

# 一株多环芳烃降解菌的筛选及复合诱变

矫文豪<sup>1,3</sup>, 杨文革<sup>2</sup>, 杜涛<sup>3</sup>, 程亚琳<sup>3</sup>, 胡永红<sup>3\*</sup>

(1. 南京工业大学材料化学国家重点实验室, 江苏南京 211816;

2. 南京工业大学药学院, 江苏南京 211816;

3. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 211816)

**摘要:**随着化石燃料的广泛应用,多环芳烃污染问题日渐突显。为采用生物法处理多环芳烃污染,提高野生型菌种的降解能力,从北京某石化公司长期受石油污染的场地分离纯化出一株菲的高效降解菌,经鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌,绘制了菌种进化树。利用氮离子诱变及常温等离子体复合诱变方法得到一株遗传稳定的高效降解菌株并对 100 mg/L 的菲进行降解处理,3 d 后菲的降解率约为 64%,5 d 后基本完全降解。

**关键词:**菲;嗜麦芽寡养单胞菌;菌种进化树;氮离子诱变;常温等离子体诱变

中图分类号:X505

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2021)S-0212-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.S.043

## Screening and compound mutagenesis of a bacterium for degrading polycyclic aromatic hydrocarbon

JIAO Wen-hao<sup>1,3</sup>, YANG Wen-ge<sup>2</sup>, DU Tao<sup>3</sup>, CHENG Ya-lin<sup>3</sup>, HU Yong-hong<sup>3\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China; 3.College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

**Abstract:** With wide application of fossil fuels, polycyclic aromatic hydrocarbon caused pollution has been becoming a serious problem. In order to improve the degradation ability of wild-type bacteria in biological treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon, a strain of high-efficient phenanthrene degrading bacteria is isolated and purified from a long-term oil-contaminated site of a petrochemical company in Beijing. It is identified as maltophilic oligotrophomonas, and its strain evolutionary tree is drawn out. A genetically stable and highly efficient degrading strain is obtained by means of nitrogen ion mutagenesis and plasma mutagenesis at normal temperature, and is used to treat with 100 mg·L<sup>-1</sup> phenanthrene. It is found that phenanthrene has been degraded by about 64% in 3 days, and has been almost fully degraded after 5 days.

**Key words:** phenanthrene; stenotrophomonas maltophilia; strain evolutionary tree; nitrogen ion mutagenesis; plasma mutagenesis at room temperature

石油作为矿产资源中不可或缺的一部分,在制造业、农业以及医药领域都有着广泛应用<sup>[1]</sup>。生物质、化石燃料燃烧以及有机化合物热解可能生成多环芳烃形成污染。绝大部分的多环芳烃对生物体都存在强烈的毒副作用包括免疫毒性以及致癌性,16种多环芳烃已经由美国环保局确认为优先污染物<sup>[2-4]</sup>。多环芳烃的去除除了常见的物理、化学方法外,还包括生物法治理手段。其中微生物降解法因为较其他降解方法具有成本低、操作方便等优点,逐渐成为石油降解的主要研究方向<sup>[5]</sup>。

自然环境中,微生物对有机物的分解转换机制是非人为条件下有机污染物去除的最主要方法,利用这种降解转化机制就是人为使用微生物法处理有

机污染物的核心思路,将它与传统的物理及化学方法相比对,其环保绿色、经济价廉的优点更受人们所青睐<sup>[6-8]</sup>。近年来大量研究已经表明表面活性剂对多环芳烃菲的降解有促进作用,但表面活性剂用量不当或是使用种类不合适会对菌种降解起到抑制作用<sup>[9]</sup>。因此笔者筛选出一株非常见的能自身生产表面活性剂的菲降解菌,并使用氮离子诱变及常温等离子体诱变手段提高其多环芳烃降解能力。

## 1 菌株筛选与诱变

### 1.1 材料与试剂

石化污染场地土壤选自中国石油化工股份有限公司北京化工研究院长期受污染土壤。主要试剂见

收稿日期:2021-03-11;修回日期:2021-05-25

基金项目:中国石油化工有限公司北京化工研究院项目(319005-1);江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(19)3101]

作者简介:矫文豪(1995-),男,硕士研究生,研究方向为芳烃污染处理,937675281@qq.com;胡永红(1968-),女,博士,教授,研究方向为生物化工,通讯联系人,hyh@njtech.edu.cn。

