



萘普生降解菌群的驯化及其降解效能

崔迪^{*1,2} 谷逊雪¹ 邓红娜¹ 侯圣琦¹ 宋金萍¹ 李昂³

1 哈尔滨商业大学药学院 黑龙江 哈尔滨 150076

2 哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心 黑龙江 哈尔滨 150076

3 哈尔滨工业大学环境学院 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090

摘要:【背景】萘普生是一种被广泛使用的非甾体抗炎药,治疗人类疾病的同时对环境产生一定的消极影响,甚至危害到人类的生存环境。【目的】利用微生物降解萘普生类污染物是一种价格低廉且行之有效的办法。【方法】以萘普生为唯一碳源,培养驯化高效的萘普生降解菌群;利用高通量测序技术解析萘普生降解菌群的微生物群落变化,鉴定萘普生降解菌群种类;通过 GC-MS 分析萘普生降解菌群的降解途径。【结果】获得了以 *Rhodanobacter* 为主的萘普生高效降解菌群,确定了萘普生降解菌群的最佳降解条件为: 30 °C、pH 7.0、摇床转速 150 r/min、接种量 10%,萘普生降解率达 60.58%,并预测出萘普生降解菌群的降解途径。【结论】获得了高效的萘普生降解菌群,明晰了降解机理和降解途径,不仅丰富了微生物资源种类,更为微生物的工程应用奠定了理论基础。

关键词: 萘普生, 菌群驯化, 群落结构, 降解途径

Acclimatization and biodegrading efficiency of the naproxen-degrading microbial community

CUI Di^{*1,2} GU Xun-Xue¹ DENG Hong-Na¹ HOU Sheng-Qi¹ SONG Jin-Ping¹ LI Ang³

1 College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076, China

2 Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076, China

3 State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China

Abstract: [Background] Naproxen is a widely used drug which is non-steroidal and anti-inflammatory. It has certainly negative impact on the environment while treating human diseases. What's more, it maybe

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51608154); Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Heilongjiang Province in 2017 (UNPYSCT-2017211); Foundation for Distinguished Young Talents of Harbin University of Commerce in 2018 (18XN026); PhD Early Development Program of Harbin University of Commerce (2016BS15)

*Corresponding author: E-mail: jscz_dd@hotmail.com

Received: 30-12-2019; Accepted: 29-05-2020; Published online: 24-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(51608154); 2017 年度黑龙江省普通高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017211); 2018 年度哈尔滨商业大学校级创新人才项目(18XN026); 哈尔滨商业大学博士科研启动项目(2016BS15)

*通信作者: E-mail: jscz_dd@hotmail.com

收稿日期: 2019-12-30; 接受日期: 2020-05-29; 网络首发日期: 2020-06-24

even endangers the human living environment. **[Objective]** The way of degrading naproxen pollutants through microorganisms is inexpensive and effective. **[Methods]** In this paper, naproxen was used as the sole carbon source to cultivate domesticated and highly effective naproxen-degrading bacteria; The high-throughput sequencing technology was used to analyze the microbial community changes of naproxen-degrading bacteria and to identify the types of naproxen-degrading microbial community; Analysis of degrading pathway of naproxen-degrading microbial community by GC-MS. **[Results]** Finally, a highly effective naproxen-degrading microbial community was mainly *Rhodanobacter*, and the optimal growth degradation condition of naproxen-degrading microbial community was determined to be 30 °C, pH 7.0, 150 r/min, 10% inoculation amount, with naproxen degrading rate reached 60.58%, and predicting the degradation pathway of naproxen-degrading microbial community. **[Conclusion]** Obtaining a high-efficiency naproxen- degrading microbial community, and clarifying the degradation mechanism and degradation pathway. The research not only enriches the types of microbial resources, but also lays the theoretical foundation for microbial engineering applications.

Keywords: Naproxen, Microbial community acclimatization, Community structure, Degradation pathway

萘普生(naproxen, NPX)又名甲氧异丙酸,为白色或微白色粉末状,无味^[1],是一种具有抗炎、退热和止疼等作用的常见药物^[2]。萘普生因其副作用小、耐受性好的优点,近年来成为世界上最畅销的非处方药之一^[3-5]。然而,萘普生若在中长期暴露会引发化学药物污染^[6-7],尤其是在进入生物体后,经过食物链的传递以及在生物体内的积累,会威胁人类的健康,严重破坏生态环境^[8-12]。若人体长期摄入量萘普生会诱发心脏病和中风等疾病^[13-14],甚至可能对肺部产生毒性效应^[15-17]。因此,有效去除环境中的萘普生是环境科学与工程领域关注的热点之一。

现有报道指出,在某些市政污水厂排放口及地表水中均有萘普生类物质被检出,其浓度范围为0.1–7.69 μg/L,在地表水中的平均浓度高达250 ng/L^[5],最高检出浓度可达到2.6 μg/L^[11,14,18-19],水体中的萘普生残留会对水生生物有一定的毒性,对生态环境安全存在潜在威胁^[20]。环境中的萘普生通常是通过家庭或医疗设施直接流入,或随着人和动物的排泄物进入土壤或水体中。常见的萘普生处理方法主要有物化方法和生物法,利用微生物降解萘普生可降低成本,同时避免二次污染的产生。因此,随着生物技术的不断成熟,生物降解萘普生的研究也受到广泛关注^[21]。

