

海水养殖生境中磺胺甲恶唑降解菌的筛选及降解条件优化

厉怡君¹, 赵阳国^{1,2*}, 刘磊¹, 岳梦晨¹, 张彦超¹, 李欢欢¹

1 中国海洋大学 环境科学与工程学院, 山东 青岛

2 中国海洋大学, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛

厉怡君, 赵阳国, 刘磊, 岳梦晨, 张彦超, 李欢欢. 海水养殖生境中磺胺甲恶唑降解菌的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2560-2575.

LI Yijun, ZHAO Yangguo, LIU Lei, YUE Mengchen, ZHANG Yanchao, LI Huanhuan. Screening of sulfamethoxazole-degrading bacteria in mariculture habitats and optimization of degradation conditions[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2560-2575.

摘要: 在海水养殖过程中, 磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMX)等抗生素类药物的大量残留加速了抗性细菌和抗性基因的传播, 严重威胁生态环境健康。生物法控制抗生素废水是解决其环境危害的重要途径。【目的】从近海养殖池底泥中筛选出一株耐盐且对 SMX 具有高效降解能力的菌株 LS-1, 分析环境因素对其降解能力的影响, 优化菌株对 SMX 的降解性能, 并通过产物类型解析其降解途径, 最终对降解产物进行毒性分析。【方法】通过对分离菌株进行 16S rRNA 基因序列测序与系统发育树分析进行鉴定, 采用单因素和响应面正交试验对降解条件进行优化, 利用气质色谱法及发光细菌水质急性毒性试验检测分析其降解产物及产物毒性。【结果】分离获得的菌株 LS-1 与产碱杆菌属(*Alcaligenes*)中的水生产碱菌(*Alcaligenes aquatilis*) AS1 序列相似度达 99.79%。单因素试验确定胰蛋白胨是菌株生长和降解 SMX 时的最佳外源碳源。菌株在温度 20–35 °C、盐度 15‰–35‰、SMX 浓度 10–100 mg/L、pH 7.0–9.0 的条件下时生长良好。响应面分析表明, 对 SMX 降解率有显著影响的因素依次为: SMX 浓度>初始 pH>环境温度。在 SMX 浓度为 33 mg/L、pH 7.4 和 30 °C 的条件下, 该菌株在 48 h 内的最高降解率达 60.17%。质谱检测分析推测菌株 LS-1 通过乙酰化和羟基化等途径降解 SMX, 发光细菌急性毒性试验表明在 SMX 降解过程中生物毒性逐渐降低。【结论】本研究分离的 SMX 降解菌能够很好地适应海洋环境条件, 降低 SMX 的水质毒性, 对海水养殖废水中抗生素污染的防治具有重要的应用前景。

关键词: 海水养殖; 磺胺甲恶唑; *Alcaligenes* sp.; 微生物降解; 降解产物

资助项目: 国家自然科学基金(41977315); 中央高校基本科研业务费专项资金(201964004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (41977315) and the Fundamental Research Fund for the Central Universities of China (201964004).

*Corresponding author. Tel: +86-532-66782390, E-mail: ygzha@ouc.edu.cn

Received: 2025-02-05; Accepted: 2025-03-15; Published online: 2025-05-20

Screening of sulfamethoxazole-degrading bacteria in mariculture habitats and optimization of degradation conditions

LI Yijun¹, ZHAO Yangguo^{1,2*}, LIU Lei¹, YUE Mengchen¹, ZHANG Yanchao¹, LI Huanhuan¹

¹ College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, China

² Key Lab of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, China

Abstract: In marine aquaculture, the accumulation of antibiotics such as sulfamethoxazole (SMX) has contributed to the spread of antibiotic-resistant bacteria and genes, posing a serious threat to ecological health. Biological treatment of antibiotic-contaminated wastewater is an essential approach to mitigate these environmental risks. **[Objective]** To isolate a salt-tolerant strain LS-1 with high SMX degradation efficiency from the sediment of an inshore aquaculture pond, examine the effects of environmental factors on the degradation capacity of this strain, optimize the SMX degradation conditions, elucidate the degradation pathway through product analysis, and evaluate the toxicity of the degradation products. **[Methods]** The isolated strain was identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Single factor experiments and response surface methodology were employed to optimize the degradation conditions. GC-MS and the luminescent bacteria test for acute toxicity were adopted to analyze the degradation products and their toxicity. **[Results]** Strain LS-1 showed 99.79% sequence similarity with *Alcaligenes aquatilis* strain AS1. Tryptone was determined to be the optimal exogenous carbon source for both growth and SMX degradation. The strain exhibited robust growth across a temperature range of 20–35 °C, salinities of 15‰–35‰, SMX concentrations from 10 to 100 mg/L, and pH 7.0–9.0. Response surface analysis revealed that SMX concentration, initial pH, and temperature significantly influenced the SMX degradation rate, in descending order of importance. Under optimal conditions (SMX concentration of 33 mg/L, pH 7.4, and 30 °C), the strain achieved a maximum degradation rate of 60.17% within 48 h. MS results indicated that LS-1 degraded SMX *via* acetylation and hydroxylation pathways. The results of the luminescent bacteria test for acute toxicity demonstrated a progressive reduction in biological toxicity during the SMX degradation process. **[Conclusion]** The SMX-degrading strain LS-1 can effectively adapt to marine environmental conditions, reducing SMX-induced toxicity in water. This study highlights the potential of LS-1 for controlling antibiotic pollution in marine aquaculture wastewater.

Keywords: marine aquaculture; sulfamethoxazole; *Alcaligenes* sp.; microbial degradation; degradation products

近年来, 受全球, 特别是亚洲水产养殖业增长的推动, 全球渔业和水产养殖产量创历史新高^[1]。中国作为亚洲区的代表, 是全球最大的水产品生产、加工和贸易国^[2], 海水产品养殖总

量占全球总量的 71%^[3-4]。然而, 由于海水养殖业的无序扩张以及养殖方式的粗放低效^[5-6], 导致了一系列生态环境问题。抗生素的使用在全球范围内受到了越来越多的限制和监管。抗生

素的过度使用, 加剧了耐药微生物及其抗性基因的传播, 对公共卫生构成了严重威胁^[7]。磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMX)是海水养殖中广泛使用的抗生素之一, 已被中国政府授权可在水产养殖中有条件地使用^[8-9]。SMX 具有强亲水性、弱降解性、高迁移率和持久性等特征^[10], 使其具有较长的半衰期(85–100 d)和较强的生物积累作用^[11]。报道显示, SMX 在水产养殖中的最高检出浓度可达 mg/L^[12-13]。SMX 在环境中的存在能够促进抗性基因(*sul1*、*sul2*、*sul3* 和 *sulA*)的传播^[14]。

针对 SMX 污染的控制, 通常采用物理吸附以及化学氧化等技术, 如生物炭、碳纳米管、芬顿反应以及光化学催化等^[15]。然而, 上述方法均面临着回收难、再利用效率低、成本高及操作程序复杂等难题^[15]。相比之下, 微生物降解技术因其环境友好成本低等特点而受到越来越多的关注。有研究从河口中筛选出一株气单胞菌(*Aeromonas caviae*), 能将 SMX 降解为苯胺与 3-氨基-5-甲基异恶唑^[16]。Kong 等^[17]从海水养殖场中分离出一株科氏扁平球菌(*Planococcus kocurii*) O516, 在 SMX 初始浓度为 10 mg/L 的条件下降解率可达 60% 以上。Liu 等^[18]从人工湿地系统中分离出一株高效降解 SMX 的细菌西里西亚单胞菌(*Pseudomonas silesiensis*) F6a, 并研究了其在不同污染物浓度下的降解动力学。目前, SMX 降解菌的研究主要集中在淡水环境^[19-20], 而在海洋环境下, SMX 降解效率的影响因素及其优化方法的研究相对较少。

响应面法是一种通过建立数学模型来分析多个显著影响因素与响应值之间的关系, 并通过统计学方法验证模型结果的技术, 已被广泛应用于多种污染物降解条件的优化, 以提高去除效率和降低成本^[21-22]。本研究从近海养殖池底泥中筛选出一株耐盐且对 SMX 具有高效降解能力的菌株。通过单因素实验分析了环境因素对其降解能力的影响, 以探究其环境适应性, 并进行了响应面分析及验证, 以优化该菌株对

SMX 的降解条件, 并分析其降解途径和产物毒性。研究结果将为海水养殖废水中抗生素污染的防治提供技术支持, 具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验样品及试剂

海水养殖底泥与海水样品取自山东省青岛市即墨区鳌山湾森林公园附近的海水养殖池(120°69'E, 36°37'N), 养殖池水深 0.2 m。取池底泥水混合物放入无菌样品瓶中, 24 h 内运回实验室, 4 °C 冷藏保存。

磺胺甲恶唑(C₁₀H₁₁N₃O₃S)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 色谱级乙腈、磷酸(98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。实验使用的其他药品均为分析纯。