表 1。

表 1 主要试剂表

序号	试剂名称	生产公司
1	菲(98%, AR)	麦克林生化科技有限公司
2	蛋白胨	OXOID
3	酵母粉	OXOID
4	琼脂粉	SCIENTAN
5	盐酸	百世化工有限公司
6	氢氧化钠	百世化工有限公司
7	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	百世化工有限公司
8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	百世化工有限公司
9	MgSO <sub>4</sub>	百世化工有限公司

## 1.2 主要仪器

主要仪器如表 2 所示。

表 2 主要仪器

序号	仪器名称	生产公司
1	恒温摇床	OLABO
2	灭菌锅	BIOBASE
3	超净工作台	VEZARY
4	电子天平	日本 DAOJIN 公司
5	pH 计	METTLER TOLEDO 公司
6	1260 液相色谱仪	美国公司 Agilent 公司
7	恒温培养箱	OLABO
8	A1200 界面张力仪	得利特科技有限公司
9	400 keV 离子注入机	南京工业大学
10	常温等离子体诱变仪	北京创誉科技有限公司

## 1.3 培养条件及部分方法

富集培养基: Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 g/L, 不需要额外调节 pH。将从场地不同地区获得的土壤各取 1 g 分别加入到摇瓶中培养, 标记为 1~5 号。

选择培养基: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, 调节 pH 至 7.0。

菲加入方法如下: 取 0.2 g 菲加入 20 mL 乙腈中充分溶解; 取 1 mL 菲的乙腈溶液通过 0.22 μm 滤膜加入 100 mL 培养基中, 恢复至室温, 乙腈完全挥发后备用。

接种后的液体培养基置于 28℃、150 r/min 摇床中培养 3 d。接种固体培养基置于 28℃ 恒温培养箱中培养 3 d。

高效液相色谱检测方法采用国标法。

## 1.4 分离与纯化

将培养好的富集培养基充分静置, 取 1 mL 培养

液加入准备好的选择培养基中, 按规定培养。在选择培养基中加入 5 g/L 的蛋白胨以及 2% 的琼脂粉, 调节 pH 至 7.0, 121℃ 条件下灭菌 20 min, 添加菲, 倒入一次性塑料平板中, 配成固体培养基, 恢复至室温后备用<sup>[11-13]</sup>。

取 1.3 中培养的富集后菌液稀释涂布, 编号为 1-1-1、1-1-2、1-1-3 至 5-2-1、5-2-2、5-2-3; 以蒸馏水同浓度稀释结果为对照, 编号为 6-1、6-2、6-3。多次以平板划线法分离纯化, 保证得到纯净的单菌落, 并进行保藏<sup>[14]</sup>。

## 1.5 菌种的筛选

表面活性剂具有使多环芳烃溶解度增加和降低液体张力的作用, 在菲降解的过程中能促进菌体对多环芳烃菲的利用效率, 因此菌体产生的表面活性剂性能作为菌种筛选时的一个重要指标<sup>[15-18]</sup>。通过测定发酵液表面张力、发酵液乳化性能、菲增容量这 3 个指标从而表征菌体产生的表面活性剂性能; 菲降解程度代表菌体对多环芳烃降解的能力。考察上述 4 个指标完成对菌体的筛选。

分别取 1.4 中培养好的发酵液 15 mL, 7 000 r/min 条件下离心 5 min。取上清液对应编号, 用界面张力仪测定表面张力, 用未经接种液体培养基进行同样的操作作为对照。

分别取 1.4 中培养好的发酵液 5 mL 加入等量石油醚, 混匀后充分静置, 根据公式 (1) 测定乳化指数。

$$\text{乳化指数} = \text{乳化层高度} / \text{总高度} \quad (1)$$

配制不同浓度的菲的正己烷溶液, 用高效液相色谱检测菲含量。

用 66.6% 氯仿的甲醇溶液萃取菌体产生的表面活性剂粗品<sup>[19]</sup>。将干燥的表面活性剂粗品加入 50 mL 含菲 100 mg/L 的液体培养基中, 振荡后离心, 除去不溶的菲, 测定培养基中的菲含量, 以不加表面活性剂的液体培养基为对照。

