



基于吐温-80 下 2 株功能菌协同降解多环芳烃的特性研究

徐晓芳¹, 许晓毅², 纪丽莲¹, 裴俊伟¹, 黄磊¹, 刘贞鑫¹, 白净^{1*}

1 苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215000

2 苏州科技大学环境科学与工程学院, 江苏 苏州 215000

徐晓芳, 许晓毅, 纪丽莲, 裴俊伟, 黄磊, 刘贞鑫, 白净. 基于吐温-80 下 2 株功能菌协同降解多环芳烃的特性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1645-1657.

XU Xiaofang, XU Xiaoyi, JI Lilian, PEI Junwei, HUANG Lei, LIU Zhenxin, BAI Jing. Synergistic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by two functional strains in the presence of Tween-80[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1645-1657.

摘要: 【目的】研究恶臭假单胞菌 B6-2 和克雷伯氏菌 CW-D3T 构建的混合功能菌对多环芳烃的协同修复效能, 并探究非离子表面活性剂吐温-80 对混菌降解多环芳烃的影响, 以期为芳烃化合物的生物修复提供技术参考和理论依据。【方法】通过生长曲线及平板菌落计数法反映混菌生长情况及比例, 从而评估混菌降解体系的可行性; 通过高效液相色谱法探究各体系以及不同吐温-80 浓度下混培体系对多环芳烃的降解效能; 最后通过烷烃吸附法测定细胞表面疏水性, 以探究吐温-80 对混合功能菌降解多环芳烃的影响机制。【结果】等比例混合的 2 株菌共培养生长状态优于纯培体系, 对混合多环芳烃(菲、荧蒹、芘)的降解率分别为 33.4%、30.1%、28.6% (7 d), 相较于菌 CW-D3T, 分别提高了 1.31 倍、1.46 倍、1.42 倍。混培体系中加入 500 mg/L 的吐温-80 对菲、荧蒹、芘的降解率分别为 47.7%、43.2%、38.8% (7 d), 相较于对照组各提高了 1.55 倍、1.38 倍、1.31 倍, 而更高浓度的吐温-80 无明显促进作用或轻微抑制。添加吐温-80 使菌 CW-D3T 和混菌的表面疏水性提高, 而菌 B6-2 表面疏水性降低。结合细菌生长量分析表明, 更高浓度的吐温-80 会对菌 B6-2 产生一定的毒性抑制其生长从而影响混菌降解效率。【结论】恶臭假单胞菌 B6-2 和克雷伯氏菌 CW-D3T 构建的混合功能菌具有良好的协同修复芳烃化合物效能, 低浓度吐温-80 可作为碳源被细菌利用,

资助项目: 国家自然科学基金(52070138); 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(20KJB180002); 江苏省自然科学基金(BK20210864); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX22_3296)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (52070138), the Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions of China (20KJB180002), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20210864), and the Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX22_3296).

*Corresponding author. E-mail: baijing@mail.usts.edu.cn

Received: 2022-09-17; Accepted: 2022-11-08; Published online: 2022-11-10

并可以提高细胞表面疏水性等从而显著提高菲、荧蒹、芘的去除效率。

关键词：多环芳烃；联合修复；吐温-80；细胞表面疏水性

Synergistic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by two functional strains in the presence of Tween-80

XU Xiaofang¹, XU Xiaoyi², JI Lilian¹, PEI Junwei¹, HUANG Lei¹, LIU Zhenxin¹, BAI Jing^{1*}

1 School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215000, Jiangsu, China

2 School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215000, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To study the synergistic remediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by mixed functional bacteria constructed by *Pseudomonas putida* B6-2 and *Klebsiella* sp. CW-D3T, and explore the effect of non-ionic surfactant Tween-80 on the degradation of PAHs by mixed bacteria, to provide the potentials and insights for the biodegradation of aromatic compounds. **[Methods]** In this study, we measured the bacteria-growth curve and the determined proportion of mixed bacteria by standard plate count method, thereby exploring the feasibility of mixed bacteria degradation system. We investigated the degradation efficiencies of PAHs by pure cultures and bacterial mixed cultures at different concentrations of Tween-80 using high-performance liquid chromatography. Finally, we conducted the cell surface hydrophobicity assay by an alkane adsorption method to explore the mechanism of Tween-80 in affecting the degradation of PAHs by mixed functional bacteria. **[Results]** The growth state of the two strains mixed in equal proportion was better than that of the pure culture system. After 7 days, the degradation rates of mixed PAHs (phenanthrene, fluoranthene, and pyrene) were 33.4%, 30.1%, and 28.6%, respectively, which were 1.31 times, 1.46 times and 1.42 times higher than those of strain CW-D3T. The degradation rates of phenanthrene, fluoranthene, and pyrene with the addition of 500 mg/L Tween-80 to the mixed bacterial culture were 47.7%, 43.2%, and 38.8%, respectively, which were 1.55 times, 1.38 times, and 1.31 times higher than those in the control group. However, higher concentrations of Tween-80 did not significantly promote or slightly inhibit the degradation of PAHs. The addition of Tween-80 increased the surface hydrophobicity of strain CW-D3T and mixed bacteria while decreasing that of strain B6-2. Combined with the number of bacterial colonies results, the higher concentration of Tween-80 produced certain toxicity to strain B6-2 and inhibited its growth, thereby affecting the degradation efficiency of mixed bacteria. **[Conclusion]** The composite functional bacteria constructed by *P. putida* B6-2 and *Klebsiella* sp. CW-D3T has a good efficiency in degrading aromatic compounds. A low concentration of Tween-80 can be utilized as a carbon source and change the hydrophobicity of the cell surface,

thus significantly improving the removal efficiency of phenanthrene, fluoranthene and pyrene.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); combined remediation; Tween-80; cell surface hydrophobicity

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)作为一种持续性有机污染物,近年来在水体、土壤等各类环境介质中频繁发现,其是由2个或2个以上的苯环组合而成的碳氢化合物^[1]。该类污染物的来源主要有为造成和自然产生2种途径,其中人为造成占据大部分,包括各种工业化生产、汽车尾气和化石燃料等中的高分子有机物质经不完全燃烧或者在还原性气氛中热分解而产生^[2]。释放到环境中的多环芳烃具有高沸点、高熔点和难溶解的特点,随着苯环数量增加,在环境介质中的持久性更长,毒性也越大^[3]。因具有致癌、致畸、致突变的“三致效应”,环境生态污染潜势较高。20世纪70年代,美国环保局将16种多环芳烃作为优先控制污染物^[4],同时我国在2018年通过了《中华人民共和国土壤污染防治法》,以用于应对当下环境污染^[5]。

