

刘长风,李欣燕,贾春云,等. 茈对毛霉胞外聚合物物质特性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(6):267-272.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.06.057

茈对毛霉胞外聚合物物质特性的影响

刘长风¹,李欣燕¹,贾春云²,陈祥²,姜春阳²

(1. 沈阳化工大学环境与安全工程学院,辽宁沈阳 110000; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所,辽宁沈阳 110000)

摘要:多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,简称 PAHs)是由 2 个以上苯环连在一起的化合物,具有强烈的致癌、致畸、致突变作用,属于持久性有毒有害有机污染物。由于胞外聚合物(extracellular polymeric substances,简称 EPS)的成分性质,EPS 对 PAHs 有较高的降解效果。因而 EPS 在去除 PAHs 过程中的应用越来越受到重视。为研究茈对毛霉 EPS 产生的影响,分析比较不同浓度茈诱导后毛霉 EPS 的特征、生化成分和生物降解效果。用浓度梯度为 0、10、20、40、80、120 mg/L 的茈诱导毛霉,提取 EPS 进行表征及降解试验。结果表明,随着茈浓度的增加,毛霉 EPS 粉末表面松散程度增强,孔隙数量变多而且直径变大;EPS 的蛋白质含量、多糖含量、类腐殖质含量均逐渐增长,并且当茈浓度达到 80 mg/L 时,这些值均达到峰值(EPS 提取量为 1 561 mg/L,糖类含量为 1 042 mg/L,蛋白质含量为 562 mg/L,类腐殖质含量为 312 mg/L)。当茈浓度为 120 mg/L 时,毛霉 EPS 粉末又重新变成板结状;EPS 提取量和各种生化成分均减少,对茈的降解率也降低。与其他毛霉相比,以 80 mg/L 茈诱导后的毛霉 EPS 对茈有更强的生物降解能力。

关键词:毛霉胞外聚合物;目标污染物茈;生物降解;特性分析;污染土壤修复

中图分类号: X592;X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)06-0267-06

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,简称 PAHs)污染是世界各国所面临的重大环境与公共健康问题之一,其对土壤的污染问题尤为突出^[1]。PAHs 污染土壤的修复是当前国内外环境科学界的共同话题和主攻热点。与物理、化学修复法相比,生物修复技术具有非破坏性、经济性和安全性等优点,可广泛应用于中低浓度大面积 PAHs 污染土壤的修复,

近年来在国内外引起广泛关注^[2-3]。其中,微生物修复技术应用最广泛,主要是通过驯化土著微生物或人为投加外源微生物对土壤中 PAHs 进行转化、降解与去除^[4]。微生物降解多环芳烃已成为最主要的多环芳烃污染土壤的修复技术。具有 PAHs 降解能力的细菌较多,如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等^[5]。真菌降解 PAHs 的效率通常高于细菌,在降解高环多环芳烃方面表现突出。研究表明,一些丝状真菌、担子菌、白腐菌和半知菌对四环或更高环数 PAHs 的降解具有一定的优势^[6-7]。

PAHs 污染土壤微生物修复过程中,胞外聚合物(extracellular polymeric substances,简称 EPS)承接细胞壁及土壤表面 PAHs,具有重要的桥联作用。EPS 通过范德华力或乳

收稿日期:2017-10-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:41673132)。

作者简介:刘长风(1974—),女,吉林白城人,硕士,副教授,研究方向为环境污染控制与资源化。E-mail:icruze@163.com。

通信作者:贾春云,博士,副研究员,研究方向为土壤污染生态。

E-mail:jiachunyun@162.com。

感区生态保护红线,其面积为 256 km²,主要分布在辽源地区和四平地区(图 3-e),该区域坡度大、降水量大,易发生水土流失,是水土流失敏感区。

5 讨论

生态保护红线目前仍处于研究阶段,在实际操作中存在较多问题,其中最主要的就是人们没有正确理解其内涵、意义及作用^[8]。生态保护红线划定工作涉及面太广、数据量多,其不仅仅是环保单方面的事情,涉及国土资源、水利资源、农林行业、建设行业等多个领域,必须要统筹国家和地方之间的关系,协调各部门之间的关系。国内各地生态保护红线划定工作尚处于起步阶段,可借鉴的相关经验较少,同时,不同地区经济发展水平与生态系统具有特殊性,因此生态保护红线落地的实施需要在今后广泛的实践中进一步修改与完善。

参考文献:

[1] Zhang L, Wang X, Zhang J, et al. Formulating a list of sites of

waterbird conservation significance to contribute to China's ecological protection red line [J]. Bird Conservation International, 2017, 27 (2):153-166.

[2] 李力,王景福. 生态红线制度建设的理论和实践[J]. 生态经济,2014,30(8):138-140.

[3] 高吉喜. 加快“三个落实”建立生态保护红线制度[J]. 环境保护,2016,44(8):17-21.

[4] 高吉喜,鞠昌华,邹长新. 构建严格的生态保护红线管控制度体系[J]. 中国环境管理,2017,14(1):14-17.

