

doi: 10.11835/j.issn.1000-582X.2024.265

引用格式:孟韦乐, 屈健伟, 黄杰, 等. 聚苯乙烯纳米塑料和 Cu^{2+} 对施氏假单胞菌的复合胁迫研究[J]. 重庆大学学报, 2025, 48(12): 20-32.



聚苯乙烯纳米塑料和 Cu^{2+} 对施氏假单胞菌的复合胁迫研究

孟韦乐, 屈健伟, 黄杰, 杨蕊, 许小伟, 陈猷鹏, 晏鹏, 方芳, 郭劲松
(重庆大学 环境与生态学院, 重庆 400044)

摘要: 聚苯乙烯纳米塑料(PS-NPs)和 Cu^{2+} 在废水中共存可产生复合胁迫效应。采用 PS-NPs 和 Cu^{2+} 对好氧反硝化菌(施氏假单胞菌)进行胁迫, 考察了菌株的生长、脱氮以及生化特性, 通过转录组学阐明了胁迫机制。研究表明, 在 50 mg/L 的 PS-NPs 胁迫下, 菌株生长活性与对照相比提升了 25.3%, 脱氮活性提高, 有关核糖体、TCA 循环及 ABC 转运通路显著上调。在 10 mg/L 的 Cu^{2+} 胁迫下, 菌株生长活性与对照相比下降了 83.2%, 菌株受到显著抑制, 细胞膜破损, 有关核糖体、氮代谢及 ABC 转运通路代谢途径显著下调, 与胞外聚合物(EPS)分泌、细胞膜合成有关基因丰度显著上调。复合胁迫下, Cu^{2+} 胁迫占据主导地位, 但 PS-NPs 会刺激更多 EPS 产生, PS-NPs 和 EPS 可以吸附部分 Cu^{2+} , 减缓 Cu^{2+} 对菌株的损伤。

关键词: 好氧反硝化菌; 聚苯乙烯纳米塑料; 铜离子; 胁迫; 转录组学

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 1000-582X(2025)12-020-13

Combined stress effects of polystyrene nanoplastics and Cu^{2+} on *Pseudomonas stutzeri*

MENG Weile, QU Jianwei, HUANG Jie, YANG Rui, XU Xiaowei, CHEN Youpeng, YAN Peng,
FANG Fang, GUO Jinsong

(College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400044, P. R. China)

Abstract: The coexistence of polystyrene nanoplastics (PS-NPs) and Cu^{2+} in wastewater can induce compound stress effects on microorganisms. This study investigated the effects of PS-NPs and Cu^{2+} on the growth, nitrogen removal, and biochemical characteristics of the aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri*, and further elucidated the stress mechanism through transcriptomics analysis. The results showed that under exposure to 50 mg/L PS-NPs, bacteria growth activity increased by 25.3% compared to the control, accompanied by enhanced nitrogen removal and significant upregulation of genes related to ribosome function, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and ABC transport pathways. In contrast, under 10 mg/L Cu^{2+} stress, bacterial growth activity decreased by

收稿日期: 2024-03-04 网络出版日期: 2024-07-12

基金项目: 国家博士后研究人员计划(GZC20233319); 国家自然科学基金项目(42207022, 51878091)。

Supported by the National Postdoctoral Research Program (GZC20233319), and National Natural Science Foundation of China (42207022, 51878091).

作者简介: 孟韦乐(2000—), 男, 硕士研究生, 主要从事水污染控制与处理方向研究, (E-mail) 1029610401@qq.com。

通信作者: 许小伟, 男, 博士后, 主要从事水土污染治理方向研究, (E-mail) Xuxw@cqu.edu.cn。

83.2% compared to the control, with severe inhibition, cell membrane damage, and marked downregulation of ribosomal, nitrogen metabolism, and ABC transport pathways. Genes related to extracellular polymeric substances (EPS) secretion and cell membrane synthesis were significantly upregulated. Under combined stress, Cu^{2+} exerted the dominant inhibitory effect; however, PS-NPs promoted EPS secretion, which, along with PS-NPs themselves, adsorbed part of the Cu^{2+} ions and mitigated their toxicity.

Keywords: aerobic denitrifying bacteria; polystyrene nanoplastics; copper ion; combined stress; transcriptomics

生物脱氮是废水处理中不可或缺的环节,好氧反硝化菌在生物脱氮中起着重要作用。施氏假单胞菌是典型的好氧反硝化菌^[1],它能够在好氧条件下通过反硝化途径去除中水中的硝氮,在生物脱氮领域具有极好的应用潜力^[2-3]。已有研究报道了不同碳源、pH、C/N 比、溶解氧、温度等培养条件下,好氧反硝化菌的性能表现出明显差异^[4-5],但对于重金属、微塑料、抗生素等污染物如何影响好氧反硝化菌脱氮尚不明晰。

微/纳塑料作为一类新兴污染物,已引起了全球的广泛关注。目前,通常将微塑料(micropastics,MPs)定义为小于 5 mm 的颗粒,而尺寸小于 1 μm 的颗粒通常被认定为纳米塑料(nanoplastics,NPs)^[6-7]。近年来研究发现纳米塑料具有比微塑料更深远的影响^[8]。纳米塑料可以触发微生物的氧化应激反应,改变基因表达,引起代谢紊乱,阻碍微生物生长和繁殖,甚至可能导致微生物死亡等^[9-10]。据报道^[11],污水中 MPs 为每升 3.2~1 106.0 颗粒,尺寸多介于 100~1 000 μm 。以平均粒径 500 μm ,密度 1.05 g/cm^3 ^[12]估算,可知污水中 MPs 含量可达 0.22~75.92 mg/L 。进入污水处理系统后,MPs 在机械破碎、空气和水流剪切等作用下产生大量的 NPs^[13-14],并进一步被污泥吸附和富集。聚苯乙烯纳米塑料(polystyrene nanoplastics,PS-NPs)结构稳定,不易被微生物降解形成可溶解的有机化合物,在实验中常被用作模型塑料^[15-16]。Liu 等^[17]研究表明,1 mg/L 的 PS-NPs 抑制了活性污泥的氨氧化速率、硝酸盐生成速率以及反硝化速率,并且剩余污泥的短链脂肪酸产生、水解、酸化过程也受到抑制。Huang 等^[18]发现,20 mg/L 和 100 mg/L 的 PS-NPs 对活性污泥的脱氮性能有显著抑制作用。目前,已有研究仅在宏观的微生物群落层面评估了 PS-NPs 的影响,关于 PS-NPs 对相关功能菌的影响鲜有研究。

Cu^{2+} 是微生物生长的必需微量元素,但高浓度 Cu^{2+} 可造成微生物活性抑制、DNA 损伤、细胞结构和功能损伤^[19]。在冶金、化工、电镀以及农药工业废水中,铜离子含量可高达几至十几毫克每升^[20]。Yang 等^[21]发现 5 mg/L 的 Cu^{2+} 引起厌氧氨氧化颗粒污泥的活性显著降低。Ochoa-Herrera 等^[22]研究发现,50 mg/L 的 Cu^{2+} 对硝化菌和反硝化菌等多种微生物具有抑制作用,但胁迫 140 h 后,显示代谢活性有所恢复。废水中往往多种污染物共存,由于微/纳塑料具有疏水性、高表面积等特点,使 Cu^{2+} 倾向于被吸附至其表面^[23],二者在废水中共存将引起更广泛和深远的环境污染问题。目前的研究很少关注 PS-NPs 和 Cu^{2+} 复合胁迫下好氧反硝化菌生命活动的变化,对于复合胁迫效应对好氧反硝化菌的影响也尚不清楚。

笔者以好氧反硝化菌(施氏假单胞菌)为研究对象,选用 PS-NPs 和 Cu^{2+} 进行胁迫实验,考察单独及复合胁迫对菌株生长情况、脱氮性能以及生化特性等的影响。进一步结合原核转录组学分析,揭示 PS-NPs 和 Cu^{2+} 胁迫对菌株的影响机制。

1 材料与方法

1.1 胁迫实验

采用氮气保护乳液聚合法制备聚苯乙烯纳米塑料(PS-NPs)^[12,24],粒径为 $(85.2 \pm 2.3) \text{ nm}$,Zeta 电位为 $(-24.8 \pm 3.2) \text{ mV}$ 。