生物修复是目前常用的技术手段之一,主要是利用生物尤其是微生物,将环境中的PAHs降解为CO₂和水或者转化为无毒或毒性小的物质^[6]。已发现的具有多环芳烃降解性能的微生物有藻类、真菌、细菌等。细菌因繁殖方式简单、适应能力强且代谢类型丰富而被广泛研究,例如假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、分枝杆菌属和克雷伯氏菌属等^[7-8]。但研究发现单个菌株对PAHs的修复效果非常有限,也会受到环境介质中共存的其他污染物的干扰^[9]。而联合修复是将不同能力的降解菌进行合理配置,通过微生物之间的协同和拮抗作用促进更高效率的生物降解^[10-11]。Xu等^[12]利用9株细菌等比构建混合菌群,结果发现混合菌群的降解效果均高

于单一菌株的降解效果。然而,由于多环芳烃复杂的化学结构,其生物利用度往往受到低溶解度的限制,表面活性剂可以扩大细胞膜的通透性,降低表面张力和界面张力,提高多环芳烃的溶解度,从而增强洗脱效率^[13]。非离子表面活性剂吐温-80因为成本低、毒性小等特点被大量研究^[14]。Al Farraj等^[15]在鞘氨醇单胞菌KSU05降解萘的体系中加入0.3 mmol/L吐温-80和5.5%葡萄糖,萘的降解效率从70.5%提高至90.0%。Xu等^[16]用含有吐温-80的土壤淋洗液冲洗固定化克雷伯氏菌,结果显示多环芳烃的去除率显著提升。但目前基于表面活性剂的单一菌种降解研究较多,而对于混合功能菌降解研究相对有限。

将协同修复和表面活性剂的增效作用叠加使用可能会得到更好的修复效果。基于此设想,本研究以菲、荧蒽、芘混合多环芳烃作为PAHs模型化合物,以已经解析出完整基因组序列且拥有多个耐溶剂性外排泵的恶臭假单胞菌B6-2^[17]和可以广泛降解多种芳烃化合物的克雷伯氏菌CW-D3T^[18]为目标菌株,基于菌株生长特性、混合后菌群比例以及不同培养模式下对多环芳烃降解效果的研究,构建高效PAHs混菌降解体系,进一步探究添加不同浓度吐温-80,对混菌降解PAHs特性的影响以及细胞表面疏水性的改变进行研究,以期多环芳烃的生物联合修复提供更多的理论指导和技术手段。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

供试菌恶臭假单胞菌B6-2:上海交通大学

生命科学技术学院食品与环境微生物技术研究室赠予；克雷伯氏菌 CW-D3T：购买于中国典型培养物保藏中心(CCTCC AB 206144T)。二者均可在含有菲、荧蒽、芘的无机盐培养基上生长。

1.2 主要试剂和培养基

菲、荧蒽、芘(纯度>98%)购买于阿拉丁；甲醇、乙醇、乙腈等购自上海麦克林生化试剂有限公司，HPLC 级；琼脂、胰蛋白胨、氢氧化钠、磷酸二氢钾、碘化钾、吐温-80 等试剂均购自国药集团有限公司。

LB 液体培养基：以蒸馏水配制，酵母膏 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，氯化钠 10 g/L，pH 调整为 7.0–7.2，用于活化细菌；无机盐培养基参考 Liu 等^[19]的方法进行配制，用于细菌对多环芳烃的降解实验。

多环芳烃储存液配制：将 2.25 g 的菲、荧蒽、芘(质量比 1:1:1)倒入小烧杯，用 50 mL 二甲亚砜(DMSO)溶解，于容量瓶内定容，得到浓度分别为 15 g/L 的菲、荧蒽、芘的 PAHs 母液，备用。

1.3 纯培体系和混培体系生长曲线的测定及共培养特性研究

挑取 PAHs 固体培养基上的单菌落于 PAHs 无机盐液体培养基中，30 °C、200 r/min 振荡培养 12–16 h，按照 1% 体积比接种于新鲜培养基中(混培体系体积比 1:1)继续培养，每隔 2 h 取样，持续培养 28 h，测量 600 nm 波长处的吸光度，绘制菌株的生长量随时间的变化曲线。

取 28 h 的混培体系菌液涂布于 PAHs 无机盐固体培养基上，置于 30 °C 恒温生化培养箱中培养，观察混菌中的共培养特性。

1.4 纯培体系和混培体系对 PAHs 的降解研究

纯培体系：将预先活化的 CW-D3T 和 B6-2 菌液分别调至 $OD_{600}=1.0$ 后，按照 1% 体积比接

种到含有 15 mg/L PAHs 无机盐培养基中，30 °C、200 r/min 避光振荡培养，定时(0、3、5、7 d)取样测定 PAHs 的浓度。混培体系：将预先活化的 2 种菌液分别调至 $OD_{600}=1.0$ 后等体积混合，按照 1% 体积比接种到含有 15 mg/L PAHs 的无机盐培养基中，30 °C、200 r/min 避光振荡培养，定时(0、3、5、7 d)取样测定 PAHs 的浓度。同时设置不加菌液的空白对照，用于计算 PAHs 的非生物损失。PAHs 浓度通过高效液相色谱法(HPLC)测定，参照 Wen 等^[20]的方法并进行了改进，待测样品溶液中加入等体积无水乙醇，超声促溶 20 min，用 0.22 μm 有机滤膜过滤后采用高效液相色谱分析定量，高效液相色谱检测条件为：WondaCract ODS-2 高效液相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)，254 nm 波长测定，温度 25 °C，保留时间 17 min。流动相为乙腈(A)-超纯水(B)，梯度洗脱：0–5 min 10% A；5–8 min 10%–90% A；8–15 min 90% A；15–16 min 90%–10% A；16–17 min 10% A。0.8 mL/min 的流速，进样量 20 μL。PAHs 的降解率按照公式(1)计算。

$$E(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

其中， C_0 、 C_t 分别为 PAHs 的初始浓度、时间 t 时的剩余浓度(mg/L)。

1.5 不同浓度吐温-80 下混培体系对多环芳烃的生物降解特性

1.5.1 混培体系对 PAHs 的降解

参照 1.4，将混合菌液按照 1% (体积分数)接种于不同浓度吐温-80 (0、500、1 000、2 000 mg/L) PAHs 无机盐培养基中，定时(0、3、5、7 d)取样测定 PAHs 的浓度。