[5] 姚红,葛君梅. 吉林省文化产业发展的 SWOT 分析[J]. 现代商业,2015(25):64-65.

[6] 孙中平,王桥,申文明,等. 全国生态环境调查与评估“一张图”系统建设与应用[J]. 环境保护,2015,43(5):62-55.

[7] David Lewis, Eric Peterson, Jennifer Pocock. America's National Parks. New York: Publications International [J]. Phytochemistry, 2009,36(6):33-35.

[8] 冯宇. 呼伦贝尔草原生态红线区划定的方法研究[D]. 北京: 中国环境科学研究院,2013.

化作用解吸土壤中的 PAHs, 增强 PAHs 的生物可利用性^[8-10]。杨智临等研究发现, EPS 与菌株联用处理石油污染土壤时, 萘去除率达 96%, 菲去除率达 100%^[11]。EPS 中的蛋白质和糖类, 特别是蛋白质中色氨酸残基, 对有机污染物的去除起重要作用。Pan 等通过热力学计算得出活性污泥 EPS 与菲的作用是自发的、放热的, 疏水相互作用是主要作用方式, 且蛋白峰中的色氨酸参与其中^[12]。Zhang 等报道, 一羟基萘 (PAHs 的代谢生物标记物) 能与牛血清蛋白中的色氨酸残基发生键合作用^[13]。此外, EPS 中多糖结合态 PAHs 的生物利用率较高^[14]。

可见, EPS 中蛋白和糖类参与 PAHs 的降解过程, 有关 EPS 的提取和表征方法已比较成熟。EPS 的提取方法包括物理、化学提取法。物理提取法主要是利用物理手段增加胞外聚合物在溶液中的溶解度, 从而达到提取 EPS 的目的。如热提取法、离心法、超声波提取法等。化学提取法是利用生物膜的内传质作用使试剂中的离子或分子进入生物膜并与胞外聚合物发生接触, 胞外聚合物的大分子会转化成为水溶性成分进而被提取出来。NaOH 提取法是比较常用的方法, 此外还有乙二胺四乙酸提取法、硫酸提取法、阳离子交换树脂法、甲醛超声波法等^[15-18]。化学提取法虽然产率高, 但样品易被流出的胞内物质污染^[19]。EPS 的表征方法较多, EPS 成分用色谱、质谱及其组合进行定性和定量分析^[20]; 胞外聚合物的功能基团和元素组成用 X-射线光电子能谱、红外光谱、三维荧光光谱、核磁共振等仪器解释^[21-25]; EPS 形貌一般用扫描电子显微镜、透射电子显微镜来表征。

为了深入研究 EPS 在 PAHs 污染土壤修复中的作用, 本试验以毛霉 EPS 为研究对象, 以萘为目标污染物, 通过室内模拟试验, 联合多种检测技术, 探索萘对毛霉 EPS 的特征影响。

1 材料与方法

1.1 试验用菌种及培养

试验用毛霉 (*Mucor mucedo*) 菌种由中国科学院沈阳应用生态研究所土壤污染生态组提供。斜面培养基 (PDA): 马铃薯去皮后洗净, 称取 200 g 切成小块, 加 1 L 水煮沸 20 min, 滤去马铃薯块, 冷却后加入 20 g 葡萄糖, 定容至 1 L, pH 值自然, 在 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。种子培养基: 4.000% 蔗糖, 0.400% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.100% KH_2PO_4 , 0.050% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005% 维生素 B₁, pH 值为 6.5。在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL 液体种子培养基, 在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 冷却后接入菌种, 在摇床 (温度为 25 ℃, 转速为 120 r/min) 中振荡培养。

1.2 毛霉 EPS 的提取方法

取 40 mL 生长到稳定期的菌体培养液, 于 2 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液补充无菌水至原体积, 于 2 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液补充无菌水至原体积, 重复 2 次, 去除液体培养基中的杂质, 然后用加热法提取 EPS。将上述菌悬液放入 60 ℃ 的水浴锅中加热 30 min, 然后把样品在 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液经过 0.22 μm 滤膜过滤后, 得到的无色透明溶液即为 EPS 溶液, 浓度用总有机碳 (total organic carbon, 简称 TOC) 来表示, TOC 由 mulit N/C® 3000 TOC 测定仪测定。

1.3 毛霉对萘的降解试验

将真菌转接到液体培养基中, 在 30 ℃ 培养 3 d。将单株菌株按 10% 的接种量接种到萘浓度分别为 10、20、40、80、120 mg/L 的 20 mL 液体无机盐培养基 (0.05% 酵母膏, 0.50% NaCl, 1.00% NH_4NO_3 , 0.50% K_2HPO_4 , 0.50% KH_2PO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% 蔗糖) 中, 在 30 ℃、130 r/min 条件下振荡培养, 取样分析培养基中萘的残留浓度。