1.2 培养基

富集培养基(g/L): NH₄Cl 1.0, K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, CH₃COONa 0.2, NaCl 30.0, 微量元素 0.1 mL/L。微量元素(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.5, EDTA 1.0, ZnSO₄ 0.2, MnCl₂·4H₂O 0.1, FeSO₄·7H₂O 0.5, CuSO₄·5H₂O 0.5, CoCl₂·6H₂O 0.2。降解培养基(g/L): K₂HPO₄ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 30.0, Tryptone 2.0。LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母浸粉 5, NaCl 30。LB 固体培养基在上述成分基础上加入 12 g/L 琼脂。所有培养基经 121 °C 灭菌 20 min。

SMX 母液: 以无水乙醇为溶剂, 配制 SMX 质量浓度为 10 mg/mL, 置于棕色瓶中, 于 -20 °C 保存。人工海水配制: 以蒸馏水为溶剂, NaCl 浓度为 30 g/L。

1.3 菌株的富集与纯化

取养殖池泥水样品 5 g 置于 250 mL 无菌海水中, 30 °C、150 r/min 振荡 3 h, 使泥中细菌充分分散到无菌海水中。取 5 mL 混合样品转移至装有 95 mL 富集培养基的锥形瓶中, 设置 SMX 初始浓度为 5 mg/L, 在恒温培养箱中

30 °C、120 r/min 避光培养。7 d 后转接至 10 mg/L SMX 的新鲜富集培养基中, 依次重复上述步骤, 每次转接按 5 mg/L 梯度浓度增大培养基中 SMX 含量, 直至抗生素浓度达到 30 mg/L。将富集菌群按 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的梯度浓度稀释, 稀释后的菌液涂布到含有 30 mg/L SMX 的 LB 固体培养基上培养, 待长出菌落后, 用接种环挑选菌株, 用四区划线法纯化分离获得纯菌株, 甘油 -80 °C 保存。

1.4 菌株的分析鉴定

将筛选出的单菌株采用平板划线法接种于含有 SMX 的富集琼脂培养基上, 30 °C 培养 48 h 后观察菌落形态并进行革兰氏染色。将菌株在 LB 培养基中 30 °C、120 r/min 培养 30 h 至 OD_{600} 值为 0.5 左右, 20 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用戊二醛固定过夜, 经过乙醇脱水, 冷冻干燥, 表面喷金后, 通过扫描电镜 (Thermo Fisher 公司) 观察菌体形态。将培养至对数生长期的菌株, 取 2 mL 置于离心管中, 委托青岛派森诺生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因序列分析鉴定。得到的序列结果提交至 NCBI 数据库, 通过 BLAST 进行初步对比鉴定。采用 MEGA 11.0 软件中的邻接 (neighbor-joining) 法进行多序列比对, 构建系统发育树并分析结果。

将培养至对数生长期 OD_{600} 为 0.5 左右的菌株, 以 2% 的接种量接种至 100 mL 降解培养基中, 于 30 °C、120 r/min 振荡培养, 分别在 4–72 h 使用紫外分光光度计测量菌株 OD_{600} 。以时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标绘制菌株生长曲线。

1.5 菌株对 SMX 降解性能优化

改变不同影响因素, 如碳源(胰蛋白胨、醋酸钠、葡萄糖、蔗糖)、SMX 初始浓度(10、20、50、100 mg/L)、接种量(1%、3%、5%、7%)、盐度(20‰、25‰、30‰、35‰)、温度(20、25、30、35 °C)、pH (5.0、7.0、9.0), 采用控制单一变量的方法, 探究各因素对菌株 48 h 降解率的影响。上述实验在 120 r/min 恒温振荡培养, 每

隔 12 h 取样, 通过高效液相色谱 (HPLC) 分析培养液中 SMX 的剩余量。

通过 Design-Expert 13 设计 Plackett-Burman (PB) 实验, 筛选对响应值具有显著影响的因素, 用于后续的响应面分析 (Box-Behnken 方法)。设计响应面试验, 分析影响因素的交互作用, 优化降解条件。

1.6 降解产物检测及途径推断

利用安捷伦气相质谱仪 (Agilent 公司), 对样本中的降解产物进行质谱分析。首先将样本在 70 °C 下平衡 4 min, 随后以 25 °C/min 的升温速率加热至 100 °C, 并在此温度下保持 1 min; 接着, 以 3 °C/min 的升温速率继续升温至 260 °C, 并在该温度下维持 10 min, 以确保充分分离与检测。质谱仪采用电子碰撞电离模式, 电离能量设置为 70 eV, 溶剂延迟时间为 4 min。MS 源温度设定为 230 °C, 传输线温度设定为 280 °C。选择全扫描模式, 扫描范围为 50–550 m/z 。依据分析得出的降解产物, 推测降解路径。

1.7 降解产物的毒性评估

为检测降解产物的毒性, 采用明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) T3 菌株, 利用 LumiFOX2000 型生物毒性分析仪 (深圳朗石公司) 检测相对发光率的变化, 以表征水质毒性。首先用 2% NaCl 复苏发光细菌冻干粉, 复苏 2 min 后细菌在黑暗中发出明显荧光。在测试仪配备的试管中加入 2% NaCl 和 10 μ L 复苏的发光细菌菌液, 混匀后先测试无降解产物对照组的发光亮度, 再依次测试含有降解产物的处理组发光亮度。相对发光率的计算如公式 (1) 所示。相对发光率越高, 说明毒性越低; 相对发光率越低, 表明水质毒性越高。

$$\text{相对发光率(\%)} = \frac{\text{样品管发光亮度(mV)}}{\text{CK管发光亮度(mV)}} \times 100 \quad (1)$$

1.8 分析方法

使用 HPLC 检测 SMX 含量。将经过微生物降解的培养液在 4 °C、4 000 \times g 离心 5 min, 收

集上清液，采用孔径为 0.22 μm 的针头过滤器过滤后，注入棕色液相瓶，4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。使用高效液相色谱仪(1260 II, Agilent 公司)，配备 C18 反向色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , Agilent 公司)，流动相为色谱级乙腈和 0.05 mol/L 磷酸(体积比 30:70)，设置 UV 检测器波长为 256 nm，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 10 μL ，流量 1.0 mL/min。

每个实验均重复 3 次，数据结果以平均值 \pm 标准差表示，CK 表示空白对照。采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析及 Tukey's HSD 检验，将 P 值阈值设置为小于 0.05，以确定组间统计学上的显著差异。借助 Origin 2021 软件进行数据可视化。

2 结果与讨论

2.1 降解菌株的分离及鉴定

从养殖池采集的沉积物样品中，经过不断富集驯化，分离出 5 株具有对 SMX 耐药性的菌株，分别命名为 LS-1、LS-2、LS-3、LS-4 和 LS-5。48 h 内，各菌株对 SMX 的降解率分别为：LS-1 为 48%，LS-2 为 14%，LS-3 为 12%，LS-4 为 22%，而 LS-5 基本无降解能力。根据菌株对磺胺甲恶唑的降解率，选择 LS-1 作为实验菌株进行后续研究。

LS-1 在平板上经 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 48 h 后，

长出肉眼可观察的菌落，如图 1A 所示。LS-1 菌落呈白色略透明，湿润凸起，边缘不规则，易挑取。经革兰氏染色后在显微镜下观察，菌体染色呈红色，为革兰氏阴性菌。利用扫描电镜对菌体形态进行观察(图 1B)，发现 LS-1 在电镜下外形清晰，呈短棒状，表面粗糙，有崎岖不平的凹槽和褶皱，长度为(2.0 \pm 0.1) μm ，宽度为(1.0 \pm 0.1) μm 。

将菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库进行同源性分析，结果表明，LS-1 的 16S rRNA 基因序列与水生产碱菌 (*Alcaligenes aquatilis*) AS1 有 99.79% 的一致性。使用 MEGA 11.0 软件，通过邻接法构建系统发育树，如图 2 所示，进一步证实该菌株为产碱杆菌。已有研究表明，该菌具有较强的脱氮能力，且未见其致病性的相关报道^[23-24]。将 LS-1 的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 数据库，获得序列登录号 PQ740307。

2.2 菌株生长曲线

菌株 LS-1 的生长曲线(OD_{600})以及培养基中 SMX 的去除率如图 3 所示。由生长曲线可知，前 20 h 为菌株的生长迟滞期，菌株需要适应含有抗生素的新环境， OD_{600} 值保持在较低水平，约为 0.05。从 20 h 开始， OD_{600} 值迅速上升，菌株进入快速生长期。在 28 h 左右， OD_{600} 值达到约 0.5，此时菌株处于对数生长期，随后继续上

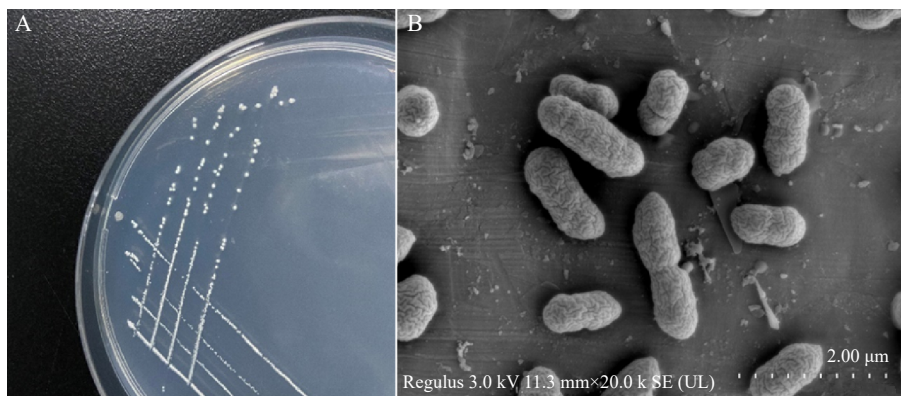


图1 菌株LS-1形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain LS-1. A: Plate scribing; B: SEM image.