1.5.2 混菌生长量测定

1.5.1 节中菌液定时取样(0、3、5、7 d)，由于该实验周期较长，为防止菌体代谢产物及死亡菌体对紫外分光光度计读数的影响，故采用平

板稀释计数法。分析不同浓度吐温-80 体系中混合菌液的活细胞数(菌落形成数, CFU/mL)变化。

1.5.3 吐温-80 对 PAHs 的增溶作用

分别取 50 mL 不同浓度(0、500、1 000、2 000 mg/L)的吐温-80 溶液加入 100 mL 锥形瓶中, 再投加 10 mg 研磨后的菲、荧蒽和芘固体粉末, 密封后于超声波仪中进行(频率为 45 kHz, 功率为 300 W)超声溶解 1 h 后, 在恒温振荡器中振荡 24 h (30 °C、200 r/min), 使固体 PAHs 充分溶解达到饱和^[21-22]。溶液经 0.45 μm 滤头除去未溶解的 PAHs 晶体, 滤出液经预处理(同 1.4)后, 通过 HPLC 检测溶解于不同浓度吐温-80 溶液中各 PAHs 化合物浓度。

1.5.4 细胞表面疏水性测定

将单菌菌液和混合菌液按照 1% 体积比接种到不同浓度吐温-80 (0、500、1 000、2 000 mg/L) 的 PAHs 无机盐培养基中(同 1.4), 30 °C、200 r/min 避光恒温振荡 96 h, 离心收集菌体, 用磷酸缓冲溶液清洗菌体 3 次。参照烷烃吸附法测定原始及表面活性剂处理后功能菌的细胞表面疏水性(cell surface hydrophobicity, CSH)。具体操作如下: 将清洗后的菌体重悬于磷酸缓冲溶液中, 配制菌液浓度为 $OD_{600}=0.5$ (作为对照组), 取 4 mL 重悬菌液和 1 mL 正己烷涡旋混合 10 s, 静置 45 min。缓慢吸取下层水相, 测其 OD_{600} 值(作为实验组)。细菌细胞表面疏水率(CSH%) 按下列公式(2)计算。

$$CSH = \frac{OD_{600\text{对照组}} - OD_{600\text{实验组}}}{OD_{600\text{对照组}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.5.5 混培体系对不同浓度吐温-80 的利用特性

定时取样采用分光光度法测定吐温-80 浓度^[23]。标准曲线操作如下: 精密称取 2 g 的吐温-80 对照品, 用蒸馏水溶解并定容成一定浓度梯度的对照品溶液(0、200、400、600、800、1 000、1 200 mg/L), 用紫外分光光度计检测

238 nm 处的吸收值, 绘制标准曲线。

1.6 数据统计和分析

各组实验均设置 3 个平行实验组, 运用 SPSS Statistics 18.0 软件中单因素方差分析法(one-way ANOVA)对数据进行统计分析, 显著性水平定义为 $P < 0.05$, 使用字母标记法进行差异说明。图形绘制使用 Excel 2019 和 Origin 2021b。

2 结果与分析

2.1 纯培体系和混培体系的生长曲线

纯培体系和混培体系的生长曲线如图 1A 所示, 纯培体系中菌株 CW-D3T 和 B6-2 的生长趋势基本一致。0-4 h, 混培体系生长量略高于纯培体系; 4-20 h, 2 种体系都处于对数生长期, 生长量情况为混培体系 > CW-D3T > B6-2, 说明混培体系中 2 株菌可能有协同促生长作用; 20 h 后纯培体系 2 株菌生长缓慢开始进入稳定期, 而混培体系依旧处于上升状态, 说明 2 株菌混合后的生长优于纯培养, 可构建混合菌体系; 24 h 后进入衰亡期。总体情况混培体系生长量一直高于纯培体系, 2 株菌生长具有协同作用。

取 28 h 混培体系的菌液稀释涂布于 PAHs 无机盐培养基上, 如图 1B 所示, CW-D3T 为乳白色圆形菌落, B6-2 为浅灰色菌落, 等比例作图(图 1C), 白色圆形代表菌 CW-D3T, 白色三角形代表菌 B6-2。经统计, CW-D3T 的菌落数为 2.4×10^{10} CFU/mL, B6-2 的菌落数为 1.5×10^{10} CFU/mL, 二者比例约 3:2, 说明混培体系中的 2 株菌可以共存, 证明实验中的混培体系有可行性, 可以进行后续实验。

2.2 不同培养体系对多环芳烃降解特性研究

纯培体系和混培体系 7 d 内对多环芳烃的降解效率如图 2 所示。以未添加微生物的体系

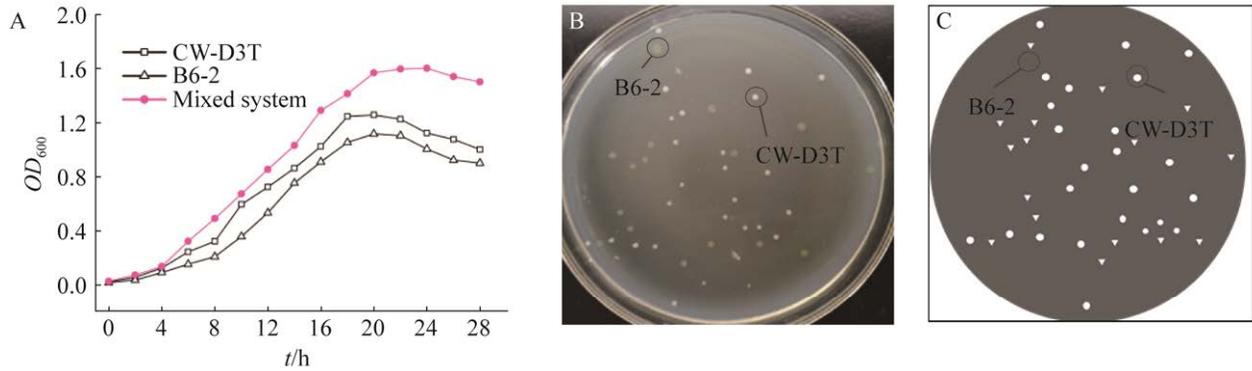


图 1 不同培养体系菌株生长情况图

Figure 1 Growth curve of strains in different culture systems. A: Growth curve. B: Dilution and coating plate diagram of mixed culture bacteria solution. C: Schematic diagram of colony distribution.