1.4 萘浓度测定

萘的提取方法采用二氯甲烷萃取, 首先将三角瓶中溶液过 0.45 μm 水相滤器, 然后向滤后溶液中加入等体积的二氯甲烷, 放入振荡器 (温度为 25 ℃, 转速为 180 r/min) 中振荡 5 min, 全部移入 50 mL 分液漏斗中, 静置 5 min, 分层后将下层有机相存入烧杯, 每个样品按此步骤重复萃取 3 次。将上述 3 次萃取液混匀, 转移至烧杯中使用普通氮气吹至近干, 最后用甲醇定容, 过 0.22 μm 有机滤膜后移入液相色谱专用进样瓶中^[26-27]。萘的浓度采用高效液相色谱法测定, 仪器为 Agilent-1200 高效液相色谱仪。色谱仪主要设定参数: 流动相为 100% 甲醇, 流速为 0.8 mL/min, 可变波长检测器 (variable wavelength detector, 简称 VWD) 检测波长为 254 nm, 柱箱温度为 35 ℃, 进样量为 10 μL。

1.5 EPS 化学成分分析

糖类含量的测定采用硫酸-苯酚法^[28], 蛋白质和腐殖酸的测定采用修正的 Folin-Lowry 法^[29], DNA 的测定采用二苯胺法^[30]。

1.6 EPS 形态特征分析

EPS 的形态特征采用环境扫描电子显微镜进行检测, 将准备好的 EPS 样品冷冻干燥成粉末状, 将制备好的 EPS 粉末粘在样品台上, 镀金后照相检测。

1.7 EPS 三维荧光光谱分析

提取的 EPS 样品可直接进行三维荧光测定。荧光光度计参数设定: 发射扫描波长为 0.25 ~ 0.65 μm, 激发扫描波长为 0.20 ~ 0.55 μm, 激发和发射狭缝宽度为 5×10^{-3} μm, 扫描速度为 12 μm/min, 响应时间为自动方式, 扫描光谱进行仪器自动校正。

1.8 EPS 红外光谱分析

将提取到的 EPS 样品经真空干燥 (-60 ℃, 24 h), 取适量的粉末用傅里叶红外光谱仪 (型号: NICOLET380) 进行测定, 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描次数为 32 次/min, 测定范围为 $4\,000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 毛霉 EPS 释放和萘降解的关系

由图 1 可知, 随着污染物萘的浓度由 0 增加到 120 mg/L, 毛霉 EPS 的含量呈先增大后减少的趋势。不加污染物萘时, 提取的毛霉 EPS 含量为 741 mg/L, 10 mg/L 萘诱导毛霉 EPS 的提取量增加到 813 mg/L, 随着萘浓度的增加, 提取到的 EPS 含量也在持续增加, 直到萘的浓度增加到 80 mg/L 时, EPS 的提取量达到峰值, 为 1 561 mg/L, 比原毛霉 EPS 的提取量增加了 820 mg/L, 而 120 mg/L 萘则明显抑制了 EPS 的提取量, 使其降低到 403 mg/L, 这说明萘的浓度

小于 80 mg/L 可以促进毛霉 EPS 的分泌,而过高浓度的芘则起到抑制作用。随着芘浓度由 10 mg/L 增加到 80 mg/L 时,TOC 值逐渐上升;芘浓度为 120 mg/L 时,毛霉对多环芳烃的降解率明显下降,其对芘的降解率由 80% 下降到 43.8%。这与 Machín - Ramírez 等的研究结论^[31-33]一致。Machín - Ramírez 等以黑曲霉、木霉霉菌、酿酒酵母菌、粘质沙雷氏菌、芽孢杆菌、假单胞菌属等降解苯并芘,最大降解率为 65% (初始浓度为 50 mg/L)^[31];Zafra 等使用绿色木霉 H15、曲霉 H7、黄曲霉等多种真菌和细菌联用降解芘,14 d 后,芘的降解率为 48.18%^[32];Jia 等的研究表明,毛霉对芘 (初始浓度为 37.9 mg/L) 的最大降解率为 86.5%^[33]。这些数据证实了真菌和细菌对芘的生物降解能力。

