



克雷伯氏菌 CW-D3T 菌株硫酸盐厌氧呼吸对水中 PHE-Cd²⁺ 的修复特性

许晓毅^{1*}, 季凡¹, 吴兵党¹, 庄金龙¹, 黄天寅¹, 白净², 张明乐¹

1 苏州科技大学 环境科学与工程学院, 江苏 苏州 215009

2 苏州科技大学 化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215009

许晓毅, 季凡, 吴兵党, 庄金龙, 黄天寅, 白净, 张明乐. 克雷伯氏菌 CW-D3T 菌株硫酸盐厌氧呼吸对水中 PHE-Cd²⁺ 的修复特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3419-3435.

XU Xiaoyi, JI Fan, WU Bingdang, ZHUANG Jinlong, HUANG Tianyin, BAI Jing, ZHANG Mingle. Bioremediation characteristics of PHE-Cd²⁺ in water by anaerobic respiration of the sulfate-reducing bacterium *Klebsiella* sp. CW-D3T[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3419-3435.

摘要: 【目的】针对菲(phenanthrene, PHE)-Cd²⁺污染体系, 探究一株兼性厌氧克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.) CW-D3T 菌株利用硫酸盐作为末端电子受体厌氧呼吸耦合降解目标污染物, 解析硫酸盐还原体系中该菌株对不同 Cd²⁺ 赋存浓度的响应机制以及 PHE 的厌氧代谢途径。【方法】构建硫酸盐初始浓度为 20 mmol/L 的还原反应体系, 以促进功能菌的生长代谢活性并强化修复 PHE-Cd²⁺ 污染; 分析胞外聚合物分泌量变化以及特征峰的振动特征, 探讨体系中 Cd²⁺ 梯度浓度胁迫时细胞自身的响应行为; 借助 GC-MS 和 HPLC 对硫酸盐还原体系中 PHE 的代谢产物进行定性和定量分析。【结果】Cd²⁺ 胁迫浓度为 0.5–50 mg/L 条件下, *Klebsiella* sp. CW-D3T 菌株的硫酸盐厌氧还原体系可以良好强化去除目标化合物; Cd²⁺ 胁迫浓度不高于 10 mg/L 时, PHE 和 Cd²⁺ 去除率均高于 70.00%。随着 Cd²⁺ 胁迫浓度的增加, 胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS) 中胞外多糖分泌含量较胞外蛋白更高, 菌体细胞表面的多糖和蛋白骨架官能团特征峰的谱峰强度增强。Cd²⁺ 胁迫下 PHE 在硫酸盐还原体系中初始活化步骤更倾向于羧基化产生 2-菲甲酸, 初始 Cd²⁺ 浓度分别为 10 mg/L 和 50 mg/L 时, 2-菲甲酸含量在第 5 天均达到峰值(15.56 μg/L 和 10.23 μg/L), 与未添加 Cd²⁺ 对照组相比分别降低了 27.56% 和 52.37%, Cd²⁺ 胁迫浓度对周期内与周期末 2-菲甲酸含量具有显著影响。【结论】利用硫酸盐作为电子受体显著促进 Cd²⁺ 赋存下 *Klebsiella* sp. CW-D3T 菌株对 PHE 的生物降解, 胞外多糖和蛋白的解毒调控机制对提高微生物抗 Cd²⁺ 胁迫具有积极作用。

资助项目: 国家自然科学基金(52070138)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (52070138).

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

Received: 2024-03-04; Accepted: 2024-05-06; Published online: 2024-05-10

关键词：PHE-Cd²⁺复合污染；兼性厌氧菌；硫酸盐耦合；胞外聚合物；代谢特性

Bioremediation characteristics of PHE-Cd²⁺ in water by anaerobic respiration of the sulfate-reducing bacterium *Klebsiella* sp. CW-D3T

XU Xiaoyi^{1*}, JI Fan¹, WU Bingdang¹, ZHUANG Jinlong¹, HUANG Tianyin¹, BAI Jing², ZHANG Mingle¹

¹ School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

² School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] A facultative anaerobic bacterium *Klebsiella* sp. CW-D3T utilizing sulfate as the terminal electron acceptor for anaerobic respiration was used for degradation of target pollutants in the system with phenanthrene (PHE)-Cd²⁺ co-contamination. The response mechanism of the strain to different Cd²⁺ concentrations in the sulfate reduction system and the anaerobic metabolic pathways of the strain for degrading PHE were studied. [Methods] A sulfate reduction system with an initial sulfate concentration of 20 mmol/L was developed to enhance the growth and metabolic activity of functional bacteria and improve the bacterial performance for remediating PHE-Cd²⁺ co-contamination. The changes in extracellular polymer secretion and the vibrational characteristics of characteristic peaks were analyzed to explore the cellular responses to different Cd²⁺ concentrations. Furthermore, qualitative and quantitative analyses of the metabolic products of PHE in the sulfate reduction system were conducted by GC-MS and HPLC. [Results] In the presence of 0.5–50.0 mg/L Cd²⁺, the sulfate reduction system of *Klebsiella* sp. CW-D3T enhanced the remediation efficiency of target compounds, with the PHE and Cd²⁺ removal rates above 70.00% when the initial Cd²⁺ concentration was below 10 mg/L. As the concentration of Cd²⁺ increased, the secretion of extracellular polysaccharides in extracellular polymeric substances (EPS) was more than that of extracellular proteins, and the intensity of characteristic peaks of polysaccharides and protein functional groups on the surface of bacterial cells was enhanced. The initial activation of PHE in the sulfate reduction system tended to favor carboxylation to produce 2-phenanthroic acid under Cd²⁺ stress. When the initial Cd²⁺ concentrations were 10 mg/L and 50 mg/L, the content of 2-phenanthroic acid peaked at 15.56 μg/L and 10.23 μg/L on day 5, respectively, which decreased by 27.56% and 52.37% compared with that of the control group without the addition of Cd²⁺. Cd²⁺ stress significantly affected the 2-phenanthroic acid content within the cycle and at the end of the cycle. [Conclusion] The biodegradation efficiency of PHE by *Klebsiella* sp. CW-D3T was significantly improved when sulfate was used as an electron acceptor in the

presence of Cd^{2+} . The extracellular polysaccharides and proteins played a positive role in enhancing the microbial tolerance to Cd^{2+} stress by regulating the detoxification process.

Keywords: PHE- Cd^{2+} co-contamination; facultative anaerobic bacteria; sulfate coupling; extracellular polymeric substances (EPS); metabolic characteristics

自然环境中的持久性有机物-无机物复合污染往往通过协同、叠加等联合作用产生更强的“三致”效应和生态毒性^[1-2]。多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)和重金属(heavy metals, HMs)污染来源广泛且能在土壤中长期累积,约有5亿 hm^2 的土壤检测出PAHs-重金属复合污染,部分调查场地的污染物浓度高于生态安全阈值水平^[3-4]。目前,PAHs的微生物修复因具有成本低、降解彻底、无二次污染等优势而备受推崇^[5-6]。由于大气沉降、冲刷积累效应,PAHs- Cd^{2+} 复合污染在土壤、河流(湿地)沉积物或滨岸带等厌氧或低氧环境中存在^[7-9],在缺少氧气作为末端电子受体或开环酶底物的环境介质中,微生物厌氧呼吸速率显著降低的同时^[10-11],降解菌对重金属约束下的代谢行为响应存在差异。因此,探索相应的强化机制和策略是微生物修复技术保障的重要前提。

研究已经证实了克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)等兼性厌氧菌能够在厌氧环境中形成稳定的种群规模和新陈代谢活动^[12-13],在硫酸盐、硝酸盐、金属离子和产甲烷还原体系中微生物不仅可以矿化PAHs,同时还能够有效降低电子受体化合物本身导致的污染负荷^[14-16]。已有文献报道硫酸盐对强化PAHs的厌氧降解具有显著作用,硫酸盐消耗率与PAHs的生物转化呈正相关^[17]。研究表明,微生物以PAHs作为碳源和电子供体,通过硫酸盐还原驱动很好地实现了PAHs降解^[18-19]。Chang等^[20]发现加入20 mmol/L的硫酸盐可促进石油化工污泥中菲(phenanthrene,

PHE)、芘等5种PAHs混合物的生物降解能力。在10 mg/L的菲作为单一污染物体系中,硫酸盐促进了克雷伯氏菌的生长能力和菲的降解效果^[21]。硫酸盐还原体系已被证实具有较完整的PAHs厌氧代谢转化路径,产生更少的中间代谢体积^[22]。Koelschbach等^[23]研究表明,萘可在硫酸盐还原体系中通过开环作用逐步分解成较易被兼氧微生物所利用的化合物结构。在微生物修复PAHs-重金属机制层面,一方面,重金属胁迫会不同程度破坏生物降解酶的生理生化功能,进而导致复合污染修复效果的降低^[24-26];另一方面,微生物细胞具有较多的官能团,可通过分泌胞外聚合物的解毒调控机制增强重金属胁迫下PAHs的生物降解^[27-28]。Liu等^[29]研究发现,高浓度 Pb^{2+} (100-300 mg/L)通过破坏菌株的酶活性和蛋白质含量进而抑制PHE的生物降解进程。目前,有关微生物厌氧修复PAHs-重金属复合污染的现状研究成果较为缺乏,厌氧环境中微生物对重金属胁迫的响应特征,以及细胞生态行为的关联机制仍有待深入探讨。功能菌厌氧呼吸耦合PAHs-重金属复合污染修复特性对进一步挖掘菌株资源具有实际意义。

