Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

Research
Environmental Engineering—Article

氯霉素及其产物降解菌群在长期驯化过程中的微生物群落和关键基因演替模式

张家禹[a,b,c,d]，周开颜[a,b,c]，郭芳亮[a,b,c]，雷华新[a,b,c]，赵仁鑫[a,b,c]，林 琳[a,b]，李晓岩[a,b]，李炳[a,b,*]

[a] State Environmental Protection Key Laboratory of Microorganism Application and Risk Control, Tsinghua Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China.
[b] Shenzhen Engineering Research Laboratory for Sludge and Food Waste Treatment and Resource Recovery, Tsinghua Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China.
[c] School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China.
[d] Research Center for Eco-Environmental Engineering, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, China

ARTICLE INFO

Article history:
Received 13 January 2023
Revised 19 May 2023
Accepted 11 July 2023
Available online 25 August 2023

关键词
抗生素
生物降解
代谢作用
微生物群落演替
宏基因组

摘要

氯霉素（CAP）作为一种广泛存在的新污染物，对水环境中的生态群落产生了负面影响。生物处理广泛应用于水体污染物的去除，而功能微生物的性能决定了其效果。本研究从活性污泥中驯化了一个具有强大CAP降解能力的菌群。对硝基苯甲酸（PNB）和2,2-二氯乙酸（DCA）是CAP生物和化学处理过程中产生的主要产物，它们也分别作为菌群的唯一底物进行长期驯化。宏基因组分析揭示了2.5年驯化过程中微生物群落和关键功能基因的演替模式。经过长期驯化，*Sphingomonas*、*Caballeronia*和*Cupriavidus*分别成为CAP、PNB和DCA降解菌群中的优势菌属，并且它们分别是CAP、PNB和DCA的关键降解菌，它们之间的协同实现了CAP的高度矿化。PNB转化为原儿茶酸（PCA），然后通过间位和邻位裂解途径被矿化。通过长期驯化，参与CAP、PNB和DCA代谢的关键功能基因，包括CAP乙酰转移酶、CAP氧化还原酶、卤代酸脱卤酶和原儿茶酸双加氧酶，在菌群中显著富集。本研究还发现pH和碳源对CAP的生物降解效率有显著影响。本研究驯化的菌群和分离的菌株可用作加强CAP、PNB和DCA污染环境生物修复的微生物资源。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. 引言

抗生素在临床抗菌治疗中起着至关重要的作用。然而，随着人们对抗生素的过度消费，它们的残留物不断地进入环境中。制药厂、医院、畜禽和水产养殖场的废水是抗生素污染的热点环境[1–3]。抗生素在水环境中的持久残留对生态群落产生负面影响，促进抗生素耐药基因的发展和传播，对临床抗感染治疗提出挑战[4–6]。从废水中去除抗生素可以有效减少抗生素向环境的迁移，这已成为环境工程领域的一项艰巨任务[7]。污水处理厂通常应用生物处理系统去除污水中的有机污染物，微生物在去除有机污染物过程中发挥着关键作用，它们的表现决定了生物处理系统的效果[8]。强有力的抗生素降解微生物的大量存在将显著提高生物处理系统中抗生素的去除效率。活性污泥微生物经常暴露在含抗生素的废水中，可作为抗生素降解微生物的来源，它们可以应用于氯霉素

* Corresponding author.
E-mail address: bingli@sz.tsinghua.edu.cn (B. Li).

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
英文原文：Engineering, 2023, 31(12): 59–69
引用本文：Jiayu Zhang, Kaiyan Zhou, Fangliang Guo, Huaxin Lei, Renxin Zhao, Lin Lin, Xiaoyan Li, Bing Li. The Successional Pattern of Microbial Communities and Critical Genes of Consortia Subsisting on Chloramphenicol and Its Metabolites Through Long-Term Domestication. *Engineering*, https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.07.009

污染环境的生物修复。通过投喂相应的抗生素来驯化活性污泥是重塑具有强大抗生素降解能力的菌群的传统方法[9]。研究人员通常关注驯化菌群的功能和群落结构，而忽略了驯化过程中的群落演替[10–11]。理解微生物群落的驯化过程，将有助于拓展我们对以抗生素为底物的微生物群落演替模式的认识，为改进微生物群落驯化策略提供重要信息。

氯霉素（CAP）作为一种广谱抗生素，由于其有效性和低成本，在一些发展中国家的临床医疗和畜禽、水产养殖生产中被大量使用[2]。CAP通过抑制蛋白质合成来抑制细菌活性，在污水处理厂的废水生物处理系统中是难降解污染物[12]。本研究描述了一个高活性的CAP降解菌群，该菌群具有应用于CAP强化生物处理的潜力。在之前的研究中，我们提出了一个完整的CAP代谢途径，并证明对硝基苯甲酸（PNB）和2,2-二氯乙酸（DCA）是该菌群产生的主要降解产物[13]。此外，一些研究还指出，在CAP生物和化学处理过程中PNB和DCA也是最常见的产物[12,14–16]。PNB和DCA具有遗传毒性和发育毒性[17]。DCA也是在氯消毒等消毒过程中产生的一种常见的有害消毒副产物[18]。由于其对人体健康的不利影响，它已经被纳入中国、美国和加拿大等许多国家的饮用水污染物管控范围[19]。因此有必要驯化菌群或分离降解菌以有效去除水环境中的DCA和PNB。本研究旨在：①通过宏基因组分析揭示来源于活性污泥的CAP降解菌群在长期驯化过程中的微生物群落演替规律；②表征驯化菌群和分离菌株对CAP、PNB和DCA的降解能力；③解译参与CAP、DCA和PNB生物转化的必需功能酶编码基因的动态变化；④揭示环境和营养因素对CAP的生物降解和微生物群落的影响。

2. 材料和方法

2.1. 菌群驯化

在之前的研究中，为了揭示抗生素选择压力下活性污泥中抗生素耐药基因的发展过程，我们建立了处理CAP生产废水的好氧活性污泥生物反应器和无CAP添加的对照生物反应器[20]。本研究则开展了这些生物反应器中微生物群落演替模式的研究。本研究首次揭示CAP降解菌群在整个驯化过程中的时序全景图。生物反应器中的活性污泥来源于当地市政污水处理厂，在之前的研究中已经详细描述生物反应器的运行信息[20]。根据驯化过程中CAP的去除规律，废水中CAP的浓度从20 mg·L^{-1}逐步增加到120 mg·L^{-1}。约5.5个月后，该菌群能稳定降解废水中120 mg·L^{-1} CAP，然后将其接种到含有120 mg·L^{-1} CAP的合成无机盐培养基中进一步驯化，使群落更加简化[13]。约12个月后，将菌群接种到含有100 mg·L^{-1} PNB或DCA的合成无机盐培养基中，再进行12个月的驯化，以培养具有PNB和DCA利用能力的微生物群落。合成无机盐培养基中添加CAP、PNB或DCA为唯一碳源，以30 mg·L^{-1} NH_4Cl为氮源。本研究最终成功驯化了三个能分别利用CAP、PNB和DCA作为唯一碳源的菌群，分别命名为CL-CAP、CL-PNB和CL-DCA。本研究所有批次培养试验均在25 ℃和120 r·min^{-1}的条件下进行。本研究在驯化过程采集16个微生物样本，进行DNA提取和宏基因组测序。此外，本研究还纳入了我们以往研究报道的该生物反应器驯化过程中获取的46个宏基因组数据集，对其进行与以往研究目的不同的宏基因组分析[20–22]。本研究所有样本和宏基因组数据集的信息列在附录A的表S1中。

2.2. 生物降解批次试验

利用驯化的CAP、PNB和DCA降解菌群进行CAP、PNB和DCA生物降解批次实验。在实验过程中收集微生物细胞进行宏基因组测序。我们已经成功利用含CAP的无机盐和R2A琼脂平板从驯化菌群中分离出8株细菌[13, 21]，本研究同时测试这8株细菌对PNB和DCA的生物降解能力。

为了研究不同营养条件对CAP降解菌群的生物降解性能的影响，测试了不同外加碳源（2.4 mmol·L^{-1}、12 mmol·L^{-1}、60 mmol·L^{-1}的乙酸钠、柠檬酸钠、丙酮酸钠、苯甲酸钠）、氮源（0.56 mmol·L^{-1}的NH_4Cl、$NaNO_2$、$NaNO_3$）、初始CAP浓度（50~600 mg·L^{-1}）对CAP生物降解的影响。同时研究接种量（5%、15%、25%培养基体积）、pH（3.5、4.5、6.0、7.5、8.5）和温度（20 ℃、25 ℃、30 ℃）对菌群降解CAP的影响。于接种后36 h和72 h收集菌体用于DNA提取和16S rRNA扩增子测序，但是添加苯甲酸钠或pH为3.5和8.5的培养基，由于细菌生长缓慢而延长了样品采集时间。这些样本的详细信息列在附录A的表S2中。