菌株为施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* (GenBank 登录号 FJ713783),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为 CICC 10428。菌株复壮采用胰酪大豆胨培养基(TSA 培养基),胁迫实验采用反硝化培养基(DN 培养基)^[25]。每升胰酪大豆胨培养基含 15.0 g 胰蛋白胨,5.0 g 大豆蛋白胨和 5.0 g 氯化钠,用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0~7.5。每升反硝化培养基含 0.72 g 硝酸钾(KNO_3),3.0 g 一水葡萄

糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$), 4.78 g 十二水磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 1.24 g 二水磷酸二氢钠($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), 4.0 g 氯化钠($NaCl$)和 3 mL 微量元素溶液。其中, 每升微量元素含 3.01 g 七水合硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 3.36 g 一水合硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$), 1.12 g 硼酸(H_3BO_3), 3.00 g 七水合硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.30 g 七水合硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 以及 0.6 g 无水氯化钙($CaCl_2$)。根据污水中 PS-NPs 和 Cu^{2+} 的含量, 选择 50 mg/L 的 PS-NPs 和 10 mg/L 的 Cu^{2+} 进行实验。共设置 4 个实验组, 未添加 PS-NPs 和 Cu^{2+} 的 CK 组为对照组, 50 mg/L 的 PS-NPs 为 PS 组, 10 mg/L 的 Cu^{2+} 为 CO 组, 50 mg/L 的 PS-NPs+10 mg/L 的 Cu^{2+} 为 CP 组, 分别探究 PS-NPs、 Cu^{2+} 及二者复合胁迫对菌株的影响。

将复壮后的菌悬液按照 5%(V/V) 接种至反硝化培养基中, 以 150 r/min、28 °C 条件进行培养。分别收集各实验组 0、6、12、18、24、30、36、42、48、54 h 时刻的细菌培养液, 通过 0.22 μm 滤膜过滤后获得水样。测定水样 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 质量浓度。 NO_3^- -N 采用紫外分光光度法测定, NO_2^- -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定, NH_4^+ -N 采用水杨酸-次氯酸盐分光光度法测定^[26]。

由于分散在溶液中的纳米塑料会干扰基于吸光度的细菌密度测定^[27], 故采用平板菌落计数法测试各实验组培养 24 h 后菌株的生长情况并根据式(1)计算生长活性^[28]。

$$\text{生长活性}(\%) = \frac{N_i}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中: N_i 为实验组细菌数量; N_0 为 CK 组细菌数量。

1.2 菌株生化指标检测

收集培养 24 h 后各实验组菌株, 对菌株生化指标进行检测。采用活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒检测细菌的胞内 ROS 水平(北京索莱宝科技有限公司); 采用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性检测试剂盒检测细菌 LDH 的释放量(北京索莱宝); 硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)和亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NiR)的活性采用试剂盒测定(苏州格锐思生物科技有限公司); 菌株的微观形貌通过扫描电镜(ZEISS Gemini 300, 德国)观察。

1.3 胞外聚合物的提取与实验

采用阳离子树脂法提取各实验组培养 24 h 后菌株的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)^[29]。采用 BCA 试剂盒(北京索莱宝)测定 EPS 中的蛋白质含量, 采用蒽酮-硫酸法测定多糖含量。将提取的 EPS 液置于 -35 °C 下冷冻干燥成固体粉末, 采用 FTIR 光谱仪(NicoLet iS50, Thermo, USA)测定 4 000~400 cm^{-1} 波长范围的红外光谱, 并将数据归一化处理。采用多功能 X 射线光电子能谱仪(ESCALAB250Xi, Thermo, USA)在 0~1 200 eV 范围下对 EPS 粉末进行全范围扫描, 并对 C 1s、N 1s 和 O 1s 元素进行高分辨扫描。

此外, 将提取 EPS 后的菌株以 5%(V/V) 接种至各实验组反硝化培养基中, 实验组的设置同胁迫实验。收集各实验组培养 24 h 的细菌测试各实验组菌株的生长活性, 通过对比未去除 EPS 菌株的生长活性, 考察 EPS 在菌株响应 PS-NPs 和 Cu^{2+} 胁迫中发挥的作用。

1.4 转录组学分析

收集各实验组培养 24 h 后的菌悬液进行转录组测序分析, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行建库测序。根据京都基因和基因组百科全书(KEGG)对序列进行注释, 鉴定功能基因并分析代谢途径。基于每千碱基/百万映射读取的映射数(FPKM)对不同样本之间的原始计数进行归一化, 分析和鉴定不同组之间的差异表达基因。差异表达基因(DEGs)为 $|\log_2 FC| \geq 1$ 且调整后 P 值 < 0.05 的基因。

1.5 数据分析及处理

通过方差分析(ANOVA)检验结果的显著性, $P < 0.05$ 时, 数据具有显著性差异, 并在图中以不同字母表示。采用 Origin 2021a 软件进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌株在胁迫下的生长情况及脱氮性能

各实验组胁迫 24 h 后菌株的生长活性如图 1(a) 所示。相比 CK 组, PS 组菌株的生长活性显著增强 ($P < 0.05$), 提升了 25.3%。CO 组菌株的生长活性相比 CK 组下降了 83.2%, 表明 Cu^{2+} 对好氧反硝化菌的生长具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)。CP 组菌株的生长活性比 CK 组下降了 78.2% ($P < 0.05$)。CP 组中 PS-NPs 的存在使菌株的生长活性相比 CO 组有所提升, 说明 PS-NPs 一定程度上缓解了 Cu^{2+} 对细菌的生长抑制作用, 但 Cu^{2+} 胁迫仍占据主导地位。

菌株的脱氮情况如图 1(b)~(d) 所示。由图 1(b) 可知, 相比 CK 组, PS 组菌株对硝氮的去除进程有所提前, 菌株 24 h、48 h 的硝氮去除率分别为 15.2%、73.7%, 而 CK 组菌株在 24 h、48 h 的去除率分别为 7.5%、61.6%。CO 组菌株 24 h、48 h 的硝氮去除率分别为 2.7%、7.9%, 且 54 h 的硝氮去除率仅有 27.5%, 表明 Cu^{2+} 对菌株的脱氮抑制作用尤为明显, 这与 Cu^{2+} 对菌株生长的显著抑制作用相符。CP 组菌株 24 h、48 h 的硝氮去除率分别为 9.6%、45.1%, 在 54 h 的硝氮的去除率可达 72.6%, 表明 PS-NPs 的存在缓解了 Cu^{2+} 对菌株脱氮的抑制作用。

如图 1(c)(d) 所示, 与 CK 组相比, PS 组亚硝氮和氨氮积累峰值的时间有所提前, 这与硝氮降解进程提前的现象相符, 但峰值无明显变化。CO 组菌株在氮去除过程中的亚硝氮和氨氮积累明显增加。CP 组菌株的亚硝氮和氨氮积累峰值和历时有所降低, 但仍高于 CK 和 PS 组的积累程度。