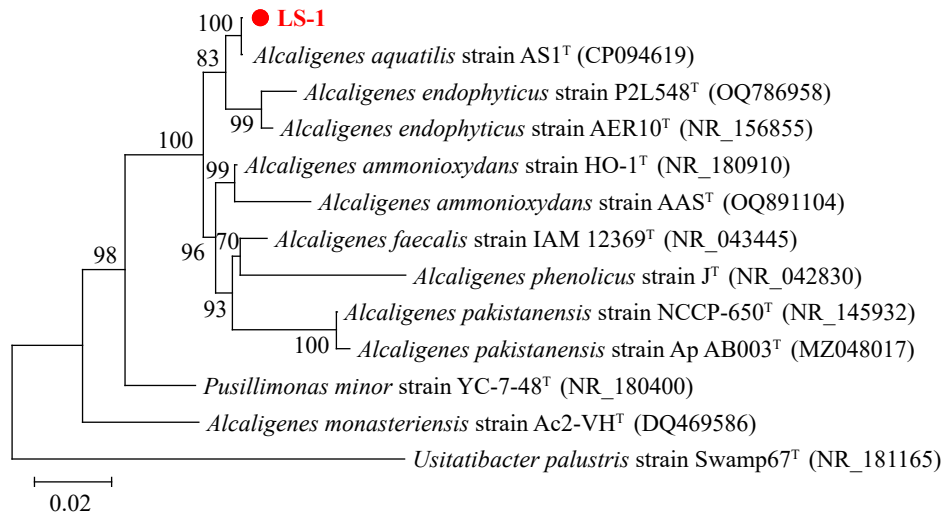


图2 基于16S rRNA基因序列构建的菌株LS-1系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain LS-1 based on 16S rRNA gene sequence. Red font: Labeled the strain screened; GenBank accession numbers are given in parentheses; Bootstrap values were expressed as a percentage of 1 000 replications; Bar 0.02 substitutions per nucleotide position.

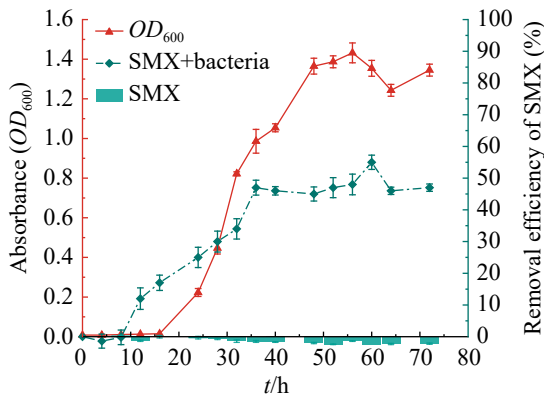


图3 LS-1生长曲线及20 mg/L SMX降解率变化

Figure 3 LS-1 growth curve and changes in degradation efficiency of 20 mg/L SMX.

升。在 40 h 左右, OD_{600} 值达到约 1.0, 增速放缓, 这可能是由于 SMX 代谢产物毒性增强所致^[25]。 OD_{600} 值继续上升, 最高达到约 1.4, 随后略有下降。

从 SMX 的降解曲线来看, 在 0 h 到约 10 h 之间, SMX 降解率出现短暂下降, 可能是由于培养基 pH 变化导致 SMX 吸光度发生改变^[26]。从 20 h 开始, SMX 降解率迅速上升, 表明菌株

开始降解 SMX。在 40 h 左右, SMX 降解率达到约 50%, 之后略有下降, 这可能是由于菌株消耗营养物质导致代谢速率减慢以及菌体死亡, 从而导致降解率下降^[27]。

2.3 环境因子对降解菌株降解能力的影响

2.3.1 碳源对菌株 LS-1 降解磺胺甲恶唑的影响

菌株 LS-1 在以 SMX 为唯一碳源的培养基中无法生长, 推测其对 SMX 的降解为共代谢作用。因此, 设置实验探究 LS-1 在不同碳源(胰蛋白胨、醋酸钠、葡萄糖、蔗糖)条件下的 SMX 降解率及生长情况, 以确定菌株生长和降解的最佳碳源。如图 4A 所示, 不同碳源对菌株 LS-1 降解 SMX 的影响较大。以胰蛋白胨为碳源时, 48 h 内 SMX 的降解率最高, 达到 55.4%; 其他碳源的降解率依次为醋酸钠(51.4%)、葡萄糖(50.5%)和蔗糖(47.6%)。微生物的共代谢过程涉及复杂的酶促反应, 需要额外的碳源作为供能物质。某些碳源可能与目标污染物的代谢形成竞争, 从而抑制降解^[28], 而合适的碳源则会

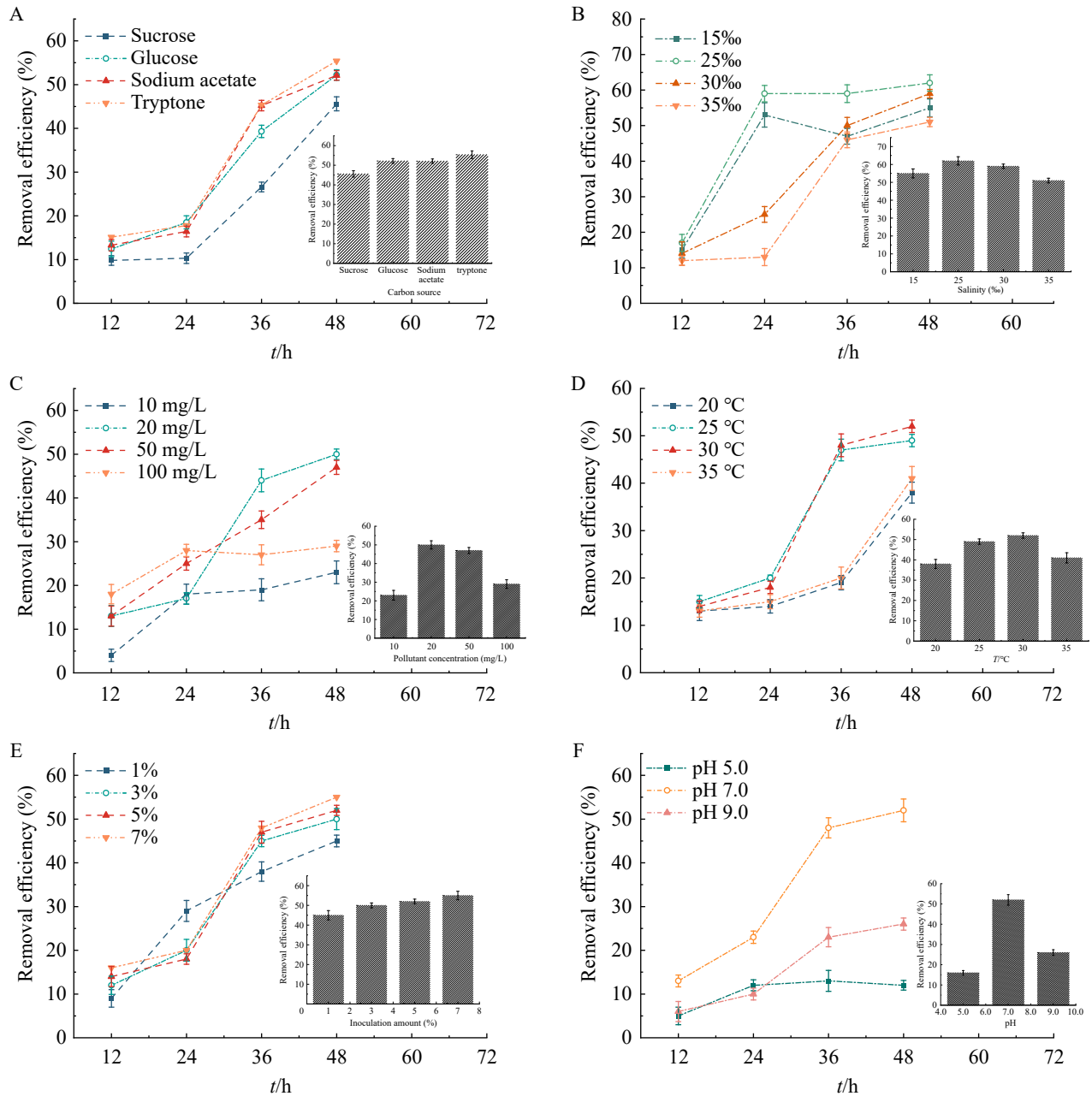


图4 不同影响因素条件下菌株LS-1对SMX的降解

Figure 4 Degradation of SMX by strain LS-1 under different influencing factors. A: Different carbon sources. B: Different salinities. C: Different pollutant concentrations. D: Ambient temperature. E: Different inoculum sizes. F: Different pH. The bar chart shows the degradation efficiency within 48 h.

