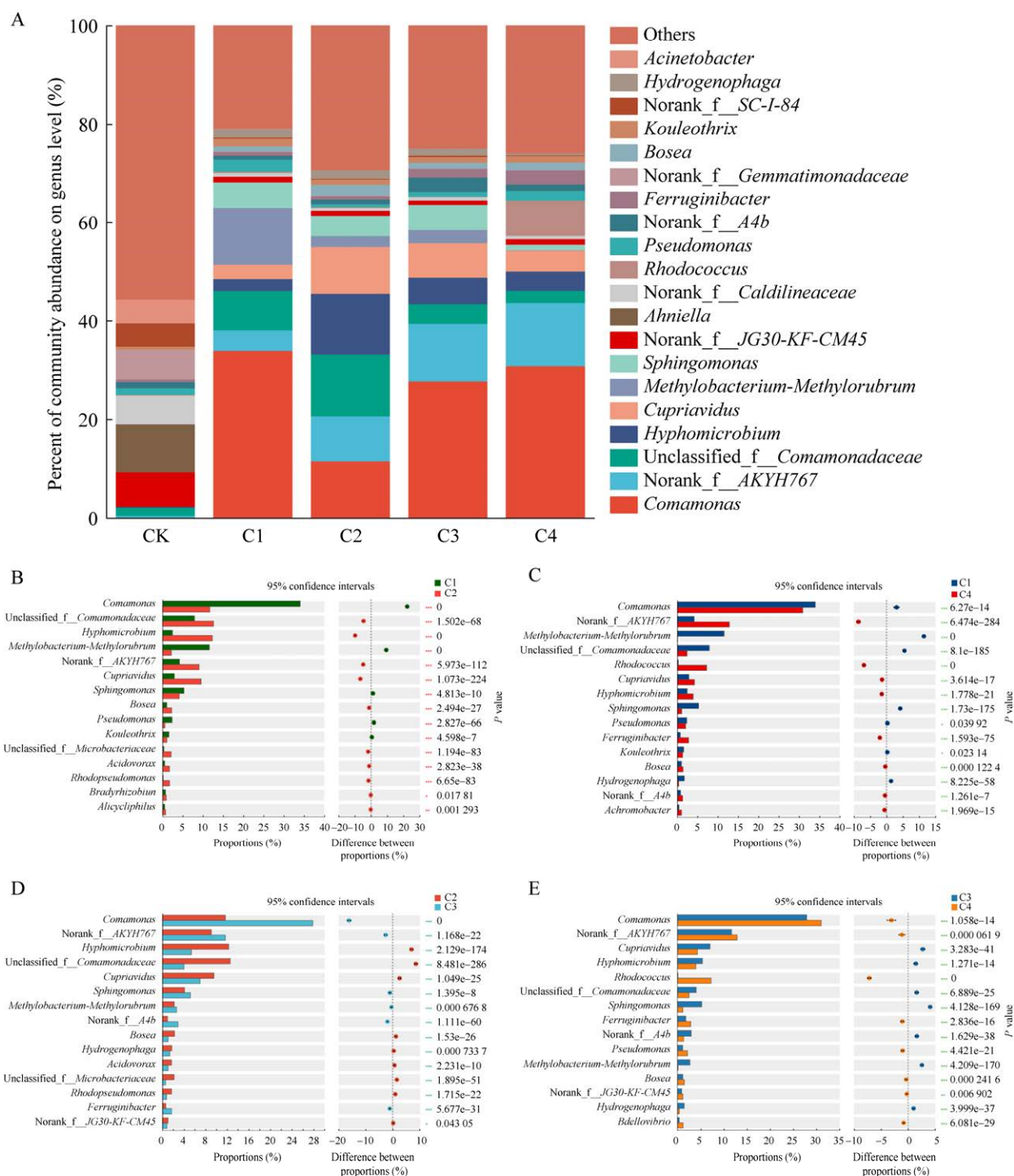


图5 不同样品在属水平上的微生物的相对丰度变化柱状图(A)和不同组之间的差异检验(B-E) CK: 原始接种污泥; C1: 活性污泥(AS); C2: 活性污泥+CC12; C3: 活性污泥(AS)+CC12+Rpf; C4: 活性污泥(AS)+Rpf。

Figure 5 Bar chart illustrates the microbial abundance variation at the genus level for different samples (A) and the statistical analysis of difference between different groups (B-E). CK: Original inoculated sludge; C1: Activated sludge (AS); C2: AS+CC12; C3: AS+CC12+Rpf; C4: AS+Rpf.