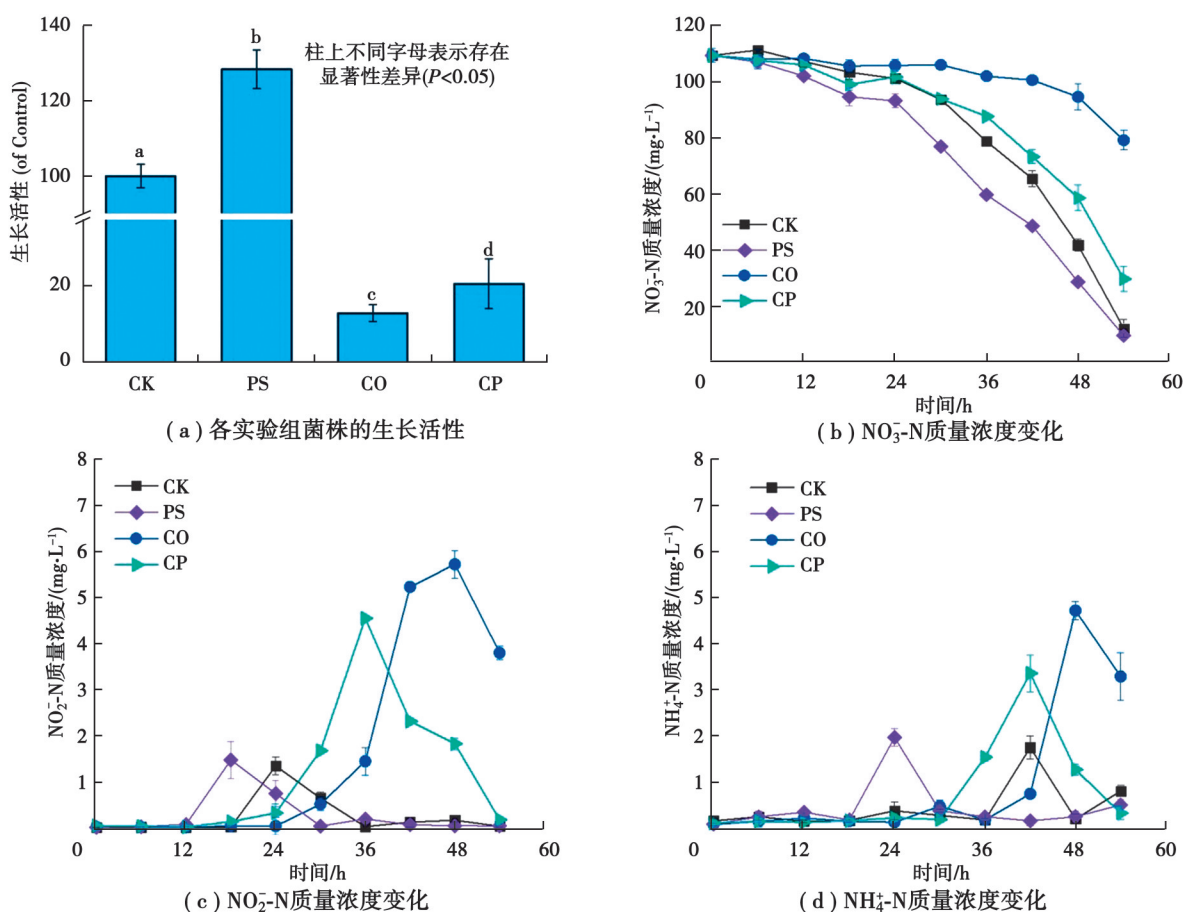


图 1 各实验组菌株的生长活性以及 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的质量浓度变化

Fig. 1 Growth activity and $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentrations of bacteria in each experimental group

2.2 菌株在胁迫下的生化响应及微观形貌

环境中有毒物质的刺激会导致细胞内产生过量的ROS,它们是生物氧代谢的有害副产物^[30],可以在细胞内引起氧化应激,导致DNA、蛋白质和脂质等生物分子的氧化损伤^[31]。如图2(a)所示,PS组菌株的ROS水平相比CK组增加了15.3% ($P<0.05$)。尽管PS-NPs一定程度上诱导了菌株氧化应激水平升高,但并未引起菌株生长及脱氮活性的降低。CO组菌株的ROS水平显著上升,与CK组相比增加了115.5% ($P<0.05$)。CP组菌株ROS水平也有所升高,比CK组上升了110.3%,与CO组的ROS水平接近,表明 Cu^{2+} 是复合胁迫中诱导细菌产生氧化应激的主要因素。

当细菌的细胞膜被损伤时,LDH会从胞内释放出来,可以通过测定LDH释放量来表征细胞膜的完整性^[10]。如图2(b)所示,PS组菌株的LDH释放量与CK组相比差异不大。CO组菌株的LDH释放量显著增加 ($P<0.05$),相比CK组增加了163.4%,表明 Cu^{2+} 胁迫对菌株造成了显著的细胞膜损伤。CP组菌株的LDH释放量比CK组增加了94.7%,表明复合胁迫仍对细菌造成了显著的细胞膜损伤,但PS-NPs存在时LDH释放量显著低于 Cu^{2+} 单独胁迫 ($P<0.05$),可见PS-NPs一定程度缓解了 Cu^{2+} 对细胞膜的损伤。

PS-NPs与 Cu^{2+} 胁迫下好氧反硝化菌的NR活性如图2(c)所示。PS组菌株的NR活性与CK组相比显著提升 ($P<0.05$)。CO组菌株的NR活性相比CK组降低了76.4%,CP组菌株的NR活性相比CK组降低了50.2%,说明 Cu^{2+} 的存在显著抑制了细菌的NR活性 ($P<0.05$)。此外,CP组NR活性与CO组相比显著上升 ($P<0.05$),这从酶活性的角度表明了PS-NPs能够一定程度上缓解 Cu^{2+} 对脱氮的抑制作用。

菌株的NiR活性如图2(d)所示。同样地,发现PS组菌株的NiR显著活性升高 ($P<0.05$),而CO和CP组菌株的NiR活性普遍显著降低 ($P<0.05$)。CP组的NiR活性与CO组相比显著上升 ($P<0.05$),这与CP组亚硝氮的积累更少的现象相符,说明PS-NPs的存在能够一定程度上缓解 Cu^{2+} 引起的亚硝氮积累。

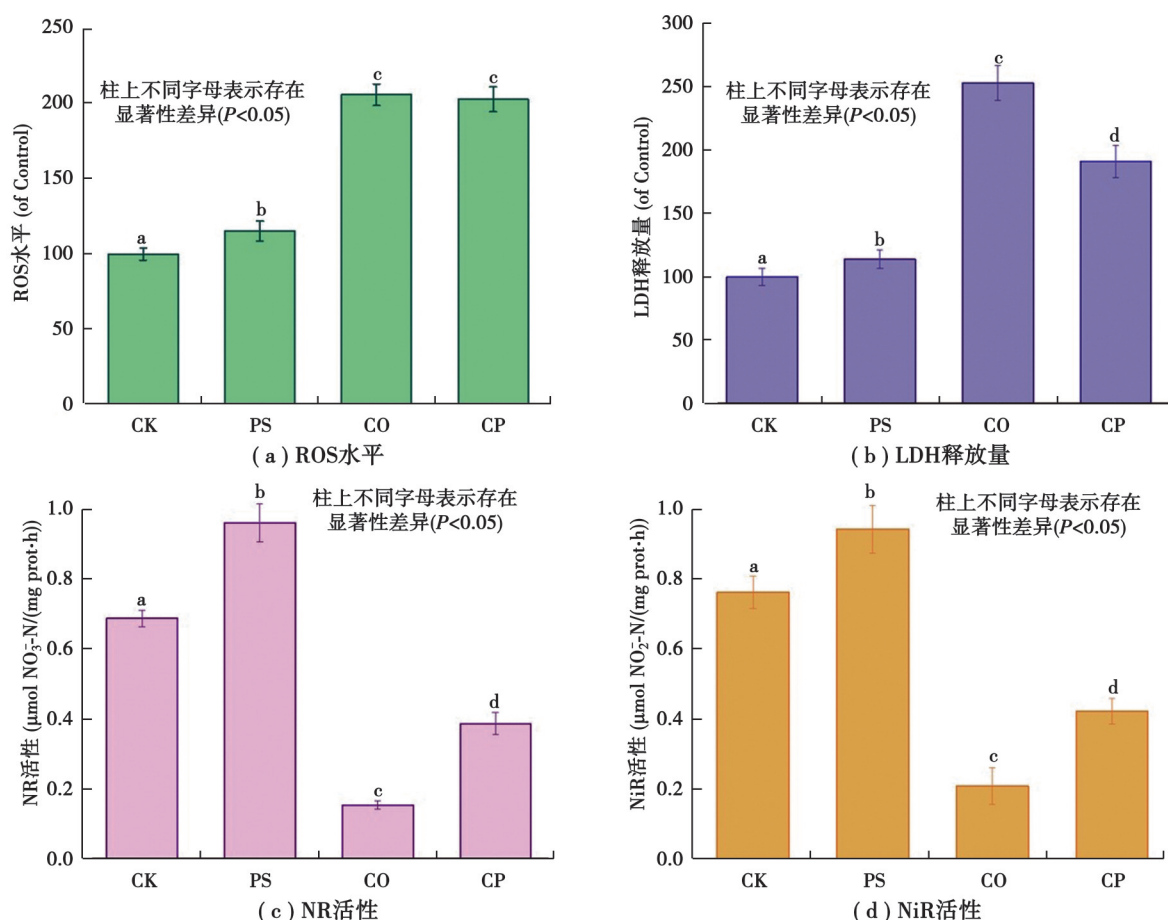


图2 各实验组菌株的ROS水平、LDH释放量、NR活性,以及NiR活性

Fig. 2 ROS level, LDH release, NR activity, and NiR activity of bacteria in each experimental group