选取生态毒性强且普遍存在于PAHs污染的环境介质中的 Cd^{2+} 为典型重金属,以兼具K区和湾区特征的PHE作为PAHs模型化合物体系,构建*Klebsiella* sp. CW-D3T硫酸盐强化厌氧降解体系,探讨 Cd^{2+} 胁迫下功能菌利用末端电子受体厌氧呼吸强化PHE的生物降解特性,同时结合功能菌的表型特征和代谢活性,分析厌氧条

件下功能菌的解毒机制, 阐释 Cd^{2+} 共存体系中功能菌代谢 PHE 的转化途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 培养基

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min。

无机盐溶液(g/L): NaNO_3 2.00, NaCl 5.00, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.30, KH_2PO_4 4.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00, Tween-80 0.20, 加蒸馏水定容至 1 L, 调 pH 至 7.0 ± 0.2 , $121\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 30 min, 添加一定量的 PHE 和 Cd^{2+} , 配制不同初始浓度的无机盐溶液, 摇匀后置于通风橱中待用。

1.1.2 供试菌株及其菌悬液的制备

Klebsiella sp. CW-D3T 菌株为革兰氏阴性, 兼性厌氧菌, 呈直杆状, 细胞大小为 $(0.3\text{--}1.0)\times(0.6\text{--}6.0)\text{ }\mu\text{m}$, 从中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC, <http://cctcc.whu.edu.cn/>)获取, 保藏号为 CCTCC AB 206144T, 高效降解萘、菲、芘等多种 PAHs 化合物, 萘的平均降解率为 73.0% ^[30]。

将菌株 CW-D3T 接种于新鲜的 LB 液体培养基中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 培养 18 h 至对数生长期, 用无菌磷酸盐缓冲溶液清洗后重悬, 调整菌液 OD_{600} 值至 1.0, 制成菌悬液备用。所有操作过程均在无菌条件下进行。

1.2 批次实验

批次实验在厌氧瓶中进行。 Cd^{2+} 初始梯度浓度分别为 0、0.5、10、25、50 mg/L, PHE 初始浓度均为 30 mg/L; 还原反应体系中硫酸盐电子受体浓度为 20 mmol/L, 设置不添加硫酸盐的空白对照组^[31]。

菌液按体积分数 10% 接种于设定 Cd^{2+} 、PHE

初始浓度的系列厌氧瓶中, 高纯氮气吹扫处理后, 使厌氧瓶内溶解氧含量趋于零。在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 摇床中避光振荡 10 d, 同时根据水位线补充灭菌去离子水, 于周期反应时间第 1、3、5、7、10 天取样并检测相关指标。

1.3 菌株抗性和耐受性检测

重金属最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定, 菌液按体积分数 1% 添加至液体 LB 培养基中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 扩培 12 h 后, 接种于不同浓度 CdCl_2 的新鲜灭菌 LB 培养基中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养 24–36 h, 接种至 LB 琼脂平板上, 结合 OD_{600} 测量值, 完全抑制细菌生长的 Cd^{2+} 最低浓度确定为 MIC^[32–33]。

以微生物生长滞后期表示重金属耐受性。将扩培接种液添加到不同浓度 CdCl_2 的新鲜 LB 液体培养基中, 设置初始 OD_{600} 约为 0.01, 每隔 2 h 测定一次 OD_{600} 值, 当 OD_{600} 值达到 0.1 时定义为细胞开始生长^[33–34]。

1.4 PHE 和 Cd^{2+} 指标的检测

PHE 浓度测定采用高效液相色谱仪(Agilent 公司), 待测样品溶液中加入等体积无水乙醇, 超声促溶 20 min, 用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤。色谱检测条件为: ZORBAX SB-C18 色谱柱($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, Micron 公司), 254 nm 波长测定, 温度 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 保留时间 18 min; 流动相为超纯水:乙腈=8:2 (体积比), 1.5 mL/min 的流速, 进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。 Cd^{2+} 浓度通过电感耦合等离子体质谱法测定, 待测样品过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜。 SO_4^{2-} 浓度采用铬酸钡分光光度法测定。 SO_4^{2-} 消耗量计算以电子转移量为比较基准, 单位时间 SO_4^{2-} 转移电子摩尔数转化为 H_2S , 按公式(1)计算。

$$N_e(\text{SO}_4^{2-}) = \frac{m_0(\text{SO}_4^{2-}) - m_t(\text{SO}_4^{2-})}{96 \times t} \times 8 \quad (1)$$

式中, $N_e(\text{SO}_4^{2-})$ 为单位时间内 SO_4^{2-} 转移电子的摩尔数(mmol/d); $m_0(\text{SO}_4^{2-})$ 为初始 SO_4^{2-} 的质量(mg); $m_t(\text{SO}_4^{2-})$ 为试验结束时 SO_4^{2-} 的质量(mg); t 为周期反应天数(d); 8 为 1 mol 的 SO_4^{2-} 转化为 1 mol 的 H_2S 过程中电子转移数, 96 为 SO_4^{2-} 的相对分子质量(g/mol)。

1.5 电子传递体系活性检测

生物的电子传递体系活性测定参考 Gu 等^[35]的方法, 通过提供过量的电子供体(NADH 与琥珀酸), 以人工添加的碘硝基氯化四氮唑蓝(iodonitrotetrazolium chloride, INT)为电子受体, 微生物将 INT 还原为甲臍(iodonitrotetrazolium chloride formazan, INTF)的速率来指示微生物的电子传递体系活性。

1.6 细胞特性检测

1.6.1 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)分析

周期反应第 5 天的菌悬液于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 得到的菌体用 2.5%戊二醛固定 12 h (4 °C)后, 再次离心富集菌体, 采用 0.2 mmol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 用梯度浓度(包括 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%、100%)乙醇溶液逐级脱水, 每次 20 min。临界点干燥并喷金处理。采用扫描电子显微镜(ThermoFisher Scientific 公司)下观察细胞表型特征。

1.6.2 胞外聚合物分析

取 30 mL 待测样于冷冻离心机中, 4 °C、4 500 r/min 离心 15 min 获得菌体, 用磷酸盐缓冲溶液二次离心清洗, 将菌体重悬于 0.9%的氯化钠溶液 60 °C加热 30 min, 再次离心 15 min (4 °C, 10 000 r/min)。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤, 转移到透析袋中(分子量为 4 000 Da, 24 h), 透析得到纯净 EPS 于-20 °C保存。蛋白含量以考马斯亮蓝法测定, 多糖以蒽酮比色法测定。

1.6.3 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)分析

待测溶液以 10 000 r/min 转速离心, 用 0.9%的无菌生理盐水洗涤离心管底部菌体 3 次后冷冻干燥。在波长 400–4 000 cm^{-1} 下采用傅里叶变换红外光谱仪(ThermoFisher Scientific 公司)检测, 以分析菌株在 Cd^{2+} 胁迫前后的细胞表面官能团的变化。

1.7 PHE 代谢产物的定性定量检测

中间代谢产物的定性检测: 反应体系整瓶萃取, 采用乙酸乙酯在中性和酸化条件下提取 2 次后, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 萃取物用旋转蒸发器完全蒸发, 正己烷重新溶解定样。提取物用 BSTFA-TMCs (99:1)在 68 °C下衍生化 1 h, 用气相色谱-质谱仪(Agilent 公司)分析。测定条件: 进样量为 1 μL, 柱速为 1.0 mL/min。升温程序为: 初始温度 50 °C, 3 min, 10 °C/min 升温至 250 °C, 保持 10 min, 10 °C/min, 升温至 280 °C, 保温 1 min。进口温度和离子源温度分别设置为 280 °C和 200 °C。

中间代谢产物的定量分析: 样品溶液倒入分液漏斗中, 加入等体积二氯甲烷, 充分混匀后静置 5 min, 将有机相接入旋蒸瓶内, 待瓶内溶液挥发至 1 mL, 加入 1 mL 二氯甲烷充分振荡并置于分液漏斗内再次萃取后倒入旋蒸瓶。旋蒸瓶内溶液挥发至 1 mL 后加入等体积乙腈, 在超声波清洗仪中促溶 5 min 后旋蒸, 待瓶内溶液全部挥发后, 加入 2 mL 乙腈, 旋蒸瓶内样品过 0.22 μm 滤膜, 采用高效液相色谱仪测定。

1.8 数据分析

各批次实验均设置平行实验组($n=3$)。数据处理以及图形绘制使用 Excel 2019、OriginPro 2018c 进行, 利用 One-way ANOVA 法于 SPSS 分析不同处理组间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株 CW-D3T 厌氧呼吸耦合时的 PHE-Cd²⁺去除特性

2.1.1 Cd²⁺胁迫下 PHE 的厌氧降解率

设置 Cd²⁺梯度浓度为 0、100、200、300、400、500、600、700、800 和 900 mg/L, 当 Cd²⁺浓度为 700 mg/L 时, 菌株 CW-D3T 停止生长(以细胞生长量计), 结果表明 Cd²⁺抗性区间为 500 mg/L < MIC < 700 mg/L, 菌株的抗 Cd²⁺特性优良。图 1A 为菌株在各梯度 Cd²⁺浓度赋存时的生长曲线,

微生物在重金属胁迫下的耐受性可用微生物生长前的滞后期长短来表征。与无 Cd²⁺添加对照组相比, 不同梯度 Cd²⁺浓度胁迫后, 该菌株出现不同程度的生长滞后; 随着 Cd²⁺初始浓度的升高, 停滞适应期时长增加。可能原因为重金属损害细胞膜表面蛋白, 进入胞内导致离子调节功能紊乱, 进而影响微生物正常的生长代谢^[36]。