极大地提高菌株的降解效率^[29]。Vo等^[30]发现,不同碳源会影响细菌胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)和酶的产生,进而影响细菌对抗生素的去除效率。

2.3.2 盐度对菌株LS-1降解磺胺甲恶唑的影响

研究了不同盐度(15‰、25‰、30‰、35‰)条件下菌株LS-1对SMX降解的影响。结果表

明, 菌株在不同盐度条件下表现出较强的适应能力(图 4B), 较低的盐度有利于 SMX 的降解, 而高盐度(35‰)则对降解产生限制作用。菌株在 25‰ 盐度下降解效果最佳, 降解率达到 62.0%。不同盐度下, SMX 的降解率依次为 25‰>30‰>15‰>35‰。微生物在合适的盐度环境中会改变自身的生化特性, 适宜的盐度还会促进酶的产生^[31]。Xiong 等^[32]研究了栅列藻(*Scenedesmus obliquus*)对左氧氟沙星的降解, 发现在一定限度内, 随着盐度的升高, 抗生素去除率可从 4.5% 上升到 93.4%。

2.3.3 SMX 浓度对菌株 LS-1 降解能力的影响

初始 SMX 浓度对菌株 LS-1 的降解能力有显著影响。如图 4C 所示, 当 SMX 浓度为 20 mg/L 时, 降解率最高, 达到 50.12%。进一步分析降解率随时间的变化发现, 当 SMX 浓度为 20 mg/L 和 50 mg/L 时, 降解率随时间迅速增加。这表明在这些浓度下, 抗生素对菌株的毒害和抑制作用较弱, 菌株能够有效降解 SMX, 生成毒性较低的代谢产物, 从而减少 SMX 对其生长和繁殖的负面影响。然而, 当 SMX 浓度为 100 mg/L 时, 高浓度抗生素显著抑制了菌株的降解能力。值得注意的是, SMX 的降解率并非随着浓度的降低而增加, 这可能是由于一定浓度的抗生素可以促进微生物的生长, 但超过一定阈值则会抑制微生物的代谢, 而且不同类型的抗生素对微生物的作用程度也各不相同^[33-34]。

2.3.4 环境温度对菌株 LS-1 降解磺胺甲恶唑的影响

温度是影响微生物生长和代谢的重要因素, 通过影响细胞内酶的活性、细胞质的流动性以及污染物的性质来调节微生物的生长速率^[35]。如图 4D 所示, 菌株 LS-1 在 25–30 °C 之间的温度范围内对 SMX 的降解效果最佳, 降解率为 49%–52%。高于或低于此温度范围降解率均有所下降。随着温度的升高, 降解率先升高后降低。

2.3.5 接种量对菌株 LS-1 降解磺胺甲恶唑的影响

从动力学角度来看, 不同接种量条件下菌株 LS-1 对 SMX 的降解趋势基本一致(图 4E)。随着接种量的增加, 降解率也随之增加。1%–7% 接种量对应的降解率分别为 45.22%、50.30%、52.23% 和 55.21%。数据分析表明, 1%、3% 和 7% 接种量下的降解率之间存在显著差异($P<0.05$), 说明接种量的增加对降解率的提升有显著影响。较高的接种量可以加速菌体生物膜的形成, 提供更多的活性位点, 同时提高酶(如氧化酶、水解酶)的分泌量。然而, 当接种量过高时, 菌体分泌的酸性代谢物(如乙酸)可能会抑制自身的生长^[36]。

2.3.6 初始 pH 对菌株 LS-1 降解磺胺甲恶唑的影响

环境 pH 对微生物的生长代谢、表面吸附作用以及抗生素的水解等过程具有重要影响。如图 4F 所示, 当初始 pH 为 7.0 时, 菌株对 SMX 的降解效率最高, 且随着时间的推移, 降解率显著提高($P<0.05$)。在酸性和碱性环境中, SMX 的降解率随时间变化不大, 表明极端 pH 值对菌株的生长产生了不利影响, 从而降低了 SMX 的降解效率。在同一时间点(48 h)横向比较, LS-1 菌株对 SMX 的降解率从酸性环境的 14.16% 上升到中性环境的 52.18%, 然后在更高碱性环境中降低至 26.64%。统计分析表明, pH 对 LS-1 菌株降解 SMX 的影响显著($P<0.05$), 且该菌株适宜在中性到偏碱性的 pH 范围内生长。这一结果与大多数细菌在中性偏碱环境中生长的普遍规律一致^[37]。此外, 海水养殖废水的进水 pH 通常在 6.5–9.0 之间^[38], LS-1 菌的降解条件处于此 pH 区间内。

2.4 响应面优化及分析

2.4.1 Plackett-Burman (PB) 试验设计与分析

根据上述单因素试验结果设计了 PB 试验,

以 *A*-浓度(mg/L)、*B*-接种量(%)、*C*-盐度(‰)、*D*-pH、*E*-温度(°C)为影响因素,通过 Design-Expert 13 生成了具包含 12 条试验设计的正交矩阵,见表 1。按照该方案检测菌株 LS-1 在 48 h 内对 SMX 的降解情况。

通过回归分析得到多元一次回归方程(以编码值表示),如公式(2)所示。

$$Y_{48\text{h降解率}}=38.77+5.75A+1.42B-1.38C+3.81D+2.26E \quad (2)$$

回归方程拟合分析结果表明, Fisher 检验(*F* 值)为 21.65, 对应的概率检验(*P* 值)为 0.000 9, 远小于系统所给的参考值 0.001, 表明模型整体在统计上极显著。通过 R^2 (决定系数)评估模型的拟合度^[39]。 $R^2=0.947 5$ 接近 1, 表明模型对预测响应值的置信度高。Adj R^2 为 0.903 7, 接近 1, 表明模型的有效性。 $R^2=0.947 5$ 和 Adj $R^2=0.903 7$ 之间的差值为 0.043 8<0.1, 表明模型的解释能力在统计上具有显著性^[40]。通过 PB 试验, 筛选出对响应值影响较大的因素。其中, 因素 *A* (SMX 浓度) *P* 值为 0.000 2 ($P<0.001$), 表现

表1 Plackett-Burman实验方案与结果

Table 1 Plackett-Burman experimental protocol and results

Test number	<i>A</i> -concentration (mg/L)	<i>B</i>	<i>C</i> -salinity (‰)	<i>D</i> -pH	<i>E</i> - <i>T</i> /°C	48 h removal efficiency (%)
1	50	7	20	9.0	35	54.48
2	10	7	35	5.0	35	31.56
3	50	3	35	9.0	25	43.31
4	10	7	20	9.0	35	41.31
5	10	3	35	5.0	35	30.93
6	10	3	20	9.0	25	35.11
7	50	3	20	5.0	35	39.05
8	50	7	20	5.0	25	44.09
9	50	7	35	5.0	25	37.32
10	10	7	35	9.0	25	32.38
11	50	3	35	9.0	35	48.87
12	10	3	20	5.0	25	26.85

为极显著; *D* (pH)和 *E* (温度) *P* 值分别为 0.001 9 和 0.020 3, 表现为显著 ($P<0.05$); *C* (盐度)、*D* (pH) *P* 值>0.05, 差异不显著。因此, 对响应值影响作用排名前 3 的因素为 $A>D>E$ 。

2.4.2 响应面优化试验

筛选出 *A*-浓度、*D*-pH、*E*-温度作为 48 h 降解率条件中的关键影响因素。分别取 3 个因素的高(+1)、中(0)、低(-1) 3 个水平, 设计 Box-Behnken 响应面试验, 见表 2。3 因素 3 水平的正交组合设计及降解率试验结果如表 2 所示。

48 h 降解率模型建立与分析得到二次多项回归模型, 如公式(3)所示。

$$Y_{48\text{h降解率}}=59.49+4.43A+2.15B+1.65C+5.56AB-3.24AC+0.51BC-14.27A^2-8.15B^2-7.75C^2 \quad (3)$$