所有批次实验均设置三个生物平行。离心收集驯化的菌群和分离的菌株细胞，并用新鲜无机盐培养基洗涤三次。然后将收集的细胞接种到含有相应底物的无机盐培养基中进行生物降解实验。间隔时间收集液体样品进行化学分析，并用0.22 μm聚四氟乙烯（PTFE）过滤器过滤（中国安谱实验科技股份有限公司）。使用酶标仪Infinite M200（Tecan，瑞士）在光密度600 nm（OD_{600}）处测定培养物生物量。

2.3. 化学分析

通过TOC-L分析仪（Shimadzu Corporation，日本）测定可溶性总有机碳（TOC）。当CAP、PNB或DCA作为培养基的唯一碳源时，TOC去除率可以代表它们的矿化率，最终矿化率以TOC去除百分比计算。通过我们之前建立的方法使用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（HPLC-QTOF-MS, Impact II™；Bruker，德国）和Thermo Hypersil Gold色谱柱（100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm; Thermo Fisher Scientific，美国）进行CAP、PNB、PCA、DCA的检测和定量[13]。液相洗脱液A为含5 mmol·L^{-1}乙酸铵的超纯水，洗脱液B为甲醇。高效液相色谱梯度洗脱过程见附录A中的表S3。采用我们已经报道的质谱参数在负离子模式下进行化合物定性和定量[13]。注入标准物质溶液进行质谱质荷比（*m*/*z*）校准。在扫描模式下对化学物进行定量分析，根据母体化合物的裂解模式进一步确定化合物的结构。

2.4. DNA提取、宏基因组和16S rRNA扩增子测序

本研究对微生物样品进行了短读长的Illumina和长读长的Oxford nanopore technologies（ONT）宏基因组测序。使用FastDNA™ Spin Kit for Soil（MP Biomedicals，美国）提取样本总DNA用于Illumina宏基因组和16S rRNA扩增子测序，使用DNeasy PowerSoil Kit（Qiagen，美国）提取样本总DNA用于ONT测序。通过1%琼脂糖凝胶电泳和Qubit® 2.0荧光计（Life Technologies，美国）检测DNA质量和浓度。使用NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit（NEB，美国）构建Illumina宏基因组测序文库，在Illumina NovaSeq平台上使用双端150 bp策略进行测序。使用Ligation Sequencing 1D kit（SQK-LSK109）（ONT，英国）进行ONT宏基因组测序文库的构建，使用PromethION（ONT，英国）平台进行ONT宏基因组测序。宏基因组测序由中国诺禾致源公司完成。62个短读长宏基因组数据集和10个长读长宏基因组数据集的信息列于附录A中的表S1。宏基因组数据集已经存入美国国家生物技术信息中心（NCBI）的Sequence Read Archive（SRA）数据库，登录号为PRJNA953649。

对104份样本进行16S rRNA扩增子测序，以表征不同培养条件下的微生物群落结构。在ABI GeneAmp® 9700聚合酶链反应（PCR）仪（Applied Biosystems，美国）上使用引物515F（5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'）和806R（5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'）扩增V4区。采用TransStart® FastPfu DNA Polymerase AP221-01 Kit（TransGen Biotech，中国）进行PCR。20 μL PCR反应体系包括模板DNA 10 ng、5 μmol·L^{-1}前后引物各0.8 μL、2.5 mmol·L^{-1}脱氧核苷三磷酸（dNTPs）2 μL、FastPfu缓冲液4 μL、FastPfu聚合酶0.4 μL。PCR反应步骤为：95 ℃预变性3 min，95 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸45 s，27个循环后72 ℃延伸10 min。使用2%琼脂糖凝胶电泳和AxyPrep DNA Gel Extraction Kit（Axygen Biosciences，美国）纯化扩增产物。使用QuantiFluor™ ST（Promega，美国）对纯化的扩增产物进行定量。然后，由Majorbio（中国）采用双端300 bp测序策略，在Illumina MiSeq平台上进行测序，测序深度为平均每个样本约50 000条序列。16S rRNA扩增子数据集存储到NCBI SRA数据库中，登录号为PRJNA953665。

2.5. 宏基因组数据分析

使用fastp（v0.23.2）对Illumina宏基因组测序数据进行质量控制[23]。通过Kraken2（v2.1.2）对宏基因组数据进行物种分类注释[24]，通过Bracken（v2.7）计算每个分类级别的丰度[25]。使用R（v4.1.2）计算微生物群落的Shannon和Pielou均匀度指数，基于群落的Bray-Curtis距离对样本进行主坐标分析（PCoA）。

使用metaSpades（v3.15.4）组装Illumina宏基因组数据[26]。通过Filtlong过滤ONT数据，最小长度阈值为500 bp，最小平均质量权重阈值为10。过滤后的ONT数据使用metaFlye（v2.9）进行组装[27]。使用Medaka（v1.6.1）、Rcon（v1.4.3）和Pilon（v1.24）[28]对ONT组装文件进行抛光，以获得高质量的ONT组装文件。CL-CAP、CL-PNB、CL-DCA群落的Illumina和ONT测序组装文件通过BASALT复原基因组（MAGs）[29]。使用dRep（v2.0.0）[30]对MAGs进行去冗余，参数为：-sa 0.95 -nc 0.30 -comp 50 -con 10。使用CheckM（v1.2.0）评估MAGs的完整度和污染度[31]。使用GTDB-Tk（v2.1.0）对MAGs进行物种分类注释[32]。通过Prodigal（v2.6.3）预测MAGs中的基因[33]，并由Prokka（v1.14.5）[34]和KofamKOALA [35]进行功能注释。通过CoPTR（v1.1.2）计算MAGs的复制速率[36]。使用CoverM（v0.6.1）计算宏基因组中MAGs的相对丰度，参数为：genome -m relative_abundance –min-read-aligned-percent 0.75 –min-read-percent-identity 0.95。使用R包limma对MAGs丰度进行富集分析[37]。基因丰度计算方法如下：以选定基因为参考序列，使用CoverM软件计算比对到参考基因序列的碱基数目，参数为：contig –m reads_per_base –min-read-aligned-percent 0.75 –min-read-percent-identity 0.95，然后除以数据集的总碱基数得到所选基因的相对丰度（覆盖率，×/

Gb）[20]。

2.6. 16S rRNA扩增子测序数据分析

通过QIIME2平台分析16S rRNA扩增子测序数据[38]。先对序列进行质控过滤，然后采用deblur方法对序列进行去噪和聚类，生成物种分类单元（OTU）表。每个代表性序列的物种分类由Ribosomal Database Project（RDP, v 2.11）[39]注释，置信阈值为80%。采用R（v4.1.2）进行冗余分析（RDA）和Adonis检验，从而揭示pH、温度、接种量、初始CAP浓度和外加碳、氮源等环境和营养因素对微生物群落结构的影响。

3. 结果与讨论

3.1. 三个驯化菌群分别具有CAP、PNB和DCA降解能力

三个驯化菌群对CAP、PNB和DCA降解能力如图1所示。经过2.5年的驯化后，菌群CL-CAP在36 h内能够完全降解250 mg·L^{-1} CAP，矿化率为93.7% [图1（a）和（d）]。我们之前的研究阐明了CAP的生物代谢途径，发现PNB和DCA是该菌群降解CAP的主要下游产物[13]。据报道，PNB和DCA是CAP生物处理过程中最常见的产物[12–13,16]。此外，在CAP的化学处理过程如电化学和高级氧化降解过程中也能广泛检测到产物PNB和DCA[14–15,40–41]。

PNB是一种硝基苯类化合物，是工业生产的重要原料和中间产品。然而，由于其具有遗传毒性和难降解的特性，应在排放到环境中之前消除其在工业废水中的残留[17,42]。DCA属于卤乙酸（HAAs）类化合物，是一种常见的有害消毒副产物，具有细胞毒性、致癌性、基因毒性、致畸性和致突变性[18,43]。HAAs的形成和消除引起了广泛关注，近年来得到了广泛的研究[44–45]。本研究分别以PNB和DCA作为降解菌群的唯一碳源驯化12个月，最终驯化形成两个菌群CL-PNB和CL-DCA，其表现出高效的降解能力。CL-PNB能在14 h内完全降解250 mg·L^{-1}的PNB，矿化率为95.9% [图1（b）和（e）]，CL-DCA能在8 h内完全降解100 mg·L^{-1}的DCA，矿化率为91.0% [图1（c）和（f）]。这三个菌群表现出高效的降解效率，具有应用于PNB和DCA污染环境生物修复的潜力。

3.2. 宏基因组复原的MAGs和群落中分离的菌株

通过对短读长和长读长宏基因组进行分析，从三个驯化的菌群中复原了21个MAGs [图2（a）]。其中，三个MAGs（MAG4、MAG5和MAG6）是只包含一条环状contig的完整基因组[图2（b）和（c）]。其中，13个MAGs是高质量基因组，它们的完整度大于95%，污染度