图 1B 为各梯度 Cd²⁺浓度赋存时菌株 CW-D3T 对 PHE 的厌氧降解率。Cd²⁺胁迫浓度为 0.5 mg/L 时, 较无 Cd²⁺添加对照组, 0–3 d 时 PHE 降解率略微升高(4.35%, $P < 0.05$), 反应周期

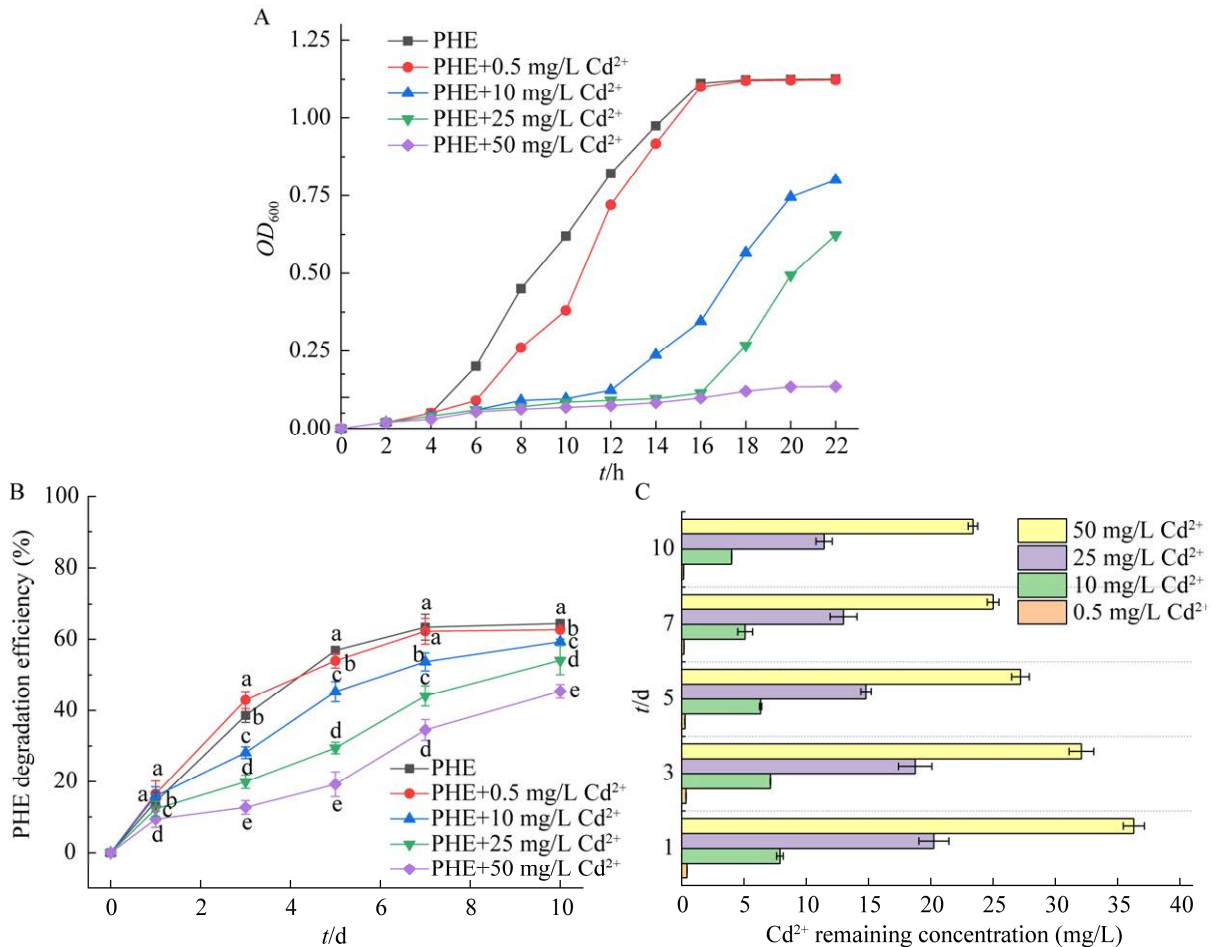


图 1 不同 Cd²⁺浓度条件下菌株 CW-D3T 的生长曲线(A)以及 PHE 的厌氧降解率(B)、Cd²⁺的剩余浓度(C)
Figure 1 Growth curves of strain CW-D3T under gradient Cd²⁺ concentration conditions (A) and anaerobic degradation of PHE by strain CW-D3T under different Cd²⁺ concentration stress (B), and the remaining concentration of Cd²⁺ (C).

末的降解率与对照组相当。供试菌株细胞呈负电性, 菌体细胞表面电负荷被一定程度中和, 可略微促进微生物对 PAHs 的吸附去除^[37]。初始 Cd²⁺浓度为 10–50 mg/L 时, PHE 的降解率为 59.31%–45.39%, 相较于对照组下降了 5.10%–19.02%。结果表明, 硫酸盐强化前的反应体系中, 不同 Cd²⁺浓度胁迫下, 菌株 CW-D3T 对 PHE 的周期末降解效果均具有显著性差异 ($P<0.05$), 菌株 CW-D3T 受高浓度 Cd²⁺胁迫效应的冲击影响较大。

反应周期结束时, 各 Cd²⁺浓度周期末去除率如图 1C 所示。Cd²⁺初始浓度为 0.5、10、25

和 50 mg/L 时, 反应周期结束时相应的剩余 Cd²⁺浓度分别为 0.145、4.010、11.435 和 23.390 mg/L, 相应的去除率分别为 71.00%、59.90%、54.26% 和 53.22%。

2.1.2 硫酸盐强化去除 PHE-Cd²⁺污染

图 2A 为 Cd²⁺胁迫下添加硫酸盐强化菌株 CW-D3T 对 PHE 的厌氧降解。相较于无添加硫酸盐的实验结果(图 1B), 强化反应体系中不同 Cd²⁺浓度条件下, PHE 周期末降解率增加了 8.75%–13.69%, 均具有显著性差异 ($P<0.05$)。硫酸盐强化反应体系中, Cd²⁺赋存浓度 0.5 mg/L 时 PHE 降解率(76.36%)与未添加 Cd²⁺实验组相

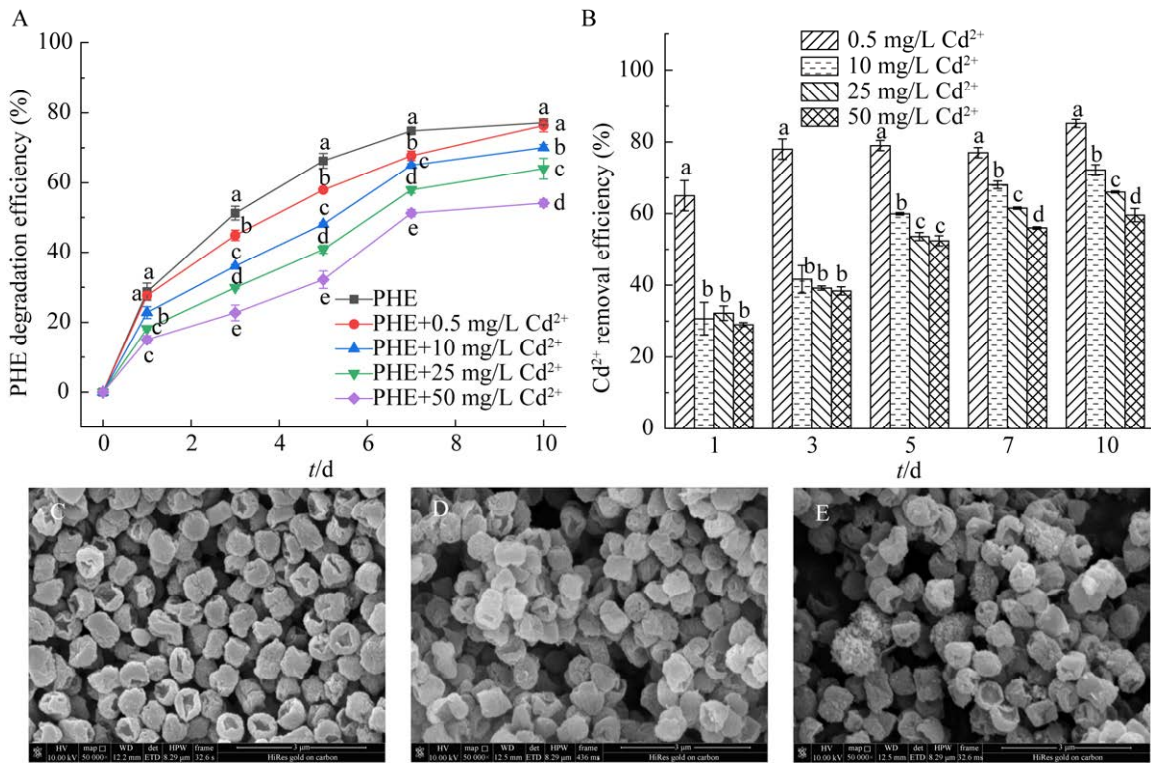


图 2 硫酸盐强化菌株 CW-D3T 厌氧去除 PHE-Cd²⁺污染以及不同 Cd²⁺浓度条件下菌株 CW-D3T 的扫描电镜图 不同小写字母表示各组之间的差异达到显著水平 ($P<0.05$)

Figure 2 Enhanced anaerobic removal efficiency of PHE-Cd²⁺ co-contamination by sulfate-reducing strain CW-D3T, and SEM analysis of strain CW-D3T treated with different Cd²⁺ concentration stress. A: Degradation efficiency of PHE by strain CW-D3T under different Cd²⁺ concentration. B: The removal efficiency of Cd²⁺ by strain CW-D3T during the reaction period. C–E: Scanning electron microscope images of strain CW-D3T under 0 mg/L, 10 mg/L, and 50 mg/L Cd²⁺ concentration, respectively. Error bars in figure represent standard deviation. Different lowercase letters indicate that the difference between the groups reached the significant level ($P<0.05$).