目前,关于微生物降解萘普生的报道较少, Hom-Diaz 等^[22]利用微光藻反应器对湖泊水中的萘普生进行处理,微光藻在第一周期对水体中萘普生的去除率仅有10%,但第二周期去除率增至69%; Marco-Urrea 等^[23]利用真菌中的漆酶对萘普生进行降解,结果表明漆酶对萘普生的降解率较高,而且与真菌中分离出的粗制漆酶对比,商品化漆酶对萘普生的降解效果更好; Marchlewicz 等^[24]从波兰某化学工厂的土壤中分离出一株革兰氏阳性的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*); Wojcieszynska 等^[25]分离的一株嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia* KB2),以及 Domaradzka 等^[26]在活性污泥中分离的一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. S5)等均具有降解萘普生的能力,但这些菌株在以萘普生为唯一碳源条件下对萘普生的降解率极低,但在以苯酚或葡萄糖为碳源进行共代谢时,对萘普生的降解率可提高至80%以上。因此,为获得能以萘普生为唯一碳源的高效降解菌群,本文利用萘普生为唯一碳源培养驯化,分析其降解机理和降解途径,以期作为微生物的工程应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌群驯化污泥的采集

萘普生降解菌群的驯化污泥取自于哈尔滨某市政污水处理厂二沉池污泥。

1.1.2 主要试剂和仪器

供试萘普生标准品, 纯度>99%, Sigma Aldrich 公司; 二甲基亚砜, 赛默飞世尔公司; 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺[Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA], 大唐(杭州)医药化工有限公司。

超高效液相色谱(UPLC)和气相质谱色谱联用仪, Agilent Technologies 公司; PCR 扩增仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 高通量测序仪, Life Technologies 公司。

1.1.3 培养基

萘普生降解菌群的培养基主要包括筛选培养基、富集培养基以及 LB 培养基, 参照文献[27]配制, 但由于本实验是以萘普生为唯一碳源, 所以将培养基中 0.1 g/L 卡马西平更换为 0.1 g/L 萘普生。

1.2 方法

1.2.1 萘普生降解菌群的富集驯化

将新鲜的活性污泥静置沉降 10 h 后倒去上清液, 将底层污泥分装于 50 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液, 保留污泥, 用磷酸盐缓冲液冲洗污泥 3 次, 冲洗后用无菌富集培养基将活性污泥配制成污泥悬液^[28], 取 20 mL 污泥悬液加入 80 mL 富集培养基(含萘普生 50 mg/L), 设置驯化周期为 7 d, 每个驯化周期结束后以 10% 的接种量接入新的富集培养基中, 设置不同萘普生浓度以 50 mg/L 逐渐递增至 150 mg/L。同时设置阴性对照组, 即高压灭菌的活性污泥, 加入梯度浓度的萘普生, 以同样的条件培养。将驯化的萘普生降解菌群与阴性对照组同时放置于 30 °C、150 r/min 的摇床中进行培养, 为排除萘普生的光降解干扰, 已对摇床做避光处理。

1.2.2 萘普生降解菌群驯化过程中降解效能的测定

萘普生降解菌群驯化阶段每隔 4 d 取一次样, 通过超高效液相色谱(UPLC)进行检测, 根据检测范围对样品进行稀释, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 装入色谱小瓶。检测波长 332 nm, 色谱柱为 C18 (250×4.6 mm, 5 μm), 流动相比比例甲醇:超纯水=75:25 (体

积比), 柱温 30 °C, 流速 0.1 mL/min, 进样量 10 μL, 保留时间 3 min。

菌体蛋白的测定方法^[29]: 转速 10 000 r/min 条件下离心 10 min 收集菌体, 利用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 振荡清洗、悬浮, 在频率 20 kHz、功率 150 W 条件下超声波破碎(工作 3 s, 间歇 3 s, 共持续 10 min), 释放菌体蛋白。采用考马斯亮蓝法^[30], 用牛血清白蛋白绘制标准曲线, 测定不同时间菌体蛋白在 595 nm 处吸光度值, 计算菌体蛋白量。

1.2.3 萘普生降解途径推测

质谱使用 Agilent 6890/5975 仪器。离子源以电子电离模式(EI: 70 eV, 230 °C)操作。记录全扫描质谱图(m/z 40–800)以鉴定中间产物。用 5% 苯基-95% 甲基聚硅氧烷的 HP 熔融石英毛细管柱进行分离。色谱柱的长度约为 30 m, 内径为 0.25 mm, 膜厚为 0.25 μm。样品以不分流的方式进样, 氦气流速为 1.0 mL/min。操作参数如下: 喷油器温度 310 °C; 传输线温度: 300 °C; 程序升温: 从 140 °C 以 12 °C/min 升温至 320 °C (保留时间 10 min)^[31]。

用于代谢途径检测的萘普生降解菌群为富集驯化后的萘普生降解菌群, 是在最佳降解条件下分别培养了 7 d 内的混合菌液。取 7 d 内不同时间段的降解液进行检测, 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 加入等体积的乙酸乙酯, 振荡萃取 5 min, 萃取 3 次, 将 3 次萃取后的乙酸乙酯合并, 以 80 r/min 速度旋转蒸发至 5 mL; 再用移液器移至玻璃管中, N₂ 吹干后, 向管中加入 100 μL 的 BSTFA, 再加入 100 μL 的吡啶, 将玻璃管密封后放入 85 °C 烘箱, 反应 1 h; 取出玻璃管, 冷却至室温后用 N₂ 吹干, 滴加 1 mL 乙酸乙酯, 边加边振荡, 振荡至反应物完全溶解后移入色谱小瓶, 以备 GC-MS 分析。