将 20 mL 发酵液加入 5 mL 正己烷, 使用涡旋混合仪充分振荡, 静置 30 min 后, 重复 4 次合并所有的上层有机相溶液<sup>[20]</sup>。采用测定菲标准曲线时相同的液相色谱法测定萃取液中降解底物的含量, 以未经接种相同条件下放置的含菲液体培养基为对照。

最后比对几项指标, 筛选出最符合要求的多环芳烃降解菌。

## 1.6 分子生物学鉴定

将筛选得到的菌种送至通用生物有限公司检

测,检测的 16SrDNA 结果进行 Blast 比对,绘制系统发育树。

## 1.7 离子注入诱变

### 1.7.1 低能氮离子注入

将筛选得到的多环芳烃降解菌在含 5 g/L 蛋白胨的选择培养基中活化培养。将活化后的目标菌株在含 5 g/L 蛋白胨的选择培养基中重新培养,并绘制菌种生长曲线。其中时间点选取如下:0、4、8、10、12、14、16、18、20、21、22、23、24、25、26 h。

将筛选得到的多环芳烃降解菌在含 5 g/L 蛋白胨的选择培养基中活化培养。将活化后的目标菌株培养至对数生长期,稀释涂布。用低能氮离子注入处理菌体,注入能量为 20 keV,注入剂量分别为  $10 \times 10^{14}$ 、 $20 \times 10^{14}$ 、 $40 \times 10^{14}$ 、 $60 \times 10^{14}$ 、 $80 \times 10^{14}$ 、 $100 \times 10^{14}$ 、 $120 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>。对照组处于相同条件下的靶室中,与实验组不同的是不注入低能氮离子。每组实验进行 3 次,避免系统误差。

### 1.7.2 突变株的筛选

在低能氮离子注入结束后,使用灭菌后恢复到室温的液体培养基将经处理的菌体从平板上洗脱,并稀释涂布培养。查算菌落数,对照组按照相同稀释倍数以同样条件处理培养。绘制不同离子注入剂量与离子诱变后菌体存活率的关系图<sup>[20-22]</sup>。

分别挑取经诱变处理与未经处理的单菌落,接种在 1.4 灭菌后恢复到室温的液体培养基中,培养 3 d,作为实验组与对照组。实验组中从每个剂量中随机挑选 20 个单菌落,对照组随机挑选 5 个单菌落,考察多环芳烃的降解量。其中实验组多环芳烃降解率较对照组高 10% 以上记为正突变,实验组多环芳烃降解率较对照组低 10% 以上记为负突变,根据公式(2)计算某一氮离子注入剂量下菌株正突变率,根据公式(3)计算某一氮离子注入剂量下菌株突变率。

正突变率 =

$$(\text{正突变的菌株数} / \text{选取的所有单菌落数}) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{突变率} = [(\text{正突变的菌株数} + \text{负突变的菌株数}) / \text{选取的所有单菌落数}] \times 100\% \quad (3)$$

以氮离子注入剂量与注射后菌体正突变率和菌体突变率分别为纵坐标与横坐标,绘制不同离子注入剂量与离子诱变后菌体突变率的关系图。

### 1.7.3 遗传稳定性分析

传代培养筛选得到的高效菌株。统计其在 5 代、10 代时多环芳烃降解量,判断其遗传稳定性,选取可以稳定遗传的菌株进行后续实验。

## 1.8 常温等离子体诱变

### 1.8.1 常温等离子体诱变

将 1.7.3 中选取的菌体分别按照 1.6 中的方法配制成菌悬液,取 0.01 mL 菌悬液滴加在无菌金属载片上,将滴有待处理菌液的金属片放置在诱变室内。采用常压室温等离子体诱变系统,载体为氦气,温度维持在常温(20℃)状态下,功率为 100 W,氦气流量为 10 SLPM。按照 30、60、90、120、150、180、210、240 s 不同时间条件处理菌液,得到常温等离子体诱变处理的多环芳烃降解菌,以放入诱变室但不经过处理的菌作为对照组<sup>[23-27]</sup>。

### 1.8.2 突变株的筛选

在常温等离子体诱变结束后,使用 1.4 中灭菌后恢复到室温的液体培养基将经处理的菌体从平板上洗脱。用同样的液体培养基稀释涂布在 1.4 灭菌的固体培养基中,同 1.3 条件下培养。查算菌落数,对照组按照相同稀释倍数以同样条件处理培养。绘制诱变时间与菌体死亡率的关系图。