当, 低浓度 Cd^{2+} (0.5 mg/L)对 PHE 的硫酸盐强化厌氧生物降解影响不显著($P>0.05$); 当 Cd^{2+} 胁迫浓度 >10 mg/L 时, 周期末的 PHE 降解率分别为 70.06%、64.02%、54.14%。 Cd^{2+} 胁迫浓度为 10–50 mg/L 时, 菌株 CW-D3T 周期末的 PHE 去除速率显著降低, PHE 周期末降解效果具有显著性差异($P<0.05$)。较高浓度 Cd^{2+} 胁迫条件下, 硫酸盐作为外源电子受体可明显促进菌株 CW-D3T 厌氧呼吸并对同步强化对 PHE 的生物降解。

图 2B 为菌株 CW-D3T 在反应周期内的 Cd^{2+} 去除特性。 Cd^{2+} 初始浓度为 0.5、10、25 和 50 mg/L 时, 反应周期结束时剩余 Cd^{2+} 浓度分别为 0.074、2.785、8.500 和 20.220 mg/L, 相应的 Cd^{2+} 最高去除率分别为 85.20%、72.15%、66.00% 和 59.56%, 与无硫酸盐添加对照组相比, Cd^{2+} 去除率分别提高了 14.20%、12.25%、11.74%、6.34%, 均具有显著性差异($P<0.05$)。

图 2C–2E 为硫酸盐强化反应体系中, 在 Cd^{2+} 浓度 0、10 和 50 mg/L 胁迫下菌株 CW-D3T 的表型特征图。结果表明, 细胞结构在 0 mg/L Cd^{2+} 浓度下形态完整, 仅部分菌体出现塌陷和断裂的情况; 随着 Cd^{2+} 浓度的逐渐升高, 菌体表面变得粗糙, 颗粒感加剧, Cd^{2+} 浓度 50 mg/L 时功能菌应激反应表现更为强烈, 菌体形态变形占比较高, 功能菌细胞间的黏附性和聚集性增强, 推测是因为微生物抵御恶劣环境分泌胞外聚合物的解毒调控机制开始启动^[38]。

2.1.3 Cd^{2+} 胁迫下硫酸盐的消耗量分析

电子受体是微生物代谢过程中的必需物质, 计算菌株 CW-D3T 对硫酸盐的利用情况以及消耗外加电子受体时的电子转移数, 结果如图 3 所示。反应周期第 10 天, Cd^{2+} 初始胁迫浓度为 0–50 mg/L 时, SO_4^{2-} 的消耗率分别为 45.33%、32.47%、25.49%、18.95%、6.70%。随着 Cd^{2+} 浓度的上升, 周期内同一取样时间点的各实验组硫酸盐的消耗量呈下降趋势。

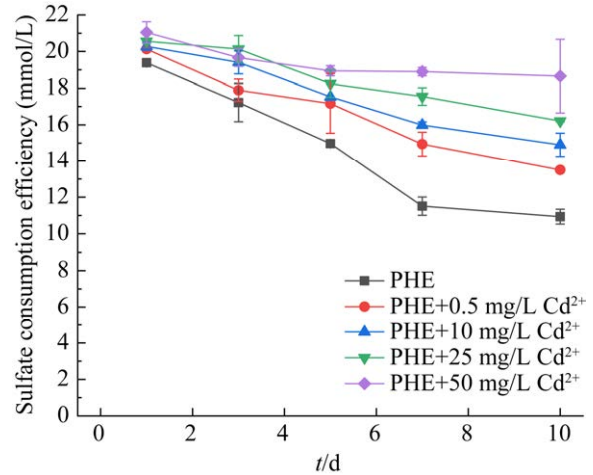


图 3 不同 Cd^{2+} 浓度胁迫下硫酸盐的消耗量

Figure 3 Sulfate consumption under different Cd^{2+} concentrations stress. Error bars in figure represent standard deviation.

根据计算结果, SO_4^{2-} 周期第 10 天单位时间内转移的电子摩尔数分别为 7.253 0、5.195 7、4.078 8、3.031 4 和 1.072 5 mmol/d, 表明菌株 CW-D3T 在厌氧降解 PHE 的过程中利用了硫酸盐进行生长代谢活动。随着 Cd^{2+} 初始赋存浓度的增加, 转移电子数呈下降趋势, 推测是由于 Cd^{2+} 对菌株 CW-D3T 细胞生长行为的胁迫效应, 阻碍了微生物利用硫酸盐作为电子受体进行自身厌氧呼吸。

2.2 硫酸盐还原体系中功能菌抗 Cd^{2+} 胁迫的响应机制

2.2.1 Cd^{2+} 胁迫对电子传递活性的影响

当存在底物、环境因子等胁迫时, 微生物脱氢酶活性受到影响, 进而破坏微生物电子传递体系的活性并影响微生物正常的生长代谢^[39]。 Cd^{2+} 对菌株电子传递体系活性(electron transport system activity, ETSA)影响如图 4 所示, 各 Cd^{2+} 浓度条件下, 菌株 CW-D3T 的 ETSA 值在降解的中期(5 d)处于较高水平, 7 d 后其 ETSA 值不同程度降低。各实验组周期内菌株 ETSA 的活性抑制效应随着 Cd^{2+} 浓度的增加而升高。 Cd^{2+} 浓度为 0.5 mg/L 时, ETSA 活性最高值为 494.5 mmol/(g·min)

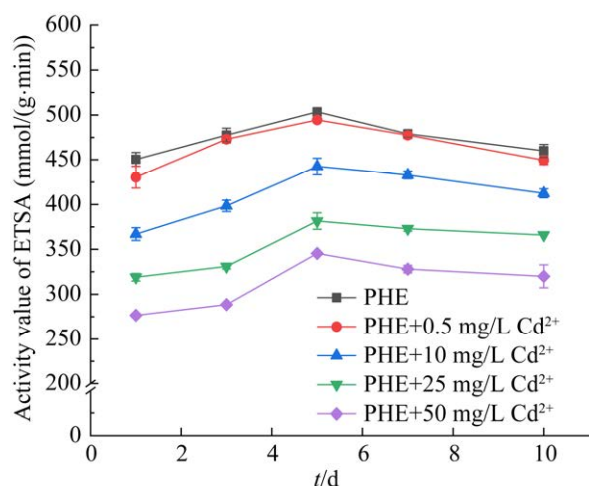


图 4 Cd^{2+} 对菌株 ETSA 活性影响

Figure 4 Effect of Cd^{2+} on the activity of strain ETSA. Error bars in figure represent standard deviation.

与对照组[503.5 mmol/(g·min)]相当; Cd^{2+} 浓度高于 0.5 mg/L 时, ETSA 活性的抑制效应显著增加, Cd^{2+} 浓度 50 mg/L 时的 ETSA 活性最大值 [345.5 mmol/(g·min)]较对照组降低了 31.38%。结合 2.1.2 节中污染物的去除效果, 实验条件下, PHE 的降解率与微生物细胞 ETSA 活性呈现较为一致的变化规律^[39]。

2.2.2 Cd^{2+} 胁迫对胞外聚合物的影响

图 5 为硫酸盐还原体系中菌株 CW-D3T 的 EPS 分泌量及其对 Cd^{2+} 的吸附去除占比, EPS 组成包括松散型蛋白(LB-PN)、紧密型蛋白(TB-PN)及松散型多糖(LB-PS)、紧密型多糖(TB-PS)。随着 Cd^{2+} 胁迫浓度的增加, 反应周期内 PN、PS 均呈现上升趋势, 各实验组在周期结束时达到峰值, 并主要以松散型为主。相较于未添加 Cd^{2+} 的反应体系, Cd^{2+} 赋存对菌株胞外多糖分泌含量的影响更为显著。 Cd^{2+} 浓度为 0.5–50 mg/L 时, 实验周期末胞外多糖分泌量峰值分别为 53.60、59.60、60.10 和 62.70 mg/L, 为不添加 Cd^{2+} 对照体系的 1.35–1.58 倍。根据实验结果, Cd^{2+} 初始浓度为 10 mg/L 条件下, 周期内胞外多

糖分泌量优于其他实验组, 可能由于较低或较高 Cd^{2+} 赋存浓度产生的生物毒性对细胞表面属性及其功能的改变均存在细胞解毒机制启动的延缓或抑制效应^[40]。

硫酸盐强化反应体系中, Cd^{2+} 胁迫浓度为 0.5–50 mg/L 时, 周期末 EPS 对 Cd^{2+} 吸附去除占比分别为 76.29%、60.21%、56.77%、54.67%, 推测反应体系中 Cd^{2+} 的去除途径主要为 EPS 胞外吸附。随着 Cd^{2+} 胁迫浓度的升高, 总去除率中的吸附去除占比呈下降趋势。

