

一株荧蒽降解菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1 的固定化及其优化

徐红霞, 李宵慧, 孙媛媛, 施小清, 吴吉春

(南京大学表生地球化学教育部重点实验室; 南京大学地球科学与工程学院, 南京 210023)

摘要:对草螺菌属荧蒽降解菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1 以不同材料和方法进行固定化, 考察固定化后菌株对土水系统中荧蒽的降解性能。结果表明: 聚乙烯醇(PVA)-硅藻土载体(硼酸法)固定的菌株对荧蒽的降解效率最高, 对荧蒽的 25-d 降解率达 97.74%; 硼酸法制备的 PVA-硅藻土载体和 PVA-活性炭载体对荧蒽的降解效果优于相应冷冻-解冻法制得的载体; 硅藻土的添加比活性炭更能够提高固定在 PVA 复合载体中的菌株 FA1 对荧蒽的降解率。在此基础上, 对 PVA-硅藻土载体(硼酸法)进行响应曲面法优化, 采用 4 水平的 Box-Behnken 设计安排实验, 对结果进行拟合和分析, 建立二次回归模型并求解, 获得最佳固定化条件为: 菌浓度 9.6%、PVA 浓度 11.2%、硅藻土浓度 4.5%、粒径 4 mm。据此优化后, PVA-硅藻土载体(硼酸法)对荧蒽的 20-d 降解率即达 99.46%。

关键词: 荧蒽; 草螺菌属细菌; 生物降解; 固定化; 响应曲面法

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2015)04-0672-07 doi:10.11654/jaes.2015.04.010

Immobilization of Fluoranthene-Degrading *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1 and Its Optimization

XU Hong-xia, LI Xiao-hui, SUN Yuan-yuan, SHI Xiao-qing, WU Ji-chun

(Key Laboratory of Surficial Geochemistry, Ministry of Education; School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Microbial remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a group of persistent toxic contaminants that are widespread in terrestrial and aquatic environments, has received increasing interests. A fluoranthene-degrading strain FA1 previously isolated from activated sludge has showed capability to use fluoranthene as sole carbon and energy sources and to degrade fluoranthene in the presence of indigenous flora. In this study, immobilization of fluoranthene-degrading strain FA1 by various matrices and its effects on fluoranthene degradation in soil-water system were investigated. Results showed that the strain FA1 immobilized on polyvinyl alcohol (PVA)-diatomite matrix prepared by chemical method (boric acid) exhibited the highest degradation of fluoranthene, with a 97.74% removal of fluoranthene from soil-water system after 25 d. PVA-diatomite and PVA-activated carbon matrices obtained by chemical method showed better effectiveness than those obtained by freezing and thawing method. The optimal immobilization conditions of PVA-diatomite matrix (chemical method) were 9.6% of cell density, 11.2% of PVA, 4.5% of diatomite and 4.0 mm of bead size. Under these conditions, 99.46% of fluoranthene was removed from the soil-water system after 20 d.

Keywords: fluoranthene; *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1; biodegradation; immobilization; response surface methodology

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类颇具代表性的疏水性有机物, 在土壤和水体

环境中分布广泛, 由于明确或潜在的致癌、致畸、致突变作用^[1-2], PAHs 的环境归趋已在全球范围内受到越来越多的关注。被美国环保局列为优先污染物的荧蒽^[3](Fluoranthene), 是由四个苯环组成的杂环芳烃, 其分子中的五元环结构与二噁英和二苯呋喃相似, 常被用作高分子 PAHs 生物降解研究的典型化合物^[4-5]。

收稿日期: 2014-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(41102148, 41030746); 高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(20110091120063)