1.2.4 萘普生降解菌群群落结构分析

萘普生降解菌群驯化过程中, 每隔 20 d 取一次污泥, 10 000 r/min 条件下离心 10 min 后冻存, 将不同时期萘普生降解菌群样品进行保存, 并编号为 1–4, 样品 1 表示初始萘普生降解菌群的样品, 2、3 代表萘普生降解菌群驯化中期的样品, 4 代表萘

普生降解菌群驯化结束时的样品。样品交由上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序, 获得数据进行群落结构种类和多样性分析。

2 结果与讨论

2.1 萘普生降解菌群驯化过程中降解效能的测定

萘普生降解菌群驯化和降解效能情况如图 1 所示。当 NPX 污泥浓度为 50 mg/L 时, 如图 1A 所示, NPX 浓度平稳下降, 1 344 h (56 d) 趋于稳定, 此时 NPX 浓度达到为 22.33 mg/L, 降解率为 55.83%; 当 NPX 污泥浓度为 100 mg/L 时, 如图 1B 所示, NPX 浓度平稳下降, 1 344 h (56 d) 趋于稳定, 此时 NPX 浓度达到为 38.81 mg/L, 降解率为 61.19%; 当 NPX 污泥浓度为 150 mg/L, 菌群降解萘普生的降解情况如图 1C 所示, 240 h (10 d) 开始 NPX 浓度急剧下降至 119.91 mg/L, 348 h (16 d) 开始下降趋势减缓, 1344 h (56 d) 后趋于平稳, 最终 NPX 浓度达到 32.57 mg/L, 降解率为 78.12%。

2.2 萘普生降解菌群的降解特性研究

2.2.1 萘普生降解菌群最佳降解温度

为考察不同温度下萘普生降解菌群的生长和降解情况, 确定萘普生降解菌群最适宜生长和降解率最高的温度。因此, 分别设置 10、20、25、30、35、40 和 50 °C 个不同温度条件对富集驯化后的萘普生降解菌群进行持续振荡培养, 结果如图 2 所示。当萘普生降解菌群以 NPX 作为唯一碳源生长时, 温度对其生长和降解 NPX 的能力都有显著影响。在 0–30 °C 的温度范围内, 萘普生降解菌群的生物量随着温度升高而增大。当温度为 10 °C 时, 萘普生降解菌群对 NPX 的降解率仅为 9.50%; 随着温度的逐渐上升, 当温度达到 30 °C 时, 萘普生降解菌群对 NPX 的降解率可达到 82.60%; 随着温度继续升高到 35 °C 时, 萘普生降解菌群的降解率开始逐渐下降, 此时差异并不明显, 萘普生降解菌群对 NPX 的降解率仍能达到 79.15%; 当温度上升至 40 °C 后, 萘普生降解菌群的生物量急速下降, 对

NPX 的降解率也骤降至 10% 左右。说明过高的培养温度不利于萘普生降解菌群的生长, 这可能与菌群酶活下降等因素相关^[32-33], 可以确定萘普生降解菌群最适宜的降解温度是 30 °C。

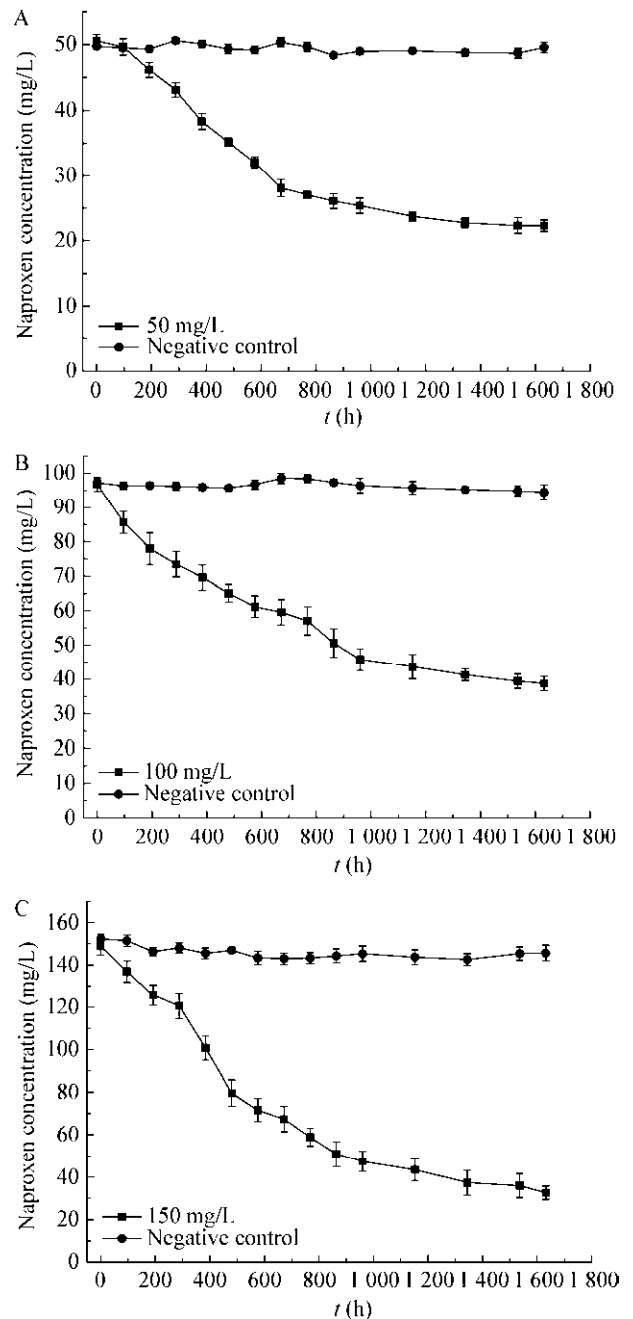


图 1 萘普生降解菌群对 NPX 的降解情况

Figure 1 Degradation of NPX of naproxen-degrading bacterial community

Note: A: 50 mg/L NPX; B: 100 mg/L NPX; 150 mg/L NPX.