方程中的 *A*、*B* 和 *C* 分别代表浓度(mg/L)、pH 和温度(°C)的编码值。回归方程中系数的正

表2 48 h降解率的响应曲面优化设计与结果

Table 2 Response surface optimization design and results of 48 h removal efficiency

Test number	<i>A</i> -concentration (mg/L)	<i>B</i> -pH	<i>C</i> - <i>T</i> /°C	48 h removal efficiency (%)
1	10	5.0	30	34.68
2	50	5.0	30	32.82
3	10	9.0	30	30.19
4	50	9.0	30	50.59
5	10	7.0	25	28.36
6	50	7.0	25	43.27
7	10	7.0	35	38.15
8	50	7.0	35	40.12
9	30	5.0	25	41.47
10	30	9.0	25	42.41
11	30	5.0	35	43.74
12	30	9.0	35	46.73
13	30	7.0	30	60.72
14	30	7.0	30	58.92
15	30	7.0	30	60.78
16	30	7.0	30	57.05
17	30	7.0	30	59.98

负符号表示变量的协同效应和拮抗效应。由表 2 可知, 第 15 条实验在浓度为 30 mg/L、pH 7.0、温度为 30 °C 时, 菌株 LS-1 对 SMX 的降解率最高, 达到 60.78%。当条件设置为浓度为 10 mg/L、pH 7.0、温度为 25 °C 时, 降解率最低, 仅为 28.36%。

经过实验数据与二次多项式回归模型的统计检验可知, 响应值 F 值为 71.10, 概率值 (P 值) < 0.000 1, 这表明由于噪声引起模型误差的可能性仅为 0.01%^[41]。 $R^2=0.989 2$ 接近 1, 证明了拟合的质量。 $R^2=0.989 2$ 和 $Adj R^2=0.975 3$ 几乎一致, 表明模型拟合效果良好^[42]。就回归方程的系数而言, 除线性系数 C (温度) 和 BC (温度和 pH 的交互系数) 外, 其他系数的 P 值检验均小于 0.01, 表现为极显著; 系数 C 的 P 值 < 0.05, 表现为显著; BC 项的 P 值检验大于 0.05, 结果失拟。以上检测值综合表明模型拟合效果良好。

如图 5A 所示, pH 值和 SMX 浓度对 SMX 降解率存在交互作用影响。其中, 三维立体图呈现出明显的拱形结构, 其曲面弧度在 3 个图中最为显著。当 pH 值固定为 7.0 时, 改变 SMX 的初始浓度会导致 48 h 降解率迅速变化, 从较低值上升至最大值 60.78%, 降解率变化趋势为先升高后降低。相反, 当温度固定在某值时, 降解率随污染物浓度的变化较为缓慢。三维图表明, 在中性 pH 条件下, 改变污染物的初始浓度会导致降解率变化最为显著。二维等高线图呈现为长轴与短轴差异较大的椭圆形, 表明 pH 值与浓度之间的交互作用较强。此外, 等值线之间的差距较大(40%–60%), 说明在两因素共同作用下响应值的变化范围较大。温度与 SMX 初始浓度之间的相互作用特征见图 5B。三维立体图呈现拱形, 二维等值线图呈椭圆形, 表明两者之间存在显著的交互作用。当温度固定在约 30 °C 时, SMX 初始浓度对降解率的影响表现为: 从 10 mg/L 增加到 50 mg/L 时, 降解率先上升后下降, 这一结果与单因素试验的观察结果

一致。温度与 pH 值的交互作用如图 5C 所示, 两者作用下响应值的三维立体图颜色变化较其他两因素作用变化较小, 二维等值线图的圆形形状表明, 两者并不存在明显的交互作用。Chen 等^[43]通过响应面法和 Box-Behnken 试验设计, 对芽孢杆菌菌株 DLY-11 降解磺胺喹恶啉 (sulfaminoxalin, SQ) 的效率提升进行了优化。研究发现, pH 值与温度之间的交互作用对降解效率的影响并不显著, 在固定温度条件下, SQ 的降解速率随 pH 值的升高呈现先增加后降低的趋势; 而在恒定 pH 值条件下, 温度的升高则显著促进了 SQ 的降解速率^[43]。Tian 等^[44]的研究表明, 与食氢产水菌属 (*Hydrogenophaga*) 相关的菌株能够高效降解 SMX, 并通过响应面法优化了该菌株对 SMX 的降解效率。结果表明, 该菌株对 SMX 的降解过程与准一级动力学模型具有高度一致性^[44]。优化降解细菌的效率对于揭示降解机制以及推动其实际应用具有关键性意义。这一过程不仅有助于深入理解不同菌株在多变环境条件下的适应性特征, 还能有效阐释降解率随多种条件变化的动态趋势, 从而为相关研究提供更为全面的理论依据^[45]。

2.4.3 优化结果验证

为了验证拟合模型对 SMX 降解率最大值的可信度, 按照预测的最大降解率条件(浓度 34 mg/L、pH 7.4、温度 30 °C), 进行了 3 个平行实验。3 个重复实验的最大降解率为(59.26±2.00)%。预测结果与实验结果之间具有良好的一致性。

2.5 降解产物及降解途径分析

SMX 的分子结构中, 五元环与磺胺基团相连, 较小的角张力赋予其相对稳定的分子构型^[46]。本研究对 LS-1 菌株在不同降解时间处理的 SMX 样品进行了质谱分析, 结果如图 6 所示。其中, N-乙酰基-SMX ($m/z=295$) 及其衍生物被检出, 这些产物可能是由 SMX 发生氨基氧化 ($m/z=283$) 及氨基乙酰化反应生成的。在相关研究中, SMX 的乙酰化产物 N⁴-乙酰氨基-SMX 常有报道, 它是人和动物体内常见的 SMX 代谢产

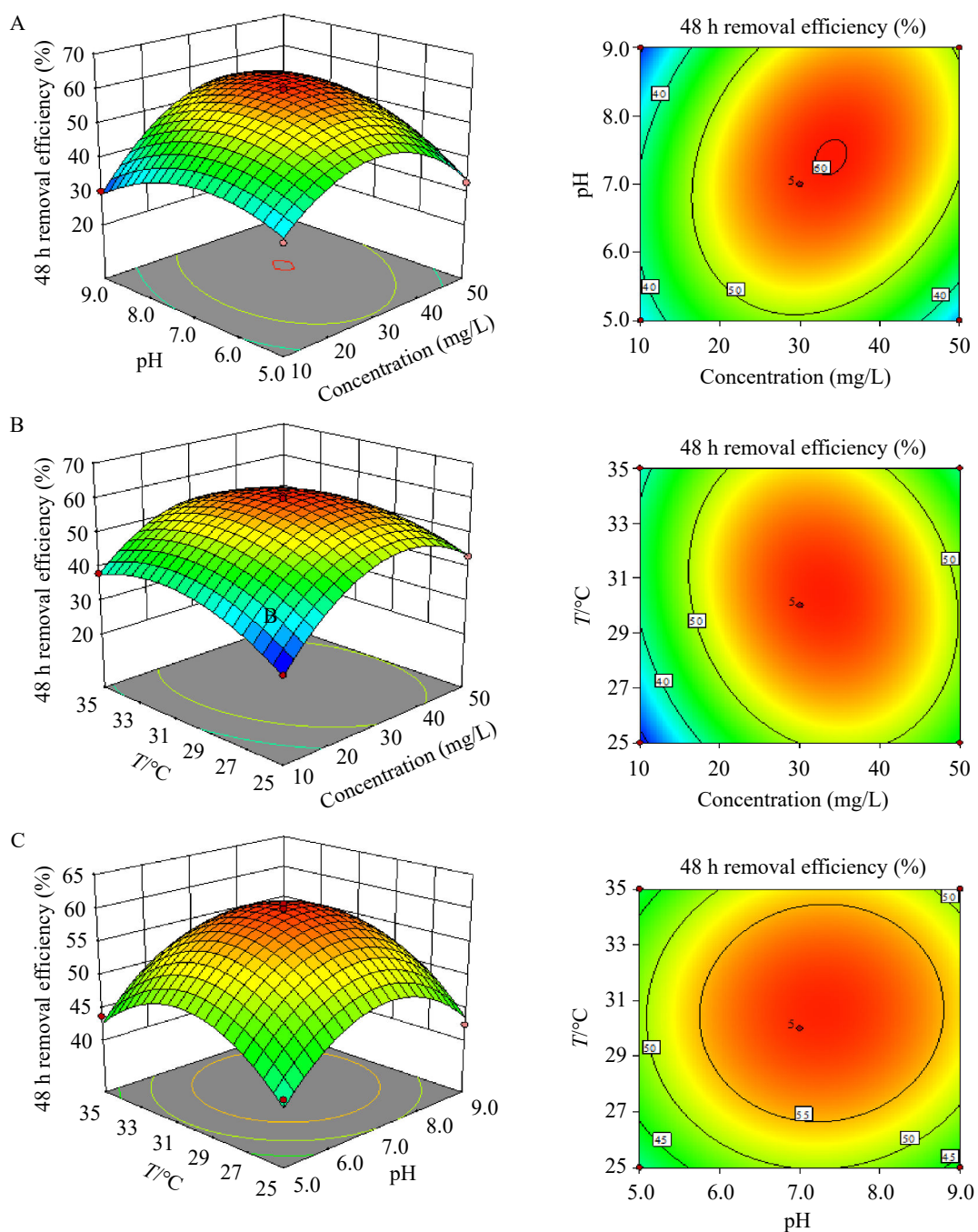


图5 影响条件对48 h降解率的响应曲面图和等高线图

Figure 5 The response surface and contour plots of the 48 hour degradation efficiency under different influencing conditions. A: pH and concentration; B: Temperature and concentration; C: Temperature and pH.