如图 3 所示,CK 组的菌株呈短杆状,细菌颗粒饱满,结构完整。PS 组观察到较多塑料微粒和细菌团聚在一起,塑料微粒的数量增多,菌株聚集程度增加,大部分菌株的形态依然完整。值得注意的是,CO 组大量菌株受损,表面出现凹陷,细胞膜破裂的受损程度明显提高,菌株形态发生了明显变化。CP 组菌株的受损程度仍然较为严重,观察到大量塑料微粒与细菌团聚在一起,与 PS 组的现象相同。上述结果表明复合胁迫下 PS-NPs 的存在虽然能够促进细菌的聚集,但 Cu²⁺对细菌的抑制作用仍占据主导,Cu²⁺单独胁迫和复合胁迫均对细菌造成严重损伤。

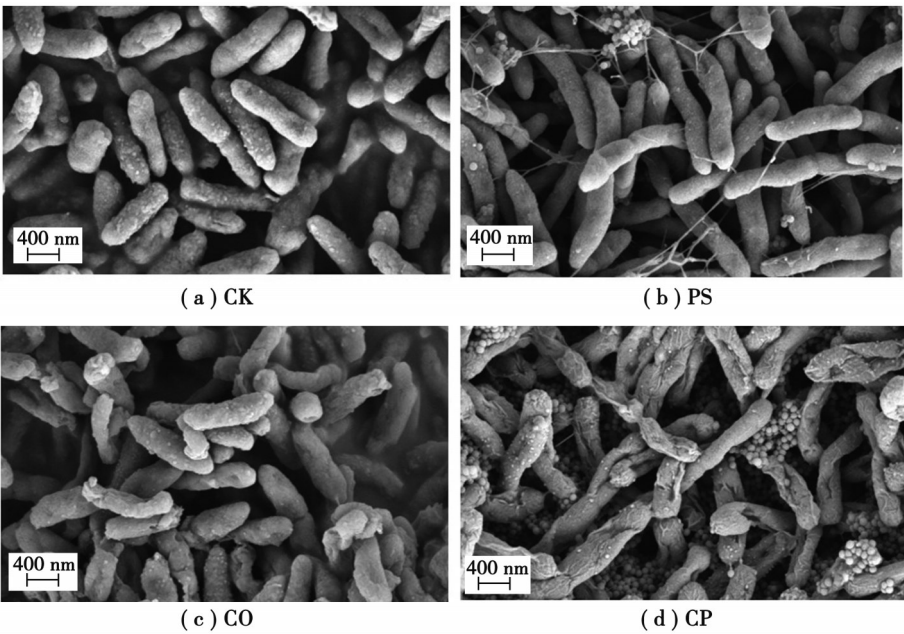


图 3 各实验组菌株的扫描电镜图像

Fig. 3 Scanning electron microscope images of bacteria in each experimental group

2.3 胞外聚合物在菌株响应胁迫中的作用

EPS 可以保护细胞免受有毒物质的外部刺激,对细胞聚集、生物吸附和稳定系统的污染物去除效率至关重要^[32]。如图 4(a)所示,与 CK 组相比,PS 组菌株 EPS 含量没有明显变化,但胞外蛋白的占比有所增加,蛋白组分的增加使得 EPS 的疏水性增强,进而有利于微生物的聚集^[33]。而 CO 和 CP 组菌株的 EPS 总量大幅度增加,并且蛋白成分的占比显著升高。已有研究也报道过类似的现象,Xie 等^[34]发现 Cu²⁺胁迫使得生物膜中 EPS 含量升高,并且 EPS 中蛋白与多糖含量的比值从 0.93 增加到 1.99。可见,Cu²⁺会使菌株产生更多 EPS。此外,Cu²⁺胁迫导致细菌的细胞膜出现严重破损,胞内物质的泄露也可能是导致 EPS 显著增多的原因之一。

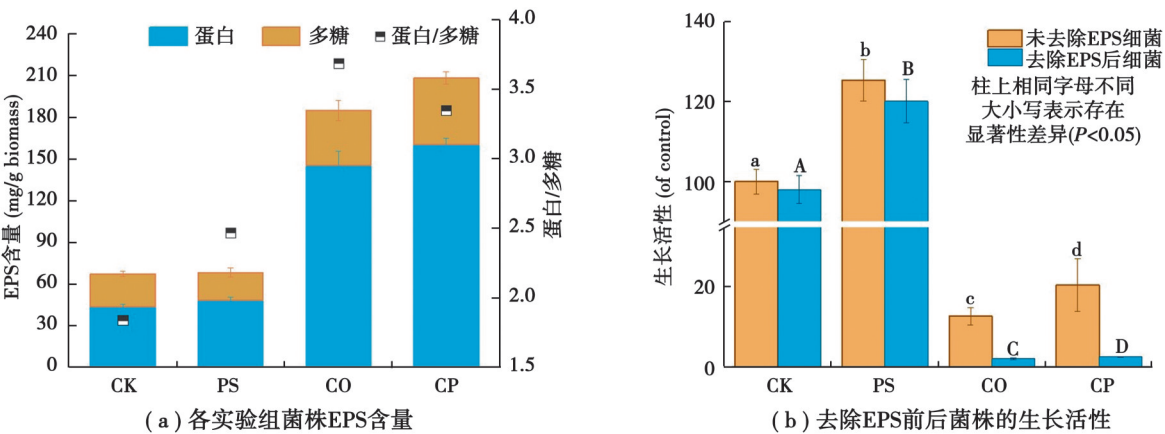


图 4 各实验组菌株 EPS 含量以及去除 EPS 前后菌株的生长活性

Fig. 4 EPS content of bacteria in each experimental group and growth activity of bacteria before and after removal of EPS

未去除EPS和去除EPS后菌株在胁迫下的生长情况如图4(b)所示。去除EPS后菌株的生长活性普遍低于未去除EPS菌株。PS组去除EPS的菌株生长活性与未去除EPS的菌株相比有所降低,表明去除EPS后削弱了PS-NPs对菌株生长的促进作用。CO和CP组去除EPS后的菌株生长活性受到显著的抑制作用。这是由于EPS可以提供吸附位点与金属离子发生结合,降低了金属离子对细菌的抑制^[35-36]。

各实验组胞外聚合物FTIR分析结果如图5(a)所示,各实验组均会对EPS官能团产生一定程度的影响。与CK组相比,各实验组菌株EPS几处特征峰的强度发生了变化。 $3\ 343\text{ cm}^{-1}$ 附近的宽重叠峰归属于N—H、O—H的伸缩振动^[37-38],N—H、O—H有利于蛋白质等分子间氢键的形成,氢键含量的增加有利于菌株之间的聚集,PS和CP组该峰增强表明PS-NPs有利于菌株的聚集。 $900\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 之间的光谱指纹区,包含芳香族的环振动^[39],PS和CP组该区域峰值的增加表明PS-NPs可与EPS相互作用并被EPS吸附。各实验组胞外聚合物XPS分析结果如图5(b)所示,菌株的EPS主要包含C、N、O等元素。其中C是EPS的主要元素。图6为各实验组菌株EPS的C 1s峰高分辨扫描谱,在C 1s峰谱中检测出3个信号峰,结合能分别在284.08 eV、285.80 eV和287.67 eV附近。结合能在285.80 eV附近的C 1s峰归属于蛋白质和多糖中醇、酰胺基团等的 $\text{C}-(\text{O}, \text{N})$ ^[40],结合能在287.67 eV附近的信号峰归属于羧酸盐、羰基、酰胺等的 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ ^[41],CO和CP组EPS中这些官能团含量的升高有利于EPS结合 Cu^{2+} ,缓解菌株所受到的胁迫。