作者简介: 徐红霞(1984—), 女, 讲师, 博士, 主要从事土壤和地下水的污染修复与控制研究。E-mail: hxxu@nju.edu.cn

与传统的物理或化学处理方法相比,利用微生物修复环境中的 PAHs 受到越来越多的重视,然而由于污染物的毒害作用以及环境中其他微生物、土著菌群的竞争和捕食作用,实验室筛选出的降解菌在实际修复中的应用仍面临挑战^[6]。近来,微生物的固定化技术发展迅速,降解菌经固定后,具有保持微生物活性、降解效率高、稳定性好以及可重复利用等特点^[7-10],有效提高了微生物修复技术的实用性。在各类被用于固定化的载体中,聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)和海藻酸钠被广泛应用于降解微生物的固定,但不同研究采用的固定化方法不尽一致^[8-10]。

目前已有较多关于 PAHs 生物降解的研究,具有降解荧蒽能力的细菌包括 *Sphingomonas paucimobilis*^[11], *Pseudomonas*^[12], *Bacillus cereus*^[13] 等,但对草螺菌属(*Herbaspirillum*)细菌降解 PAHs 的研究尚少有报道。课题组从活性污泥中筛选出一株能够降解多环芳烃荧蒽的草螺菌属细菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1^[14],为了提高菌株 FA1 对荧蒽的降解效果,本研究采用不同载体和固定化方法来固定菌株,考察其对土水体系中荧蒽的降解性能,筛选出固定化效果最好的载体,并通过响应曲面法(Response surface methodology, RSM)进一步优化,确定最佳固定化条件并进行验证,以期采用固定化技术修复 PAHs 污染环境的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

实验用荧蒽降解菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1 筛选自南京某石化厂的活性污泥^[14],其 NCBI 序列登录号为 HM107777。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5 g·L⁻¹,蛋白胨 10 g·L⁻¹,NaCl 5 g·L⁻¹,pH 7.0~7.2。

无机盐培养基(MSM):磷酸盐缓冲液(pH7.0)100 mL·L⁻¹,MgSO₄ 0.067 5 g·L⁻¹,CaCl₂ 0.036 4 g·L⁻¹,FeCl₃ 溶液(0.25 g·L⁻¹)1.0 mL·L⁻¹,微量元素溶液^[15][Mn₂SO₄ 39.9 mg,ZnSO₄·H₂O 42.8 mg,(NH₄)Mo₇O₂₄·4H₂O 34.7 mg,水 1.0 L]1.0 mL·L⁻¹,pH 7.0。

1.2 供试土壤

采集南京大学校园内的表层土壤(5~20 cm),阴干,去杂后研细,过 1 mm 筛备用。土壤氮含量 0.011%,磷含量 0.042%,TOC 为 0.12%,土壤含水率为 2.67%,pH7.7。将一定量的荧蒽甲醇溶液添加入土壤中制备人工污染土样,充分混合均匀后,纱布封口

于通风阴暗处,待甲醇挥发完毕后,用铝箔包裹容器,置于黑暗处 4℃恒温老化 4 周。

1.3 固定化载体制备

将菌株 FA1 接入牛肉膏蛋白胨培养基富集培养,将处于对数生长期的菌液以 8000 r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min,用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)洗涤 3 次并稀释成浓度为 7.2×10⁹ CFU·mL⁻¹ 的菌悬液。

1.3.1 海藻酸钠载体

于 90 mL 的 4%(质量浓度,下同)海藻酸钠溶液中加入 1.575 g 改性硅藻土^[16],接入菌悬液 10 mL,充分混匀后滴入 4% 的 CaCl₂ 溶液中,室温下静置 1 h,于 4℃下交联 20 h^[7],生理盐水冲洗 2 次后冷藏备用。小球直径约为 4 mm。

1.3.2 硼酸法制备 PVA 复合载体

PVA-硅藻土载体:将 90 mL 含有 12%PVA 和 1%海藻酸钠的混合溶液与 10 mL 菌悬液混合,加入 2.5%的改性硅藻土,混匀后室温下静置 1 h,滴入 5% 的硼酸溶液中^[9](含 2% CaCl₂,pH 6.5~7.0),同时以磁力搅拌器搅动,防止粘连,4℃下交联 20 h。将制得的小球浸泡在 10%的硼酸溶液中 30 min 并保持搅动,然后置于 0.5 mol·L⁻¹ 的 Na₂SO₄ 溶液中浸泡 30 min 并保持搅动,最后以无菌去离子水浸泡 1 h 后,生理盐水冲洗 2 次,冷藏备用。小球直径约 4 mm。