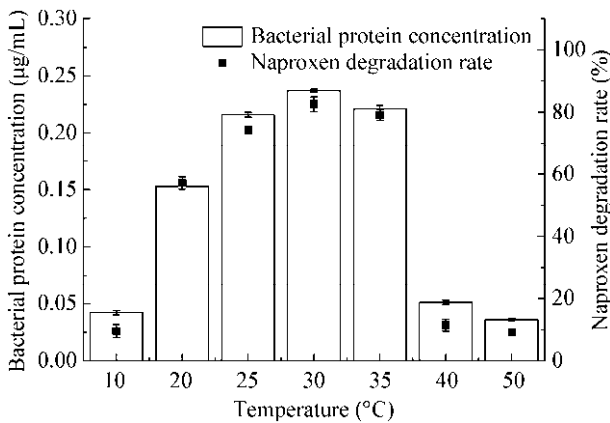


图2 温度对萘普生降解菌群的生长和降解情况的影响
Figure 2 Effect of temperature on the growth and degradation of naproxen-degrading bacterial community

2.2.2 萘普生降解菌群最佳降解 pH

分别设置 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 五个不同初始 pH 条件的培养环境，并对萘普生降解菌群生长情况和 NPX 的降解效能进行测定，萘普生降解菌群的降解效能结果如图 3 所示。当萘普生降解菌群以 NPX 为唯一碳源生长时，pH 对其生长和降解 NPX 的能力有显著影响。在 pH 为 7.0 时，菌体蛋白浓度较高，说明菌液中菌量较大，同时降解相关酶的活性也较高，对 NPX 的降解率最大，可以达到 74.50%；当 pH 为 5.0、9.0 时，萘普生降解菌群的生长受到了抑制，降解 NPX 相关酶的催化活性较低^[34-35]，此时 NPX 的降解率仅能达到 4.75% 和 10.07%。

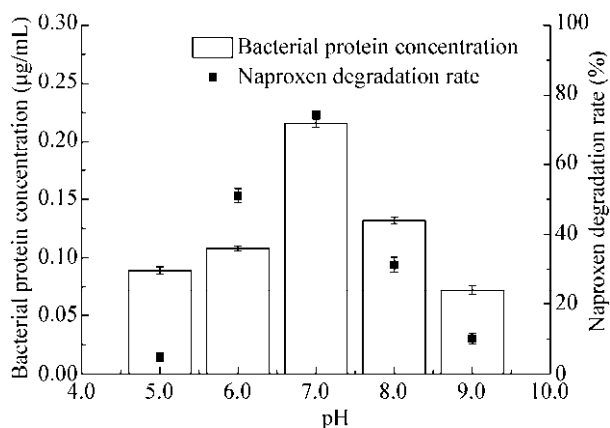


图3 pH 对萘普生降解菌群生长和降解情况的影响
Figure 3 Effects of pH on the growth and degradation of naproxen-degrading bacterial community

2.2.3 萘普生降解菌群最佳降解摇床转速

分别设置 0、50、100、150、200 r/min 五个不同摇床转速的培养环境，并对萘普生降解菌群生长情况和 NPX 的降解情况进行测定，萘普生降解菌群的生长及对 NPX 的降解情况如图 4 所示。当摇床转速为 0 时，菌浊仍可以达到最大菌浊的 1/3，说明由于降解菌的菌量较小，萘普生降解菌群可以利用锥形瓶中残留的分子氧进行分解代谢和合成代谢，但当生物量提高到一定程度后，氧这一生态因子成为了萘普生降解菌群生长繁殖的限制因子。摇床转速在 0–150 r/min 范围内时，萘普生降解菌群的浊度和对 NPX 的降解情况随摇床转速的提高呈逐渐上升的趋势；当摇床转速为 150 r/min 和 200 r/min 时，萘普生降解菌群对 NPX 的去除率差异并不明显，分别为 68.94% 和 62.25%。由此可以推断，萘普生降解菌群的最佳降解 NPX 的摇床转速为 150 r/min。

2.2.4 萘普生降解菌群最佳降解接种量

在相同底物浓度的培养基中分别接种了 1%、5%、10%、20%、30% (体积比) 种子液，探究在不同接种条件下萘普生降解菌群的生长和对 NPX 的降解率，结果如图 5 所示。在接种量为 1% 时，萘普生降解菌群浊度较低，对 NPX 的降解率也仅为

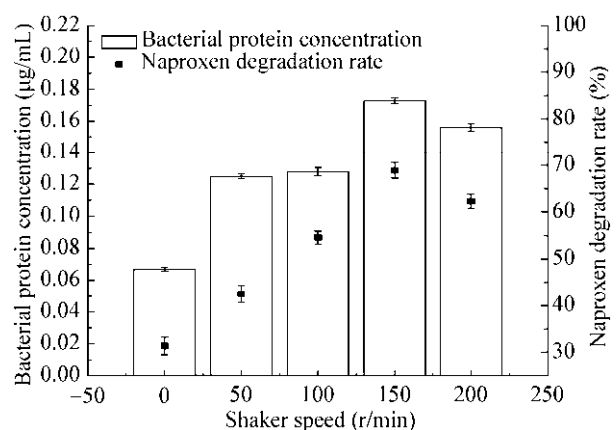


图4 摇床转速对萘普生降解菌群生长和降解情况的影响
Figure 4 Effect of shaking speed on growth and degradation of naproxen-degrading bacterial community