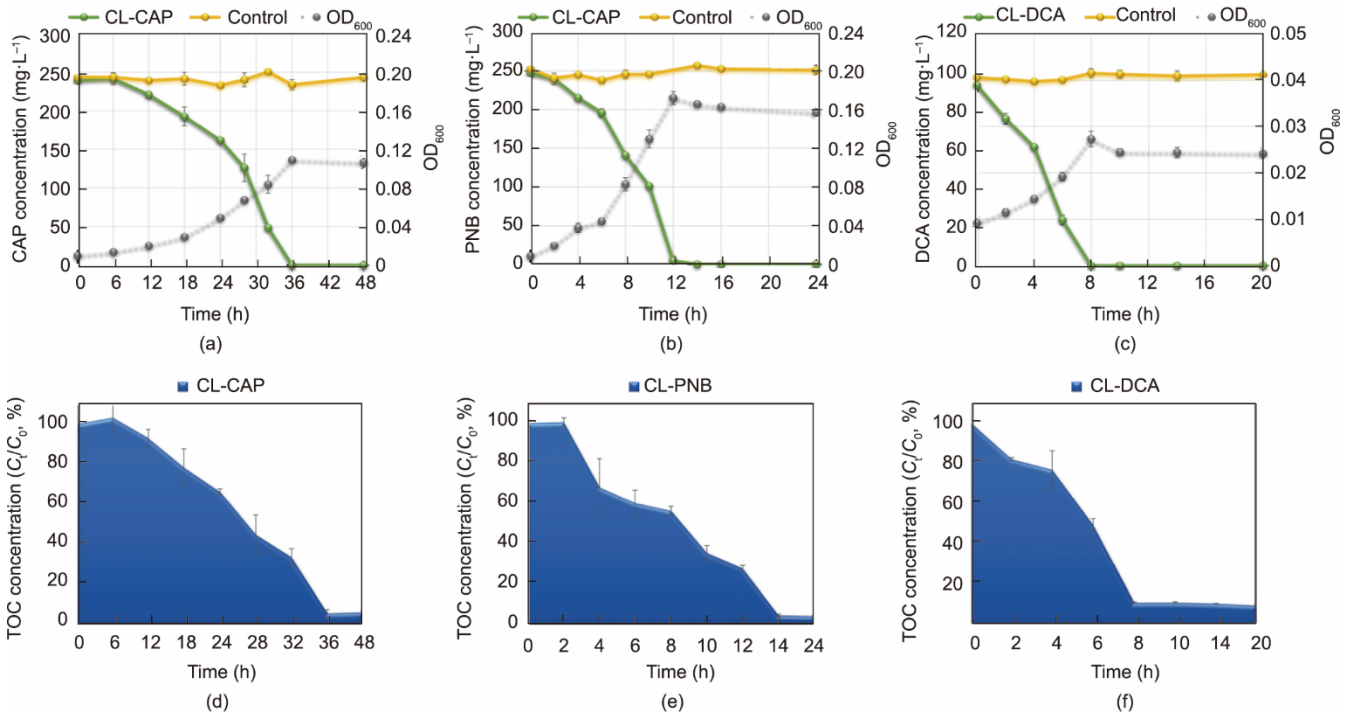

图1. 三个驯化菌群对CAP、PNB和DCA的生物降解性能。（a）~（c）CL-CAP、CL-PNB和CL-DCA富集菌群对CAP、PNB和DCA的生物降解。（d）~（f）CL-CAP、CL-PNB和CL-DCA富集菌群对CAP、PNB和DCA的矿化作用。CAP、PNB和DCA的初始浓度分别为250 mg·L^{-1}、250 mg·L^{-1}和100 mg·L^{-1}。数据表示为三个重复的均值±标准差（SD）。C_t：时间为t时的数值；C_0：0 h的初始值。

小于3.5%[图2（c）]。MAG1、MAG2、MAG3、MAG4和MAG5分别属于*Sphingomonas*、*Cupriavidus*、*Caballeronia*、*Pigmentiphaga*和*62-47*，它们在CL-CAP群落中占主导地位（平均相对丰度 > 1.0%）[图2（a）]。MAG2（*Cupriavidus*）、MAG3（*Caballeronia*）和MAG4（*Pigmentiphaga*）在CL-PNB菌群中占优势，而MAG2（*Cupriavidus*）和MAG5（*62-47*）在CL-DCA菌群中占优势[图2（a）]。MAG1（*Sphingomonas*）、MAG2（*Cupriavidus*）、MAG3（*Caballeronia*）分别在CL-CAP、CL-DCA和CL-PNB菌群中显著富集（$p < 0.05$），它们在相应群落中平均相对丰度分别为58.6%、92.5%和76.5%，表明它们可能分别是CAP、DCA和PNB生物降解的关键菌属[图2（a）和图3]。在CAP、DCA和PNB降解过程中，MAG1、MAG2和MAG3的复制速率呈倒“U”形模式[图2（a）]，上述结果表明它们可能是负责CAP、DCA和PNB降解的关键菌。

我们之前的研究已经证实：从CL-CAP菌群中分离出的*Sphingomonas* sp. CL5.1是重要的CAP降解菌，可以将CAP分解为PNB和DCA [13]。本研究测试了CL-CAP菌群中分离出的8株菌株对PNB和DCA的降解能力，其结果如图3所示。*Sphingomonas* sp. CL5.1、*Caballeronia* sp. CLC5和*Caballeronia* sp. PC1是PNB降解菌，可以利用PNB作为唯一的碳源[图3（a）]。在丙酮酸钠存在时，*Cupriavidus* sp. CLC6也可以通过共代谢降解PNB [图3（b）]。其中，*Caballeronia* sp. CLC5对PNB的降解能力最强，它可以在18 h内完全降解100 mg·L^{-1} PNB，并且矿化率达到89.7% [图3（a）、（c）]。*Cupriavidus* sp. CLC6是一个强大的DCA降解菌，可以在36 h内完全降解100 mg·L^{-1} DCA，矿化率为70.7% [图3（d）、（f）]，而*Caballeronia* sp. CLC5和*Caballeronia* sp. PC1也可以通过共代谢降解DCA [图3（e）]。因此我们得出结论：*Shingomonas* sp.将CAP转化为PNB和DCA，而*Caballeronia* sp.和*Cupriavidus* sp.是这两种产物的主要分解者。换言之，它们通过协同合作实现CAP矿化。这些纯菌生物降解试验的结果证实了通过宏基因组推测的群落中优势成员对底物的偏好[图2（a）和附录A中的图S1]。

3.3. 以CAP及其代谢物（PNB和DCA）为底物的微生物群落的演替模式

通过对Illumina宏基因组短序列物种分类，揭示整个驯化过程的微生物组成。如图4所示，所有样本的短序列中有70.22%被成功分类为细菌（70.12%）、古生菌（0.04%）、真核生物（0.05%）和病毒（0.01%）。在门水平上，群落主要由变形菌门（63.57%）、放线菌门（4.54%）和拟杆菌门（0.87%）组成（图4）。菌群的微生物多样性和均匀度随着驯化而降低，驯化后菌群的α多样性指数（Shannon和Pielou均匀度指数）较原始活性污泥显著降低（*t*检验，$p < 0.05$）[图5（a）和（b）]。在含有CAP、PNB或DCA的无机盐培养基中驯化后，微生物群

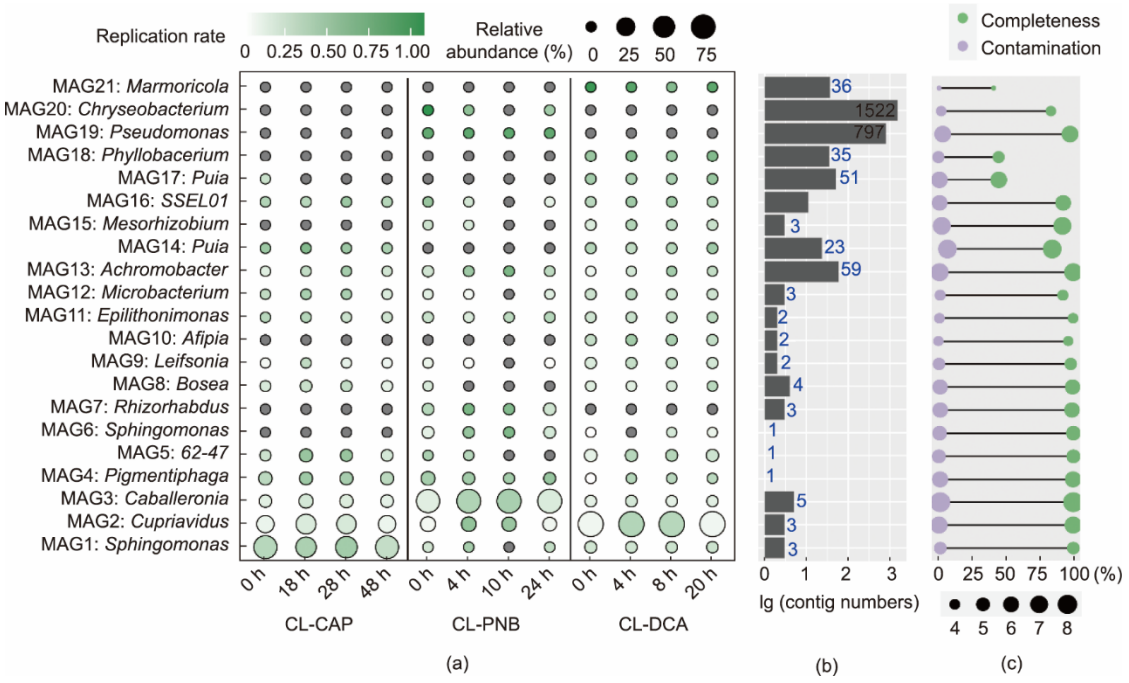

图2. 驯化后CAP、PNB和DCA降解菌群中MAGs的特征和相对丰度。（a）生物降解过程中CAP、PNB和DCA降解菌群中MAGs相对丰度和复制率的变化；（b）每个MAG的contig数目；（c）每个MAG的完整度、污染度和基因组大小。