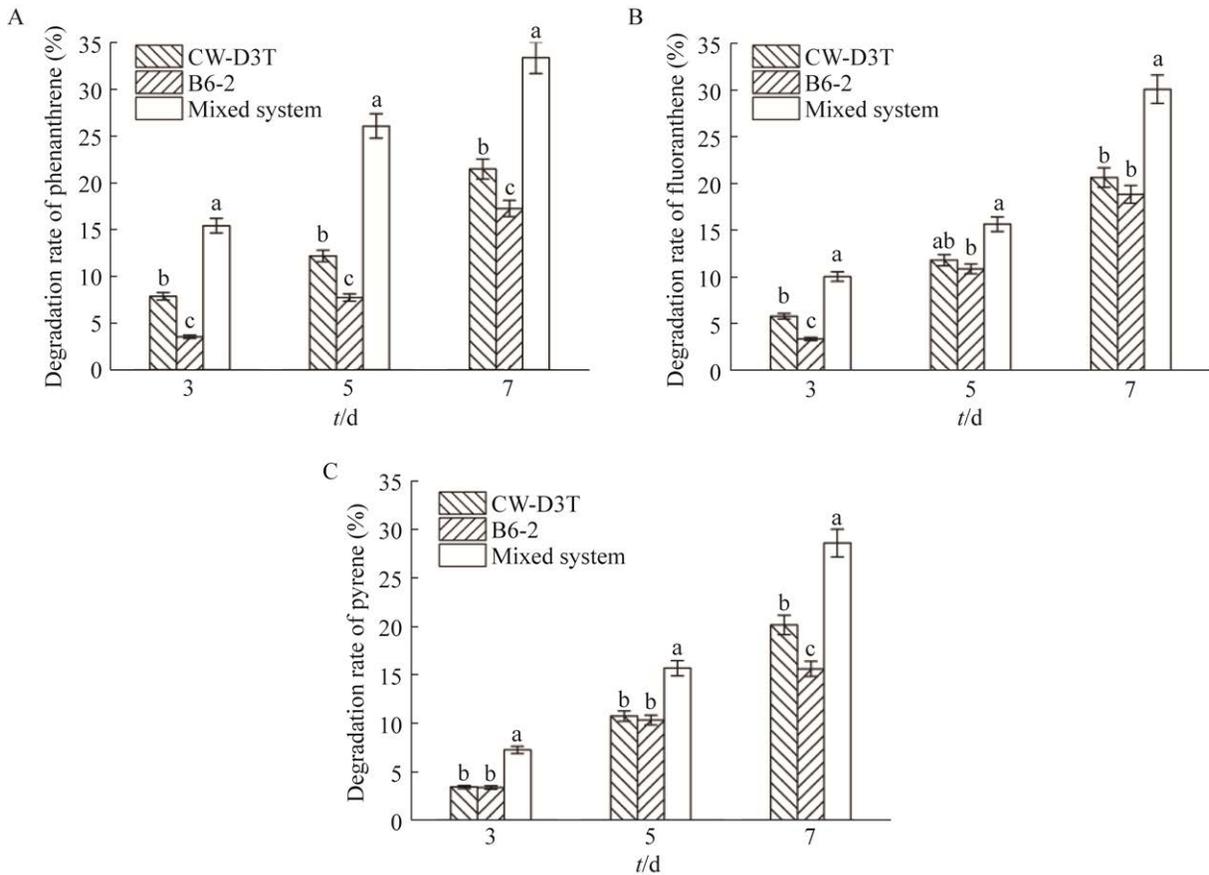


图 2 纯培体系和混培体系对多环芳烃的降解特性

Figure 2 Degradation characteristics of PAHs in pure culture system and mixed culture system. A: Phenanthrene. B: Fluoranthene. C: Pyrene. The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

作为对照组, 7 d 后, 菲、荧蒹和芘的非生物损失率分别为 15.4%、10.3%、9.2%。不同体系下对 PAHs 的降解率均随着天数的增加而逐步上升。反应周期结束后第 7 天混培体系对 3 种 PAHs 的降解效率分别为 33.4% (菲)、30.1% (荧蒹)、28.6% (芘), 相较于 2 种纯培体系, 菲、荧蒹和芘的去除率提高了 10%–15%, 具有显著性差异($P<0.05$)。3 种 PAHs 的降解效果均为混培体系>CW-D3T>B6-2, 说明混合功能菌群构建较成功, 共同培养的 2 株菌具有良好的协同作用。可能原因是单一菌株的降解关键酶种类有限, 而混合菌群之间的协同作用提高了降解效率, 或分泌的代谢产物可被互相利用^[24-25]。

2.3 不同浓度吐温-80 下混培体系的降解特性

2.3.1 不同浓度吐温-80 下多环芳烃的降解研究

不同浓度吐温-80 下混培体系对 PAHs 的降解特性如图 3A–3C 所示。反应周期结束后, 500 mg/L 吐温-80 体系中菲、荧蒹、芘的降解率分别为 47.7%、43.2%、38.8%, 相较于无吐温-80 体系分别提高了 1.55 倍、1.38 倍和 1.31 倍。加入 500 mg/L 的吐温-80 显著提高混培体系对 PAHs 的去除($P<0.05$)。而 1 000 mg/L 和 2 000 mg/L 吐温-80 体系在反应周期内并没有明显的促进效果($P>0.05$), 反而轻微抑制 PAHs 的降解。这可能是由于吐温-80 虽然作为表面活性剂可以改变细胞膜的通透性, 提高 PAHs 的生物利用度, 但同时作为化学试剂对细菌细胞有一定的毒性, 随着浓度的增大毒性越大, 反而会抑制细胞的生长从而影响去除效果^[26]。臧淑艳等^[27]在对苯并芘(BaP)的生物降解研究中也证明了这一点, 表面活性剂在 500–1 000 mg/L 范围内, BaP 的去除率大幅度提高, 而更高浓度的吐温-80 产生了一定的抑制作用。此外, 三环的菲作为低分子量多环芳烃在水中的溶解度高于四环的荧蒹和

芘, 所以其降解率高于二者。

2.3.2 菌体生长量

利用稀释涂布平板法测定不同浓度吐温-80 对混培体系中 2 株菌数量的影响, 结果如图 3D 所示。整个反应周期中, 因为底物 PAHs 可作为碳源和能源被利用, 无吐温-80 对照体系中 2 株菌均稳定生长, 但趋势较缓。添加吐温-80 实验体系中, CW-D3T 的菌体数量随着吐温-80 浓度增大而增加, 说明吐温-80 可以促进 CW-D3T 的生长。而不同浓度吐温-80 对 B6-2 的生长影响有显著差异($P<0.05$), 500 mg/L 下细菌数量最多, 更高浓度的吐温-80 抑制细菌的增殖。