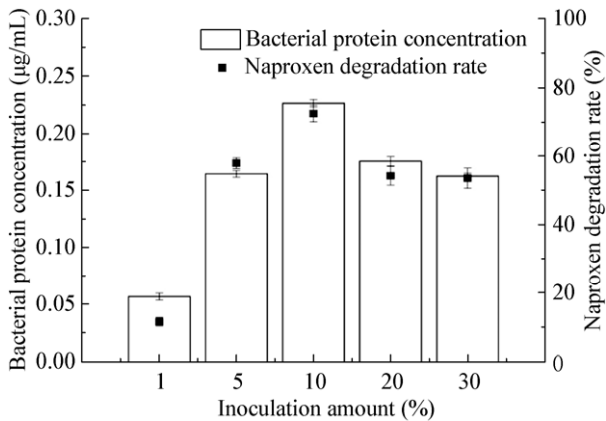


图5 接种量对萘普生降解菌群生长和降解情况的影响
Figure 5 Effect of inoculation amount on growth and degradation of naproxen-degrading bacterial community

11.75%。随着接种量的增加,萘普生降解菌群对NPX的降解率明显提升,接种量提高到10%时降解率达到72.34%,而在接种量为5%、20%和30%时,萘普生降解菌群对NPX的降解率分别为57.81%、54.10%和53.44%。由此可知萘普生降解菌群最佳降解NPX的接种量为10%。

根据实验结果,在以萘普生为唯一碳源的情况下,萘普生降解菌群的最佳降解条件为:30 °C、pH 7.0、摇床转速150 r/min、接种量10%,在此条件下萘普生降解菌群的降解率可达到60.58%。然而Domaradzka等^[26]在以萘普生为唯一碳源条件下,*Pseudomonas* sp. S5降解萘普生的降解率只达到10%。因此,本研究驯化的混合菌群在降解萘普生的过程中表现出了更好的降解效能,为萘普生的生物处理提供了高效的菌种资源。

2.3 萘普生降解途径推测

在已有的微生物降解萘普生的报道中,明确萘普生代谢途径的报道极为有限。Zhong等^[36]筛选出3株*Cunninghamella*属真菌(*Cunninghamella blakesleana*、*Cunninghamella elegans*和*Cunninghamella echinulata*)降解萘普生,得到降解产物2-(6-羟基萘-2-基)丙酸[2-(6-hydroxynaphthalene-2-yl) propionic acid]。Marco-Urrea等^[23]在研究真菌*Trametes versicolor*降解萘普生的过程中,证明了起

主要作用的降解酶是漆酶,产生的代谢产物有6-O-去甲基萘普生(6-O-desmethylnaproxen)和2-乙酰基-6-甲氧基萘(2-acetyl-6-methoxynaphthalene)。关于细菌降解萘普生的报道中,Domaradzka等^[26]在苯酚共代谢条件下,探究了菌株*Pseudomonas* sp. S5对萘普生降解的主要途径,确定由萘双加氧酶催化的二羟基化^[37]是萘普生转化的第一步,后续可能发生苯酚单加氧酶对7,8-二羟基萘普生(7,8-dihydroxynaproxen)的羟基化,并形成5,7,8-三羟基萘普生(5,7,8-trihydroxynaproxen),后者又可以作为羟基喹啉1,2-双加氧酶的底物^[38]。

本研究根据质谱谱图以及NIST17.L谱库,可以得到相对应的物质及结构,如图6所示,可得到如表1所示化合物。

通过GC-MS分析可推断出,萘普生在反应过程中产生的降解产物分别为2-乙烯基-6-甲氧基萘(2-ethenyl-6-methoxy-naphthalene)、2-乙酰基-6-甲氧基萘(2-acetyl-6-methoxynaphthalene)以及3,4-二甲氧基苯甲醇(3,4-dimethoxybenzyl alcohol)。本研究推测萘普生降解菌群对萘普生的降解途径如图7所示。

在Marco-Urrea等^[23]研究的报道中,真菌漆酶降解萘普生过程中产生产物2-乙酰基-6-甲氧基萘(2-acetyl-6-methoxynaphthalene),与本研究出现的降解产物结构相同。Domaradzka等^[26]关于细菌共代谢降解萘普生的研究中得到的萘普生降解途径表明,主要的代谢产物有7,8-二羟基萘普生(7,8-dihydroxynaproxen)和5,7,8-三羟基萘普生(5,7,8-trihydroxynaproxen),与本研究萘普生降解菌群产生代谢产物不相同。

2.4 萘普生降解菌群群落结构分析

将不同时期萘普生降解菌群样品进行高通量测序,得到萘普生降解菌属结构,如图8所示。图8所示为样品1、2、3、4中萘普生降解菌群微生物在属水平上的群落结构组成,在驯化过程中,萘普生浓度的变化引起微生物群落结构发生改变,物种丰富度也随之改变;随着萘普生浓度的不断提