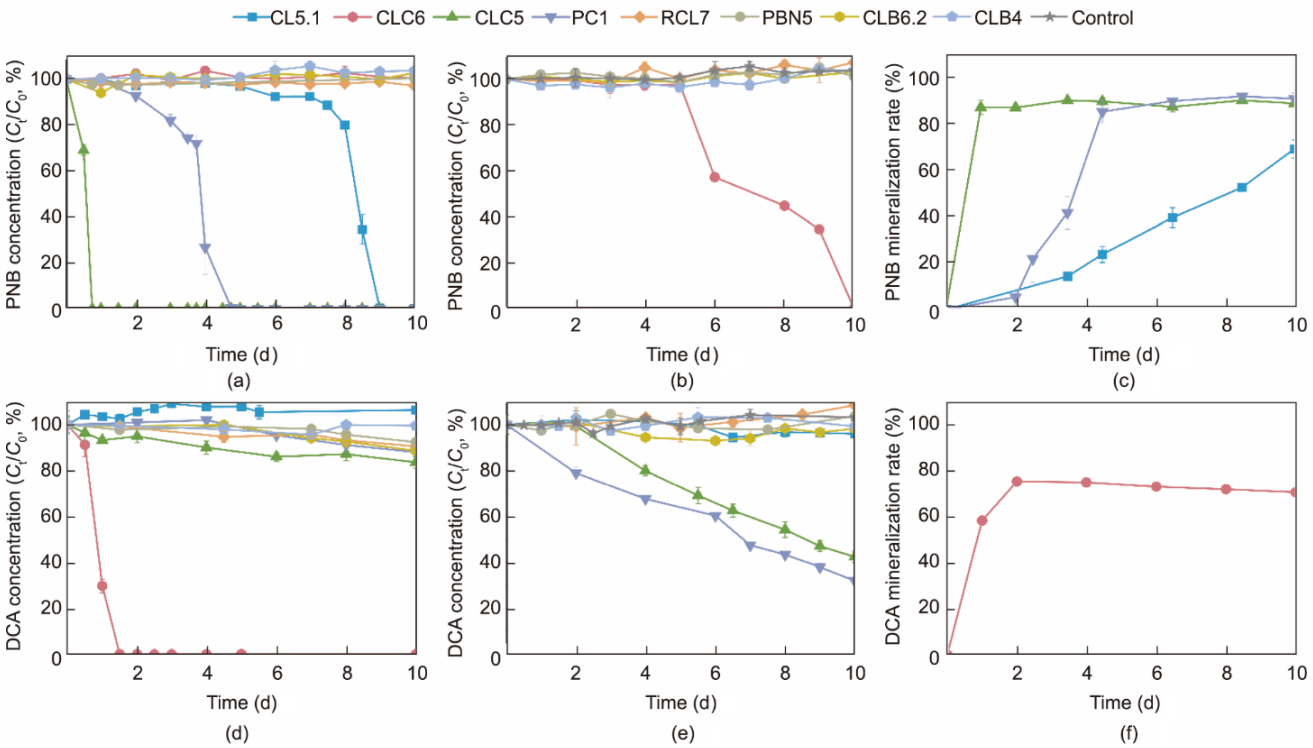

图 3. 8 种分离菌株 *Sphingomonas* sp. CL5.1、*Cupriavidus* sp. CLC6、*Caballeronia* CLC5、*Caballeronia* PC1、*Chryseobacterium* sp. RCL7、*Labrys* sp. PNB5、*Pigmentiphaga* sp. CLB6.2、*Achromobacter* sp. CLB4 对 PNB 和 DCA 的生物降解。（a）、（d）PNB 和 DCA 作为唯一碳源时的生物降解。（b）、（e）PNB 和 DCA 在 500 mg·L^{-1}丙酮酸钠存在条件下的生物降解。（c）、（f）可利用 PNB 和 DCA 作为唯一碳源的菌株对它们的矿化作用。PNB 和 DCA 的初始浓度均为 100 mg·L^{-1}。数据表示为三个重复的均值±SD。

落结构更为简化，在无机盐培养基中驯化 6 个月后的 α 多样性指数显著降低（*t* 检验，$p < 0.05$）。Luan 等[46]发现了类似的现象，好氧生物膜反应器在连续投加链霉素 576 天后的 α 多样性显著下降。在整个驯化过程中，群落在属水平上的 PCoA 分析结果显示，微生物群落受到培养基组成的显著影响（Adonis 检验，$p < 0.001$）[附录 B 中的图 S2（a）]。例如，PNB 和 DCA 显著影响了微生物群落结构（Pairwise Adonis 检验，$p < 0.01$）。在 5.5 个月后，未接触 CAP 的对照菌群（Control-7）在属水平上主要由 *Alicycliphilus*（19.9%）、*Acidovorax*（10.1%）、*Diaphorobacter*（6.3%）、*Comamonas*（4.5%）和 *Pseudomonas*（3.1%）组成[图 5（c）]。在 20 mg·L^{-1} CAP 驯化的初始阶段，*Paenarthrobacter*（46.0%）、*Alicycliphilus*（4.4%）和 *Microbacterium*（4.2%）在群落中成为优势物种（CAP-20）[图 5（d）]。随着 CAP 投加浓度升高，在驯化 5.5 个月后，*Paenarthrobacter*（13.9%）、*Sphingomonas*（12.9%）和 *Caballeronia*（6.8%）成为群落（CAP-120）中的优势物种[图 5（d）]。在无机盐培养基中驯化两年后，*Sphingomonas*（在 CAP-120c 中占 57.8%）、*Caballeronia*（在 PNB-100 中占 60.2%）和 *Cupriavidus*（在 DCA-100 中占 74.5%）分别成为 CAP、PNB 和 DCA 降解群落的优势物种[图 5（d）]。*Sphingomonas*、*Caballeronia* 和 *Cupriavidus* 分别是 CAP、PNB 和 DCA 的关键降解菌，在本研究和我们之前研究中的纯菌生物降解试验均证明了这一点[13]。它们分别在以 CAP、PNB 和 DCA 为食的群落中借助底物的利用优势而逐渐变为主要物种。

3.4. 参与 CAP、DCA、PNB 生物转化的关键功能基因的动态变化

我们之前的研究发现菌群主要通过乙酰化和氧化途径降解 CAP [13]。乙酰化是细菌常见的 CAP 耐药途径，其乙酰化产物失去了抗菌活性[47]。MAG2（*Cupriavidus*）携带负责 CAP 乙酰化的 CAP 乙酰转移酶编码基因 *catB3*。如图 6 所示，在不添加 CAP 的对照组菌群中，*catB3* 的平均相对丰度为 3.7，而经过 CAP 长期驯化后，菌群中 *catB3* 的平均相对丰度从 4.0 增加到 62.4。我们之前的研究[13, 48]以及 Ma 等[12]的研究发现微生物能够通过 C_3 羟基氧化降解 CAP。*Sphingomonas* sp. CL5.1 携带的氧化还原酶 capO 属于葡萄糖-甲醇-胆碱（GMC）氧化还原酶超家族，我们之前的研究证实 capO 可催化 CAP 的两步氧化，生成氧化 CAP [48–49]。在未接触 CAP 的对照组中，*capO* 基因的相对丰度小于 0.05，而在 CAP 的长期驯化期间，*capO* 的平均相对丰度由 25.4 增加到 341.6。