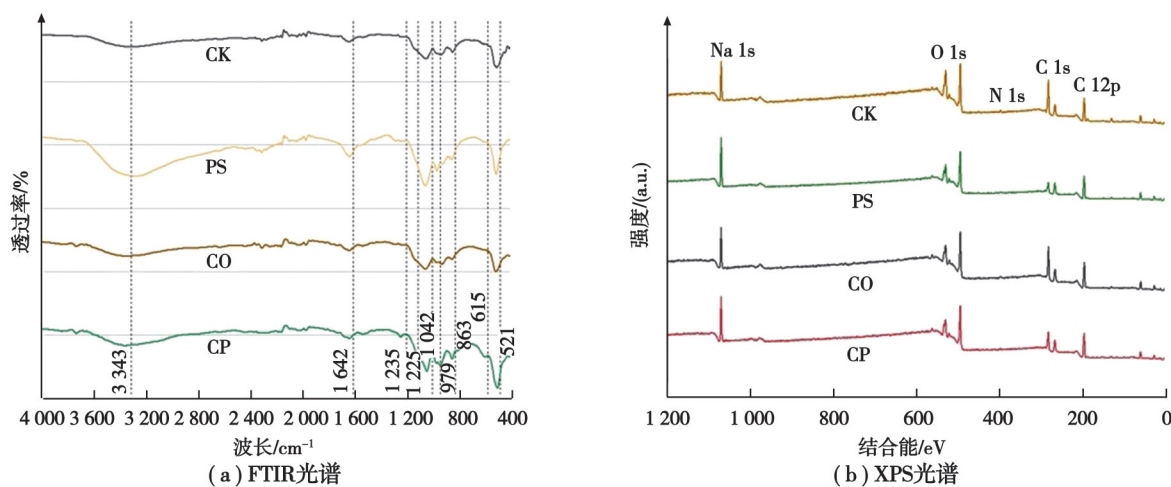
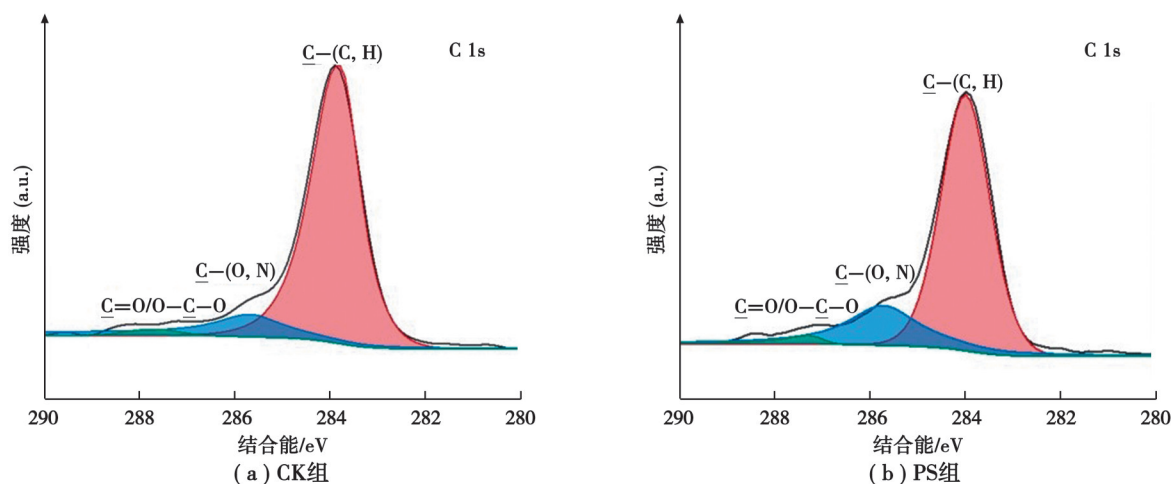


图5 各实验组菌株EPS的FTIR光谱和XPS能谱

Fig. 5 FTIR spectrum and XPS energy spectrum of C1s peak of EPS in each experimental group



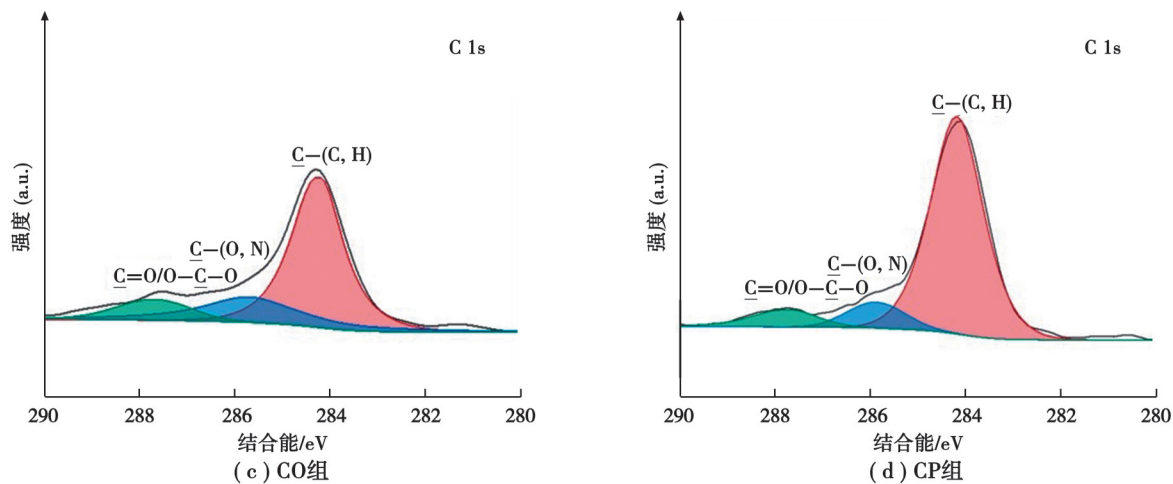


图 6 各实验组菌株 EPS 的 C 1s 峰高分辨扫描谱

Fig. 6 The high-resolution scanning spectrum of C 1s peak of EPS in each experimental group

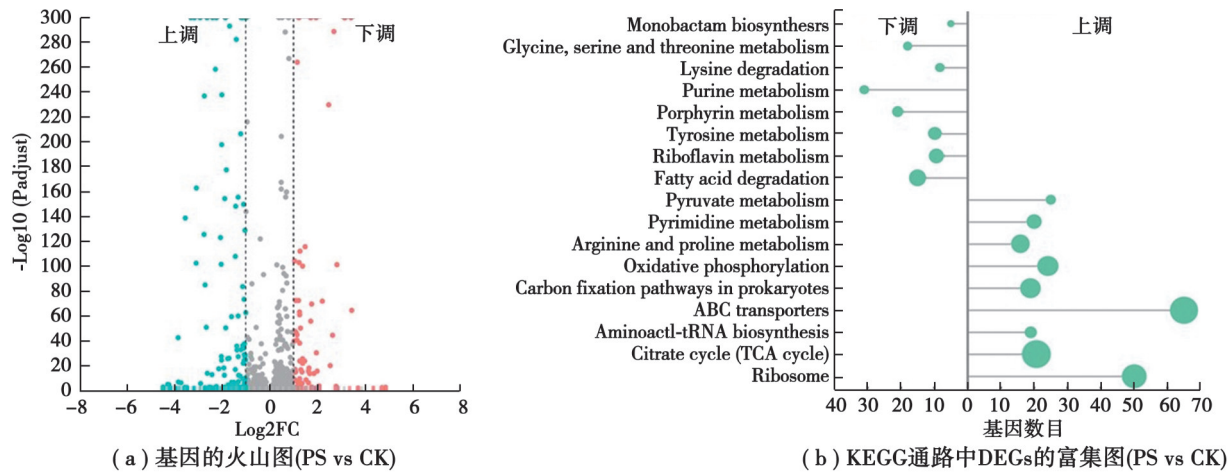
2.4 胞外聚合物在菌株响应胁迫中的作用

2.4.1 KEGG 通路富集分析

各组与 CK 组相比,菌株受到胁迫后差异表达基因数量如图 7(a)(c)(e)所示。PS 组有 84 个基因上调,139 个基因下调。CO 组有 819 个基因上调,288 个基因下调。CP 组有 1 588 个基因上调,403 个基因下调。这表明 Cu²⁺ 及 Cu²⁺ 与 PS-NPs 复合胁迫会对菌株产生更强烈的影响,菌株通过调整基因表达来抵抗。