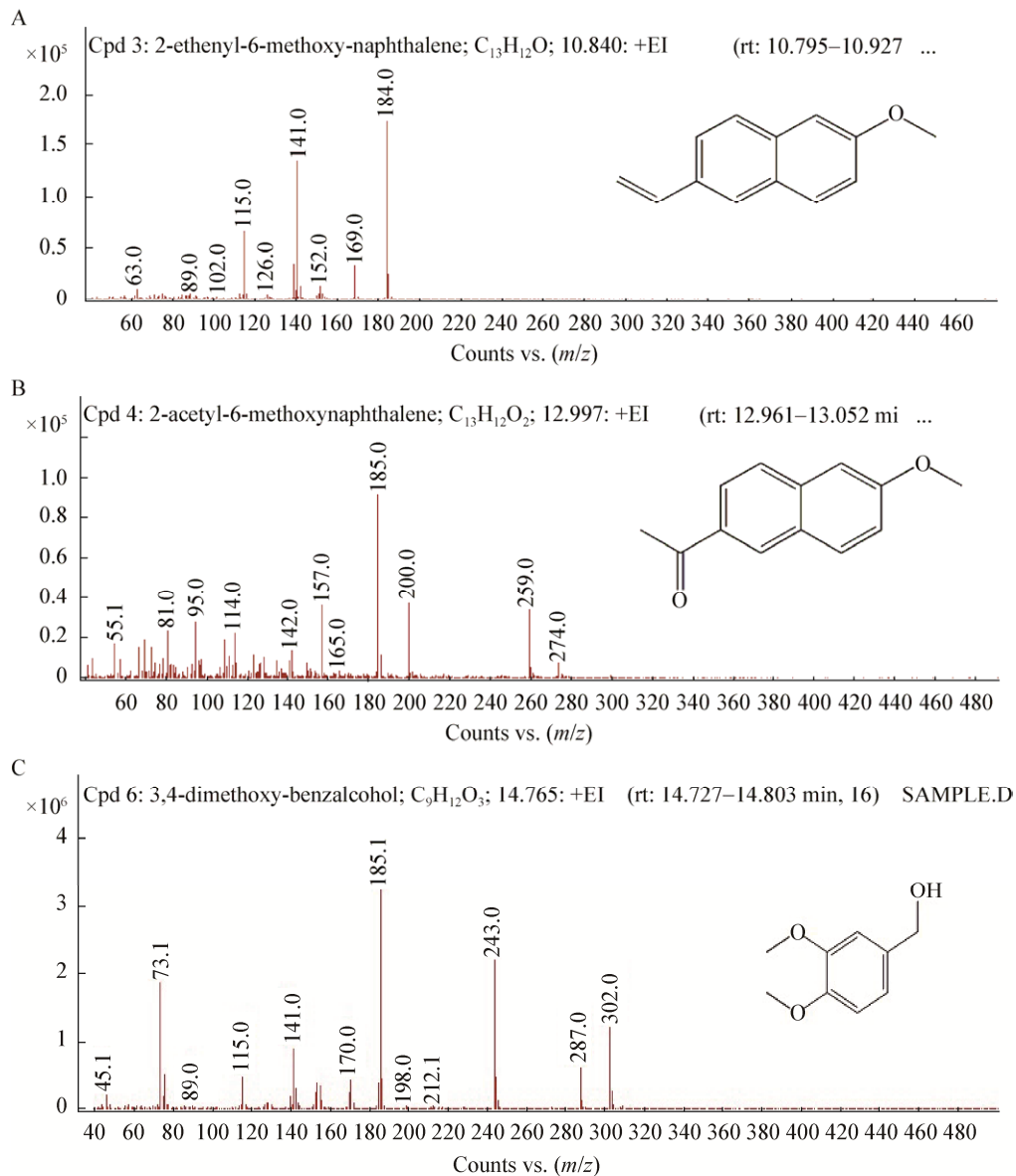


图 6 GC-MS 检测出的萘普生降解菌群降解萘普生的中间产物

Figure 6 Intermediate products of naproxen degradation by naproxen-degrading bacterial community detected by GC-MS

注: A: 2-乙烯基-6-甲氧基萘; B: 2-乙酰基-6-甲氧基萘; C: 3,4-二甲氧基-苯甲醇。

Note: A: 2-ethenyl-6-methoxy-naphthalene; B: 2-acetyl-6-methoxynaphthalene; C: 3,4-dimethoxy-benzalcohol.

表 1 化合物列表

Table 1 List of compounds

RT	化合物名称 Compound name	DB 分子式 DB molecular formula	匹配 Matching (DB)	分数(谱库) Fractions (Library)	谱库 Library
10.84	2-乙烯基-6-甲氧基萘 2-ethenyl-6-methoxy-naphthalene	$C_{13}H_{12}O$	4	94.05	NIST17.L
12.997	2-乙酰基-6-甲氧基萘 2-acetyl-6-methoxynaphthalene	$C_{13}H_{12}O_2$	3	94.14	NIST17.L
14.765	3,4-二甲氧基-苯甲醇 3,4-dimethoxy-benzalcohol	$C_9H_{12}O_3$	6	93.12	NIST17.L

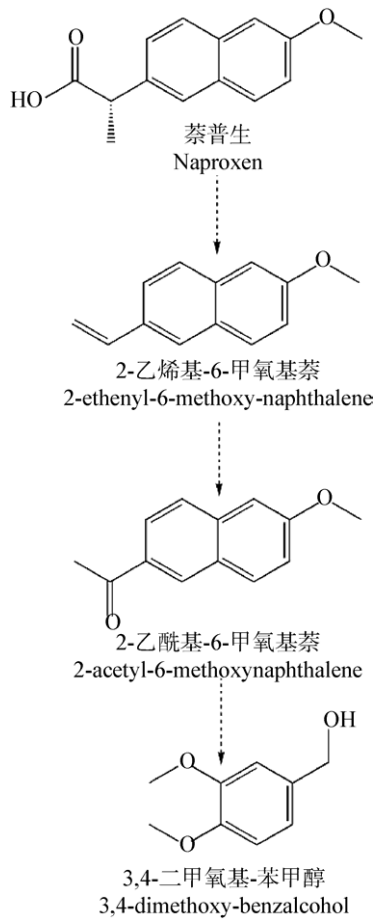


图7 萘普生降解菌群降解萘普生的代谢途径
Figure 7 Metabolic pathway of naproxen degradation by naproxen-degrading bacterial community