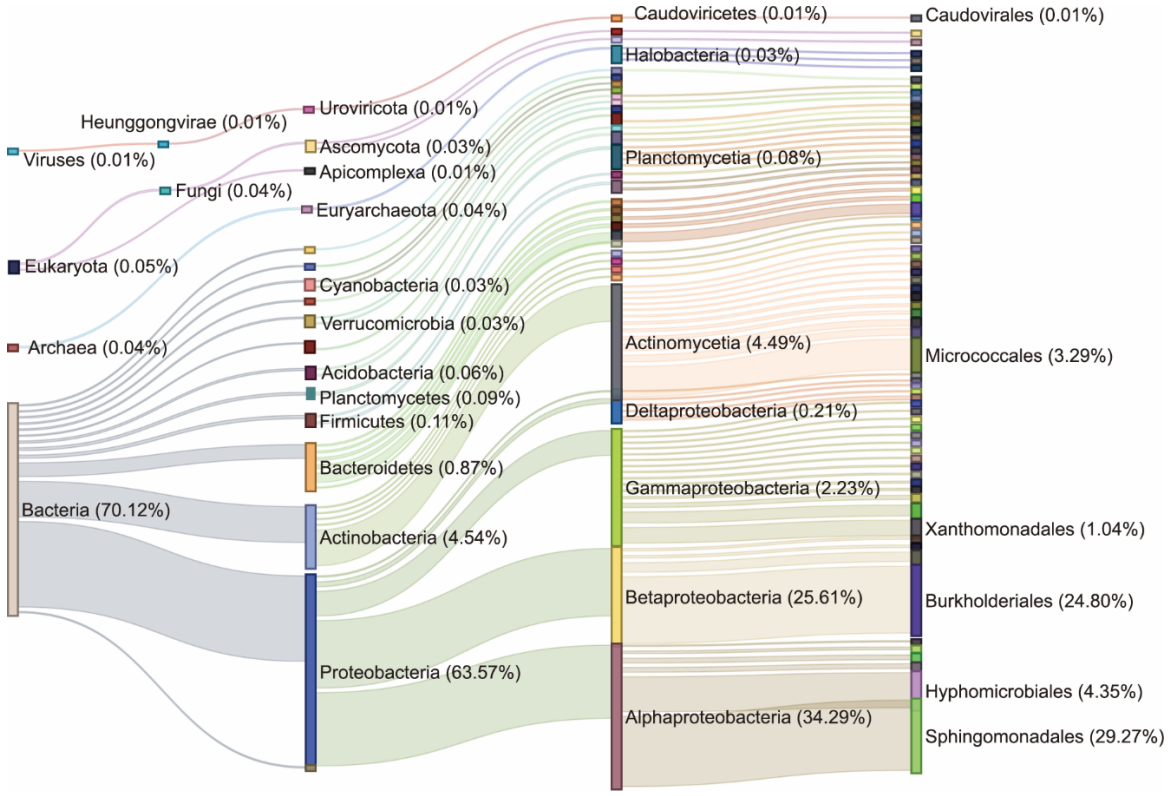

图4. 整个驯化阶段中微生物群落从门到目水平的物种分类结构。连线的宽度表示物种分类水平的平均相对丰度。

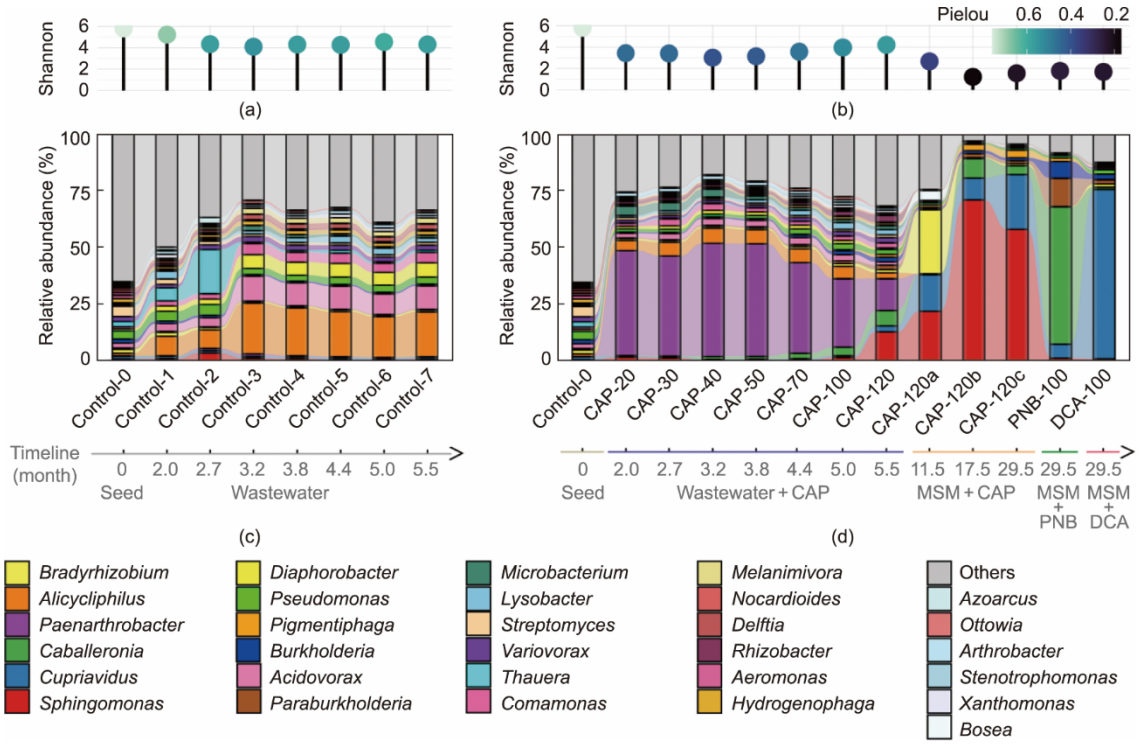

图5. 在2.5年驯化过程中微生物群落的演替。（a）对照组微生物群落的Shannon和Pielou均匀度指数；（b）CAP、PNB和DCA富集群落的Shannon和Pielou均匀度指数；（c）对照组群落优势菌属的平均相对丰度；（d）CAP、PNB和DCA富集群落的优势菌属的平均相对丰度。数值以每组样本的平均值表示。

卤代酸脱卤酶可以催化DCA中碳氯键的水解，其广泛存在于好氧细菌中[50–51]。我们在群落成员MAG2（*Cupriavidus*）、MAG3（*Caballeronia*）、MAG5（*62-47*）、MAG8（*Bosea*）、MAG10（*Afipia*）、MAG13（*Achromo-*

bacter）和MAG15（*Mesorhizobium*）中发现了15个卤代酸脱卤酶编码基因（包括4种类型：*dhlB*、*dehI*、*dehII*和*hdl IVa*）。MAG2（*Cupriavidus*）基因组中有4个卤代酸脱卤酶编码基因，这4个基因在CL-DCA菌群的相对丰度显著高于其他菌群（*t*检验，$p < 0.05$）。事实上，分离的菌株 *Cupriavidus* sp. CLC6确实表现出很强的DCA降解能力。

本研究通过HPLC-QTOF-MS分析发现PCA为CL-PNB菌群降解PNB的产物[附录B中的图S3（a）和（b）]。在PNB生物降解过程中产生PCA，PCA最终被菌群完全矿化[附录B中的图S3（c）]。本研究测试了分离株对PNB的降解能力，发现*Sphingomonas* sp. CL5.1、*Caballeronia* sp. PC1和*Caballeronia* sp. CLC5是PNB降解菌，并且它们还可以利用PCA作为唯一的碳源[附录B中的图S3（d）]。其中，*Caballeronia* sp. PC1和*Caballeronia* sp. CLC5可以在8 h内完全降解10 mg·L^{-1}的PCA。上述结果表明菌群成员可将PNB转化为PCA，然后通过PCA裂解途径完全将其矿化。PCA是各种芳烃化合物代谢途径中最常见的中间产物之一[52]。通常PCA可以由好氧微生物通过4,5-裂解（间位裂解）、3,4-裂解（邻位裂解）和2,3-裂解途径进一步分解[52–53]。我们根据在MAGs中发现的关键催化酶编码基因，推断本研究的菌群主要通过间位和邻位裂解途径代谢PCA。由α链（ligA）和β链（ligB）组成的原儿茶酸4,5-双加氧酶负责催化PCA的间位裂解[54]。本研究在MAG1（*Sphingomonas*）、MAG3（*Caballeronia*）和MAG4（*Pigmentiphaga*）中发现了相应的编码基因*ligA*和*ligB*，表明它们具有间位裂解PCA的潜力（图6）。PCA的邻位裂解是由两个亚基（*pcaG*和*pcaH*）组成的原茶酸3,4-双加氧酶催化[55]。本研究发现10个MAGs同时含有*pcaG*和*pcaH*，具有潜在的PCA邻位裂解能力，并且本研究中的*pcaG*和*pcaH*基因序列在系统发育树上形成了三个主要进化分支（图6）。MAG2（*Cupriavidus*）和MAG3（*Caballeronia*）携带的*pcaG*和*pcaH*基因在驯化后的菌群（CAP-120c、PNB-100和DCA-100）中显著富集（*t*检验，$p < 0.05$）。上述结果揭示了在长期驯化过程中参与CAP、DCA和PNB生物转化的关键基因相对丰度的动态变化。