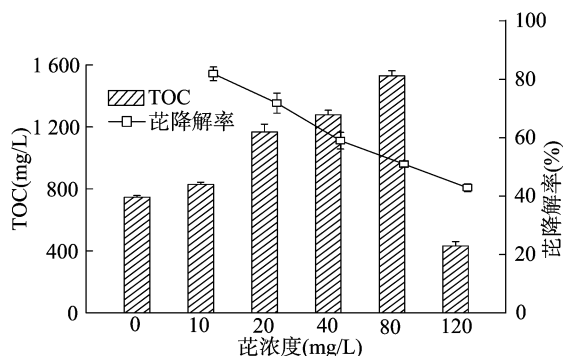


图1 不同浓度芘诱导后毛霉 EPS 的提取量和芘降解率

2.2 芘对毛霉 EPS 生化成分的影响

2.2.1 不同芘浓度下毛霉 EPS 主要成分含量的变化 由图 2 可知,毛霉 EPS 的 4 种主要成分中糖类的含量最高,其次为蛋白质,再次为类腐殖质,最后为 DNA (由于提取 EPS 过程中没有破坏细胞核,EPS 中 DNA 含量极低),随着污染物芘的浓度由 0 增加到 120 mg/L,提取毛霉 EPS 中的糖类、蛋白质、类腐殖质含量呈先增大后减小的规律,而 DNA 的含量基本不变,这可能是因为毛霉为真核微生物,真核微生物的 DNA 一般多数在细胞核内,加热法提取 EPS 为物理方法,对细胞破坏较小,不会破坏细胞核结构,因此 DNA 含量基本保持不变。综合不同浓度芘诱导毛霉 EPS 提取量的试验结果进行分析,4 种主要成分中除 DNA 外,随着芘浓度增加的变化规律与毛霉 EPS 提取量的变化规律相同。80 mg/L 芘诱导下,EPS 的提取量与糖类、蛋白质、类腐殖质的含量均出现峰值。说明微生物在芘的诱导下,细胞会分泌降解所需的酶和糖类,而高浓度的芘则会对细胞产生毒性,从而抑制了微生物的生长,进而抑制其 EPS 的分泌。

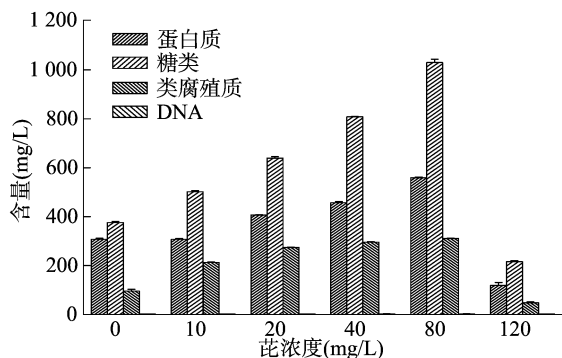
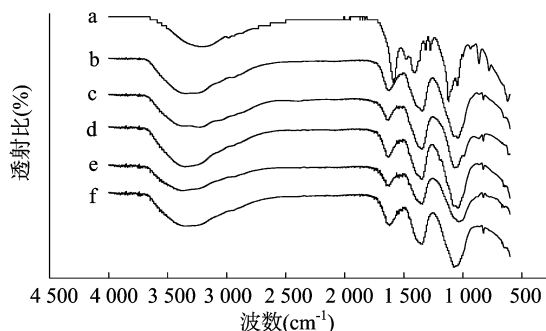


图2 不同芘浓度下毛霉 EPS 各生化成分含量

毛霉 EPS 主要成分为糖类和蛋白质,其次为类腐殖质等,这与李绍峰等的研究结论^[34-35]一致。与污泥 EPS 的主要成分为多糖和蛋白质的研究结果^[36]也相似。加入芘诱导后蛋白质和多糖含量发生变化,因此,污染物芘对 EPS 的成分产生影响。Yue 等从污水处理厂中分离出脱硫弧菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) 菌株,培养过程中加入 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} ,分析结果表明重金属的存在增加了 EPS 表面官能团的浓度^[37]。

2.2.2 芘对毛霉 EPS 红外光谱的影响 由图 3 可知,光谱图上均出现多个吸收峰,说明 EPS 中存在较多官能团。3 400 ~ 3 200 cm^{-1} 处的谱峰可归属为细胞表面蛋白质 N—H 键的伸缩振动和碳水化合物中结合水的 O—H 键的伸缩振动。1 650 ~ 1 620 cm^{-1} 处的谱峰来自典型的细胞蛋白质酰胺 I 带 (C=O 的伸展振动) 和酰胺 II 带 (N—H 的弯曲振动与 C—N 伸展振动的叠加)。1 380 ~ 1 330 cm^{-1} 处的谱峰是烷基 C—H 伸缩振动的吸收带。1 200 ~ 1 000 cm^{-1} 处的谱峰是 C—O 键伸展振动的吸收带,谱带强,主要是多糖 C—O 键的伸展振动吸收,称为多糖区。另外,指纹区 (1 330 ~ 400 cm^{-1}) 出现多个吸收峰,是由于整个分子振动转动引起的,表明毛霉 EPS 中存在着含硫、磷基团。由光谱 a 与光谱 b、c、d、e、f 比较可知,由光谱 a 中 3 346 cm^{-1} 处宽而大的蛋白峰在光谱 b、c、d、e、f 中分别为 3 345、3 278、3 255、3 282、3 355 cm^{-1} , C—O 键向低波数移动, C—O 键键长缩短,发生了红移,且随着芘浓度由 10 mg/L 增加到 80 mg/L,移动长度由 1 cm^{-1} 增加到 364 cm^{-1} ,当芘浓度增加到 120 mg/L 时, C—O 键向高波数移动, C—O 键键长增长,发生了蓝移,说明在芘诱导毛霉时 EPS 中的蛋白质参加了反应,且随着芘浓度的增大毛霉 EPS 中蛋白质对毛霉降解芘的促进作用呈先增大后减小的趋势。光谱 a 中 1 555 cm^{-1} 处谱峰为酰胺 (O=C—N—H) I 带,是 C=O 键的伸缩振动,诱导前后从 11 648 cm^{-1} 分别移动到 1 626、1 635、1 632、1 632、1 621 cm^{-1} ,这说明毛霉降解芘时,毛霉 EPS 中主要是羟基和酰胺基起主要作用。光谱 a 中 1 038 cm^{-1} 处峰在不同浓度芘诱导后的光谱 b、c、d、e、f 中分别移至 1 042、1 069、1 042、1 031、1 072 cm^{-1} ,发生红移,说明在毛霉降解芘时,EPS 中多糖上的—COO 被消耗,减少了一—COO 的含量。说明,在毛霉降解芘的过程中,EPS 的主要成分糖类促进了降解反应的进行,随着芘浓度的增大蛋白质的促进作用呈现先增大后减小的规律。