物^[47-48], 其代谢过程与细菌中的 N-乙酰转移酶 (NAT) 密切相关, 是 SMX 解毒的关键途径之一^[49]。质谱检测还发现了 3-氨基-5-甲基异恶

唑(3A5MI, $m/z=98$), 这是一种常见的 SMX 代谢产物。有研究指出, 3A5MI 的生成受到 2 个单加氧酶基因(*sanA* 和 *sadB*)和 1 个 NADH⁺还原

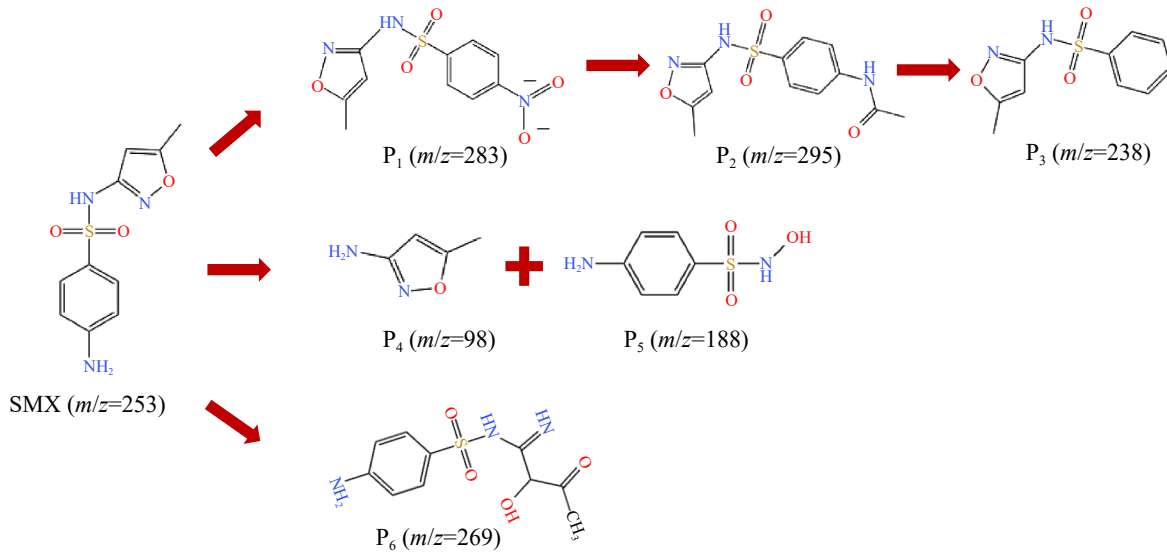


图6 SMX降解产物及降解路径推断

Figure 6 SMX degradation products and proposed degradation pathway.

酶基因(*sadC*)编码酶的共同作用^[50-51]。与其共存的还有 3-羟基-5-氨基-SMX ($m/z=188$)，这是 SMX 发生 C-N 键断裂后羟基化反应的产物，在 3A5MI 生成前，可能存在 4-氨基-N-氢苯磺酰胺 (4ANSH)，但 4ANSH 可能不稳定，迅速脱水至磺胺^[16]。此外，有研究指出，与 3A5MI 一同产生的中间产物 P₄ 是一种发育性无毒剂^[52]。Qi 等^[53]指出，SMX 可以被活性污泥微生物组完全代谢，并将其转化为 3A5MI 和对氨基苯酚，在降解过程中，3A5MI 呈现稳定积累的状态，而氨基苯酚则被迅速消耗。本研究还检测到了磺胺甲恶唑羟胺($m/z=269$)，它是由五元环上 N-O 键断裂后形成的羟基化产物。该产物的生成可能与微生物体内单加氧酶及活性氧的协同作用密切相关。具体而言，异恶唑环中 N-O 键的裂解可能引发这一转变，进而生成不稳定的自由基阴离子中间体，并最终转化为多种稳定的终末产物^[54]。

2.6 急性毒性试验

采用发光细菌法对不同浓度的样品进行水质急性毒性检测，评估样品对发光细菌的毒性效应。设置了 5、10、20、50、100 mg/L 5 个

SMX 浓度梯度，并在 0、24、48 h 3 个关键时间点进行取样检测。结果如图 7 所示，图 A 和图 B 分别为发光细菌在 15 min 和 30 min 时的相对发光率。结果表明，在未经 LS-1 处理的不同浓度 SMX 样品中，细菌相对发光率随 SMX 浓度的提高而显著降低，且发光率普遍处于较低水平(<50%)，表明不同浓度的 SMX 具有较强的水质毒性。进一步对比图 A 与图 B 可见，经 LS-1 作用后，在低浓度(5、10 和 20 mg/L)条件下，细菌相对发光率显著提升($P<0.05$)，说明在 24 h 和 48 h 时，SMX 的水质毒性经 LS-1 处理后已大幅减弱。已有报道表明，SMX 转化为 N⁴-乙酰磺胺甲恶唑后，相比母体有较低的毒性^[55]，同时，SMX 上氨基的氧化有利于解毒^[56]。然而，在 50 mg/L 浓度下(图 C)，细菌相对发光率从 0 h 的 24% 上升至 24 h 的 53%，随后在 48 h 回落至 20%，图 D 也呈现出相同趋势，且数值变化相对稳定。在更高浓度(100 mg/L)时，LS-1 菌株对 SMX 的水质毒性影响较小($P>0.05$)，甚至随着时间推移，毒性呈现上升趋势(图 D)。推测这可能是因为高浓度的 SMX 对 LS-1 的生长产生了抑制作用，同时可能促使毒性更高的中间产物

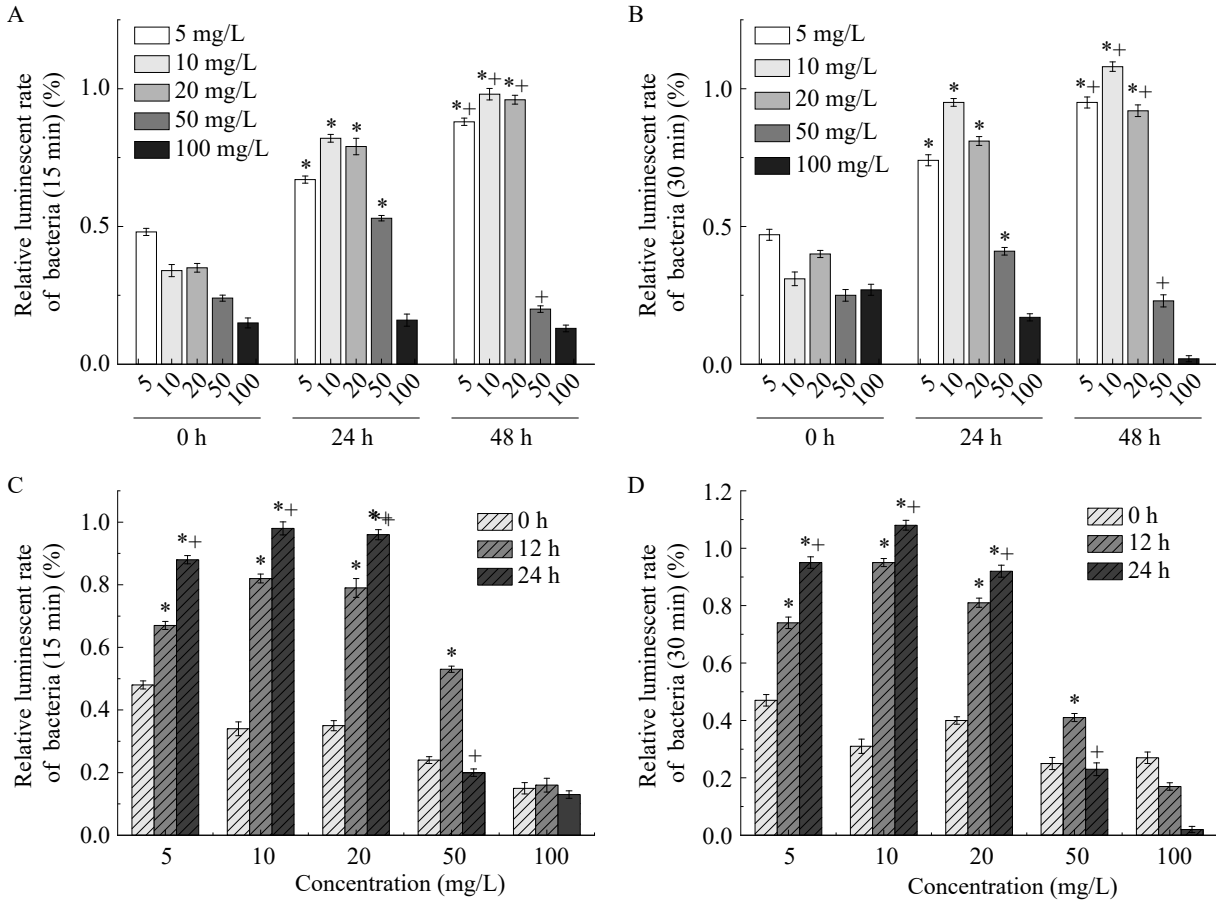


图7 水质急性毒性实验

Figure 7 Water quality acute toxicity test. *: $P < 0.05$ vs. 0 h untreated group. +: $P < 0.05$ vs. 24 h treatment group.