分别挑取经诱变处理与未经处理的单菌落,接种在 1.4 灭菌后恢复到室温的液体培养基中,培养 3 d,作为实验组与对照组。实验组中从每个诱变时间中随机挑选 20 个单菌落,对照组随机挑选 5 个单菌落作为参考,考察多环芳烃的降解量,选取具有较高多环芳烃降解效率的菌株。

### 1.8.3 遗传稳定性分析

传代培养筛选得到的高效菌株。统计其在 5 代、10 代时多环芳烃降解量,判断其遗传稳定性,选取可以稳定遗传的菌株进行后续实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菲降解菌的筛选

使用液相色谱法,绘制菲的降解曲线拟合回归方程为  $y = 206.48x + 610.36$ ,其中  $R^2 = 0.999$ ,说明拟合效果较好,有使用价值。

乳化指数、发酵液表面张力以及表面活性剂增溶效果三者反映了菌株产生表面活性剂的性能,乳化指数越高、发酵液表面张力越低以及菲增容量越大表明该菌体产生的表面活性剂性能越高。菲降解量作为最重要的依据指标,采用 1.2 中的液相色谱法进行测定。

按照 1.5 中的方法,从受石油污染土样中初步筛选得到 3 株菌株,比对相关指标如表 3 所示,误差分析见表 4。

表3 初步筛得的3株菌性能指标及标准误差

编号	乳化指数/%	发酵液表面张力/(mN·m <sup>-1</sup> )	非增容量/(mg·L <sup>-1</sup> )	非降解率/%
细菌1	62.40	44.9	27.5	52.80
细菌2	48.60	57.7	18.6	48.90
细菌3	52.10	53.2	25.3	43.60

表4 误差分析

编号	乳化指数标准误差/%	发酵液表面张力标准误差/%	非增容量标准误差/%	非降解率标准误差/%
细菌1	4.60	7.30	5.62	2.14
细菌2	6.72	3.65	4.37	5.79
细菌3	5.32	6.21	8.13	4.31

从标准误差分析可以看出,所有数据标准误差均在10%以下,标准误差较小,数据波动较小,数据稳定性良好。根据上表的4项指标最终选取细菌1作为本文的研究对象,命名为J1。

根据现有的文献来看,多环芳烃降解菌产生表面活性剂的能力与菌体的种类、碳源种类、菌体生长条件等因素息息相关,任何因素的改变都会对生物表面活性剂的生成造成较大影响。因此现阶段人们利用生物表面活性剂往往是提取粗提纯产物,加入到降解体系中,进而研究其对多环芳烃的促降解情况,少有文献报道菌种在降解多环芳烃过程中伴生的生物表面活性剂。根据现有文献总结,利用铜绿假单胞菌时,发酵6d发酵液表面张力达到29.2 mN/m,其对煤油的乳化指数为65.6%,对豆油的乳化指数为66.8%,利用无色杆菌时,发酵6d发酵液表面张力降至33.2 mN/m,其对煤油的乳化指数为61.4%,对豆油的乳化指数为11.8%;在利用铜绿假单胞菌时,发酵液表面张力降至28.4 mN/m;利用铜绿假单胞菌对煤油乳化指数达到79%;利用考克氏菌对煤油的乳化指数达到37%。本研究筛选得到的菌株J1培养3d后测其发酵液,菌液的表面张力降至44.9 mN/m,对石油醚的乳化指数为62.40%。与现有报道数据相比,液体表面张力不如顶尖的生物表面活性剂,可能是因发酵时间不足,液体表面张力没有降低至最低值、乳化指数达到优秀水平。表明该菌在降解多环芳烃同时产生的生物表面活性剂性能优秀,菌株J1具有继续研究的价值。

J1的生长曲线如图1所示。由图1可知,J1在23h左右进入平稳期。

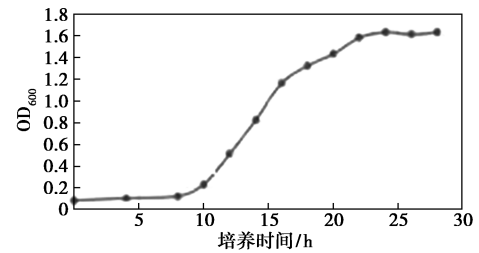


图1 菌种J1生长曲线

## 2.2 菌体的16srDNA鉴定

将该菌的16SrDNA基因序列导入NCBI进行Blast比对。菌株J1与*Stenotrophomonas maltophilia*相似度最高,亲缘关系最近,由此判断该菌种为嗜麦芽寡养单胞菌。