选取具有显著差异的通路进行分析($P<0.05$),KEGG 通路富集分析如图 7(b)(d)(f)所示,富集图圈越大代表显著性越高,PS 组菌株上调最为显著的通路是核糖体、TCA 循环以及 ABC 转运蛋白。核糖体是生物翻译的主要场所,其主导的氨基酸和蛋白质合成被认为是细胞生命的主要过程^[42-43],该通路上调能够调节胞内过程并协调菌株的转录翻译,有利于菌株在 PS-NPs 胁迫下的生长代谢。TCA 循环是微生物的中枢代谢途径之一^[44],该通路上调表明菌株能够产生更多的物质和能量来缓解 PS-NPs 的胁迫。ABC 转运蛋白是广泛存在于原核生物细胞膜上的跨膜转运蛋白,该通路上调表明 ATP 驱动进行多种底物的特异性跨膜主动运输增强。此外,显著上调的通路还有原核生物的碳固定和氧化磷酸化,这些通路均会参与细菌的能量代谢。由此可知,NPs 胁迫会促进细菌的蛋白质生物合成和能量代谢,有助于细菌生长代谢,表现为脱氮性能增强。

CO 组上调的通路主要富集于嘌呤代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解通路。这些氨基酸代谢通路的增强有助于 EPS 胞外蛋白的完整合成^[45],阻挡 Cu²⁺ 进入细胞。下调的通路主要富集于核糖体、氮代谢以及 ABC 转运通路,表明蛋白质合成、氮转化和跨膜主动运输的酶和蛋白减少^[42]。核糖体通路的下调最终会削弱细菌的能量产生系统,导致能量合成减少,影响氮代谢。ABC 转运通路的下调是由于菌株的细胞膜受到损伤,相关转运体受到影响。



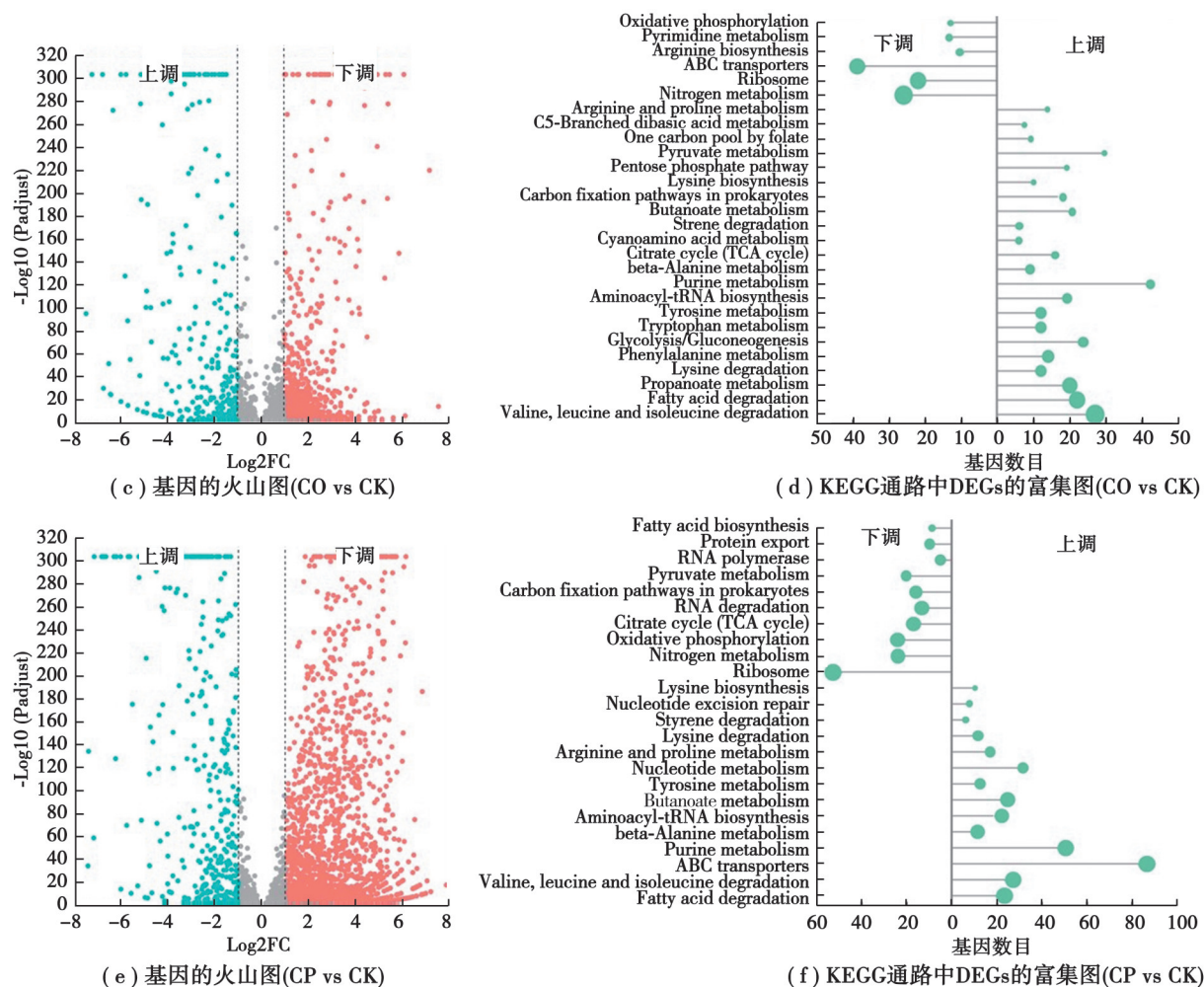


图7 各实验组间基因的火山图以及KEGG通路中DEGs的富集图

Fig. 7 Volcano map of inter-group genes in each experimental group and DEGs enrichment map in KEGG pathway

值得注意的是,CP组大多数上下调通路与CO组相似,但ABC转运通路表现为显著上调,这可能是由于NPs带负电荷,一定程度上可以吸附部分 Cu^{2+} ,从而使得细胞膜损伤减弱。

2.4.2 相关基因表达分析

过量的ROS可以在细胞内引起氧化应激,而谷胱甘肽代谢可以参与清除ROS^[25]。如图8(a)所示,与CK组相比,PS-NPs胁迫会引起菌株抗氧化系统一定程度的调节,但并无显著性变化。CO、CP组有关谷胱甘肽代谢途径的基因(如ggt和gst)表达与CK组相比显著上调,这些基因的上调可以提升菌株清除ROS的能力,从而减缓 Cu^{2+} 对细菌的抑制作用。

细胞膜是细菌的保护屏障^[46],如图8(b)所示,与CK组相比,PS组有关细胞膜合成的基因(mrdA、hsbA、gmhC、pilG等)变化不大,但CO组有关细胞膜合成的基因与CK组相比明显上调,这是由于 Cu^{2+} 胁迫损坏了菌株的细胞膜,从而上调有关细胞膜合成基因来抵抗 Cu^{2+} 的胁迫。CP组有关细胞膜合成的基因与CK组相比也有所上调,但大多数基因上调水平要小于CO组,这是由于NPs可以吸附部分 Cu^{2+} ,使进入细胞的 Cu^{2+} 较少,从而减少 Cu^{2+} 对细胞膜的损伤。

EPS有利于细胞聚集,有助于减轻外界对细菌的毒性^[47]。如图8(c)所示,各实验组有关EPS基因(glgB、malZ、pgi等)的表达与CK组相比均有所上调,CP组中malZ和pgm基因上调尤为明显。这些基因与氨基糖和核苷酸糖代谢以及淀粉和蔗糖代谢相关,上调可以分泌更多的EPS^[48]。相应地,CP组的EPS含量高于PS和CO组(见图4(b))。更多EPS的产生可以抵御 Cu^{2+} 进入细胞,从而减缓 Cu^{2+} 对菌株生长以及脱氮抑制效果。