生成。研究发现，3A5MI 为已检测出的毒性高于母体的中间产物^[57]，其积累可能影响了 LS-1 对 SMX 毒性处理的效果。

3 结论

从海水养殖池底泥中筛选出了一株具有耐盐性能的 SMX 降解菌 LS-1。通过 16S rRNA 基因测序和系统发育树分析，鉴定该菌株为产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)。菌株的对数生长期在 28 h 左右，在 48 h 内对 SMX 的降解率达到 52.13%。单因素试验表明，菌株在不同盐度(15‰–35‰)、污染物浓度(10–100 mg/L)、温度(20–35 °C)和初始 pH (5.0–9.0)条件下表现出良好的适应性。对 SMX 降解率影响显著的因素从强到弱排序为：

SMX 浓度、pH 和温度。响应面分析显示，SMX 浓度与 pH、浓度和温度之间的交互作用显著。SMX 降解的最优条件为：SMX 浓度 34 mg/L、初始 pH 7.4、温度 30 °C，在此条件下，降解率可达 59.26%，经验证实实际值与预测值具有良好的一致性。经质谱分析，LS-1 菌对 SMX 的降解产物为 N-乙酰基-SMX ($m/z=295$)、3A5MI 和磺胺甲恶唑羟胺($m/z=269$)等，主要降解途径为氨基乙酰化，羟基化和五元环 N-O 键断裂。在 SMX 低浓度时，经过 LS-1 菌的处理，水质毒性迅速减弱。该菌株能够有效控制海水养殖环境中的 SMX，对抗生素污染的防治具有很好的应用前景。

作者贡献声明

厉怡君：实验设计、操作及论文撰写；赵阳国：实验指导、论文修改和润色；刘磊：协助实验操作、论文讨论；岳梦晨：协助实验操作、论文讨论；张彦超：协助实验操作及指导，李欢欢：协助实验操作。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] CHEN GL, LI YZ, WANG J. Occurrence and ecological impact of microplastics in aquaculture ecosystems[J]. *Chemosphere*, 2021, 274: 129989.
- [2] NAYLOR RL, HARDY RW, BUSCHMANN AH, BUSH SR, CAO L, KLINGER DH, LITTLE DC, LUBCHENCO J, SHUMWAY SE, TROELL M. A 20-year retrospective review of global aquaculture[J]. *Nature*, 2021, 591(7851): 551-563.
- [3] HE LX, HE LY, GAO FZ, ZHANG M, CHEN J, JIA WL, YE P, JIA YW, HONG B, LIU SS, LIU YS, ZHAO JL, YING GG. Mariculture affects antibiotic resistome and microbiome in the coastal environment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 452: 131208.
- [4] ZHANG SQ, ZHAO X, FENG KS, HU YC, TILLOTSON MR, YANG L. Do mariculture products offer better environment and nutritional choices compared to land-based protein products in China? [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 372: 133697.
- [5] GONZÁLEZ-GAYA B, GARCÍA-BUENO N, BUELOW E, MARIN A, RICO A. Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 806: 151190.
- [6] 彭霏. 我国海水养殖污染问题与其治理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014.
PENG P. The Study of pollution and control in saltwater aquaculture in China[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [7] 于世雄. 基于生命周期的海水养殖环境影响评估: 以山东省为例[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2023.
YU SX. Assessment of environmental effect of seawater aquaculture based on LCA: taking Shandong Province as an example[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2023 (in Chinese).
- [8] CHEN JJ, GAO MC, ZHAO YG, GUO L, JIN CJ, JI JY, SHE ZL. Nitrogen and sulfamethoxazole removal in a partially saturated vertical flow constructed wetland treating synthetic mariculture wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 358: 127401.
- [9] CHEN JM, SUN RX, PAN CG, SUN Y, MAI BX, LI QX. Antibiotics and food safety in aquaculture[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(43): 11908-11919.
- [10] LIU XW, LV K, DENG CX, YU ZM, SHI JH, JOHNSON AC. Persistence and migration of tetracycline, sulfonamide, fluoroquinolone, and macrolide antibiotics in streams using a simulated hydrodynamic system[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252: 1532-1538.
- [11] ZHANG B, HE YK, SHI WX, LIU LJ, LI L, LIU C, LENS PNL. Biotransformation of sulfamethoxazole (SMX) by aerobic granular sludge: Removal performance, degradation mechanism and microbial response[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 858: 159771.
- [12] DENG YY, ZOU MY, LIU W, LIAN YL, GUO QM, ZHANG XM, DAN A. Antibiotic removal and microbial response mechanism in constructed wetlands treating aquaculture wastewater containing veterinary drugs[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 394: 136271.
- [13] LIANG DH, HU YY, LIANG DM, CHENGA JH, CHENA YC. Bioaugmentation of moving bed biofilm reactor (MBBR) with *Achromobacter* JL9 for enhanced sulfamethoxazole (SMX) degradation in aquaculture wastewater[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207: 111258.
- [14] BORSETTO C, RAGUIDEAU S, TRAVIS E, KIM DW, LEE DH, BOTTRILL A, STARK R, SONG LJ, CHA CJ, PEARSON J, QUINCE C, SINGER AC, WELLINGTON EMH. Impact of sulfamethoxazole on a riverine microbiome[J]. *Water Research*, 2021, 201: 117382.
- [15] PRASANNAMEDHA G, KUMAR PS. A review on contamination and removal of sulfamethoxazole from aqueous solution using cleaner techniques: present and future perspective[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 250: 119553.
- [16] WANG QN, WANG HD, LV M, WANG XY, CHEN LX. Sulfamethoxazole degradation by *Aeromonas caviae* and co-metabolism by the mixed bacteria[J]. *Chemosphere*, 2023, 317: 137882.
- [17] KONG SJ, ZHAO YG, GUO L, GAO MC, JIN CJ, SHE ZL. Transcriptomics of *Planococcus kocurii* O516 reveals the degrading metabolism of sulfamethoxazole in marine aquaculture wastewater[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265: 114939.
- [18] LIU XH, CHEN J, LIU Y, WAN ZF, GUO XC, LU SY, QIU DR. Sulfamethoxazole degradation by *Pseudomonas silesiensis* F6a isolated from bioelectrochemical technology-integrated constructed wetlands[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 240: 113698.
- [19] LI YX, YANG T, LIN XJ, HUANG JF, ZENG JW, CAI QY, ZHANG YL, RONG JN, YU WD, QIU JR, PANG YW, ZHOU JL. Isolation, identification, and optimization of conditions for the degradation of four sulfonamide antibiotics and their metabolic pathways in *Pseudomonas stutzeri* strain DLY-21[J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): e29123.
- [20] QI MY, MA XD, LIANG B, ZHANG LY, KONG DY, LI