基于此,本研究进一步通过高通量测序技术分析了优势降解菌与 Rpf 的投加对活性污泥中微生物群落组成的影响。结果表明,在门水平上,投加 Rpf 后促进了 *Bacteroidota* 和 *Actinomycetota* 相对丰度的增加,其中 C3 和 C4 组 *Bacteroidota* 相对丰度高于 C1 和 C2 组,其中只加入优势菌的 C2 组 *Bacteroidota* 相对丰度又高于 C1 组,推测是优势菌 CC12 的投加一定程度缓解了 CAP 的胁迫作用,同时 Rpf 进一步促进那些对抗生素产生抗性基因的微生物迅速繁殖。以往研究表明, *Bacteroidota* 为大多数抗性基因携带者<sup>[24]</sup>,也与污染物的去除和颗粒稳定性有关<sup>[25]</sup>,说明其对 CAP 具有良好的适应性,并且 Rpf 对归属于 *Bacteroidota* 的多个属细菌的 VBNC 状态具有缓解或恢复的功能<sup>[26]</sup>,与本研究结果一致。

在属水平上, Rpf 的加入促进了 *Cupriavidus*、*norank\_f\_\_AKYH767* 与 *Rhodococcus* 相对丰度的增加,其中 *norank\_f\_\_AKYH767* 的相对丰度相较于空白组 C1 提升了 8.64%,成为第二优势菌属。Tian 等<sup>[27]</sup>研究发现 *norank\_f\_\_AKYH767* 是序批式活性污泥法和上流式微氧污泥反应器处理养猪场多种抗生素共存的无粪废水中的主要抗生素降解细菌,其对 CAP 去除可能发挥了重要作用。Zhang 等<sup>[28]</sup>研究发现 *Cupriavidus* 促进了氯霉素的矿化。此外, C4 组中 *Rhodococcus* 相对丰度相较于其他组明显增加,不仅是好氧反硝化细菌,也具有降解腈类化合物<sup>[29]</sup>的能力。徐璐宁<sup>[30]</sup>的研究表明 Rpf 可以使好氧反硝化菌复苏并保持活性。也有研究表明反硝化细菌能产生抗生素抗性基因<sup>[31]</sup>,增强其对抗生素的去除效果。此外, Rpf 可能通过改变微生物的代谢活动,促进了 EPS 的合成,这种变化可能增强了微生物之间的互作和生物膜的稳定性,从而提高了微生物的降解能力和环境适应性。虽然本研究为 Rpf 耦合优势菌株在抗生素废水处理中的应用提供了理论基础,证明了该方案具有可行性,但还需深入研究其对微生物

群落结构、代谢网络及其与环境因子的相互作用机制,还可以进一步探讨 Rpf 在不同类型废水处理中的应用潜力,特别是在处理高浓度有机污染物和抗生素废水方面。

## 4 结论

本研究利用 Rpf 与 CAP 降解菌 *Raoultella ornithinolytica* CC12 联合活性污泥降解 CAP 废水,其中在活性污泥中投加优势菌 CC12 后对 230 mg/L CAP 废水的降解率由 56.41%提高至 89.98%;而在活性污泥中投加 Rpf 能够将 CAP 降解率进一步提升至 93.53%。高通量测序结果表明在活性污泥中投加 Rpf 后微生物的多样性和相对丰度明显增加, Rpf 可能通过激活优势菌属 *Rhodococcus*、*Cupriavidus*、*norank\_f\_\_AKYH767* 的相对丰度提升了系统内微生物群落的稳定性和 CAP 降解效率。本研究为 Rpf 在抗生素废水处理中的应用提供了新的思路。

## 作者贡献声明

徐伟龙:撰写文章,数据分析;徐展博:方法论;刘思涵:数据收集与监管;崔静:执行调研;赵雷真:数据收集与监管;屈建航:提供资源,经费支持;周佳:提出概念,撰写文章,获取基金。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

## REFERENCES

- [1] 向红,刘欢,李磊,周贻兵,周黎,田鹏. 氯霉素降解菌的筛选与降解性能[J]. 医学动物防制, 2017, 33(8): 811-814, 914.  
XIANG H, LIU H, LI L, ZHOU YB, ZHOU L, TIAN P. Isolation and characterization of chloramphenicol-degradation bacterial strains[J]. Journal of Medical Pest Control, 2017, 33(8): 811-814, 914 (in Chinese).
- [2] NGUYEN LM, NGUYEN NTT, NGUYEN TTT, NGUYEN TT, NGUYEN DTC, TRAN TV. Occurrence, toxicity and adsorptive removal of the chloramphenicol antibiotic in water: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2022, 20(3): 1929-1963.