混培体系中, 不同浓度吐温-80 对细菌数量的影响为 500 mg/L>2 000 mg/L \approx 1 000 mg/L \approx 0 mg/L, 可能是 2 株菌之间的协同作用和吐温-80 共同作用所致, 所以不仅吐温-80 会对细菌增殖产生影响, 二者之间也可能会因为某些分泌物导致细胞数量发生变化。但整体效果与前期 2.2 和 2.3.1 的结果相一致, 同时结合混菌对 PAHs 的降解分析可知, 在第 7 天时菌群尚未达到稳定期, PAHs 的降解仍有提高的空间。

2.3.3 吐温-80 对 PAHs 的增溶作用

吐温-80 可以促进污染介质中 PAHs 的解吸从而提高生物利用度^[14]。吐温-80 对菲、荧蒹、芘的增溶作用如图 4A 所示, PAHs 在液相中的溶解度随着吐温-80 浓度提高而增大, 呈现出良好的线性关系。菲、荧蒹、芘在不添加吐温-80 水溶液中的浓度分别为 1.045、0.332、0.293 mg/L, 在 2 000 mg/L 的吐温-80 水溶液中溶解度分别为 38.48、30.49、9.92 mg/L, 相比于对照组, 溶解度分别提高了 36.82 倍、97.84 倍和 33.82 倍。结果分析表明, 当吐温-80 浓度为 500 mg/L 时, 3 种多环芳烃在水溶液中部分溶解; 当吐温-80 浓度为 1 000 mg/L 时, 菲全部以溶解态存在, 荧蒹和芘部分溶解; 当吐温-80 浓度提高至 2 000 mg/L

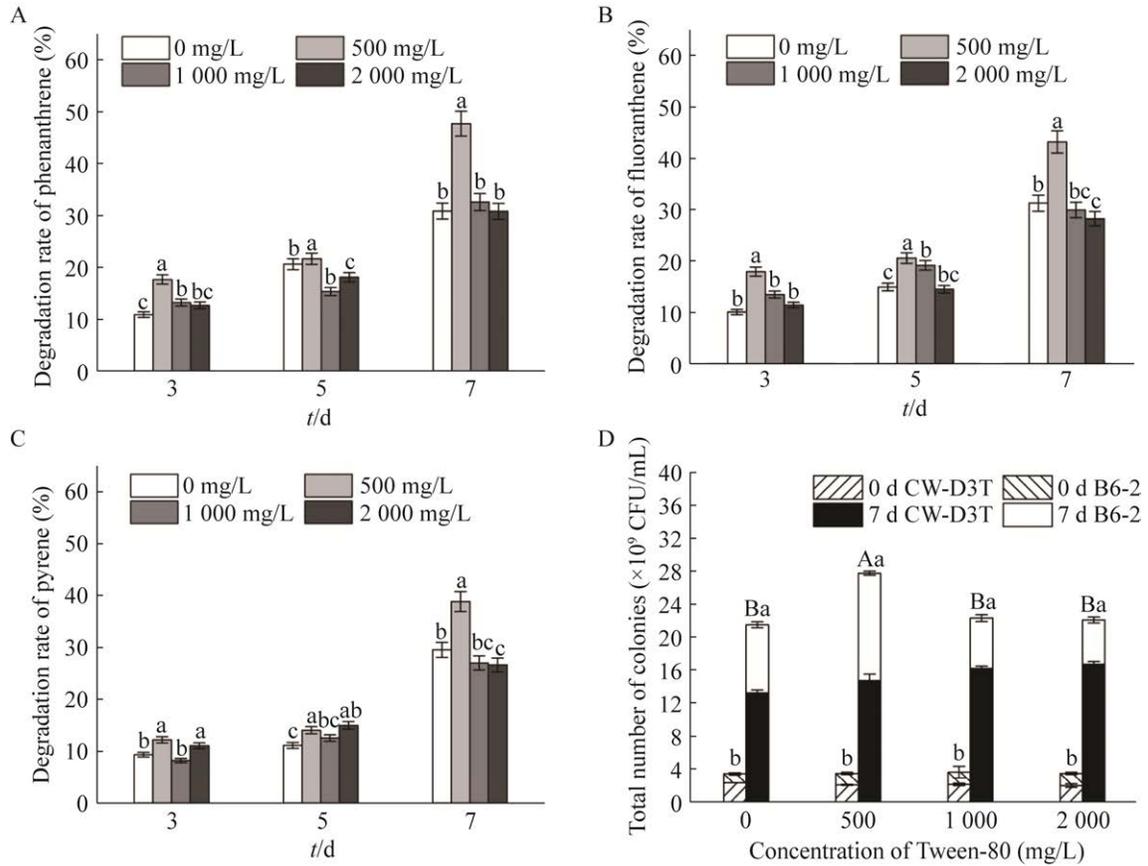


图 3 吐温-80 对 PAHs 的降解效率及菌落数的影响

Figure 3 Effect of Tween-80 on the degradation efficiency and colony number of PAHs. A: Phenanthrene. B: Fluoranthene. C: Pyrene. D: Determination of colony number of different single bacteria under different concentration of Tween-80. The different lowercase letters/capital letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

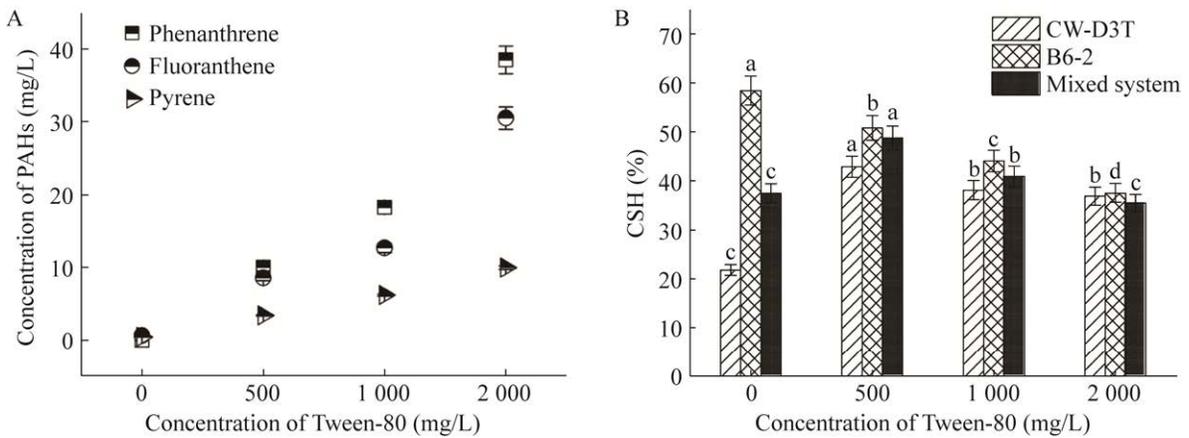


图 4 吐温-80 对 PAHs 增溶特性及细胞表面疏水性影响

Figure 4 Effect of Tween-80 on solubilization and cell surface hydrophobicity of PAHs. A: Solubilization. B: CSH. The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