根据现有文献报道,利用玫瑰杆菌属新菌株SCSIO43702在10d内对100 mg/L菲的降解率最高可达96%;利用短芽孢杆菌在48h内对1 mg/L菲降解率达到98.8%,利用鞘氨醇单胞菌在56h内对1 mg/L菲降解率达到96.3%;利用不动杆菌AC在7d内对20 mg/L菲降解率达到80%;利用奥斯陆莫拉克菌属CFP312在48h内对400 mg/L菲降解率达到84%;利用弗留明拜叶林克氏菌在60h内对50 mg/L菲降解率达到99.3%;利用短芽孢杆菌在7d内对50 mg/L菲降解率达到62.09%;利用假单胞菌属*Pseudomonas* sp. DY123-6在6d内对100 mg/L菲降解率达到98%。本文筛选得到的嗜麦芽寡养单胞菌J1在3d内不添加其他辅助因素的条件下对100 mg/L菲降解率达到52.8%,显示出其对多环芳烃菲的降解能力比较出色。并且从现有资料来看,嗜麦芽寡养单胞菌在多环芳烃降解方面的应用报道鲜有发现,值得进行接下来的深入研究。

## 2.3 菌体J1的离子注入诱变

氮离子注入诱变的效果与注入剂量和注入能量密切相关,按照1.7.2中的方法绘制不同离子注入剂量与离子诱变后菌体存活率的关系图,结果如图2所示。

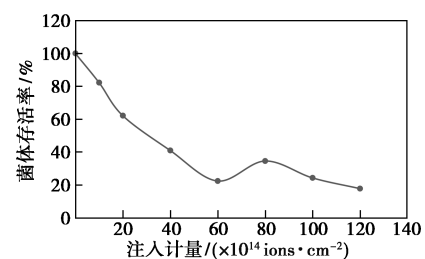


图2 注入剂量与菌体存活率关系

由图 2 可知,菌体存活率随着离子注入计量的提高出现明显的马鞍形态势,当注入剂量达到  $60 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,菌体的存活率降低至 22.7%,是马鞍区的最低点。菌体存活率之所以出现这种马鞍形态势,究其原因如下:对菌体注入低能离子时由于离子刻蚀效果的存在,细胞膜甚至细胞壁被破坏,同时细胞内大型生物活性物质因为电荷的积累也会受到损伤;当细胞内注入低能氮离子的剂量增加至某一极限值的时候,细胞自身开始修复自救,细胞存活率开始回升;随着注入计量的持续增加,外界注入的低能氮离子对细胞破坏力逐渐高于细胞自身自救能力,细胞存活率开始持续走低。从现有文献报道不难发现,在注入剂量与菌体存活率关系图中“马鞍形”区域出现菌株正突变几率最高,而突变效果最好的菌株往往出现在菌株存活率在 90% 左右的区域。

绘制不同离子注入剂量与离子诱变后菌体突变率的关系图,结果如图 3 所示。

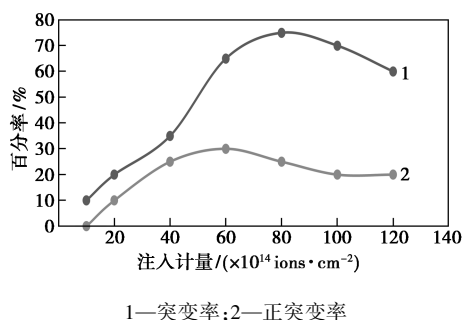


图 3 注入剂量与离子诱变后菌体突变率的关系

由图 3 可以发现正突变率最高点出现在注入剂量达到  $60 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup> 时,此时正突变率达到 30%。该注入剂量正好是在注入剂量与菌体存活率关系图中“马鞍形”区域的最低点,与大量文献中的描述相符合。

综合上述两个方面考虑,低能氮离子注入诱变的注入剂量采用  $60 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>。选取生长速度较快、成型单菌落较大的菌体进行液体发酵实验。按照 1.5 中方法测定菌种对培养基中菲的降解程度,以未经诱变的 J1 菌在相同条件下培养作为对照。5 株菌分别编号为 J1-1、J1-2、J1-3、J1-4、J1-5。经测定后该 5 株菌及对照组菌降解性能如表 5 所示。