3.5. 环境和营养因素对CAP降解菌群微生物群落的影响

研究影响CAP降解菌群性能的因素，有助于指导其应用于CAP污染环境生物修复。本文研究了CAP降解菌群CL-CAP在不同环境和营养条件下对CAP的降解性能，CAP生物降解规律和菌群生物量测定结果见附录A中的图S4和图S5。此外，采用16S rRNA扩增子测序揭示了环境和营养条件对CL-CAP菌群结构的影响。如图S4（a）所示，随着初始接种量从5%增加到25%，CL-CAP能够更快地降解CAP。当初始接种量为25%时，该菌可在28 h内完全降解240 mg·L^{-1} CAP，比目前已知的CAP降解菌群或菌株效率更高[12,16,56]。菌群CL-CAP在20~30 ℃的温度下可完全降解240 mg·L^{-1} CAP，在30 ℃时降解速度最快[图S4（b）]。菌群CL-CAP降解CAP的效率在pH值约为6.0时最高，在pH值为8.5和3.5时，CAP的降解受到明显抑制（*t*检验，$p < 0.01$）[图S4（c）和图5（c）]。初始浓度50~400 m·L^{-1}的CAP可以被菌群完全降解，而初始浓度高于500 m·L^{-1}的CAP则很难被降解[图S4（d）]。CAP通过与细菌的核糖体50S亚基结合阻碍蛋白质合成，从而发挥抗菌作用[57]。当CAP浓度过高时，群落无法及时解毒，会抑制群落生物量的增长[图S5（d）]，从而减缓其底物利用率。

CL-CAP能够利用CAP作为唯一的碳源和氮源[图S4（e）、（f）]。其他碳源的存在并没有显著加快该菌群对CAP的生物降解。乙酸钠、柠檬酸钠和苯甲酸钠甚至阻碍了CAP的生物降解[图S4（e）]。值得注意的是，浓度高于12 mmol·L^{-1}的乙酸钠和苯甲酸钠显著抑制了CAP的生物降解（*t*检验，$p < 0.01$）[图S4（e）]。我们的前期研究发现，6 mmol·L^{-1}乙酸钠显著抑制了菌群CL-CAP中关键的CAP降解菌*Sphingomonas* CL5.1的生长[13]，这可能是乙酸钠抑制菌群对CAP降解的关键因素。此外，在添加12 mmol·L^{-1}和60 mmol·L^{-1}苯甲酸钠的条件下，种群的生物量没有显著增加（*t*检验，$p < 0.01$）[图S5（e）]。苯甲酸钠通过干扰微生物细胞膜通透性和抑制呼吸酶系统活性而发挥广谱抗菌活性[58]。因此，它广泛用作各种食品和软饮料的防腐剂和抗菌剂[59]。在本研究中，苯甲酸钠对CAP降解菌群的生长有较强的抑制作用，这可能为该菌群完成CAP去除工作后的控制提供一种新的方法。我们还发现亚硝酸盐对CAP生物降解的抑制作用[图S4（f）、图S5（f）]。多项研究表明在污水生物处理中亚硝酸盐对细菌生长和污染物去除具有抑制作用[60–61]。亚硝酸盐通过使细胞色素氧化酶或含铁酶失活来干扰需氧微生物的细胞呼吸[62]。

RDA分析表明群落受到pH、初始CAP浓度和外加碳源的显著影响（Adonis检验，$p < 0.05$）[图7（a）、（b）]。*Pigmentiphaga*、*Labrys*与pH呈正相关[图7（a）]。在pH值为4.5和6.0时，*Labrys*的相对丰度低于0.5%；而在pH值为7.5和8.5时，*Labrys*的相对丰度大于1.7%；在pH值为8.5时，*Labrys*的平均相对丰度达到27.2%，成为

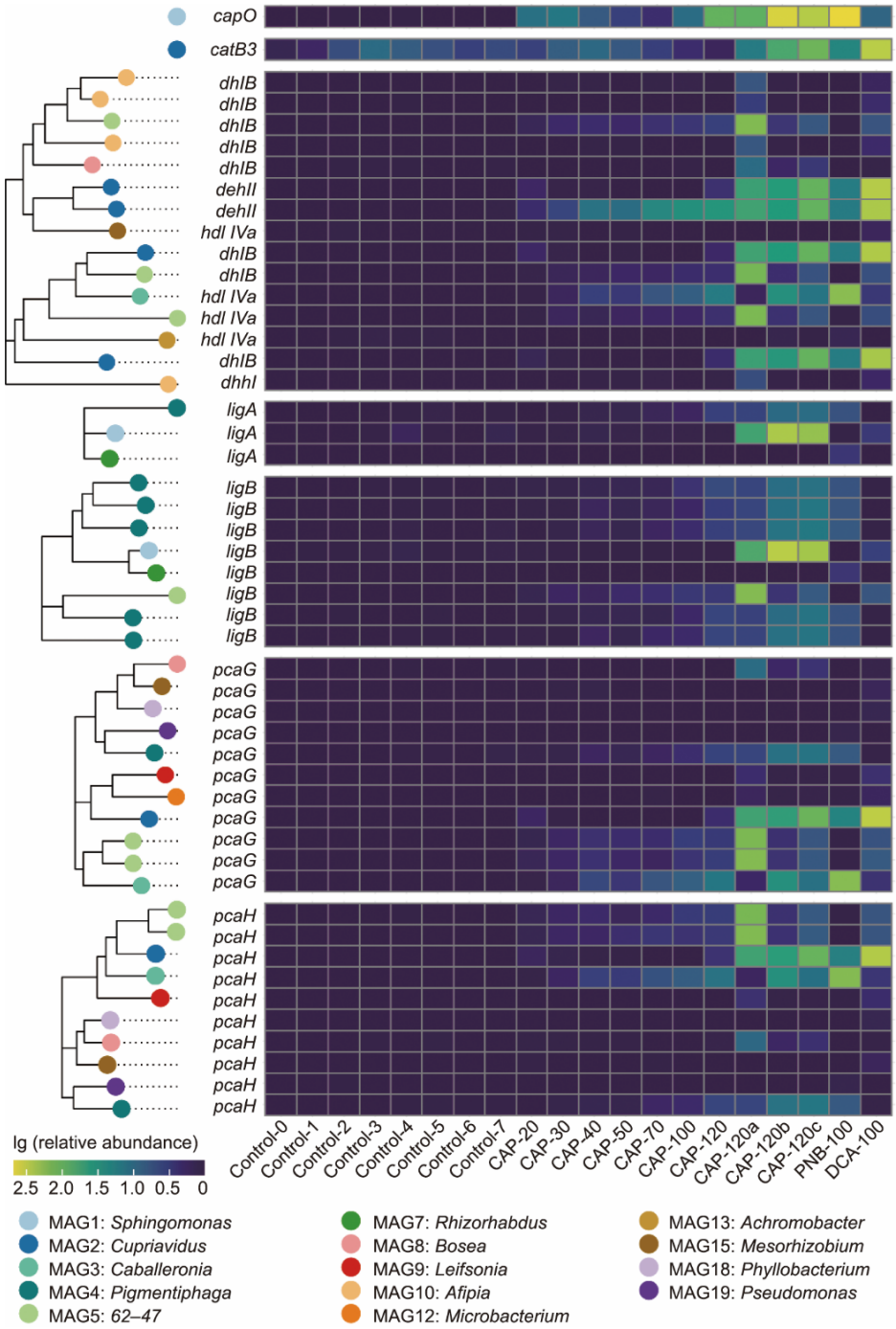

图6. 群落驯化过程中参与CAP、DCA和PNB生物转化的关键基因相对丰度（覆盖度，×/Gb）的动态变化。左侧为基因的系统进化树，系统进化树中的彩色气泡表示相应的基因携带者。*capO*：葡萄糖-甲醇-胆碱（GMC）氧化还原酶；*catB3*：氯霉素乙酰转移酶；*dhlB*、*hdl Iva*、*dehII*、*dehI*：卤代酸脱卤酶；*ligA*：原儿茶酸4,5-双加氧酶α链；*ligB*：原儿茶酸4,5-双加氧酶β链；*pcaG*：原儿茶酸3,4-双加氧酶α链；*pcaH*：原儿茶酸3,4-双加氧酶β链。数值以每组样本的平均值表示。

菌群中的优势菌属（附录A中的图S6）。此外，*Cupriavidus*与初始CAP浓度呈正相关[图7（a）、图S6]。菌群受到碳源（包括乙酸钠、柠檬酸钠、丙酮酸钠和苯甲酸钠）的强烈影响，因为菌群的成员对底物的偏好不同[图7（b）、图S6]。研究环境和营养因素对CAP降解微生物群落的影响，可为改善CAP污染废水的生物处理提供一定的指导。