红外光谱分析结果中羟基、酯基是疏水基团,羟基、羧基、



a—0 mg/L 芘; b—10 mg/L 芘; c—20 mg/L 芘; d—40 mg/L 芘; e—80 mg/L 芘; f—120 mg/L 芘

图3 不同浓度的芘对毛霉 EPS 红外光谱的影响

醛基、氨基和磺酸基是亲水基团。众所周知,蛋白质和多糖影响微生物菌株 EPS 的物理化学性质、疏水性和絮凝性^[38]。EPS 和污染物之间的驱动力主要来自疏水相互作用、氢键或静电相互作用^[39]。由于 EPS 中存在一些疏水区域,许多有机污染物如菲、苯、染料(如甲苯胺蓝)等都可以被 EPS 吸收^[40-41]。因此,在茈生物降解过程中,茈诱导后微生物 EPS 对茈降解效果的影响比原微生物的 EPS 更有效。

2.2.3 茈对毛霉 EPS 三维荧光光谱的影响 在 0.230/0.350 μm 的激发/发射波长(Ex/Em)处识别出第一主要荧光峰(峰 1),而另一个主峰(峰 2)位于 Ex/Em = 0.275/0.350 μm 处。根据 Hudson 的分类^[42],这 2 个峰位于 I(芳香族蛋白质)和 II(芳香族蛋白质)的区域。它们与衍生自其中的芳香族氨基酸如酪氨酸和色氨酸蛋白质的化合物相关。

由表 1 可知,污染物茈的浓度由 10 mg/L 增加到

80 mg/L,荧光强度逐渐增强,色氨酸和酪氨酸含量随之上升,说明茈对毛霉向胞外分泌蛋白都有一定的促进作用,其中茈的浓度为 80 mg/L 时,蛋白峰的荧光强度达到最大值,色氨酸和酪氨酸含量最高。当茈的浓度为 120 mg/L 时,蛋白峰的荧光强度达到最小值,色氨酸和酪氨酸含量最低。也就是说,120 mg/L 茈抑制了毛霉向胞外分泌蛋白。因此,适量茈诱导后,毛霉 EPS 中色氨酸含量增加。茈的加入使得 EPS 的峰 1 和峰 2 的荧光强度发生变化,这直接影响了 EPS 在茈去除过程中的作用。值得注意的是,经 0~80 mg/L 茈诱导,毛霉 EPS 在 0.230/0.350 μm 的激发/发射波长处的类蛋白 1,荧光强度由 86.45 a.u. 上升至 221.30 a.u.;在 0.275/0.350 μm 的激发/发射波长处的类蛋白 2,荧光强度由 202.10 a.u. 上升至 243.10 a.u.;茈的浓度超过 80 mg/L 后峰 1 荧光强度减至 31.65 a.u.,峰 2 荧光强度减至 180.10 a.u.。

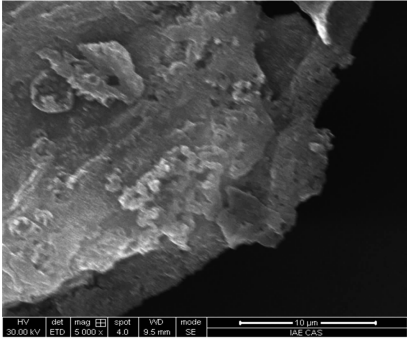
表 1 不同浓度茈诱导下毛霉 EPS 三维荧光光谱分析结果

茈浓度 (mg/L)	峰 1		峰 2	
	Ex/Em(μm)	荧光强度(a.u.)	Ex/Em(μm)	荧光强度(a.u.)
0	0.230/0.350	86.45	0.275/0.350	202.10
10	0.230/0.350	123.60	0.275/0.350	207.90
20	0.230/0.350	177.20	0.275/0.350	210.90
40	0.230/0.350	197.00	0.275/0.350	223.80
80	0.230/0.350	221.30	0.275/0.350	243.10
120	0.230/0.350	31.65	0.275/0.350	180.10