根据上述结果,提出了 PS-NPs 和 Cu^{2+} 胁迫对好氧反硝化菌的影响机制。PS-NPs 胁迫下菌株有关能量合成、蛋白质合成以及转录相关通路显著上调,从而促进菌株生长,提升脱氮性能。 Cu^{2+} 胁迫破坏了菌株的细胞膜完整性并进入胞内,刺激菌株产生大量 ROS,导致 LDH 泄露以及增殖受阻,从而抑制细菌的生长和脱氮性能。复合胁迫下 PS-NPs 会刺激更多 EPS 产生,PS-NPs 和 EPS 可以吸附部分 Cu^{2+} ,减少进入细胞的 Cu^{2+} ,缓解 Cu^{2+} 导致的细胞损伤。

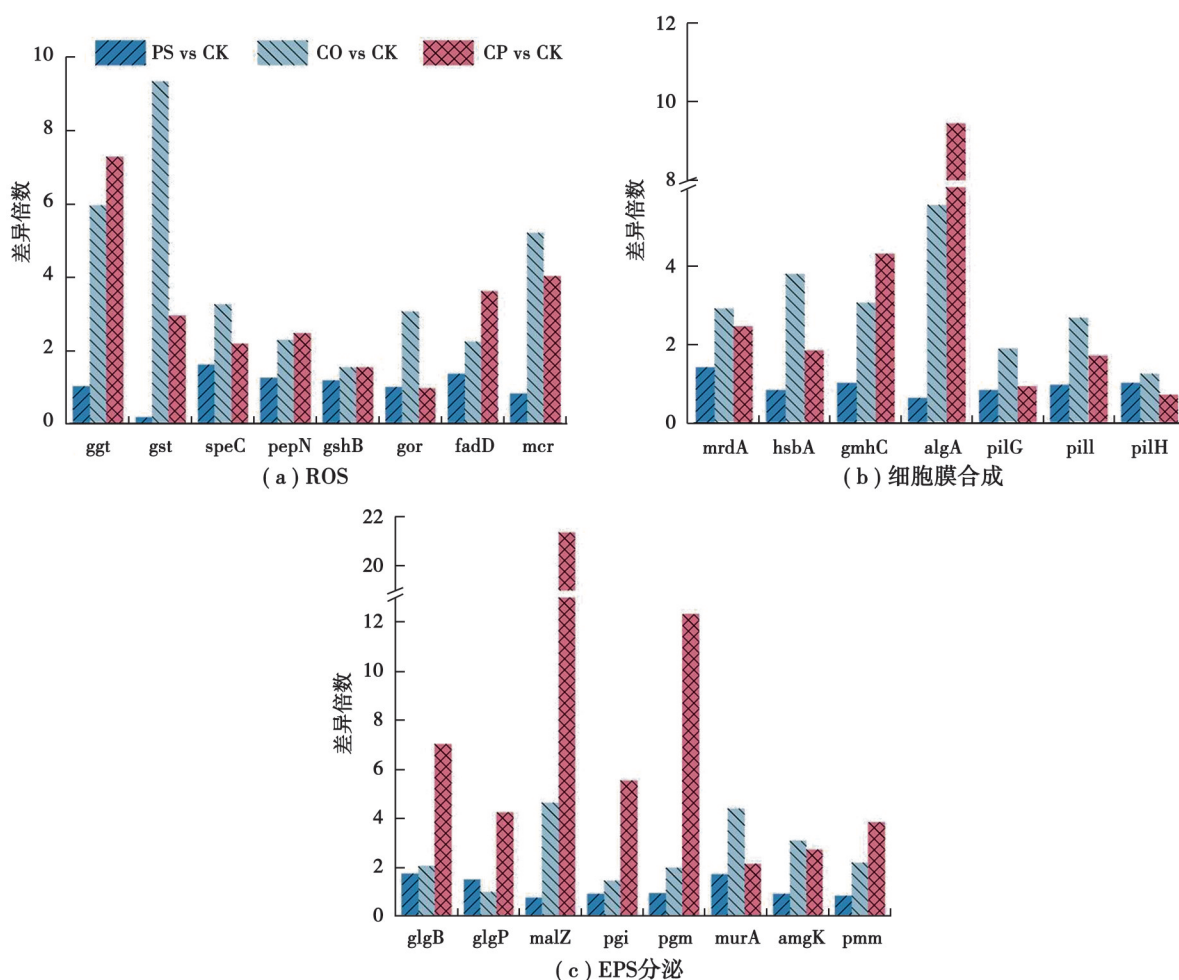


图 8 各实验组有关 ROS、细胞膜合成和 EPS 分泌相关的基因表达变化

Fig. 8 Gene expression changes related to ROS, cell membrane synthesis and EPS secretion in each experimental group

3 结 论

1) PS-NPs 胁迫促进了菌株的生长和脱氮,而 Cu^{2+} 胁迫使菌株的生长活性下降了 83.2%,脱氮进程和氮还原酶活性受到显著抑制,而复合胁迫下 PS-NPs 的存在缓解了 Cu^{2+} 的抑制作用。

2) PS-NPs 胁迫未造成菌株显著的氧化应激和细胞膜损伤,PS-NPs 与菌株聚集并吸附在细菌表面,而 Cu^{2+} 胁迫使菌株 ROS 水平显著升高了 115.5%,细胞膜严重破损,菌株表面出现凹陷。复合胁迫下,菌株受损得到缓解。

3) 去除 EPS 后,菌株的生长活性普遍低于未去除 EPS 菌株。 Cu^{2+} 胁迫及复合胁迫下 EPS 含量显著升高,蛋白组分显著增加,羧酸盐、羰基、酰胺等官能团含量增加,进而缓解 Cu^{2+} 胁迫。

4) PS-NPs 胁迫下菌株有关核糖体、TCA 循环及 ABC 转运通路显著上调,从而促进菌株生长和脱氮。 Cu^{2+} 胁迫下菌株有关核糖体、氮代谢及 ABC 转运通路显著下调,显著抑制了菌株的生长和脱氮,而与 EPS 分

泌、细胞膜合成基因丰度显著上调有利于菌株抵抗 Cu^{2+} 胁迫。复合胁迫下,菌株上下调通路与 Cu^{2+} 胁迫相似,菌株的生长和脱氮仍受到较为严重的抑制,但 ABC 转运通路、有关 EPS 分泌基因上调有助于菌株抵抗 Cu^{2+} 胁迫,缓解抑制作用。