表 5 氮离子诱变菌体菲降解程度

名称	J1-1	J1-2	J1-3	J1-4	J1-5	对照
降解程度/%	53.60	57.32	54.66	57.83	56.32	51.70

从表 5 中看到,菌株 J1-4 比对照组原始菌株的降解能力提高了 11.9%;菌株 J1-2 的降解能力提高了 10.9%。最终决定对菌株 J1-4 和菌株 J1-2 进行遗传稳定性实验,实验结果如表 6 所示。

表 6 菌株遗传稳定性实验

名称	初代/%	5代/%	10代/%
J1-4	57.83	56.11	52.33
J1-2	57.32	57.28	57.17

由表 6 可知,经过 10 代的传代培养,菌株 J1-4 对菲的降解能力明显下降,菌株 J1-2 对菲的降解能力变化不大,保持在 57.2% 左右,表明该菌株经过氮离子诱变之后具有较好的遗传稳定性,适合用于接下来的进一步实验。

#### 2.4 常温等离子体诱变

常温等离子体诱变中,由于活性物质的作用,改变细胞体表面结构及膜的通透性,同时改变细胞遗传物质及代谢通路,最终改变菌体的表征特性。绘制不同诱变时间与菌体死亡率的关系图,如图 4 所示。

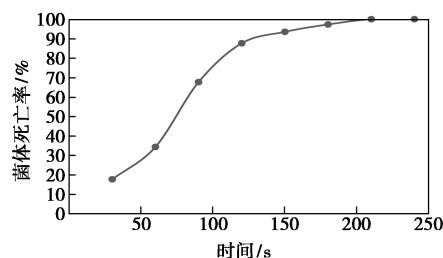


图 4 不同诱变时间与菌体死亡率的关系

由图 4 看出,常温等离子体对菌种 J1-2 损伤能力较强,120 s 前菌种死亡率随诱变时间的增长快速增长,达到 87.6%。当诱变时间达到 180 s 时,菌种死亡率达到 97.3%,随后随着时间的继续增加,菌种死亡率达到 100%。根据文献报道,考虑诱变效果,应选择菌种死亡率在 90% 左右,此时的诱变效果较佳。因此最终选择的诱变时间为 150 s。

在诱变时间为 150 s 条件下,选取生长速度较快、成型单菌落较大的菌体进行液体发酵实验。按照 1.5 中的方法测定菌种对培养基中菲的降解程度,以未经诱变的 J1-2 菌在相同条件下培养作为对照。4 株菌分别编号为 J1-2-1、J1-2-2、J1-2-3、J1-2-4。经测定后该 4 株菌及对照组菌降解性能如表 7 所示。

表7 氮离子诱变菌体非降解程度

名称	J1-2-1	J1-2-2	J1-2-3	J1-2-4	对照
降解程度/%	59.29	61.17	64.66	54.97	57.28

从表7中看到,菌株J1-2-3降解菲能力增幅最大,比对照组菌株的降解能力提高了12.89%。最终决定对菌株J1-2-3进行遗传稳定性实验,实验结果如表8所示。

表8 菌株遗传稳定性实验

名称	初代/%	5代/%	10代/%
J1-2-3	64.66	64.28	63.81

由表8可知,经过10代的传代培养,菌株J1-2-3对菲的降解能力变化不大,保持在64%左右,表明该菌株经过氮离子诱变之后具有较好的遗传稳定性,适合用于接下来的进一步实验。

对筛选得到的菌株培养5d,经测定多环芳烃菲含量仅剩3%左右,基本降解完全。

### 3 结论

采用氮离子诱变方法和常温等离子体诱变对筛选得到的嗜麦芽寡养单胞菌进行诱变处理,研究结果显示,低能氮离子注入诱变的注入剂量采用 $60 \times 10^{14}$  ions/cm<sup>2</sup>、注入能量为20 keV,常温等离子体诱变功率为100 W、诱变时间为150 s。该条件下筛选得到的菌种10代遗传稳定,对100 mg/L的菲3d降解率为64%左右,4d后降解基本完全。