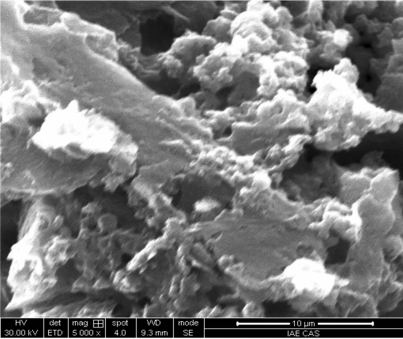
芳香族蛋白质物质和类腐殖质是提取的 EPS 样品中的 2 种主要物质,特别是蛋白质中色氨酸残基,对有机污染物的去除起重要作用。通过热力学计算得出,EPS 对菲的降解是自发的、放热的,疏水相互作用是主要作用方式,且蛋白峰中的色氨酸参与其中^[12]。Zhang 等报道,一羟基茈(PAHs 的代谢生物标记物)能与牛血清蛋白中的色氨酸残基发生键合作用^[13]。

2.3 茈对 EPS 表征的影响

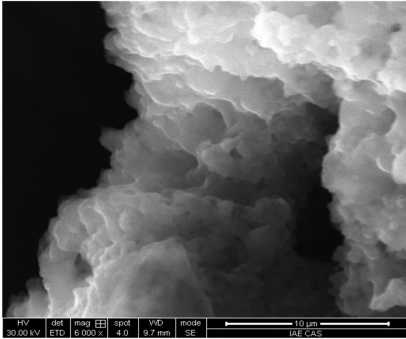
图 4 为不同浓度茈诱导下液体培养毛霉 EPS 粉末放大 5 000 倍的扫描电镜照片,由图 4-a 可知,未经驯化的毛霉 EPS 呈板结块状,四周凸起部分呈锋利薄片状。随着茈的浓度由 10 mg/L 增加到 80 mg/L,EPS 粉末逐渐变得松散多孔,尤其是 80 mg/L 茈诱导下的毛霉 EPS 的照片呈毛绒状,空隙量多



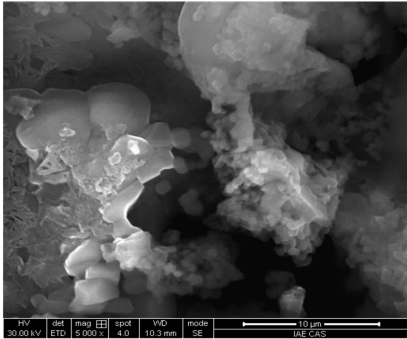
a.0 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图



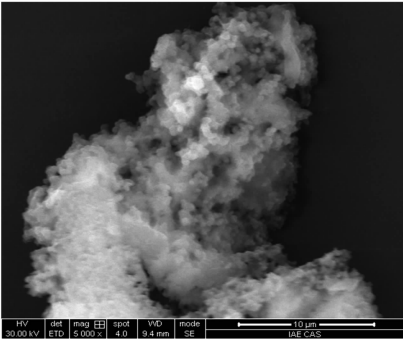
b.10 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图



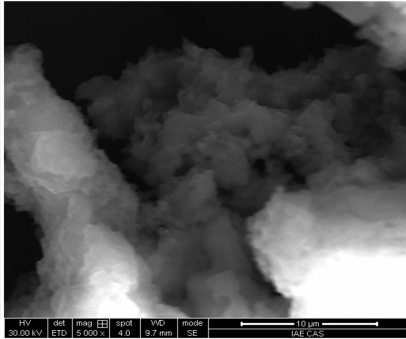
c.20 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图



d.40 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图



e.80 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图



f.120 mg/L 茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图

图4 经茈驯化后毛霉 EPS 的电镜图

而且大,而 120 mg/L 芑诱导下的毛霉 EPS 没粉末又重新变成板结状。说明芑诱导明显影响毛霉 EPS 的结构,芑诱导后 EPS 具有更大的接触面和吸附力,能更好地促进芑的生物降解。

3 讨论与结论

EPS 是同时含有亲水和疏水部分的两亲性化合物。因此, EPS 可显示可溶疏水底物的表面活性^[43]。在相互作用的初始阶段会产生使 EPS 和芑共聚的吸引力,如疏水相互作用^[44-46]。在我国的报告中, EPS 和 PAHs 之间的相互作用是自发的和放热的, PAHs 与 EPS 的结合主要由疏水相互作用^[47]。一些研究报道引入化学物质,如合成表面活性剂、生物吸收剂、细菌聚合物等,可以增强 PAHs 从土壤表面的解吸^[48-50]。Liu 等认为,细菌产生的细胞外聚合物可以增强吸收菲的释放程度^[8]。因此,可以推断 EPS 可以增强芑在土壤表面的释放,进而增强 PAHs 的生物降解效果。