2.2.3 Cd^{2+} 胁迫对表面官能团的影响

如图 6 所示, 菌株 CW-D3T 厌氧呼吸的硫酸盐还原体系中, 各初始 Cd^{2+} 浓度条件下红外光谱中特征峰的位置基本一致, 但较不添加 Cd^{2+} 的对照组, 各谱峰强度均有所加强, 吸收峰强度与赋存的 Cd^{2+} 浓度成正比, 细胞生理结构总体未被破坏。3 100–3 500 cm^{-1} 处出现的吸收峰, 可能是缔合羟基 O–H 或酰胺 II 带的 N–H 伸缩振动, 这 2 个官能团通常为多糖、脂肪酸等^[41]。2 800–3 000 cm^{-1} 处出现弱吸收峰, 是 CH_3 、 CH_2 、 CH 的 C–H 伸缩振动引起。这些吸收峰的变化可能是脂肪酸、各种膜及细胞组分的亲水脂分子与镉结合所引起的^[42]。1 500–1 590 cm^{-1} 的较强吸收峰由酰胺 II 带的 N–H 弯曲振动导致, 这是蛋白质骨架的特征吸收峰^[43]。900–1 200 cm^{-1} 处强特征吸收峰来自 C–O、C–C、C–O–P 振动引起, 是多糖的特征峰。这些特征峰表明细胞表面的蛋白质和多糖是参与目标污染物去除过程中的重要组分^[44]。在 0.5 mg/L Cd^{2+} 浓度条件下, 菌株 CW-D3T 的特征峰与对照组无显著差异, 表明该浓度下菌株 CW-D3T 细胞组分几乎未受到 Cd^{2+} 胁迫的不利影响; Cd^{2+} 胁迫浓度 10 mg/L 和 25 mg/L 时, O–H 或 N–H 峰位由原来对照组的 3 272 cm^{-1} 处位移至 3 276 cm^{-1} 处; Cd^{2+} 胁迫浓度 50 mg/L 时, 该峰更是位移至 3 280 cm^{-1} 处。

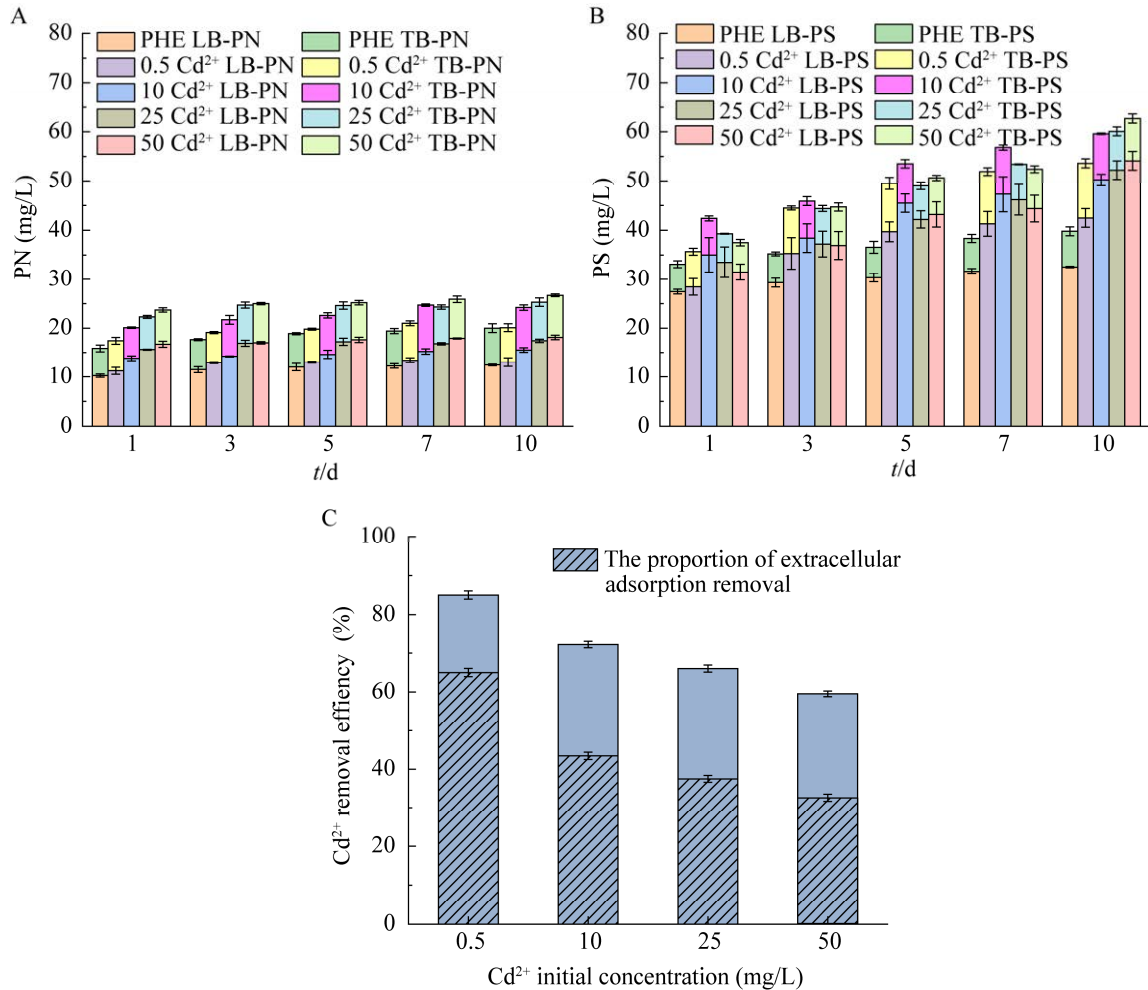


图 5 不同 Cd²⁺ 浓度条件下胞外蛋白(A)和胞外多糖(B)的分泌量及 EPS 对 Cd²⁺ 吸附去除占比(C)

Figure 5 Extracellular protein (A) and extracellular polysaccharide (B) secretion of strain CW-D3T under different Cd²⁺ concentrations stress and the proportion of EPS adsorption and removal of Cd²⁺ (C). Error bars in figure represent standard deviation.

2.3 硫酸盐还原体系中 PHE 的生物代谢特性

2.3.1 PHE 的生物转化途径

图 7 为在 Cd²⁺ 初始浓度 0、10 和 50 mg/L 的硫酸盐还原反应体系中，基于代谢产物检测的 PHE 生物转化途径分析图。根据实验结果，各反应体系均检测出 3 种物质(I-III)，分别鉴定为 2-菲甲酸、2-甲基-5-羟基苯甲醛、对甲酚，苯酚(代谢产物IV)仅在未添加 Cd²⁺ 的反应体系中检出。中间代谢体I为 PHE 通过羧基化和逐

步环还原的初始步骤分解而成，此外还检测出了六氢-2-菲甲酸等其他 PHE 羧基化代谢产物，可以推测 2-菲甲酸逐步环还原向六氢-2-菲甲酸转化的过程^[45-46]。代谢产物II主要经由一系列水合和水解反应导致 PHE 开环形成。代谢产物III进一步通过脱羧基反应生成，其可经由连续的甲基氧化步骤代谢转化为苯酚(代谢产物IV)，进而最终完成 PHE 的矿化^[47]。由于苯酚(代谢产物IV)未在添加 Cd²⁺ 的反应体系中检出，表明

Cd²⁺对 PHE 的生物代谢转化速率和矿化进程具有显著的不利影响, 周期结束时(10 d), Cd²⁺胁迫体系中的中间代谢产物尚不能满足矿化作用反应的要求。

2.3.2 两种中间代谢产物定量分析

图 8 为不同 Cd²⁺初始浓度下硫酸盐还原体系内 2-菲甲酸(A)和 2-甲基-5-羟基苯甲醛(B)在反应周期内的含量变化。未添加 Cd²⁺对照组、10 mg/L Cd²⁺和 50 mg/L Cd²⁺的降解体系中 2-菲甲酸含量均在周期反应的第 5 天达到最大值, 分别为 21.48、15.56 和 10.23 μg/L。2-菲甲酸含量和 2-甲基-5-羟基苯甲醛在周期内随 Cd²⁺初始浓度的增加呈下降趋势, 反应周期结束时, 未添加 Cd²⁺对照组中 2 种代谢中间体含量均比 Cd²⁺添加组低, Cd²⁺对反应体系中 PHE 的矿化具有不利影响。初始 Cd²⁺浓度为 50 mg/L 的降解体系中, 仅在前 3 天检出 2-甲基-5-羟基苯甲醛(1.08–2.02 μg/L),

推测高浓度 Cd²⁺胁迫作用下以 2-甲基-5-羟基苯甲醛为中间体的代谢途径相对较弱。

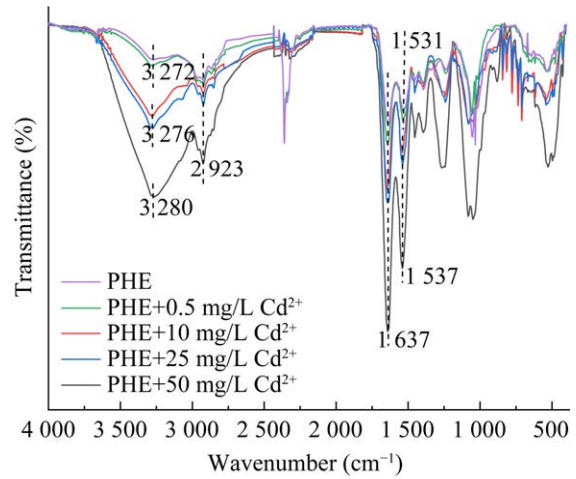


图 6 不同 Cd²⁺浓度胁迫下菌株 CW-D3T 表面官能团振动情况

Figure 6 Vibration of functional groups on the surface of strain CW-D3T under different Cd²⁺ concentrations stress.