经诱变处理后的菌种对菲降解效果较好、实施简便、成本较低,具有一定的应用前景。同时嗜麦芽寡养单胞菌降解菲的代谢通路有待确认,以确保不会带来二次污染。利用分子生物学手段有望再进一步提高菌种的降解能力。

### 参考文献

- [1] Crampon M, Bureau F, Akpa-Vinceslas M, et al. Correlations between PAH bioavailability degrading bacteria and soil characteristics during PAH biodegradation in five diffusely contaminated dissimilar soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(13): 8133-8145.
- [2] 环境保护部.水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法: HJ 478—2009[S].北京:中国环境科学出版社,2009.
- [3] Sorkhoh N A, Ghannoum M A, Ibrahim A S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait[J]. Environmental Pollu-

tion, 1990, 65(1): 1-17.

- [4] Lomza P, Poszytek K, Sklodowska A, et al. Evaluation of bioremediation of soil highly contaminated by petroleum hydrocarbons[J]. New Biotechnology, 2016, 141(33): 14-28.
- [5] 吴作军,卢滇楠,张敏莲,等.微生物分子生态学技术及其在石油污染土壤修复中的应用现状与展望[J].化工进展,2010,30(5): 789-795.
- [6] 周际海,袁颖红,朱志保,等.土壤有机污染物生物修复技术研究进展[J].生态环境学报,2015,24(2): 343-351.
- [7] 熊丽君,吴杰,王敏.交通道路沿线土壤多环芳烃污染及风险防控综述[J].生态环境学报,2018,27(5): 974-982.
- [8] 黄兴如,张彩文,张瑞杰,等.多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J].微生物学通报,2016,43(5): 965-973.
- [9] Alley J F, Brown L R. Use of sublimation to prepare solid microbial media with water-insoluble substrates[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 439-442.
- [10] 顾平,周启星,王鑫,等.一株土著B[a]P降解菌的筛选及降解特性研究[J].农业环境科学学报,2018,37(5): 926-932.
- [11] Bautista L F, Sanz R, Molina C M, et al. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(7): 913-922.
- [12] Aryal M, Liakopoulou-Kyriakides M. Biodegradation and kinetics of phenanthrene and pyrene in the presence of nonionic surfactants by *Arthrobacter* strain Sphe3[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 2013, 224(2): 1426.
- [13] Rodrigues A, Nogueira R, Melo L F, et al. Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 83: 48-55.
- [14] Shin K H, Ahn Y, Kim K W. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(11): 2768-2774.
- [15] Chen J, Yang J J, Zhou W J. Simultaneous removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal from co-contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(12): 2325-2329.
- [16] Schippers C, Geßner K, Müller T, et al. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture[J]. Journal of Biotechnology, 2000, 83(3): 189-198.
- [17] Bezza F A, Chirwa E M N. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 309: 563-576.
- [18] Blyth W, Shahsavari E, Morrison P D, et al. Biosurfactant from red ash trees enhances the bioremediation of PAH contaminated soil at a former gasworks site[J]. Journal of Environmental Management, 2015, 162: 30-36.
- [19] Zhao B W, Zhu L Z, Li W, et al. Solubilization and biodegradation of phenanthrene in mixed anionic-nonionic surfactant solutions[J]. Chemosphere, 2005, 58(1): 33-40.

(下转第221页)

0.5~0.8  $\mu\text{m}$ ,而PVA-VA水凝胶拥有更小的孔径,约150 nm,即具有更高的交联密度,也是其更为强韧的原因。

### 3 结论

通过在PVA溶液中引入VA,室温下一步制备了PVA基水凝胶,并对其结构与性能进行了表征。该水凝胶拥有均匀、致密的网络结构,最大应力从0.52 MPa增加到1.31 MPa,断裂伸长率从395%增加到600%。表现出与冻融水凝胶不同的塑性形变,具有3.8 MJ/m<sup>3</sup>的能量耗散,耗散系数高达85%。由于制备的水凝胶通过小分子与PVA形成氢键交联,在高低温会因为氢键的解离和再形成而具有可逆的溶胶-凝胶转变能力。可以预见,通过这种方法制备出的水凝胶,在承重生物医学领域作为关节软骨材料将具有广阔的发展潜力。