此外,驯化后 EPS 形态和成分的变化对 PAHs 的生物降解也有影响。电镜下未经驯化的黑曲霉 EPS 呈不规则块状,颗粒大且结块,使用未经驯化的黑曲霉降解芑,降解率达 56.61%^[51],与驯化过的毛霉相比降解率略低(80 mg/L 芑驯化降解率为 80%),除去菌种自身降解能力外,未经驯化的菌种 EPS 较为平滑,与驯化过的毛霉 EPS 相比, EPS 与 PAHs 的接触面积较小,因而降解能力略低。就成分而言,微生物分泌的胞外蛋白作为介质为微生物摄入外来物质,胞外多糖起到对物质的吸附和絮凝作用,腐殖酸与有机物产生吸附和配合作用,形成大分子络合物^[52-53]。几种化合物相互配合使得 EPS 与生物体间发生离子架桥、静电中和等反应所表现出的黏结性,有利于对多环芳烃的溶解吸附,提高微生物对多环芳烃的去除能力^[54],本试验结果与其基本一致。鉴于 EPS 的生物降解作用以及驯化后 EPS 形态和成分的变化,可以推测驯化后毛霉 EPS 对芑有更强的生物降解效果。

毛霉是高效的芑降解菌株,芑浓度为 80 mg/L 时,芑诱导后毛霉产生的 EPS 量最大,为 1 561 mg/L,其中糖类含量为 1 042 mg/L,蛋白质含量为 562 mg/L,类腐殖质的含量为 312 mg/L。0~80 mg/L 芑诱导后毛霉 EPS 荧光强度渐强,这说明色氨酸和类腐殖质的蛋白质样物质的量有所增加。因此,80 mg/L 芑诱导后毛霉产生的 EPS 更能促进芑的生物降解效果。80 mg/L 芑诱导后的毛霉 EPS 呈毛绒状,质地疏松,接触面更大,吸附力更强,可以更好地促进芑的生物降解。

参考文献:

- [1] Barth J, Steidle D, Kuntz D, et al. Deposition, persistence and turnover of pollutants: first results from the EU project AquaTerra for selected river basins and aquifers [J]. Science of the Total Environment, 2007, 376(1/2/3): 40-50.
- [2] Teng Y, Luo Y M, Ping L F, et al. Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil [J]. Biodegradation, 2010, 21(2): 167-178.
- [3] Lors C, Damidot D, Ponge J F, et al. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales [J]. Environmental Pollution, 2012, 165: 11-17.
- [4] Janbandhu A, Fulekar M H. Biodegradation of phenanthrene using

- adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 187(1/2/3): 333-340.
- [5] 邹德勋, 骆永明, 滕应, 等. 多环芳烃长期污染土壤的微生物强化修复初步研究 [J]. 土壤, 2006, 38(5): 652-656.
- [6] Bumpus J A, Tien M, Wright P, et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus [J]. Science, 1985, 228(4706): 1434-1436.
- [7] Asgher M, Bhatti H N, Ashraf M, et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system [J]. Biodegradation, 2008, 19: 771-783.
- [8] Liu A, Ahn I S, Mansfield C, et al. Phenanthrene desorption from soil in the presence of bacterial extracellular polymer; observations and model predictions of dynamic behavior [J]. Water Research, 2001, 35(3): 835-843.
- [9] Jia C Y, Li P J, Li X J, et al. Degradation of pyrene in soils by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(8): 1627-1631.
- [10] 姜春阳. 微生物胞外聚合物在多环芳烃降解酶释放过程中的作用 [D]. 沈阳: 沈阳理工大学, 2015: 3-4.
- [11] 杨智临, 陈海, 白智勇, 等. 生物共代谢法降解石油污染土壤中的萘、菲 [J]. 油气田地面工程, 2014(11): 48-49.
- [12] Pan X L, Liu J, Zhang D Y. Binding of phenanthrene to extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic activated sludge: a fluorescence study [J]. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2010, 80(1): 103-106.
- [13] Zhang J, Chen W X, Zhang W, et al. Interaction of 1-hydroxypyrene with BSA using fluorescence anisotropy and synchronous fluorescence analysis methods [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2015, 36(8): 1511-1516.
- [14] Johnsen A R, Karlson U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(4): 452-459.
- [15] Jorand F, Zartarian F, Tomas F, et al. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs [J]. Water Research, 1995, 29(7): 1639-1647.
- [16] Bura R, Cheung M, Liao B, et al. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix [J]. Water Science and Technology, 1998, 37(4/5): 325-333.
- [17] Morgan J W, Forster C F, Evison L. A comparative study of the Nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludge [J]. Water Research, 1990, 24(6): 743-750.
- [18] Houghton J I, Stephenson T. Effect of influent organic content on digested sludge extracellular polymer content and dewaterability [J]. Water Research, 2002, 36(14): 3620-3628.
- [19] Domínguez L, Rodríguez M, Prats D. Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges: Part II: influence of extraction methods over molecular weight distribution [J]. Desalination, 2010, 262(1/2/3): 106-109.
- [20] Dignac M F, Urbain V, Rybacki D, et al. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure [J]. Water Science and Technology, 1998, 38(8/9): 45-53.
- [21] Omoike A, Chorover J. Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: aqueous chemistry and adsorption effects [J]. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1219-1230.