4. 结论

在废水处理等环境生物修复实践中，生物处理是一种常规的、经济的抗生素去除方法。生物处理的效果由系统中功能微生物的表现决定。可以通过使用抗生素驯化菌群来提高生物处理系统对相应抗生素去除的性能。本文成功

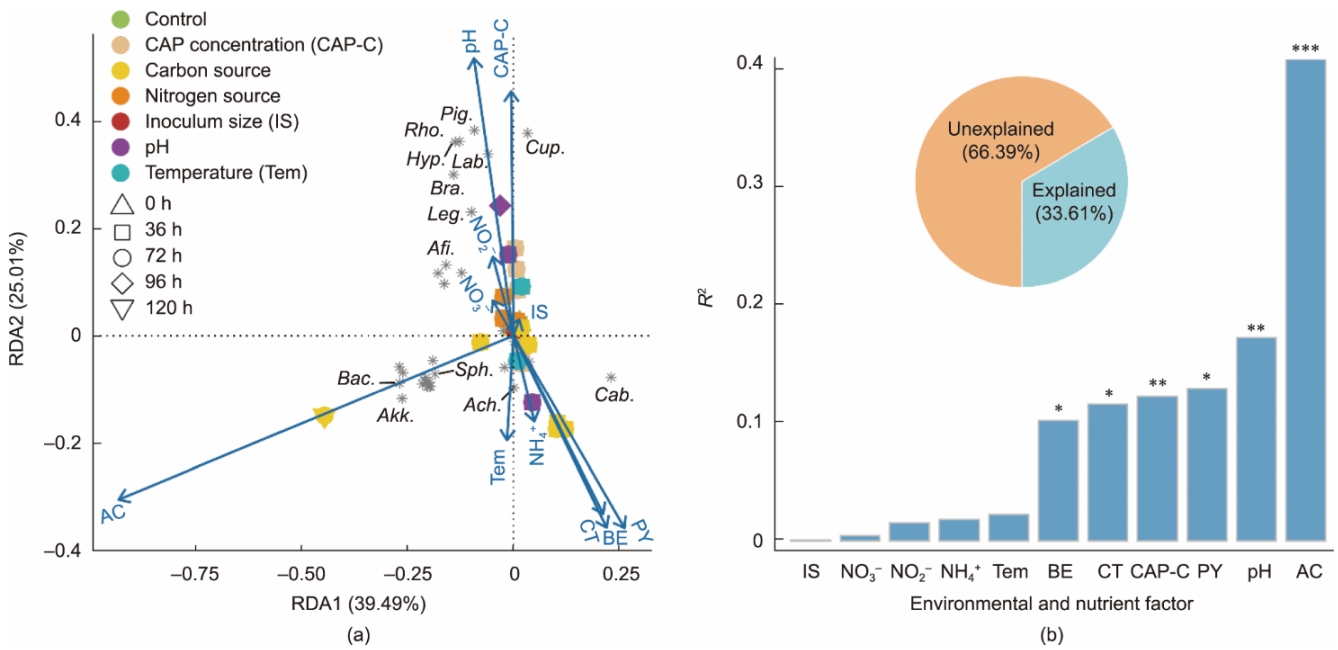

图7. 环境和营养因子对CAP降解菌群微生物群落的影响。（a）通过RDA分析揭示环境和营养因素对微生物群落结构在属水平上的影响。（b）Adonis分析揭示环境和营养因子对微生物群落结构的贡献。饼状图显示已解释和未解释变量的百分比。测试的碳源包括乙酸钠（AC）、丙酮酸钠（PY）、柠檬酸钠（CT）和苯甲酸钠（BE）。测试的氮源包括氯化铵（NH_4^+）、硝酸钠（NO_3^-）和亚硝酸钠（NO_2^-）。Sph.: *Sphingomonas*; Cup.: *Cupriavidus*; Cab.: *Caballeronia*; Pig.: *Pigmentiphaga*; Lab.: *Labrys*; Bra.: *Bradyrhizobium*; Ach.: *Achromobacter*; Hyp.: *Hyphomicrobium*; Rho.: *Rhodopseudomonas*; Lei.: *Leifsonia*; Afi.: *Afipia*; Leg.: *Legionella*; Akk.: *Akkermansia*; Bac.: *Bacteroides*。$^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$。

从活性污泥中驯化了三个具有强大的CAP、PNB和DCA降解能力的菌群。系统研究了长达2.5年驯化过程中微生物群落和关键功能基因的演替模式。经过驯化后，*Sphingomonas* (57.8%)、*Caballeronia* (60.2%) 和 *Cupriavidus* (74.5%)分别成为以CAP、PNB和DCA为生的群落中的优势菌属。总体而言，驯化降低了群落的微生物多样性和均匀性。通过长期驯化，参与CAP、PNB和DCA代谢的关键功能基因在微生物群落中显著富集。pH、碳源等环境和营养因素对CAP降解效率有明显影响。*Sphingomonas*、*Caballeronia*、*Cupriavidus* 分别是菌群中CAP、PNB和DCA的关键降解菌，它们在群落中具有底物利用优势。驯化的菌群和分离的菌株在CAP、PNB和DCA矿化方面表现优异，可作为生物修复的重要微生物资源。值得注意的是，驯化的菌群和分离的菌株在生物修复实践中的稳定定殖能力有待进一步研究。

致谢

本研究得到了国家重点研发计划（2022YFE0103200）、国家自然科学基金（22176107和22206107）、广东省基础与应用基础研究基金（2019B1515020342021A1515110772）和中国博士后科学基金（2021M691772）的资助。

Compliance with ethics guidelines

Jiayu Zhang, Kaiyan Zhou, Fangliang Guo, Huaxin Lei, Renxin Zhao, Lin Lin, Xiaoyan Li, and Bing Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.07.009.

References

[1] Zhong M, Wang T, Zhao W, Huang J, Wang B, Blaney L, et al. Emerging organic contaminants in Chinese surface water: identification of priority pollutants. Engineering 2022;11:111–25.
[2] Chu W, Krasner SW, Gao N, Templeton MR, Yin D. Contribution of the antibiotic chloramphenicol and its analogues as precursors of dichloroacetamide and other disinfection byproducts in drinking water. Environ Sci Technol 2016;50(1):388–96.
[3] Li X, He F, Wang Z, Xing B. Roadmap of environmental health research on emerging contaminants: inspiration from the studies on engineered nanomaterials. Eco-Environment & Health 2022;1(3):181–97.
[4] Zhang J, Xu J, Lei H, Liang H, Li X, Li B. The development of variation-based rifampicin resistance in *Staphylococcus aureus* deciphered through genomic and transcriptomic study. J Hazard Mater 2023;442:130112.
[5] Zhou Y, Farzana R, Sihalath S, Rattanavong S, Vongsouvath M, Mayxay M, et al. A one-health sampling strategy to explore the dissemination and