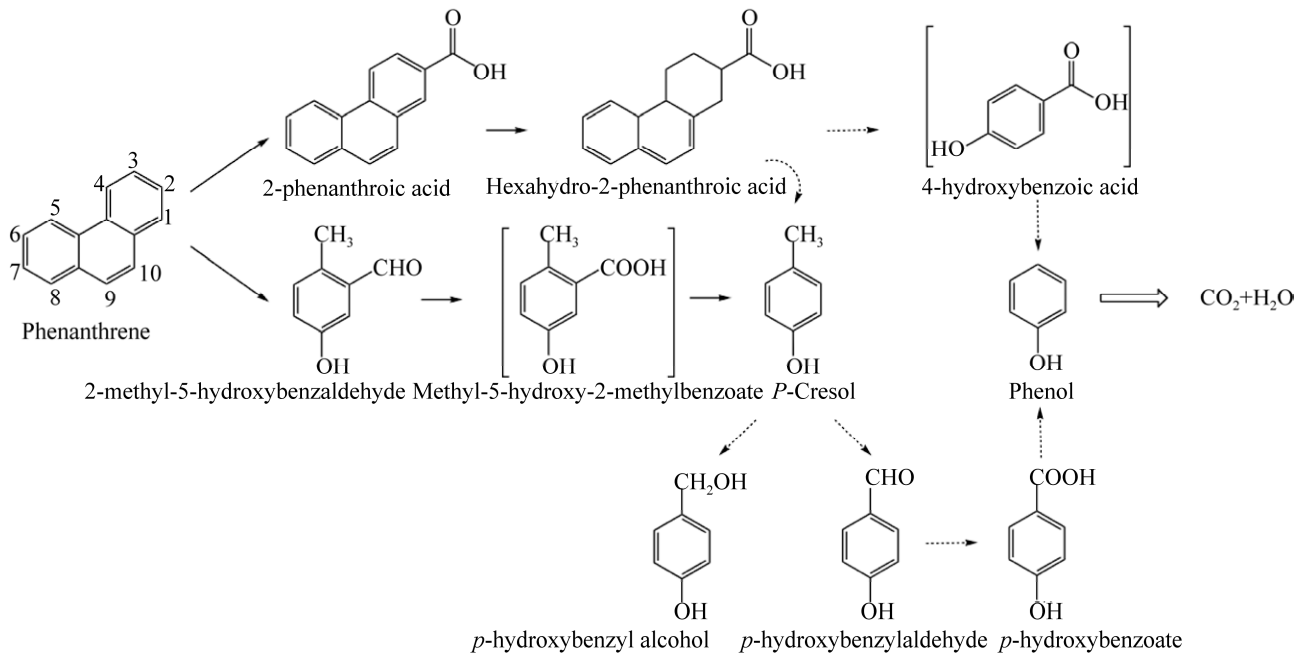


图 7 PHE 在硫酸盐还原体系中的可能生物转化途径

方括号中的化合物为本研究中未检测到的物质,

虚线箭头代表后续推测的连续反应

Figure 7 Possible metabolic pathways of PHE in sulfate reduction systems. Compounds in square brackets represents metabolites not detected in our study, dashed arrows represents the continuous reaction of subsequent speculation.

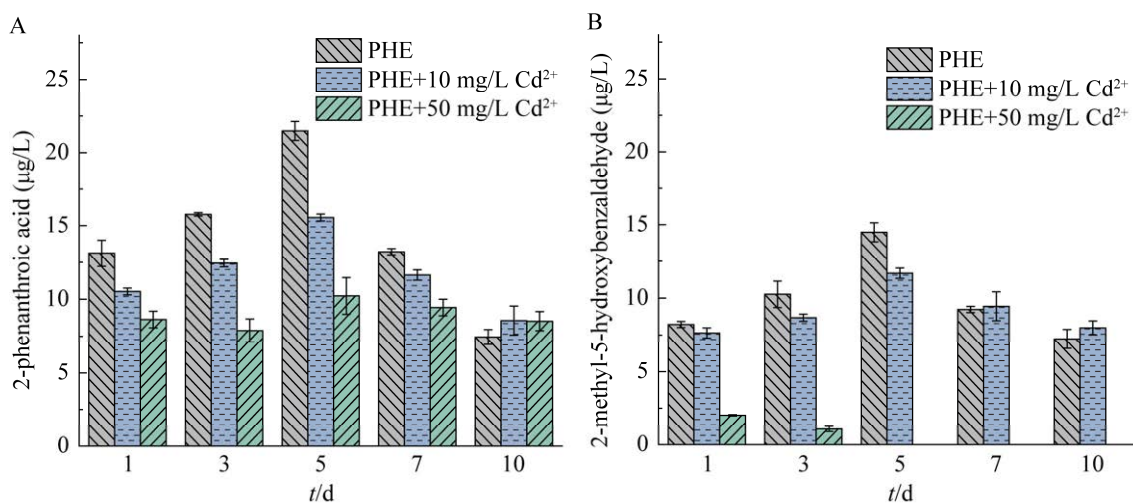


图 8 不同 Cd²⁺浓度胁迫下硫酸盐还原体系内 2-菲甲酸(A)和 2-甲基-5-羟基苯甲醛(B)含量变化
Figure 8 Changes of 2-phenanthroic acid (A) and 2-methyl-5-hydroxybenzaldehyde (B) in sulfate reduction systems under different Cd²⁺ concentration stress. Error bars in figure represent standard deviation.

3 讨论

目前,微生物修复厌氧环境中 PAHs-重金属复合污染的关键在于菌株高效的生长代谢活动以及抗重金属胁迫的调控机制。截至目前已分离纯化出许多具有微生物降解功能的兼性厌氧菌,如克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、肠球菌属(*Enterococcus* sp.)、芽孢杆菌属(*Bacilli* sp.)和红球菌属(*Rhodococcus* sp.)等^[48-51]。这些菌株可以依赖不同的电子受体厌氧呼吸同步对污染物进行生物降解。因此,本研究选取了一株抗 Cd²⁺性能优良的兼性厌氧菌 *Klebsiella* sp. CW-D3T 利用硫酸盐作为末端电子受体厌氧呼吸并实现了目标污染物的强化降解。

PHE 的生物降解率随 Cd²⁺胁迫浓度的升高而降低,相较于无硫酸盐添加对照组,硫酸盐电子受体能够削减 Cd²⁺胁迫对 PHE 降解的不利影响,同步刺激功能菌的厌氧呼吸作用,并强化菌株对 PHE 的降解转化能力。不同电子受体还原体系的研究对比表明,硫酸盐还原体系对红树林沉积物 PAHs 的生物降解率促进最为显著,硫酸

盐的得电子能力高于 Fe³⁺等其他电子受体^[20]。硫酸盐强化体系中,当 Cd²⁺初始浓度为 0 mg/L 时,反应周期末 PHE 的降解率为 77.19%,相较于无硫酸盐添加对照组提高了 12.78%,Cd²⁺去除率也增加 14.20%。高浓度 Cd²⁺ (50 mg/L)胁迫浓度的反应体系中,相较于无硫酸盐添加体系,PHE、Cd²⁺周期末去除效果分别为 54.14%、59.56%。研究表明,硫酸盐可显著促进海底沉积物中萘的厌氧降解,13 d 萘的矿化率为 66%^[52]。Tsai 等^[53]以养猪场废水污泥为接种物,培养的硫酸盐还原菌在 21 d 后对 5 mg/L 菲的生物转化率约 65%。Mu 等^[31]发现在海洋沉积物中投加硫酸盐作为末端电子受体时微生物对苯并(A)芘的降解率为 69.26%。本研究中采用硫酸盐作为微生物厌氧代谢过程的末端电子受体,兼性厌氧菌 *Klebsiella* sp.对 PHE-Cd²⁺复合污染的修复效果优良。另一方面,PAHs-重金属复合污染的微生物修复过程中,重金属胁迫浓度是影响微生物对目标化合物去除的关键因素。顾玲峰等^[54]从油污土壤中分离出 2 株高效芘降解菌与一株耐 Cr(VI)菌构建混菌体系,对 50 mg/L 芘和 25 mg/L

Cr^{6+} 的去除率分别为 46.4% 和 40.2%。本研究随着 Cd^{2+} 胁迫浓度的升高, 体系中硫酸盐消耗量呈下降趋势, 菌株 CW-D3T 生长繁殖和代谢活性降低, 可能是由于重金属的生态毒性干扰了细胞稳态, 功能菌解毒抗 Cd^{2+} 胁迫的生理机制启动导致厌氧呼吸速率减缓^[36]。