- [3] KONG DY, LIANG B, YUN H, CHENG HY, MA JC, CUI MH, WANG AJ, REN NQ. Cathodic degradation of antibiotics: characterization and pathway analysis[J]. *Water Research*, 2015, 72: 281-292.
- [4] 林海龙, 宋鸽, 司亮, 余建平, 陈兆波, 吴玉凤. 抗生素废水生物处理法的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(11): 258-261.  
LIN HL, SONG G, SI L, YU JP, CHEN ZB, WU YF. Advances in study on the biological treatment of antibiotic wastewater[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(11): 258-261 (in Chinese).
- [5] 徐超, 王启中, 王宗平. 菌藻颗粒污泥对氯霉素废水的去除效率及机理研究[J]. *水处理技术*, 2023, 49(7): 45-49.  
XU C, WANG QZ, WANG ZP. Using algae-bacteria granular sludge to effectively treat chloramphenicol wastewater: performance and mechanism[J]. *Technology of Water Treatment*, 2023, 49(7): 45-49 (in Chinese).
- [6] LONDONG J, BARTH M, SÖBKE H. Modeling and simulation of source separation in sanitation systems for reducing emissions of antimicrobial resistances[J]. *Water*, 2021, 13(23): 3342.
- [7] CAO L, NI L, QI L, WEN HT, WANG Z, MENG JQ, ZHANG XB, ZHANG YF. The application of post-denitrification fixed biofilm reactor for polishing secondary effluent: nitrate removal, soluble microbial products and micropollutants biotransformation[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 369: 128511.
- [8] HE RS, DING S, LIU DY, YANG Z, LIU R, CAO L, HE Q, AI HN. The impairment of joint tetracycline and copper oxide nanoparticle exposure on activated sludge[J]. *Chemical Engineering Journal Advances*, 2024, 20: 100652.
- [9] 史可, 郭晨蕾, 马晓丹, 梁斌, 王爱杰. 一株氯霉素降解细菌的分离鉴定与代谢特性研究[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3653-3662.  
SHI K, GUO CL, MA XD, LIANG B, WANG AJ. Isolation, identification and characterization of a chloramphenicol-degrading bacterium[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3653-3662 (in Chinese).
- [10] ZHAO X, TIAN FW, WANG G, LIU XM, ZHANG QX, ZHANG H, CHEN W. Isolation, identification and characterization of human intestinal bacteria with the ability to utilize chloramphenicol as the sole source of carbon and energy[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 82(3): 703-712.
- [11] XU HD, XIAO LL, ZHENG SL, ZHANG YC, LI JJ, LIU FH. Reductive degradation of chloramphenicol by *Geobacter metallireducens*[J]. *Science China Technological Sciences*, 2019, 62(10): 1688-1694.
- [12] ZHANG JY, GAN WH, ZHAO RX, YU K, LEI HX, LI RY, LI XY, LI B. Chloramphenicol biodegradation by enriched bacterial consortia and isolated strain *Sphingomonas* sp. CL5.1: the reconstruction of a novel biodegradation pathway[J]. *Water Research*, 2020, 187: 116397.
- [13] 赵艳, 张晓波, 郭伟. 不同土壤胶质芽孢杆菌生理生化特征及其解钾活性[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2283-2286.  
ZHAO Y, ZHANG XB, GUO W. Physiological and biochemical characteristics and capacities of potassium-releasing of *Bacillus mucilaginosus* screened from different soils[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(6): 2283-2286 (in Chinese).
- [14] 张宇帆, 刘彤彤, 周鹏, 孟子诺, 张雨佳, 张秀敏. Rpf 蛋白: 一种激活休眠状态放线菌的复苏促进因子[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3872-3883.  
ZHANG YF, LIU TT, ZHOU P, MENG ZN, ZHANG YJ, ZHANG XM. Rpf protein: a resuscitation-promoting factor for reactivating dormant actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3872-3883 (in Chinese).
- [15] LI XX, REN Q, SUN ZB, WU YN, PAN HX. Resuscitation promotion factor: a pronounced bacterial cytokine in propelling bacterial resuscitation[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(8): 1528.
- [16] 李欣怡, 杨媛媛, 李浩铭, 贾洋洋, 刘泽钊, 史舟, 沈超峰. 复苏促进因子辅助单细胞分离筛选青藏高原低温联苯降解潜力菌[J]. *科学通报*, 2023, 68(4): 414-423.  
LI XY, YANG YY, LI HM, JIA YY, LIU ZF, SHI Z, SHEN CF. Resuscitation-promoting factor assists single-cell isolation for screening potential low-temperature biphenyl-degrading bacteria in Qinghai-Xizang Plateau[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2023, 68(4): 414-423 (in Chinese).
- [17] 李鸿炫. 复苏促进因子强化多氯联苯污染土壤微生物修复机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.  
LI HX. Study on resuscitation-promoting factor strengthened mechanism of bioremediation in polychlorinated biphenyls contaminated soil[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018 (in Chinese).
- [18] 张宇, 王慧荣, 梅荣武, 李明智, 李欲如, 丁林贤, 苏晓梅, 朱瑞芬. 来源于 *Micrococcus luteus* 的复苏促进因子异源表达及其对活性污泥中休眠细菌的促生长作用[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2364-2375.  
ZHANG Y, WANG HR, MEI RW, LI MZ, LI YR, DING LX, SU XM, ZHU RF. Heterologous expression of resuscitation promoting factor from *Micrococcus luteus* and promotes growth dormant bacteria from activated sludge[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2364-2375 (in Chinese).
- [19] FU J, CHEN J, WANG Y, MENG T, YUE L, LUO D, WANG X. Promoting effect of the recombinant resuscitation promoting factors-2 of *Rhodococcus erythropolis* on petroleum degradation and cultivable bacterial diversities of the oil-contaminated soils[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 74(3): 462-469.
- [20] ZHOU J, CHEN Y, QU JH, WANG YK, MAI WN, WAN DJ, LU XY. Responses of microbial community and antibiotic resistance genes to co-existence of chloramphenicol and salinity[J]. *Applied Microbiology*