高, *Rhodanobacter* 菌属丰度也随之不断升高, 同时 *gamma_proteobacterium_OR-113* 和 *Unclassified_g_Dyella* 等菌属微生物丰度逐渐下降, *Rhodanobacter* 菌属逐渐成为优势菌属, 这可能与 *Rhodanobacter* 菌属利用萘普生作为碳源进行生长有关, 进而判断 *Rhodanobacter* 菌属微生物在降解萘普生的过程中起到了积极的作用^[39]。除此之外, *Acidisphaera* 菌属和 *Acidipilla* 菌属等微生物种群在驯化过程中的相对丰度逐渐增大, 推测这些菌属也可能参与萘普生的降解过程^[40-41]。

3 结论

(1) 通过单因素实验确定了萘普生降解菌群的最佳降解条件为: 30 °C、pH 为 7.0、摇床转速 150 r/min、接种量 10%, 萘普生降解率达 60.58%。

(2) 利用 GC-MS 确定了萘普生降解菌群在降解萘普生时的中间产物, 进而推测出萘普生的降解途径, 为降解效能的机理研究提供了理论依据。

(3) 通过高通量测序获得了萘普生降解菌群属水平上的群落结构分布情况, 可确定优势菌属为 *Rhodanobacter*, 这一菌属在萘普生降解的过程中起到了一定积极作用。

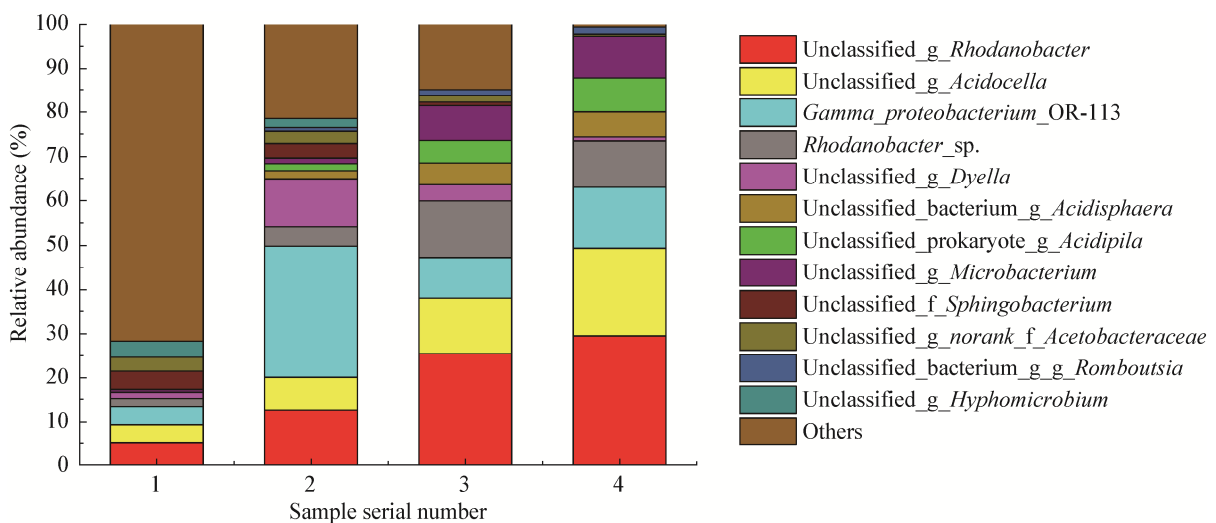


图8 萘普生降解菌群在属分类水平上的分布
Figure 8 Distribution of naproxen-degrading bacterial community at the classification level of genus