时, 菲和茈萸全部以溶解态存在, 茈萸部分溶解。各体系中 PAHs 在液相中的溶解度均表现为菲>茈萸>茈萸。

2.3.4 细胞表面疏水性

CSH 是微生物细胞最重要的理化特性之一。细胞表面疏水性强, 则有利于其黏附于原油等烃类物质的表面, 促进微生物对原油的利用和降解^[28]。利用烷烃吸附法测定纯培体系和混培体系的 CSH, 结果如图 4B 所示。通过 CSH 可反应不同浓度吐温-80 对 PAHs 在细菌表面附着的难易程度的影响。表面活性剂处理前 CW-D3T、B6-2 和混菌的 CSH 分别为 21.9%、58.4%和 37.5%, 表明 CW-D3T 属于中等亲水, B6-2 属于高度疏水, 混培体系属于中等疏水。随着吐温-80 浓度的增加, CW-D3T 的 CSH 显著提升($P<0.05$), 但更高浓度吐温-80 体系中 CSH 略有下降的趋势; B6-2 的 CSH 随着吐温-80 的浓度增加逐渐降低; 混培体系处于二者之间, 500 mg/L 吐温-80 体系中 CSH 最高为 48.8%, 相比其初始 CSH 提高了 11.3%, 更高浓度的吐温-80 对 CSH 影响不显著甚至较初始值减小($P>0.05$)。

虽然吐温-80 可以提高细菌的 CSH, 但并不总是呈正相关。B6-2 初始 CSH 很高, 随着吐温-80 浓度增大, CSH 反而逐渐降低。这可能是因为表面活性剂的疏水端倾向于与表面呈疏水性细菌的疏水基团结合, 使细菌表面亲水位点比例增加而降低细胞的疏水性^[29]。这与 Zhao 等的研究结果相似, 高疏水性供试菌株在鼠李糖脂处理下, 其 CSH 显著降低, 表现出抑制降解作用^[30]。

2.3.5 混菌对吐温-80 的利用特性

利用紫外分光光度法绘制吐温-80 标准曲线, 吐温-80 浓度(y)和吸光值(x)的关系式为: $y=0.002\ 9x+0.071\ 19$, 相关系数 $R^2=0.995\ 5$, 表

示实验结果具有可靠性。混菌对吐温-80 的利用率如图 5 所示。在反应周期内, 混培体系对 500、1 000、2 000 mg/L 吐温-80 的利用率分别是 28.4%、27.4%、30.7%。吐温-80 浓度越高, 细菌对吐温-80 的利用率越高。混合功能菌群在各体系中对吐温-80 的利用主要集中在反应的前 5 天, 后期吐温-80 的降解速率逐步减缓。PAHs 在整个反应周期的前 5 天降解率相对较低, 可能由于混菌在反应前期优先利用吐温-80 作为碳源进行增殖, 与 PAHs 产生了竞争抑制。说明吐温-80 在体系中不仅作为表面活性剂影响细胞膜等结构, 同时还可作为碳源被细胞利用。

3 讨论与结论

3.1 讨论

本研究对比了纯培体系和混培体系中菌株生长及对 PAHs 的降解特性。通过生长曲线测定和稀释涂布平板实验表明 2 株菌(CW-D3T 和 B6-2)之间存在一定的协同作用, 并在降解周期中持续保持良好的生长比例, 可用于 PAHs 的生物修复。混培体系对 PAHs 的降解效率分别为 33.4%、30.1%、28.6%, 显著优于纯培体系

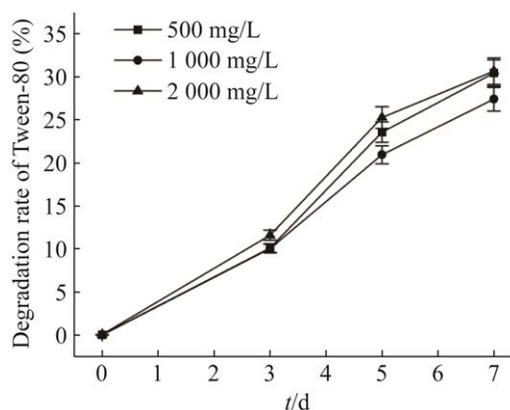


图 5 混培体系对不同浓度吐温-80 的降解率
Figure 5 The degradation rate of different concentrations of Tween-80 in the mixed system.

($P < 0.05$)。且在反应周期内(7 d)尚未达到稳定期, PAHs 的降解效率仍有上升空间。近年来多项研究表明相较于单个菌株, 混合细菌之间具有更多的代谢途径和代谢关键酶, 通过相互降解彼此无法代谢的中间体或分泌如表面活性剂等物质加快降解速率, 提高降解能力, 被用于各类环境修复中^[31-32]。

吐温-80 是 PAHs 修复中最常用的非离子表面活性剂之一。本研究测定了不同浓度吐温-80 对混菌降解 PAHs 特性以及细胞表面疏水性等影响。实验结果表明, 在一定浓度范围内, 添加吐温-80 可有效提高混培体系中 PAHs 的去除率, 与对照组(0 mg/L 吐温-80)相比, 500 mg/L 吐温-80 体系中混菌对 PAHs 的降解率最高, 均可提高 10% 以上(图 3A-3C)。可能是由于吐温-80 可利用亲水基团与污染物的斥力或形成胶束促进污染物的解吸^[33-34], 从而使吐温-80 提高了 PAHs 在水中的溶解度(图 4A)。同时, CSH 是影响 PAHs 跨膜转运的关键因素, 而跨膜转运是细菌降解的关键步骤^[35]。500 mg/L 吐温-80 混培体系中, 混菌的 CSH 从 37.5% 提高至 48.8% (图 4B), 可能是因为吐温-80 附着在混菌细胞表面或促进混菌表面释放脂多糖进而影响了混菌 CSH^[36]。此外, 吐温-80 也可以作为细菌生长的碳源, 在第 5 天, 500 mg/L 体系中吐温-80 利用率达到 23.6% (图 5), 并且细菌数量显著提高 ($P < 0.05$) (图 3B)。