- [22] Morales O, Santiago G B, Chan M J, et al. Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2007, 102(1): 254–264.
- [23] Sheng G P, Yu H Q, Wang C M. FTIR – spectral analysis of two photosynthetic hydrogen producing strains and their extracellular polymeric substances [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 73(1): 204–210.
- [24] Akay O, Özer A T, Fox G A, et al. Behavior of sandy slopes remediated by EPS – block geofoam under seepage flow [J]. Geotextiles and Geomembranes, 2013, 37: 81–98.
- [25] Lattner D, Flemming H C, Mayer C. ¹³C – NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1/2/3): 81–88.
- [26] 谢重阁. 环境中石油污染物的分析技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 31–33.
- [27] 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物样品中多环芳烃(PAHs)分析方法研究[J]. 应用生态学报, 1995, 6(1): 92–96.
- [28] Zhang Z, Xia S, Wang X, et al. A novel biosorbent for dye removal: extracellular polymeric substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ – 1 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(1): 279–284.
- [29] Frolund B, Palmgren R, Keiding K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749–1758.
- [30] Domingues A. Composition, fate, and transformation of extracellular polymers in wastewater and sludge treatment processes [D]. New York: Cornell University, 2000.
- [31] Machín – Ramírez C, Morales D, Martínez – Morales M, et al. Benzo [a]pyrene removal by axenic – and co – cultures of some bacterial and fungal strains [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2010, 64(7): 538–544.
- [32] Zafra G, Absalón A E, del Carmen – Cuevas M, et al. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil – contaminated soils [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2014, 225: 1826.
- [33] Jia C Y, Li X J, Zhang L F, et al. Extracellular polymeric substances from a fungus than a bacterium are more effective in polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2017, 228: 195.
- [34] 李绍峰, 崔崇威, 黄君礼. 胞外聚合物 EPS 对 MBR 膜污染的影响[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(2): 266–269.
- [35] 龙腾锐, 龙向宇, 唐 然, 等. 胞外聚合物对生物絮凝影响的研究[J]. 中国给水排水, 2009, 25(7): 30–34, 40.
- [36] 田卫东. 三种方法提取活性污泥胞外聚合物的比较[J]. 节能技术, 2009, 154(2): 184–186.
- [37] Yue Z B, Li Q, Li C C, et al. Component analysis and heavy metal adsorption ability of extracellular polymeric substances (EPS) from sulfate reducing bacteria [J]. Bioresource Technology, 2015, 194: 399–402.
- [38] Guo W S, Ngo H H, Li J X. A mini – review on membrane fouling [J]. Bioresource Technology, 2012, 122(5): 27–34.
- [39] Xu J, Sheng G P, Ma Y, et al. Roles of extracellular polymeric substances (EPS) in the migration and removal of sulfamethazine in activated sludge system [J]. Water Research, 2013, 47(14): 5298–5306.
- [40] Spath R, Flemming H C, Wuertz S. Sorption properties of biofilms [J]. Water Science and Technology, 1998, 37(4/5): 207–210.
- [41] Sheng G P, Zhang M L, Yu H Q. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge [J]. Colloids and Surfaces B – Biointerfaces, 2008, 62(1): 83–90.
- [42] Hudson N, Baker A, Ward D, et al. Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the biochemical oxygen demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England [J]. Science of the Total Environment, 2008, 391(1): 149–158.
- [43] Desai J D, Banat I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews Mmbr, 1997, 61(1): 47–64.
- [44] Jorand F, Boue – Bigne F, Block J C, et al. Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances [J]. Water Science and Technology, 1998, 37(4/5): 307–315.
- [45] Esparza – Soto M, Westerhoff P. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass [J]. Water Research, 2003, 37(10): 2301–2310.
- [46] Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(3): 526–532.
- [47] Zhou W J, Zhu L Z. Efficiency of surfactant – enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil – surfactant – PAHs system [J]. Environmental Pollution, 2007, 147(1): 66–73.
- [48] Nie M Q, Yin X H, Ren C Y, et al. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon – degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3 [J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(5): 635–643.
- [49] Lai C C, Huang Y C, Wei Y H, et al. Biosurfactant – enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 167(1/2/3): 609–614.
- [50] 姜春阳, 贾春云, 张丽芳, 等. 微生物胞外聚合物对土壤中芪降解效果的促进作用[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 303–306.
- [51] Czaczyk K, Myszka K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16(6): 799–806.
- [52] Seo Y, Lee W H, Sorial G, et al. The application of a mulch biofilm barrier for surfactant enhanced polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation [J]. Environmental Pollution, 2009, 157(1): 95–101.
- [53] Zhou Z, Sun H, Zhang W. Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged and unaged charcoals with and without modification of humic acids [J]. Environmental Pollution, 2010, 158(5): 1916–1921.
- [54] Mayer C, Moritz R, Kirschner C, et al. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 26(1): 3–16.