### 参考文献

- [1] Sun T L, Kurokawa T, Kuroda S, *et al.* Physical hydrogels composed of polyampholytes demonstrate high toughness and viscoelasticity [J]. *Nature Materials*, 2013, 12(10): 932-937.
- [2] Jiao C, Chen Y, Liu T, *et al.* Rigid, strong thermo-responsive shape memory hydrogels transformed from poly(vinyl pyrrolidone-co-acryloxy acetophenone) organogels [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(38): 32707-32716.
- [3] Zhang L, Wang Z, Xu C, *et al.* High strength graphene oxide/polyvinyl alcohol composite hydrogels [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(28): 10399-10406.
- [4] Grad S, Kupcsik L, Gorna K, *et al.* The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: Potential and limitations [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(28): 5163-5171.
- [5] Moutos F T, Freed L E, Guilak F A. A biomimetic three-dimensional woven composite scaffold for functional tissue engineering of cartilage [J]. *Nature Materials*, 2007, 6(2): 162-167.
- [6] 章志斌, 杜国平, 李旺, 等. 冻融法制备微米级 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/聚乙烯醇磁性水凝胶及其磁力学性能研究 [J]. *现代化工*, 2008, 28(9): 60-63.
- [7] 吴国杰, 崔英德, 柳宁, 等. 聚乙烯醇-壳聚糖互穿网络水凝胶的合成与性能研究 [J]. *现代化工*, 2006, 26(S1): 159-161.
- [8] Wang X, Yucel T, Lu Q, *et al.* Silk nanospheres and microspheres from silk/PVA blend films for drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(6): 1025-1035.
- [9] Peppas N A, Peppas N A. Turbidimetric studies of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions [J]. *Die Makromolekulare Chemie*, 1975, 176(11): 3433-3440.
- [10] Rosa C D, Auriemma F, Girolamo R D. Kinetic analysis of cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol)/water solutions by small-angle neutron scattering [M]// *Polymeric Cryogels*. Springer International Publishing, 2014.
- [11] Willcox P J, Howie D W, Schmidt-Rohr K, *et al.* Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling [J]. *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*, 1999, 37(24): 3438-3454.
- [12] Baik S, Lee H J, Kim D W, *et al.* Bioinspired adhesive architectures: From skin patch to integrated bioelectronics [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(34): 1-18.
- [13] Joshi N, Suman K, Joshi Y M. Rheological behavior of aqueous poly(vinyl alcohol) solution during a freeze-thaw gelation process [J]. *Macromolecules*, 2020, 53(9): 3452-3463.
- [14] Zhang S, Zhang Y, Li B, *et al.* One-step preparation of highly stretchable, conductive and transparent polyvinyl alcohol-phytic acid hydrogel for casual writing circuits [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(35): 32441-32448.
- [15] Cao J, Zhao X, Ye L. A facile method to fabricate super-strong and tough poly(vinyl alcohol) hydrogels with high energy dissipation [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2020, 59(22): 10705-10715.
- [16] Lin S, Liu X, Liu J, *et al.* Anti-fatigue-fracture hydrogels [J]. *Science Advances*, 2019, 5(1). DOI: 10.1126/sciadv.aau8528. ■
- [17] Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, *et al.* Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions [J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 944-968.
- [18] Feng T C, Cui C Z, Dong F, *et al.* Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 779-789.
- [19] Chang B V, Chang I T, Yuan S Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(2): 145-149.
- [20] 卫昆, 陈烁娜, 尹华, 等. 蜡状芽胞杆菌对芘的降解特性及降解酶研究 [J]. *环境科学学报*, 2016, 36(2): 506-512.
- [21] Song X H, Xu Y, Li G M, *et al.* Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecularweight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(10): 2122-2128.
- [22] Makkar R S, Rockne K J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(10): 2280-2292.
- [23] Grimberg S J, Nagel J, Aitken M D. Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactants [J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29(6): 1480-1487.
- [24] Kuppusamy S, Thavamani P, Venkateswarlu K, *et al.* Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions [J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 944-968.
- [25] Feng T C, Cui C Z, Dong F, *et al.* Phenanthrene biodegradation by halophilic *Marteella* sp. AD-3 [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4): 779-789.
- [26] Chang B V, Chang I T, Yuan S Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 80(2): 145-149.
- [27] Xu X Y, Chen X, Su P, *et al.* Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria strains enriched from Yangtze river sediments [J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(5): 513-520. ■

(上接第217页)