吐温-80 浓度与 PAHs 的降解率并不呈正相关, 吐温-80 浓度为 500 mg/L 时, PAHs 降解率达到最大。而更高浓度的吐温-80 对 PAHs 的降解效果并不显著反而出现了轻微抑制作用($P > 0.05$)。实验结果表明, B6-2 的初始 CSH 较大, 属于高度疏水菌, 但随着吐温-80 浓度增大, CSH 反而减小; 此外, 高浓度吐温-80 混培体系中 B6-2 的细胞数量占比下降。结合细胞表面疏水性和菌

体生长量结果, 推测吐温-80 在 500 mg/L 使混菌达到最大 PAHs 降解率可能是由于 B6-2 菌对高浓度吐温-80 敏感, 吐温-80 对其产生的毒性作用影响了混菌的降解率。也说明 B6-2 在混菌降解过程中起到了较为关键的作用。

3.2 结论

(1) 拥有多个耐溶剂性外排泵的恶臭假单胞菌 B6-2 和具有广泛芳香烃降解能力的克雷伯氏菌 CW-D3T 构建的复合功能菌群在 PAHs 生物修复上展现出良好的协同效应, 能够有效提高 PAHs 的降解效率, 为 PAHs 的联合修复提供一定的理论依据和参考。

(2) 在一定浓度范围内, 添加吐温-80 可有效提高混培体系中 PAHs 的生物利用度, 增强 PAHs 生物修复。培养 7 d 后, 菲、荧蒹、芘的降解率分别为 47.7%、43.2% 和 38.8%, 相较于对照组去除效果分别提高了 1.55 倍、1.38 倍和 1.31 倍。结合细胞表面疏水性和细菌生长量分析, 吐温-80 不仅可以提高细胞膜的通透性还可以作为碳源供细菌生长。

(3) 吐温-80 的浓度与 PAHs 的降解率并不一直呈正相关。高浓度吐温-80 反而抑制混菌对 PAHs 的降解。其中对 B6-2 的影响最为显著, 细菌生长受到限制, 同时 CSH 降低。

4 总结与展望

通过比较纯培体系和混培体系对多环芳烃的降解, 以及不同浓度吐温-80 体系中混菌的降解效率, 结果表明菌 CW-D3T 和 B6-2 具有协同作用。相比单菌, 构建的混菌体系(体积比 1:1)可以显著提高 PAHs 的降解效率, 外源添加 500 mg/L 的吐温-80 可以使 3 种 PAHs 在 7 d 的降解率提高 10% 以上。吐温-80 作为碳源促进菌群的生长同时提高细胞表面的疏水性, 进一步证明吐温-80 在混培体系降解 PAHs 发挥了良

好的促进作用。

尽管本研究基于吐温-80 的混培体系显著优于纯培体系的降解能力, 但产生这种现象的分子机理, 例如吐温-80 对细菌细胞膜转运通道、氨基酸代谢通路等影响仍需进一步深入研究, 需利用组学技术以及分子生物学手段阐明其中的原理, 从而便于整合功能基因构建基因工程菌用于原位修复, 这项技术的成熟和广泛应用还有待继续深入研究。

致谢

本研究中恶臭假单胞菌 B6-2 由上海交通大学生命科学技术学院食品与环境微生物技术实验室提供, 在此表示感谢。

参考文献

- [1] DAI CM, HAN YM, DUAN YP, LAI XY, FU RB, LIU SG, LEONG KH, TU Y, ZHOU L. Review on the contamination and remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal soil and sediments[J]. *Environmental Research*, 2022, 205: 112423.
- [2] SEO JS, KEUM YS, LI QX. Bacterial degradation of aromatic compounds[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6(1): 278-309.
- [3] 吴洁婷, 许琪, 张营, 赵磊, 陈忠林, 于英潭, 于畅, 许海萍, 马放. 微生物降解典型高分子量多环芳烃的研究进展[J]. *环境科学研究*, 2021, 34(8): 1981-1990.
WU JT, XU Q, ZHANG Y, ZHAO L, CHEN ZL, YU YT, YU C, XU HP, MA F. Progress in microbial degradation of typical HMW-PAHs[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2021, 34(8): 1981-1990 (in Chinese).
- [4] NZILA A. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: overview of studies, proposed pathways and future perspectives[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 239: 788-802.
- [5] 中华人民共和国生态环境部. 中华人民共和国土地污染防治法[Z]. 北京: 中华人民共和国生态环境部, 2018-08-31.
- [6] Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China. Law of the People's Republic of China on the Prevention and Control of Land Pollution[Z]. Beijing: Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, 2018-08-31 (in Chinese).
- [7] ALEGBELEYE OO, OPELU BO, JACKSON VA. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation[J]. *Environmental Management*, 2017, 60(4): 758-783.
- [8] XU XY, CHEN X, SU P, FANG F, HU BB. Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria strains enriched from Yangtze River sediments[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(5): 513-520.
- [9] 彭子淇, 罗宇同, 陆阳阳, 李可, 李文均. 我国主要河口沉积物中多环芳烃细菌降解及生物修复强化方式的研究进展[J]. *微生物学报*, 2022, 62(6): 2311-2327.
PENG ZQ, LUO YT, LU YY, LI K, LI WJ. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of main estuaries in China by bacteria and the methods to enhance the degradation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2311-2327 (in Chinese).
- [10] 鲁麒, 魏香婷, 姚菁华, 肖雷. 微生物共培养降解多环芳烃研究进展[J]. *现代化工*, 2021, 41(6): 46-50, 54.
LU Q, WEI XT, YAO JH, XIAO L. Research progress on polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by microbial co-culture[J]. *Modern Chemical Industry*, 2021, 41(6): 46-50, 54 (in Chinese).
- [11] ZHANG T, ZHANG HJ. Microbial consortia are needed to degrade soil pollutants[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 261.
- [12] ZAFRA G, TAYLOR TD, ABSALÓN AE, CORTÉS-ESPINOSA DV. Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 318: 702-710.
- [13] XU M, WU M, ZHANG Y, ZHANG H, LIU W, CHEN G, XIONG G, GUO L. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial mixture[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2022, 19(5): 3833-3844.
- [14] LAMICHHANE S, BAL KRISHNA KC, SARUKKALIGE R. Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: a review[J].