参考文献

- [1] Qian Y, Qiao W C, Zhang Y H. Toxic effect of sodium perfluorononyloxy-benzenesulfonate on *Pseudomonas stutzeri* in aerobic denitrification, cell structure and gene expression[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2021, 15(5): 100.
- [2] 徐富强, 桂梦瑶, 杜俊逸, 等. 典型工业污染物对好氧反硝化菌群脱氮性能及群落结构的影响[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(10): 2442-2450.
Xu F Q, Gui M Y, Du J Y, et al. Effects of typical industrial pollutants on the denitrification performance and the community structure of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2019, 13(10): 2442-2450. (in Chinese)
- [3] Guo L, Li L S, Zhou S B, et al. Metabolomic insight into regulatory mechanism of heterotrophic bacteria nitrification-aerobic denitrification bacteria to high-strength ammonium wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 394: 130278.
- [4] Hao Z L, Ali A, Ren Y, et al. A mechanistic review on aerobic denitrification for nitrogen removal in water treatment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 847: 157452.
- [5] Song T, Zhang X L, Li J, et al. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 801: 149319.
- [6] Thompson R C, Olsen Y, Mitchell R P, et al. Lost at sea: where is all the plastic?[J]. *Science*, 2004, 304(5672): 838.
- [7] Mitrano D M, Wick P, Nowack B. Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution[J]. *Nature Nanotechnology*, 2021, 16: 491-500.
- [8] Pelegrini K, Pereira T C B, Maraschin T G, et al. Micro- and nanoplastic toxicity: a review on size, type, source, and test-organism implications[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 878: 162954.
- [9] Hanif M A, Ibrahim N, Dahalan F A, et al. Microplastics and nanoplastics: recent literature studies and patents on their removal from aqueous environment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 810: 152115.
- [10] Matthews S, Mai L, Jeong C B, et al. Key mechanisms of micro- and nanoplastic (MNP) toxicity across taxonomic groups[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP*, 2021, 247: 109056.
- [11] Wu X W, Zhao X L, Chen R Z, et al. Wastewater treatment plants act as essential sources of microplastic formation in aquatic environments: a critical review[J]. *Water Research*, 2022, 221: 118825.
- [12] Xu S S, Li H X, Wang G L, et al. Effects of long-term exposure to low-concentration PS-NPs on anammox granular sludge: resistance and inhibition depend on PS-NP accumulation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 365: 132902.
- [13] Enfrin M, Lee J, Gibert Y, et al. Release of hazardous nanoplastic contaminants due to microplastics fragmentation under shear stress forces[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121393.
- [14] Mohana A A, Farhad S M, Haque N, et al. Understanding the fate of nano-plastics in wastewater treatment plants and their removal using membrane processes[J]. *Chemosphere*, 2021, 284: 131430.
- [15] Qian J, He X X, Wang P F, et al. Effects of polystyrene nanoplastics on extracellular polymeric substance composition of activated sludge: the role of surface functional groups[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 279: 116904.
- [16] Torres-Ruiz M, De la Vieja A, de Alba Gonzalez M, et al. Toxicity of nanoplastics for zebrafish embryos, what we know and where to go next[J]. *The Science of the Total Environment*, 2021, 797: 149125.
- [17] Liu Q, Li L, Zhao X L, et al. An evaluation of the effects of nanoplastics on the removal of activated-sludge nutrients and production of short chain fatty acid[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2021, 148: 1070-1076.
- [18] Huang S C, Zhang B, Zhao Z W, et al. Metagenomic analysis reveals the responses of microbial communities and nitrogen metabolic pathways to polystyrene micro(nano)plastics in activated sludge systems[J]. *Water Research*, 2023, 241: 120161.
- [19] Jiang Y, Liu Y, Zhang H N, et al. Aerobic granular sludge shows enhanced resistances to the long-term toxicity of $\text{Cu}(\text{II})$ [J]. *Chemosphere*, 2020, 253: 126664.
- [20] Li R J, Tao J X, Huang D L, et al. Investigating the effects of biodegradable microplastics and copper ions on probiotic (*Bacillus amyloliquefaciens*): toxicity and application[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443(Pt A): 130081.

- [21] Yang G F, Ni W M, Wu K, et al. The effect of Cu(II) stress on the activity, performance and recovery on the anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) process[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 226: 39-45.
- [22] Ochoa-Herrera V, León G, Banihani Q, et al. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems[J]. The Science of the Total Environment, 2011, 412/413: 380-385.
- [23] Wang Y, Wang X J, Li Y, et al. Biofilm alters tetracycline and copper adsorption behaviors onto polyethylene microplastics[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 392: 123808.
- [24] Feng L J, Shi Y, Li X Y, et al. Behavior of tetracycline and polystyrene nanoparticles in estuaries and their joint toxicity on marine microalgae *Skeletonema costatum*[J]. Environmental Pollution, 2020, 263(Pt A): 114453.
- [25] Wang X, Chen Y P, Liu S Y, et al. The effect of silver nanoparticles on aerobic denitrifying bacteria during biological nitrogen removal: a new perspective based on morphological effects[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 471: 144538.
- [26] 国家环境保护总局,《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境出版社, 2002. State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China, Editorial Board of Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (in Chinese)
- [27] Qiu T A, Nguyen T H T, Hudson-Smith N V, et al. Growth-based bacterial viability assay for interference-free and high-throughput toxicity screening of nanomaterials[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(3): 2057-2064.
- [28] Sun X M, Chen B J, Li Q F, et al. Toxicities of polystyrene nano- and microplastics toward marine bacterium *Halomonas alkaliphila*[J]. The Science of the Total Environment, 2018, 642: 1378-1385.
- [29] Wei X, Fang L C, Cai P, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1369-1374.
- [30] Scandalios J G. The rise of ROS[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(9): 483-486.
- [31] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. Cell, 2005, 122(2): 221-233.
- [32] 康福星, 龙健, 王倩, 等. 微生物胞外聚合物对水体重金属和富营养元素的环境生化效应研究展望[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(1): 129-134.
Kang F X, Long J, Wang Q, et al. Environmental & biochemical effects of microbial extracellular polymeric substances on the heavy metals and eutrophic elements in water areas: a review[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(1): 129-134. (in Chinese)
- [33] Feng L J, Wang J J, Liu S C, et al. Role of extracellular polymeric substances in the acute inhibition of activated sludge by polystyrene nanoparticles[J]. Environmental Pollution, 2018, 238: 859-865.
- [34] Xie T H, Xi Y N, Liu Y F, et al. Long-term effects of Cu(II) on denitrification in hydrogen-based membrane biofilm reactor: performance, extracellular polymeric substances and microbial communities[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 830: 154526.
- [35] Zhang L, Yang X, Li S S, et al. A contrast of Pb(II), Cd(II), and Cu(II) toxicities to *Aspergillus niger* through biochemical, morphological, and genetic investigations[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 446: 130691.
- [36] 黄祥武, 宋卫锋, 杨佐毅, 等. 碳源诱导下 *D. desulfuricans* sub sp. EPS 特性及对 Cd(II) 的吸附[J]. 中国环境科学, 2023, 43(6): 2889-2898.
Huang X W, Song W F, Yang Z Y, et al. The EPS characteristics of *D. desulfuricans* sub sp. and its adsorption performance for Cd(II) under carbon source induction[J]. China Environment Science, 43(6): 2889-2898. (in Chinese)
- [37] Lian Z Y, Yang Z Y, Song W F, et al. Effects of different exogenous cadmium compounds on the chemical composition and adsorption properties of two gram-negative bacterial EPS[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 806(Pt 1): 150511.
- [38] Hou X L, Liu S T, Zhang Z T. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. Water Research, 2015, 75: 51-62.
- [39] Nigam H, Jain R, Malik A, et al. Effect of different polystyrene nano-plastic concentrations on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Algal Research, 2022, 67: 102835.
- [40] Wang B B, Liu X T, Chen J M, et al. Composition and functional group characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge: the impacts of polymerization degree of proteinaceous substrates[J]. Water Research, 2018, 129: 133-142.

- [41] Wu C, Chen Y R, Qian Z Y, et al. The effect of extracellular polymeric substances (EPS) of iron-oxidizing bacteria (*Ochrobactrum* EEELCW01) on mineral transformation and arsenic (As) fate[J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2023, 130: 187-196.
- [42] Iyer S, Le D, Park B R, et al. Distinct mechanisms coordinate transcription and translation under carbon and nitrogen starvation in *Escherichia coli*[J]. Nature Microbiology, 2018, 3: 741-748.
- [43] Mikhaylina A O, Nikonova E Y, Kostareva O S, et al. Regulation of ribosomal protein synthesis in prokaryotes[J]. Molecular Biology, 2021, 55(1): 16-36.
- [44] Aoshima M. Novel enzyme reactions related to the tricarboxylic acid cycle: phylogenetic/functional implications and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(2): 249-255.
- [45] Charlier D, Bervoets I. Regulation of arginine biosynthesis, catabolism and transport in *Escherichia coli*[J]. Amino Acids, 2019, 51(8): 1103-1127.
- [46] Brown L, Wolf J M, Prados-Rosales R, et al. Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13: 620-630.
- [47] Zhang B, Huang S C, Wu L, et al. Micro(nano)plastic size and concentration co-differentiate the treatment performance and toxicity mechanism in aerobic granular sludge systems[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 457: 141212.
- [48] Xiao C Q, Wan K, Hu J G, et al. Performance changes in the anammox process under the stress of rare-earth element Ce(III) and the evolution of microbial community and functional genes[J]. Bioresource Technology, 2023, 384: 129349.

(编辑 郑洁)