ETSA 活性与细胞代谢行为密切相关, 本实验条件下, Cd^{2+} 赋存浓度为 10–50 mg/L 时对细胞 ETSA 活性的抑制作用显著 ($P < 0.05$)。Czarny 等^[55] 和 Li 等^[39] 研究发现重金属胁迫使 ETSA 活性降低, 进而导致微生物酶失活。硫酸盐还原体系中菌株 CW-D3T 的 SEM 结果表明, 菌株细胞结构的完整程度随着 Cd^{2+} 浓度的升高而降低, 菌体间的聚集性也随之增强, 推测 EPS 存在动态变化。 Cd^{2+} 胁迫条件下, 促进功能菌分泌胞外多糖和蛋白吸附重金属离子, 可以降低其对自身的迫害作用^[56]。基于 EPS 含量的变化和 Cd^{2+} 胞外吸附去除的占比分析, 结果表明反应体系中 EPS 随 Cd^{2+} 胁迫浓度的增加而增加, EPS 胞外吸附是 Cd^{2+} 的主要去除途径, 本研究条件下, 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, Cd^{2+} 胞外吸附去除的占比呈下降趋势。根据现有文献报道, 微生物对重金属的去除机制主要包括胞外吸附、胞外络合以及胞内积累^[28], 其中胞外吸附主要依靠 EPS 完成^[57]。同时微生物对重金属的去除机制中还存在不同程度的价态转化, Kang 等^[43] 和 Su 等^[58] 的研究表明, EPS 分泌量的增加对 Au^{3+} 和 Cr^{6+} 等重金属的还原和解毒能力具有重要作用。硫酸盐强化的厌氧反应体系中, 红外光谱中特征峰的伸缩振动证实了胞外多糖和胞外蛋白介导了功能菌对 Cd^{2+} 的吸附去除过程, 并且特征峰的谱峰强度与 Cd^{2+} 赋存浓度成正比。表明重金属离子可通过与细胞表面官能团的直接配位而被吸附, 进一步实现微生物对重金属的累积作用和去除效应^[27]。

基于硫酸盐还原菌群厌氧降解菲的转化途

径研究表明, 羧化和甲基化是硫酸盐还原的初始活化反应步骤^[59–60]。研究发现 2-菲甲酸为羧化反应后的逐步还原产物^[61], 在本研究各降解体系中均检测到这一重要的中间代谢体, 随后经由一系列反应逐步生成较易被微生物降解利用的取代苯系物。苯酚未在 Cd^{2+} 添加组中检出, 这可能是 Cd^{2+} 的抑制作用导致中间代谢产物长期积累, 初始环还原之后并未来得及发生后续环裂解。中间代谢产物定量分析结果表明: 各降解体系中 2-菲甲酸含量高于 2-甲基-5-羟基苯甲醛含量, 推测 PHE 在硫酸盐还原体系中更倾向于转化为 2-菲甲酸。2 种中间代谢产物在周期内随 Cd^{2+} 初始浓度的增加呈下降趋势, Su 等^[58] 和 Yin 等^[62] 发现 PAHs 的好氧代谢通路不会因为 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的胁迫作用而发生变化, 但会减少中间代谢产物的产量。

4 结论

(1) PAHs-HMs 为环境介质中的典型复合污染, 兼性厌氧菌利用硫酸盐作为末端电子受体强化厌氧呼吸可强化修复 PHE- Cd^{2+} 复合污染。

(2) 硫酸盐作为终端电子受体的还原反应体系中, Cd^{2+} 初始赋存浓度为不高于 10 mg/L 时, 硫酸盐还原体系中菌株对 PHE、 Cd^{2+} 的去除率均大于 70.00%。添加硫酸盐可以显著降低高浓度 Cd^{2+} 胁迫下 PHE 的生物降解, 此强化策略可为微生物厌氧修复 PAHs-重金属复合污染提供参考。

(3) 反应周期内菌株的 ETSA 值在周期反应 5 d 时处于较高水平, 7 d 后有所下降, 高浓度 Cd^{2+} 赋存对 ETSA 活性的抑制作用更为显著。ETSA 代表了细菌综合代谢水平, 与细胞自身生长代谢联系更为紧密, 与目标污染物降解特性规律一致。

(4) 胞外聚合物分泌量的增加可以提高菌

株 Cd²⁺抗性以及菌体间的黏附性。同时细胞官能团的伸缩振动证实了胞外多糖和蛋白参与了菌株对 Cd²⁺的吸附去除过程。

参考文献

- [1] MOJIRI A, ZHOU JL, OHASHI A, OZAKI N, KINDAICHI T. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 696: 133971.
- [2] QIN YF, LIU YQ, WANG JB, LU Y, XU ZM. Emission of PAHs, PCBs, PBDEs and heavy metals in air, water and soil around a waste plastic recycling factory in an industrial park, Eastern China[J]. *Chemosphere*, 2022, 294: 133734.
- [3] LIU LW, LI W, SONG WP, GUO MX. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: principles and applicability[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 206-219.
- [4] WU C, LI F, YI SW, GE F. Genetically engineered microbial remediation of soils co-contaminated by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: advances and ecological risk assessment[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 296: 113185.
- [5] AN H, TIAN T, WANG ZT, JIN RF, ZHOU JT. Role of extracellular polymeric substances in the immobilization of hexavalent chromium by *Shewanella putrefaciens* CN32 unsaturated biofilms[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 810: 151184.
- [6] 曾军, 吴宇澄, 林先贵. 多环芳烃污染土壤微生物修复研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2804-2815. ZENG J, WU YC, LIN XG. Advances in microbial remediation of soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2804-2815 (in Chinese).
- [7] LAANE RWPM, SONNEVELDT HLA, VAN DER WEYDEN AJ, LOCH JPG, GROENEVELD G. Trends in the spatial and temporal distribution of metals (Cd, Cu, Zn and Pb) and organic compounds (PCBs and PAHs) in Dutch coastal zone sediments from 1981 to 1996: a model case study for Cd and PCBs[J]. *Journal of Sea Research*, 1999, 41(1/2): 1-17.
- [8] ZHANG P, CHEN YG. Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in surface soil of China: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 605-606: 1011-1020.
- [9] 郑美林, 赵颖豪, 苗莉莉, 高喜燕, 刘志培. 多环芳烃污染土壤生物修复研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3535-3548. ZHENG ML, ZHAO YH, MIAO LL, GAO XY, LIU ZP. Advances in bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3535-3548 (in Chinese).
- [10] 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.
- [11] 孙娇, 张作涛, 郭海礁, 王慧. 多环芳烃厌氧生物降解研究进展[J]. *微生物学报*, 2020, 60(12): 2844-2861. SUN J, ZHANG ZT, GUO HJ, WANG H. Progresses in anaerobic microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(12): 2844-2861 (in Chinese).
- [12] LIANG L, SONG XH, KONG J, SHEN CH, HUANG TW, HU Z. Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1[J]. *Biodegradation*, 2014, 25: 825-833.
- [13] ZHANG ZT, GUO HJ, SUN J, WANG H. Investigation of anaerobic phenanthrene biodegradation by a highly enriched co-culture, PheN9, with nitrate as an electron acceptor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 383: 121191.
- [14] LI CH, WONG YS, TAM NFY. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(21): 8083-8092.
- [15] SHIN B, KIM M, ZENGLER K, CHIN KJ, OVERHOLT WA, GIEG LM, KONSTANTINIDIS KT, KOSTKA JE. Anaerobic degradation of hexadecane and phenanthrene coupled to sulfate reduction by enriched consortia from northern Gulf of Mexico seafloor sediment[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 1239.
- [16] YANG SC, GOU YL, SONG Y, LI PZ. Enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil using nitrate and soil microbes[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2018, 77: 432.
- [17] MECKENSTOCK RU, BOLL M, MOUTTAKI H, KOELSCHBACH JS, CUNHA TAROUCO P, WEYRAUCH P, DONG XY, HIMMELBERG AM. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic

- aromatic hydrocarbons[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1-3): 92-118.
- [18] ANANTHARAMAN K, HAUSMANN B, JUNGBLUTH SP, KANTOR RS, LAVY A, WARREN LA, RAPPÉ MS, PESTER M, LOY A, THOMAS BC, BANFIELD JF. Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1715-1728.
- [19] KÜMMEL S, HERBST FA, BAHR A, DUARTE M, PIEPER DH, JEHLICH N, SEIFERT J, von BERGEN M, BOMBACH P, RICHNOW HH, VOGT C. Anaerobic naphthalene degradation by sulfate-reducing *Desulfobacteraceae* from various anoxic aquifers[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(3): fiv006.
- [20] CHANG BV, CHANG SW, YUAN SY. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge[J]. *Advances in Environmental Research*, 2003, 7(3): 623-628.
- [21] 侯晓鹏, 叶春, 李春华, 郑向勇, 许士洪, 郭士林. 低氧条件下不同电子受体对克雷伯氏菌降解菲的影响[J]. *环境科学研究*, 2016, 29(2): 227-233.
HOU XP, YE C, LI CH, ZHENG XY, XU SH, GUO SL. Effects of different electron acceptors on the biodegradation of phenanthrene by *Klebsiella* sp. ZS1 under low-oxygen condition [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2016, 29(2): 227-233 (in Chinese).
- [22] ZHANG XM, SULLIVAN ER, YOUNG LY. Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium[J]. *Biodegradation*, 2000, 11: 117-124.
- [23] KOELSCHBACH JS, MOUTTAKI H, MERL-PHAM J, ARNOLD ME, MECKENSTOCK RU. Identification of naphthalene carboxylase subunits of the sulfate-reducing culture N47[J]. *Biodegradation*, 2019, 30: 147-160.
- [24] BISWAS B, SARKAR B, MANDAL A, NAIDU R. Heavy metal-immobilizing organoclay facilitates polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in mixed-contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298: 129-137.
- [25] GAO P, DA SILVA E, HOU L, DENSLOW ND, XIANG P, MA LQ. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolomics perspective[J]. *Environment International*, 2018, 119: 466-477.
- [26] LIU J, ZHANG AN, LIU YJ, LIU Z, LIU Y, WU XJ. Analysis of the mechanism for enhanced pyrene biodegradation based on the interactions between iron-ions and *Rhodococcus ruber* strain L9[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225: 112789.
- [27] PALENCIA M. Functional transformation of Fourier-transform mid-infrared spectrum for improving spectral specificity by simple algorithm based on wavelet-like functions[J]. *Journal of Advanced Research*, 2018, 14: 53-62.
- [28] 喻涌泉, 黄魏魏, 董建江, 朱启法, 卢滇楠, 刘永民. 硝基还原假单胞菌吸附重金属镉的机理研究[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(6): 2232-2238.
YU YQ, HUANG WW, DONG JJ, ZHU QF, LU DN, LIU YM. Study on the removal of Cd(II) by *Pseudomonas nitroreducens*: biosorption characteristics and mechanism[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(6): 2232-2238 (in Chinese).
- [29] LIU SH, ZENG GM, NIU QY, GONG JL, HU XJ, LU LH, ZHOU YY, HU X, CHEN M, YAN M. Effect of Pb(II) on phenanthrene degradation by new isolated *Bacillus* sp. P1[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(69): 55812-55818.
- [30] XU XY, HE ZM, JI F, ZHANG ML, BAI J, WANG B. Insight into the interactions between surfactants and microorganisms for the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: enhancing efficiency, cellular response, and elucidating mechanisms[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2024, 187: 105710.
- [31] MU J, CHEN Y, SONG Z, LIU M, ZHU BK, TAO HC, BAO MT, CHEN QG. Effect of terminal electron acceptors on the anaerobic biodegradation of PAHs in marine sediments[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 438: 129569.
- [32] BRAUNER A, FRIDMAN O, GEFEN O, BALABAN NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14: 320-330.
- [33] 许晓毅, 崔佳豪, 白净, 王斌, 陈小宾, 贺志敏, 温妍. 两株多环芳烃降解菌协同对菲-镉污染的去除恶特性[J]. *微生物学报*, 2023, 63(1): 283-296.
XU XY, CUI JH, BAI J, WANG B, CHEN XB, HE ZM, WEN Y. Synergistic removal of phenanthrene and cadmium by two polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(1): 283-296 (in Chinese).

- [34] CHEN XM, ZHAO Y, ZHAO XY, WU JQ, ZHU LJ, ZHANG X, WEI ZM, LIU Y, HE PP. Selective pressures of heavy metals on microbial community determine microbial functional roles during composting: sensitive, resistant and actor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 398: 122858.
- [35] GU X, LENG JT, ZHU JT, ZHANG K, ZHAO JQ, WU P, XING QY, TANG KJ, LI XL, HU B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126116.
- [36] GUO HJ, LUO SL, CHEN L, XIAO X, XI Q, WEI WZ, ZENG GM, LIU CB, WAN Y, CHEN JL, HE YJ. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8599-8605.
- [37] LI ZH, LIU JL, QIAO MH, FAN KN. A theoretical study on the metal cation- π complexes of Zn^{2+} and Cd^{2+} with benzene and cyclohexene[J]. *Molecular Physics*, 2009, 107(8-12): 1271-1282.
- [38] MA XK, DING N, PETERSON EC, DAUGULIS AJ. Heavy metals species affect fungal-bacterial synergism during the bioremediation of fluoranthene[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100: 7741-7750.
- [39] LI CH, YE C, WONG YS, TAM NFY. Effect of Mn(IV) on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons under low-oxygen condition in mangrove sediment slurry[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 190(1-3): 786-793.
- [40] TANG X, ZENG GM, FAN CZ, ZHOU M, TANG L, ZHU JJ, WAN J, HUANG DL, CHEN M, XU P, ZHANG C, LU Y, XIONG WP. Chromosomal expression of CadR on *Pseudomonas aeruginosa* for the removal of Cd(II) from aqueous solutions[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 636: 1355-1361.
- [41] TANG YF, DAI XH, DONG B, GUO YQ, DAI LL. Humification in extracellular polymeric substances (EPS) dominates methane release and EPS reconstruction during the sludge stabilization of high-solid anaerobic digestion[J]. *Water Research*, 2020, 175: 115686.
- [42] WANG J, LI Q, LI MM, CHEN TH, ZHOU YF, YUE ZB. Competitive adsorption of heavy metal by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sulfate reducing bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 374-376.
- [43] KANG FX, QU XL, ALVAREZ PJJ, ZHU DQ. Extracellular saccharide-mediated reduction of Au^{3+} to gold nanoparticles: new insights for heavy metals biomineralization on microbial surfaces[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(5): 2776-2785.
- [44] SHUKLA A, PARMAR P, GOSWAMI D, PATEL B, SARAF M. Characterization of novel thorium tolerant *Ochrobactrum intermedium* AM7 in consort with assessing its EPS-Thorium binding[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122047.
- [45] HIMMELBERG AM, BRÜLS T, FARMANI Z, WEYRAUCH P, BARTHEL G, SCHRADER W, MECKENSTOCK RU. Anaerobic degradation of phenanthrene by a sulfate-reducing enrichment culture[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(10): 3589-3600.
- [46] MOUTTAKI H, JOHANNES J, MECKENSTOCK RU. Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(10): 2770-2774.
- [47] TSAI JC, KUMAR M, LIN JG. Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164(2-3): 847-855.
- [48] ADAPA S, NARAMALA S, TIWANA HS, PATEL N, VERMA R, KODURI NM, KONALA VM. Peritonitis from facultative anaerobic Gram-negative bacilli likely due to translocation of bacteria from gut in a patient undergoing peritoneal dialysis[J]. *Infectious Disease Reports*, 2020, 12(1): 8376.
- [49] DUARTE MS, SALVADOR AF, CAVALEIRO AJ, STAMS AJM, PEREIRA MA, ALVES MM. Multiple and flexible roles of facultative anaerobic bacteria in microaerophilic oleate degradation[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(9): 3650-3659.
- [50] KRISS M, HAZLETON KZ, NUSBACHER NM, MARTIN CG, LOZUPONE CA. Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 44: 34-40.
- [51] SUN MM, CHAO HZ, ZHENG XX, DENG SP, YE M, HU F. Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 740: 140008.

- [52] BEDESSEM ME, SWOBODA-COLBERG NG, COLBERG PJS. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 152(2): 213-218.
- [53] TSAI JC, KUMAR M, CHANG SM, LIN JG. Determination of optimal phenanthrene, sulfate and biomass concentrations for anaerobic biodegradation of phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and elucidation of metabolic pathway[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 171(1-3): 1112-1119.
- [54] 顾玲峰. 生物炭固定化菌群研制及其修复芘-Cr(VI)复合污染土壤研究[D]. 上海: 上海大学硕士学位论文, 2016.
GU LF. Preparation of biochar immobilized consortium and its remediation of pyrene and Cr(VI) co-contaminated soils[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai University, 2016 (in Chinese).
- [55] CZARNY J, STANINSKA-PIĘTA J, PIOTROWSKA-CYPLIK A, JUZWA W, WOLNIEWICZ A, MARECIK R, ŁAWNICZAK Ł, CHRZANOWSKI Ł. *Acinetobacter* sp. as the key player in diesel oil degrading community exposed to PAHs and heavy metals[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 383: 121168.
- [56] 李敏, 罗晟, 鄢祖旋, 万娟娟, 卢时康, 程新. 镉胁迫对屎肠球菌 CX2-6 生理代谢及胞外多糖合成的影响[J]. 环境科学学报, 2024, 44(2): 441-452.
LI M, LUO S, YAN ZX, WAN JJ, LU SK, CHENG X. Effect of Cd stress on physiological metabolism and exopolysaccharidesynthesis of *Enterococcus faecalis* CX2-6[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2024, 44(2): 441-452 (in Chinese).
- [57] YANG JX, WEI W, PI SS, MA F, LI A, WU D, XING J. Competitive adsorption of heavy metals by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1[J]. Bioresource Technology, 2015, 196: 533-539.
- [58] SU YH, SUN S, LIU QY, ZHAO CC, LI L, CHEN SQ, CHEN HX, WANG YR, TANG F. Characterization of the simultaneous degradation of pyrene and removal of Cr(VI) by a bacteria consortium YH[J]. Science of the Total Environment, 2022, 853: 158388.
- [59] KRAISELBURD I, BRÜLS T, HEILMANN G, KASCHANI F, KAISER M, MECKENSTOCK RU. Metabolic reconstruction of the genome of candidate *Desulfatiglans* TRIP_1 and identification of key candidate enzymes for anaerobic phenanthrene degradation[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(4): 1267-1286.
- [60] MECKENSTOCK RU, ANNWEILER E, MICHAELIS W, RICHNOW HH, SCHINK B. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2743-2747.
- [61] ZAIN UL ARIFEEN M, MA YN, WU TS, CHU C, LIU X, JIANG JP, LI DX, XUE YR, LIU CH. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi isolated from anaerobic coal-associated sediments at 2.5 km below the seafloor[J]. Chemosphere, 2022, 303: 135062.
- [62] YIN C, XIONG WL, QIU H, PENG WL, DENG ZX, LIN SJ, LIANG RB. Characterization of the phenanthrene-degrading *Sphingobium yanoikuyae* SJTF8 in heavy metal co-existing liquid medium and analysis of its metabolic pathway[J]. Microorganisms, 2020, 8(6): 946.