REFERENCES

- [1] Péry ARR, Gust M, Vولات B, et al. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(3): 300-304
- [2] Cunha V, Burkhardt-Medicke K, Wellner P, et al. Effects of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on multixenobiotic resistance (MXR) related efflux transporter activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 136: 14-23
- [3] Ekman E. The non-selective anti-inflammatory, naproxen at an over-the-counter dose during arthroscopic surgery[J]. *The Journal of Pain*, 2012, 13(S4): S85
- [4] Zhang L. Marketing analysis of naproxen[J]. *China Pharmacy*, 2003, 14(6): 326-328 (in Chinese)
张伦. 萘普生市场透析[J]. *中国药房*, 2003, 14(6): 326-328
- [5] Lin T, Yu SL, Chen W. Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China[J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 1-9
- [6] Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 122(3): 195-204
- [7] Clara M, Strenn B, Gans O, et al. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants[J]. *Water Research*, 2005, 39(19): 4797-4807
- [8] Ikehata K, Naghashkar NJ, El-Din MG. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review[J]. *Ozone: Science & Engineering*, 2006, 28(6): 353-414
- [9] Kim I, Yamashita N, Tanaka H. Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products during UV and UV/H₂O₂ treatments[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(4): 518-525
- [10] Wang L, Ying GG, Zhao JL, et al. Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of North China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(16): 3139-3147
- [11] Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(3): 597-603
- [12] Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers[J]. *Water Research*, 1998, 32(11): 3245-3260
- [13] Ali S, Pimentel JD, Ma C. Naproxen-induced liver injury[J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2011, 10(5): 552-556
- [14] Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 122-159
- [15] Domínguez JR, González T, Palo P, et al. Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: Influence of pH and presence of other drugs[J]. *Desalination*, 2011, 269(1/3): 231-238
- [16] Hasan Z, Jeon J, Jung SH. Adsorptive removal of naproxen and clofibrac acid from water using metal-organic frameworks[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 209-210: 151-157
- [17] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, et al. Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1): 135-143
- [18] Chen XQ, Jin YY. *New Materia Medica*[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1985 (in Chinese)
陈新谦, 金有豫. *新编药理学*[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1985
- [19] Todd PA, Clissold SP. Naproxen: A reappraisal of its pharmacology, and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states[J]. *Drugs*, 1990, 40(1): 91-137
- [20] Qi YJ, Liu F. Analysis of antibiotics in groundwater: a review[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2014, 33(1): 1-11 (in Chinese)
祁彦洁, 刘菲. 地下水中抗生素污染检测分析研究进展[J]. *岩矿测试*, 2014, 33(1): 1-11
- [21] Kramer RD, Filippé TC, Prado MR, et al. The influence of solid-liquid coefficient in the fate of pharmaceuticals and personal care products in aerobic wastewater treatment[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(25): 25515-25525
- [22] Hom-Díaz A, Jaén-Gil A, Bello-Laserna I, et al. Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: Pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 592: 1-11
- [23] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Blázquez P, et al. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(7): 2159-2166
- [24] Marchlewicz A, Domaradzka D, Guzik U, et al. *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, 227(6): 197
- [25] Wojcieszynska D, Domaradzka D, Hupert-Kocurek K, et al. Bacterial degradation of naproxen-undisclosed pollutant in the environment[J]. *Journal of Environmental Management*,

- 2014, 145: 157-161
- [26] Domaradzka D, Guzik U, Hupert-Kocurek K, et al. Cometabolic degradation of naproxen by *Planococcus* sp. strain S5[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, 226(9): 297
- [27] Cai R. Isolation and degradation characteristic of a new cold-adapted carbamazepine-degrading bacterium[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2012 (in Chinese)
蔡蕊. 低温卡马西平降解菌的筛选及降解特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2012
- [28] Ma F, Shan D, Wang C, et al. Screening and characterization of an aniline-degrading flora with high efficiency at low temperature[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2007, 1(5): 7-10 (in Chinese)
马放, 山丹, 王晨, 等. 低温降解苯胺高效菌群的筛选及特性研究[J]. *环境工程学报*, 2007, 1(5): 7-10
- [29] Li A. Biodegradation of biphenyl by *Dyella ginsengisoli* LA-4 and cloning, expression of *bph* genes[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian University of Technology, 2009 (in Chinese)
李昂. 菌株 *Dyella ginsengisoli* LA-4 降解联苯及基因的克隆与表达[D]. 大连: 大连理工大学博士学位论文, 2009
- [30] Qu YY, Zhou JT, Wang J, et al. Novel approach for rapid extraction of genomic DNA from activated sludge and its fingerprinting analysis[J]. *Journal of Dalian University of Technology*, 2006, 46(3): 335-339 (in Chinese)
曲媛媛, 周集体, 王竞, 等. 活性污泥基因组 DNA 快速提取新方法及其指纹分析[J]. *大连理工大学学报*, 2006, 46(3): 335-339
- [31] Nosek K, Styszko K, Golas J. Combined method of solid-phase extraction and GC-MS for determination of acidic, neutral, and basic emerging contaminants in wastewater (Poland)[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2014, 94(10): 961-974
- [32] Al Disi ZA, Bontognali TRR, Jaoua S, et al. Influence of temperature, salinity and Mg^{2+} : Ca^{2+} ratio on microbially-mediated formation of Mg-rich carbonates by *Virgibacillus* strains isolated from a sabkha environment[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 19633
- [33] Roslee AFA, Zakaria NN, Convey P, et al. Statistical optimisation of growth conditions and diesel degradation by the Antarctic bacterium, *Rhodococcus* sp. strain AQ5-07[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(2): 277-291
- [34] da Silva LCA, Honorato TL, Cavalcante RS, et al. Effect of pH and temperature on enzyme activity of chitosanase produced under solid stated fermentation by *Trichoderma* spp.[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(1): 60-65
- [35] de Angelis M, Calasso M, Di Cagno R, et al. NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(5): 1763-1774
- [36] Zhong DF, Sun L, Liu L, et al. Microbial transformation of naproxen by *Cunninghamella* species[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2003, 24(5): 442-447,149
- [37] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, et al. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis*, *cis*-muonic acid production[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(6): 1297-1307
- [38] Parales RE, Lee K, Resnick SM, et al. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(6): 1641-1649
- [39] Zhao X, Wang XC, Chen ZL, et al. Microbial community structure and pharmaceuticals and personal care products removal in a membrane bioreactor seeded with aerobic granular sludge[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1): 425-433
- [40] Onesios-Barry KM, Berry D, Proescher JB, et al. Removal of pharmaceuticals and personal care products during water recycling: microbial community structure and effects of substrate concentration[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(8): 2440-2450
- [41] Kraigher B, Kosjek T, Heath E, et al. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors[J]. *Water Research*, 2008, 42(17): 4578-4588