- Journal of Environmental Management, 2017, 199: 46-61.
- [14] CHENG M, ZENG GM, HUANG DL, YANG CP, LAI C, ZHANG C, LIU Y. Tween 80 surfactant-enhanced bioremediation: toward a solution to the soil contamination by hydrophobic organic compounds[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(1): 17-30.
- [15] AL FARRAJ DA, ALKUFEIDY RM, ALKUBAIS NA, ALSHAMMARI MK. Polynuclear aromatic anthracene biodegradation by psychrophilic *Sphingomonas* sp., cultivated with Tween-80[J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128115.
- [16] XU XY, ZHOU H, CHEN X, WANG B, JIN ZX, JI FY. Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized *Klebsiella* sp. in soil washing effluent[J]. *Chemosphere*, 2019, 223: 140-147.
- [17] WANG WW, LI QG, ZHANG LG, CUI J, YU H, WANG XY, OUYANG XY, TAO F, XU P, TANG HZ. Genetic mapping of highly versatile and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* B6-2 (ATCC BAA-2545) as a 'superstar' for mineralization of PAHs and dioxin-like compounds[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(8): 4309-4325.
- [18] XU JF, LI WJ, CHEN XY, ZHOU Y. *Klebsiella alba* sp. nov., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted environment[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2010, 56(3): 241-247.
- [19] LIU SS, GUO CL, LIANG XJ, WU FJ, DANG Z. Nonionic surfactants induced changes in cell characteristics and phenanthrene degradation ability of *Sphingomonas* sp. GY2B[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 129: 210-218.
- [20] WEN Y, XU XY, WANG B, HE ZM, BAI J, CHEN XB, CUI JH, XU XF. PAHs biodegradation in soil washing effluent by native mixed bacteria embedded in polyvinyl alcohol-sodium alginate-nano alumina gel beads[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 297: 113415.
- [21] 郎丽萍, 钟金魁, 张杰西, 晏丽娟, 尚婷婷, 黄丽萍. 鼠李糖脂对多环芳烃的增溶作用及影响因素研究[J]. *安全与环境学报*, 2015, 15(3): 267-270.
- LANG LP, ZHONG JK, ZHANG JX, YAN LJ, SHANG TT, HUANG LP. Effect of rhamnolipid on the enhanced solubilization of the polycyclic aromatic hydrocarbons and the influential factors[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(3): 267-270 (in Chinese).
- [22] 朱婷婷, 倪晋仁. 表面活性剂对 *Bacillus pumilus* strain Bap9 降解苯并[a]芘的影响[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(9): 3344-3348.
- ZHU TT, NI JR. Effect of surfactants on biodegradation of benzo[a]pyrene by *Bacillus pumilus* strain Bap9[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(9): 3344-3348 (in Chinese).
- [23] 徐阳光, 王超, 刘海宽, 林世文, 周伟昌, 陈智胜. 一种检测吐温-80 溶液的浓度的方法[P]. 中国: CN110426361A, 2019-11-08.
- XU YG, WANG C, LIU HK, LIN SW, ZHOU WC, CHEN ZS. A method for detecting the concentration of Tween-80 solution[P]. Shanghai: CN110426361A, 2019-11-08 (in Chinese).
- [24] SOBERÓN-CHÁVEZ G, GONZÁLEZ-VALDEZ A, SOTO-ACEVES MP, COCOTL-YAÑEZ M. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(1): 136-146.
- [25] AHMAD Z, ZHANG XZ, IMRAN M, ZHONG H, ANDLEEB S, ZULEKHA R, LIU GS, AHMAD I, COULON F. Production, functional stability, and effect of rhamnolipid biosurfactant from *Klebsiella* sp. on phenanthrene degradation in various medium systems[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 207: 111514.
- [26] de la CUEVA SC, RODRÍGUEZ CH, CRUZ NOS, CONTRERAS JAR, MIRANDA JL. Changes in bacterial populations during bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, 227(3): 91.
- [27] 臧淑艳, 李培军, 杨艳杰, 张凤春, 赵慧, 王娟. Tween-80 作用下苯并(a)芘的微生物降解研究[J]. *辽宁工程技术大学学报*, 2007, 26(3): 467-469.
- ZANG SY, LI PJ, YANG YJ, ZHANG FC, ZHAO H, WANG J. Study on biodegradation of BaP in the presence of surfactant Tween-80[J]. *Journal of Liaoning Technical University*, 2007, 26(3): 467-469 (in Chinese).
- [28] 颜湘波, 刘免, 王鑫, 卜云洁, 王学江, 赵建夫. 石油烃降解菌的细胞表面疏水性的研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2014, 36(7): 80-83.
- YAN XB, LIU M, WANG X, BU YJ, WANG XJ, ZHAO JF. Research progress of cell surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degradation bacterium[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2014, 36(7): 80-83 (in Chinese).

- [29] ZHANG D, ZHU LZ. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1[J]. Environmental Pollution, 2012, 164: 169-174.
- [30] ZHAO ZY, SELVAM A, WONG JWC. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(5): 3999-4007.
- [31] JANBANDHU A, FULEKAR MH. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 187(1/2/3): 333-340.
- [32] ZHANG GB, YANG XH, ZHAO ZH, XU T, JIA XQ. Artificial consortium of three *E. coli* BL21 strains with synergistic functional modules for complete phenanthrene degradation[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(1): 162-175.
- [33] DESHPANDE S, SHIAU BJ, WADE D, SABATINI DA, HARWELL JH. Surfactant selection for enhancing *ex situ* soil washing[J]. Water Research, 1999, 33(2): 351-360.
- [34] VISHNYAKOV A, LEE MT, NEIMARK AV. Prediction of the critical micelle concentration of nonionic surfactants by dissipative particle dynamics simulations[J]. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2013, 4(5): 797-802.
- [35] YADAV M, SHUKLA AK, SRIVASTVA N, UPADHYAY SN, DUBEY SK. Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: a review[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(4): 727-742.
- [36] ZHANG D, ZHU LZ, LI F. Influences and mechanisms of surfactants on pyrene biodegradation based on interactions of surfactant with a *Klebsiella oxytoca* strain[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 454-461.