relationship between colistin resistance in human, animal, and environmental sectors in Laos. Engineering 2022;15:45–56.
[6] Han Z, Feng H, Luan X, Shen Y, Ren L, Deng L, et al. Three-year consecutive field application of erythromycin fermentation residue following hydrothermal treatment: cumulative effect on soil antibiotic resistance genes. Engineering 2022;15:78–88.
[7] Tran NH, Chen H, Reinhard M, Mao F, Gin KY. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. Water Res 2016;104:461–72.
[8] Nguyen PY, Carvalho G, Reis MAM, Oehmen A. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes. Water Res 2021;188:116446.
[9] Wang G, Wang D, Xu Y, Li Z, Huang L. Study on optimization and performance of biological enhanced activated sludge process for pharmaceutical wastewater treatment. Sci Total Environ 2020;739:140166.
[10] Mosca Angelucci D, Clagnan E, Brusetti L, Tomei MC. Anaerobic phenol biodegradation: kinetic study and microbial community shifts under high-concentration dynamic loading. Appl Microbiol Biotechnol 2020;104(15):6825–38.
[11] Ma X, Qi M, Li Z, Zhao Y, Yan P, Liang B, et al. Characterization of an efficient chloramphenicol-mineralizing bacterial consortium. Chemosphere 2019;222:149–55.
[12] Ma X, Liang B, Qi M, Yun H, Shi K, Li Z, et al. Novel pathway for chloramphenicol catabolism in the activated sludge bacterial isolate *Sphingobium* sp. CAP-1. Environ Sci Technol 2020;54(12):7591–600.
[13] Zhang J, Gan W, Zhao R, Yu K, Lei H, Li R, et al. Chloramphenicol biodegradation by enriched bacterial consortia and isolated strain *Sphingomonas* sp. CL5.1: the reconstruction of a novel biodegradation pathway. Water Res 2020;187:116397.
[14] Sayed M, Khan A, Rauf S, Shah NS, Rehman F, A. Al-Kahtani A,et al. Bismuth-doped nano zerovalent iron: a novel catalyst for chloramphenicol degradation and hydrogen production. ACS Omega 2020;5(47):30610–24.
[15] Guo H, Jiang N, Wang H, Lu N, Shang K, Li J, et al. Degradation of antibiotic chloramphenicol in water by pulsed discharge plasma combined with TiO_2/WO_3 composites: mechanism and degradation pathway. J Hazard Mater 2019; 371:666–76.
[16] Xin Z, Fengwei T, Gang W, Xiaoming L, Qiuxiang Z, Hao Z, et al. Isolation, identification and characterization of human intestinal bacteria with the ability to utilize chloramphenicol as the sole source of carbon and energy. FEMS Microbiol Ecol 2012;82(3):703–12.
[17] Grummt T, Wunderlich HG, Chakraborty A, Kundi M, Majer B, Ferk F, et al. Genotoxicity of nitrosulfonic acids, nitrobenzoic acids, and nitrobenzylalcohols, pollutants commonly found in ground water near ammunition facilities. Environ Mol Mutagen 2006;47(2):95–106.
[18] Liu Y, Li H, Wang R, Hu Q, Zhang Y, Wang Z, et al. Underlying mechanisms of promoted formation of haloacetic acids disinfection byproducts after indometacin degradation by non-thermal discharge plasma. Water Res 2022; 220:118701.
[19] Zhao H, Yang L, Li Y, Xue W, Li K, Xie Y, et al. Environmental occurrence and risk assessment of haloacetic acids in swimming pool water and drinking water. RSC Advances 2020;10(47):28267–76.
[20] Zhao R, Yu K, Zhang J, Zhang G, Huang J, Ma L, et al. Deciphering the mobility and bacterial hosts of antibiotic resistance genes under antibiotic selection pressure by metagenomic assembly and binning approaches. Water Res 2020;186:116318.
[21] Zhang J, Li X, Klümper U, Lei H, Berendonk TU, Guo F, et al. Deciphering chloramphenicol biotransformation mechanisms and microbial interactions via integrated multi-omics and cultivation-dependent approaches. Microbiome 2022;10(1):180.
[22] Zhao R, Feng J, Huang J, Li X, Li B. Reponses of microbial community and antibiotic resistance genes to the selection pressures of ampicillin, cephalexin and chloramphenicol in activated sludge reactors. Sci Total Environ 2021; 755(Pt 2):142632.
[23] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 2018;34(17):i884–90.
[24] Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. Genome Biol 2019;20(1):257.
[25] Lu J, Breitwieser FP, Thielen P, Salzberg SL. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. PeerJ Comput Sci 2017;3:e104.
[26] Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. Genome Res 2017;27(5):824–34.
[27] Kolmogorov M, Bickhart DM, Behsaz B, Gurevich A, Rayko M, Shin SB, et al. metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. Nat Methods 2020;17(11):1103–10.
[28] Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. PLoS One 2014;9(11):e112963.
[29] Yu K, Qiu Z, Mu R, Qiao X, Zhang L, Lian CA, et al. Recovery of high-qualitied Genomes from a deep-inland Salt Lake Using BASALT. 2021. bioRxiv 2021.03.05.434042.
[30] Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. ISME J 2017;11(12):2864–8.
[31] Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res 2015;25(7):1043–55.
[32] Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. Bioinformatics 2019; 36(6):1925–7.
[33] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics 2010;11(1):119.
[34] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 2014; 30(14):2068–9.
[35] Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, et al. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. Bioinformatics 2020;36(7):2251–2.
[36] Joseph TA, Chlenski P, Litman A, Korem T, Pe'er I. Accurate and robust inference of microbial growth dynamics from metagenomic sequencing reveals personalized growth rates. Genome Res 2022;32(3):558–68.
[37] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res 2015;43(7):e47.
[38] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol 2019;37(8):852–7.
[39] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 2007;73(16):5261–7.
[40] Nie M, Yan C, Xiong X, Wen X, Yang X, lv Z, et al. Degradation of chloramphenicol using a combination system of simulated solar light, Fe_2^+ and persulfate. Chem Eng J 2018;348:455–63.
[41] Chen J, Xia Y, Dai Q. Electrochemical degradation of chloramphenicol with a novel Al doped PbO_2 electrode: performance, kinetics and degradation mechanism. Electrochim Acta 2015;165:277–87.
[42] Chong S, Song YL, Zhao H, Zhang GM, Li J. Ultrasound/Zn^0 for aqueous 4-nitrobenzoic acid degradation. Desalination Water Treat 2016;57(52):24990–8.
[43] Mazhar MA, Khan NA, Ahmed S, Khan AH, Hussain A, Rahisuddin, et al. Chlorination disinfection by-products in municipal drinking water-a review. J Clean Prod 2020;273:123159.
[44] Zhang J, Zhang H, Liu X, Cui F, Zhao Z. Efficient reductive and oxidative decomposition of haloacetic acids by the vacuum-ultraviolet/sulfite system. Water Res 2022;210:117974.
[45] Park KY, Choi SY, Ahn SK, Kweon JH. Disinfection by-product formation potential of algogenic organic matter from *Microcystis aeruginosa*: effects of growth phases and powdered activated carbon adsorption. J Hazard Mater 2021; 408:124864.
[46] Luan X, Zhang H, Tian Z, Yang M, Wen X, Zhang Y. Microbial community functional structure in an aerobic biofilm reactor: impact of streptomycin and recovery. Chemosphere 2020;255:127032.
[47] Sorg RA, Lin L, van Doorn GS, Sorg M, Olson J, Nizet V, et al. Collective resistance in microbial communities by intracellular antibiotic deactivation. PLoS Biol 2016;14(12):e2000631.
[48] Zhang J, Li X, Lei H, Zhao R, Gan W, Zhou K, et al. New insights into thiamphenicol biodegradation mechanism by *Sphingomonas* sp. CL5.1 deciphered through metabolic and proteomic analysis. J Hazard Mater 2022; 426:128101.
[49] Zhang J, Yang C, Hu J, Zhang Y, Lai Y, Gong H, et al. Deciphering a novel chloramphenicols resistance mechanism: oxidative inactivation of the propanediol pharmacophore. Water Res 2022;225:119127.
[50] Wang Y, Xiang Q, Zhou Q, Xu J, Pei D. Mini review: advances in 2-haloacid dehalogenases. Front Microbiol 2021;12:758886.
[51] Meusel M, Rehm HJ. Biodegradation of dichloroacetic acid by freely suspended and adsorptive immobilized *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 in soil. Appl Microbiol Biotechnol 1993;40(1):165–71.

[52] Cao B, Nagarajan K, Loh KC. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. Appl Microbiol Biotechnol 2009;85(2):207–28.
[53] Kasai D, Fujinami T, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, et al. Uncovering the protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes. J Bacteriol 2009; 191(21):6758–68.
[54] Barry KP, Taylor EA. Characterizing the promiscuity of LigAB, a lignin catabolite degrading extradiol dioxygenase from *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. Biochemistry 2013;52(38):6724–36.
[55] Valley MP, Brown CK, Burk DL, Vetting MW, Ohlendorf DH, Lipscomb JD. Roles of the equatorial tyrosyl iron ligand of protocatechuate 3,4-dioxygenase in catalysis. Biochemistry 2005;44(33):11024–39.
[56] Xu H, Xiao L, Zheng S, Zhang Y, Li J, Liu F. Reductive degradation of chloramphenicol by *Geobacter metallireducens*. Sci China Technol Sci 2019; 62(10):1688–94.
[57] Crofts TS, Sontha P, King AO, Wang B, Biddy BA, Zanolli N, et al. Discovery and characterization of a nitroreductase capable of conferring bacterial resistance to chloramphenicol. Cell Chem Biol 2019;26(4):559–70.
[58] Chen H, Zhong Q. Antibacterial activity of acidified sodium benzoate against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth and on cherry tomatoes. Int J Food Microbiol 2018;274:38–44.
[59] Khoshnoud MJ, Siavashpour A, Bakhshizadeh M, Rashedinia M. Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, learningon, memory, and oxidative stress in brain of mice. J Biochem Mol Toxicol 2018;32(2):e22022.
[60] Liu B, Terashima M, Quan NT, Ha NT, Van Chieu L, Goel R, et al. High nitrite concentration accelerates nitrite oxidising organism's death. Water Sci Technol 2018;77(11–12):2812–22.
[61] Hrenović J, Orhan Y, Büyükgüngör H, Horvatiček M. Influence of ammonium, nitrate and nitrite on the performance of the pure culture of *Acinetobacter junii*. Biologia 2007;62(5):517–22.
[62] Rowe JJ, Yarbrough JM, Rake JB, Eagon RG. Nitrite inhibition of aerobic bacteria. Curr Microbiol 1979;2(1):51–4.