- ZL, WANG AJ. Complete genome sequences of the antibiotic sulfamethoxazole-mineralizing bacteria *Paenarthrobacter* sp. P27 and *Norcardiodes* sp. N27[J]. *Environmental Research*, 2022, 204: 112013.
- [21] NODEHI RN, SHEIKHI S. Nanomaterial-based AOPs for the removal of organic pollutants in aqueous matrices: a systematic review of response surface methodology (RSM) models[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2024, 35: 103718.
- [22] SHAMSKILANI M, NIAVOL KP, NABAVI E, MEHRNIA MR, SHARAFI AH. Removal of emerging contaminants in a membrane bioreactor coupled with ozonation: optimization by response surface methodology (RSM)[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2023, 234(5): 304.
- [23] CHEN JL, XU J, ZHANG SN, LIU F, PENG JW, PENG YX, WU JS. Nitrogen removal characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria, *Alcaligenes faecalis* strain WT14[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 282: 111961.
- [24] CAO XH, ZHAO BH, WU YM, HUANG J, WANG HZ, SUN XY, LI SJ. Characterization of *Alcaligenes aquatilis* as a novel member of heterotrophic nitrifier-aerobic denitrifier and its performance in treating piggery wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 354: 127176.
- [25] AO XW, LIU WJ, SUN WJ, YANG C, LU ZD, LI C. Mechanisms and toxicity evaluation of the degradation of sulfamethoxazole by MPUV/PMS process[J]. *Chemosphere*, 2018, 212: 365-375.
- [26] DŁUGOSZ M, PAWEŁ Ż, KWIECIEŃ A, SZCZUBIAŁKA K, KRZEK J, NOWAKOWSKA M. Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous solution using a floating TiO₂-expanded perlite photocatalyst[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298: 146-153.
- [27] URBANO M. Factors controlling Macondo oil biodegradation on a rapidly eroding coastal headlands beach[D]. Louisiana State University Libraries, Master of Science in Civil Engineering (MSCE), 2012. DOI: 10.31390/gradschool.theses.3748.
- [28] XIONG Q, LIU YS, HU LX, SHI ZQ, CAI WW, HE LY, YING GG. Co-metabolism of sulfamethoxazole by a freshwater microalga *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Water Research*, 2020, 175: 115656.
- [29] SHI JX, XU CY, HAN YX, HAN HJ. Enhanced anaerobic degradation of nitrogen heterocyclic compounds with methanol, sodium citrate, *Chlorella*, *Spirulina*, and carboxymethylcellulose as co-metabolic substances[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121496.
- [30] VO HNP, NGO HH, GUO WS, LIU YW, CHANG SW, NGUYEN DD, ZHANG XB, LIANG H, XUE S. Selective carbon sources and salinities enhance enzymes and extracellular polymeric substances extrusion of *Chlorella* sp. for potential co-metabolism[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 303: 122877.
- [31] MISHRA A, MANDOLI A, JHA B. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(10): 1093-1101.
- [32] XIONG JQ, KURADE MB, PATIL DV, JANG M, PAENG KJ, JEON BH. Biodegradation and metabolic fate of levofloxacin via a freshwater green *Alga*, *Scenedesmus obliquus* in synthetic saline wastewater[J]. *Algal Research*, 2017, 25: 54-61.
- [33] REIS PJM, REIS AC, RICKEN B, KOLVENBACH BA, MANAIA CM, CORVINI PFX, NUNES OC. Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 280: 741-749.
- [34] YAN RF, WANG YB, LI JH, WANG XH, WANG YK. Determination of the lower limits of antibiotic biodegradation and the fate of antibiotic resistant genes in activated sludge: both nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria matter[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 127764.
- [35] MOHAPATRA B, PHALE PS. Microbial degradation of naphthalene and substituted naphthalenes: metabolic diversity and genomic insight for bioremediation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 602445.
- [36] GOERS L, FREEMONT P, POLIZZI KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level[J]. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2014, 11(96): 20140065.
- [37] 赵翔宇, 马冬雪, 赵阳国. 海水养殖生境中硫酸盐还原菌活性的抑制机制[J]. *微生物学报*, 2022, 62(8): 3048-3061.
- ZHAO XN, MA DX, ZHAO YG. Sulfide-producing activity inhibition of sulfate-reducing bacteria in mariculture[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(8): 3048-3061 (in Chinese).
- [38] ISLAM MS. Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(1): 48-61.
- [39] NAM SN, CHO H, HAN J, HER N, YOON J. Photocatalytic degradation of acesulfame K: optimization using the Box-Behnken design (BBD)[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2018, 113: 10-21.
- [40] 张晓菲, 倪晓菁, 张子仪, 等. 响应面法优化黑曲霉固定化条件及其对土壤中溴氰菊酯的降解特性研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4574-4593.
- ZHANG XF, NI XQ, ZHANG ZY, PRNG FQ, ZHOU SY, RAN XY, FANG YW, LIANG XY, ZHOU TY, WANG Q, LIU P. Optimization of immobilization conditions of *Aspergillus niger* for degrading deltamethrin in soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4574-4593 (in Chinese).
- [41] FAVIER L, ANDREI-IONUȚ SIMION, HLIHOR RM, FEKETE-KERTÉSZ I, MOLNÁR M, HARJA M, VIAL C. Intensification of the photodegradation efficiency of an emergent water pollutant through process conditions optimization by means of response surface methodology[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 328: 116928.
- [42] WANG ZY, SONG W, LI J, ZHANG XL, WANG HJ.

- Optimization and mechanism of Tetrabromobisphenol A removal by dithionite under anaerobic conditions: Response surface methodology and degradation pathway[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 321: 116034.
- [43] CHEN CY, LUO ZF, TU HX, LIN XJ, PANG YW, HUANG JF, ZHANG J, WANG XJ, CAI QY, WEI ZB, ZENG JW, QIU JR. Response surface methodology and Box-Behnken design optimization of Sulfaquinoxaline removal efficiency and degradation mechanisms by *Bacillus* sp. strain DLY-11[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2025, 486: 136986.
- [44] TIAN SH, YOU LL, HUANG X, LIU CX, SU JQ. Efficient sulfamethoxazole biotransformation and detoxification by newly isolated strain *Hydrogenophaga* sp. SNF1 via a ring ortho-hydroxylation pathway[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 480: 136113.
- [45] ZHANG MY, FAN DP, SU C, PAN LQ, HE QL, LI ZL, LIU C. Biotransformation of sulfamethoxazole by a novel strain, *Nitratireductor* sp. GZWM139: characterized performance, metabolic mechanism and application potential[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 441: 129861.
- [46] DONG ZK, YAN XJ, WANG JH, ZHU LS, WANG J, LI CY, ZHANG WJ, WEN SF, KIM YM. Mechanism for biodegradation of sulfamethazine by *Bacillus cereus* H38[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 809: 152237.
- [47] HARNISCH F, GIMKIEWICZ C, BOGUNOVIC B, KREUZIG R, SCHRÖDER U. On the removal of sulfonamides using microbial bioelectrochemical systems[J]. *Electrochemistry Communications*, 2013, 26: 77-80.
- [48] RADKE M, LAUWIGI C, HEINKELE G, MÜRDTER TE, LETZEL M. Fate of the antibiotic sulfamethoxazole and its two major human metabolites in a water sediment test[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(9): 3135-3141.
- [49] CRIBB AE, NAKAMURA H, GRANT DM, MILLER MA, SPIELBERG SP. Role of polymorphic and monomorphic human arylamine N-acetyltransferases in determining sulfamethoxazole metabolism[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1993, 45(6): 1277-1282.
- [50] RICKEN B, KOLVENBACH BA, BERGESCH C, BENNDORF D, KROLL K, STRNAD H, VLČEK Č, ADAIXO R, HAMMES F, SHAHGALDIAN P, SCHÄFFER A, KOHLER HE, CORVINI PF. FMNH₂-dependent monooxygenases initiate catabolism of sulfonamides in *Microbacterium* sp. strain BR1 subsisting on sulfonamide antibiotics[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 15783.
- [51] RICKEN B, CORVINI PFX, CICHOCKA D, PARISI M, LENZ M, WYSS D, MARTÍNEZ-LAVANCHY PM, MÜLLER JA, SHAHGALDIAN P, TULLI LG, KOHLER HE, KOLVENBACH BA. Ipso-hydroxylation and subsequent fragmentation: a novel microbial strategy to eliminate sulfonamide antibiotics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5550-5558.
- [52] ZHAO X, PEI WN, QI YH, LI YB, KONG XQ. Enhanced aerobic granular sludge with micro-electric field for sulfamethoxazole degradation: efficiency, mechanism, and microbial community[J]. *Chemosphere*, 2024, 354: 141741.
- [53] QI MY, LIANG B, ZHANG L, MA XD, YAN L, DONG WC, KONG DY, ZHANG LY, ZHU HZ, GAO SH, JIANG JD, LIU SJ, CORVINI PF, WANG AJ. Microbial interactions drive the complete catabolism of the antibiotic sulfamethoxazole in activated sludge microbiomes[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(5): 3270-3282.
- [54] REIS AC, KOLVENBACH BA, NUNES OC, CORVINI PFX. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants - part I[J]. *New Biotechnology*, 2020, 54: 34-51.
- [55] MAJEWSKY M, WAGNER D, DELAY M, BRÄSE S, YARGEAU V, HORN H. Antibacterial activity of sulfamethoxazole transformation products (TPs): general relevance for sulfonamide TPs modified at the Para position[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, 27(10): 1821-1828.
- [56] WANG J, SHEN M, WANG HL, DU YS, ZHOU XQ, LIAO ZW, WANG HB, CHEN ZQ. Red mud modified sludge biochar for the activation of peroxymonosulfate: Singlet oxygen dominated mechanism and toxicity prediction[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 740: 140388.
- [57] WANG L, LIU YL, MA J, ZHAO F. Rapid degradation of sulphamethoxazole and the further transformation of 3-amino-5-methylisoxazole in a microbial fuel cell[J]. *Water Research*, 2016, 88: 322-328.