- and Biotechnology, 2022, 106(22): 7683-7697.
- [21] 姚萌, 罗红元, 谢小青, 戴兰华, 吴伟, 张凯松. 城市污水厂活性污泥胞外聚合物的三维荧光特性分析[J]. 中国环境科学, 2012, 32(1): 94-99.
- YAO M, LUO HY, XIE XQ, DAI LH, WU W, ZHANG KS. Three dimensional excitation-emission fluorescence spectra of expolymer substances in activated sludge of WWTP[J]. China Environmental Science, 2012, 32(1): 94-99 (in Chinese).
- [22] 陈研. 生物接触氧化法处理磺胺二甲嘧啶废水中微生物作用规律研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2023.
- CHEN Y. Study of action rules of microorganism in the treatment of sulfamethazine effluent by biological contact oxidation[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [23] 陈茂祥, 夏灵恩, 毛乐佳, 傅文韬, 许双燕, 郑华宝. 氯霉素降解菌的分离筛选及降解性能研究[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(9): 61-65.
- CHEN MX, XIA LN, MAO LJ, FU WT, XU SY, ZHENG HB. Study on isolation and screening of chloramphenicol degrading bacteria and degradation property[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(9): 61-65 (in Chinese).
- [24] GAZE WH, ZHANG LH, ABDOUSLAM NA, HAWKEY PM, CALVO-BADO L, ROYLE J, BROWN H, DAVIS S, KAY P, BOXALL ABA, WELLINGTON EMH. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment[J]. The ISME Journal, 2011, 5(8): 1253-1261.
- [25] HUANG Y, ZHANG JQ, LIU JY, GAO XP, WANG XH. Effect of C/N on the microbial interactions of aerobic granular sludge system[J]. Journal of Environmental Management, 2024, 349: 119505.
- [26] KE Q, ZHANG YG, WU XL, SU XM, WANG YY, LIN HJ, MEI RW, ZHANG Y, HASHMI MZ, CHEN CJ, CHEN JR. Sustainable biodegradation of phenol by immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 222: 185-189.
- [27] TIAN YJ, LI JZ, LIU JZ, MENG J, LI JL. Insights into the microbiological mechanism of antibiotic removal in an aerobic-microaerobic process treating manure-free piggery wastewater[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 484: 149634.
- [28] ZHANG JY, LI XY, KLÜMPER U, LEI HX, BERENDONK TU, GUO FL, YU K, YANG C, LI B. Deciphering chloramphenicol biotransformation mechanisms and microbial interactions via integrated multi-omics and cultivation-dependent approaches[J]. Microbiome, 2022, 10(1): 180.
- [29] 陈丛, 刘言琛, 冯建英, 刁硕祺, 晁红军, 闫达中, 吴菁. 苯甲腈降解菌 *Rhodococcus* sp. BN02 的筛选和鉴定[J]. 武汉轻工大学学报, 2024, 43(3): 31-40, 52.
- CHEN C, LIU YC, FENG JY, DIAO SQ, CHAO HJ, YAN DZ, WU J. Screening and identification of the benzonitrile degrading strain *Rhodococcus* sp. BN02[J]. Journal of Wuhan Polytechnic University, 2024, 43(3): 31-40, 52 (in Chinese).
- [30] 徐璐宁. 污染物胁迫下微生物 VBNC 状态的形成及 Rpf 复苏环境功能菌种的研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2020.
- XU LN. Study on the formation of microbial VBNC state under pollutants stress and resuscitation of functional bacteria by rpf[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [31] LI TT, LIU C, LU J, GAURAV GK, CHEN W. Determination of how tetracycline influences nitrogen removal performance, community structure, and functional genes of biofilm systems[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2020, 106: 99-109.