PVA-活性炭载体:以等量活性炭代替硅藻土,同样方法制得 PVA-活性炭载体小球。

1.3.3 冷冻-解冻法制备 PVA 复合载体

PVA-硅藻土载体:将 90 mL 含有 12%PVA 和 1%海藻酸钠的混合溶液与 10 mL 菌悬液混合,加入 2.5%的改性硅藻土。混匀静置 1 h 后,将溶液倾注于平板上,形成厚度约为 3 mm 的薄层。-20℃急冻 12 h,4℃下融冻 12 h。重复上述冻融过程 2 次后制备成边长为 3 mm 的小立方体颗粒。

PVA-活性炭载体:以等量活性炭代替硅藻土,同样方法制得 PVA-活性炭载体颗粒。

1.4 游离和固定化菌株 FA1 对荧蒽的降解

为了比较不同方法固定的降解菌对荧蒽的降解效果,设置游离菌 FA1 和固定化菌株 FA1 对土水体系中荧蒽的降解实验,以游离菌为对照,筛选出降解效果好的载体进一步优化。根据课题组之前对土水反应体系的优化结果安排实验^[14],于污染土样中分别加入吐温 80、无机盐培养基及 N 源(NaNO₃)、P 源(K₂HPO₄·3H₂O),使得反应体系中荧蒽浓度为 5 mg·kg⁻¹ 土壤,氮磷比为 5:1,盐度(氮磷总浓度)为 2%,吐

温 80 浓度为 100 mg·kg⁻¹ 土壤,土水比为 1:3,调节体系 pH 值至 8.0。游离菌和固定化菌株降解体系中,菌株 FA1 的初始浓度均为 7.8×10⁷ CFU·g⁻¹ 土壤。以无菌去离子水代替降解菌设置空白,同时设置 3 组平行样。样品置于黑暗环境下 30 ℃恒温培养,每天摇匀,并通过称重法控制水分。定时取样,测定体系中的荧蒽含量。

1.5 固定化条件的优化

1.5.1 响应曲面法实验设计

根据 1.4 的结果,选取对荧蒽降解效率最高的 PVA-硅藻土载体(硼酸法)进行固定化条件的 RSM 优化。选取影响降解菌固定化效果的 4 个主要因子^[9,17]:菌浓度(X_1)、PVA 浓度(X_2)、硅藻土浓度(X_3)和载体粒径(X_4),采用 Box-Behnken 设计来安排试验。以 4 个影响因子为自变量,记为 X_i ;以对土水系统中荧蒽的降解率为响应值,记为 Y 。

根据实验设计,对自变量 X_i 按照式(1)进行编码转换,各影响因子的编码水平和对应实际值见表 1。

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \tag{1}$$

式中: x_i 为自变量 X_i 的编码值,无量纲; X_i 为自变量的实际实验水平值; X_0 为实验水平中心点的实际值; ΔX 为步长。

表 1 Box-Behnken 实验设计中各因子的编码和水平

因子	代码	编码值		
		-1	0	1
菌浓度/%	x_1	6	10	14
PVA 浓度/%	x_2	10	12	14
硅藻土浓度/%	x_3	2	4	6
粒径/mm	x_4	2	4	6

采用 Design-Expert 软件(Version 7.1, Stat-ease Inc., USA) 进行实验设计与分析。根据 Box-Behnken 设计的因子水平组合(表 2)以硼酸法制备 PVA-硅藻土载体,按 1.4 的方法进行土水系统中荧蒽的降解实验,共计 29 组不同因素水平组合,中心点处安排 5 次重复,样品培养 20 d 后,测定荧蒽残留量。

1.5.2 数据分析

对 1.5.1 的实验数据进行分析,建立二次多项回归方程来描述自变量和响应值之间的关系(式 2)^[18],并对回归方程和方程各项系数的统计显著性进行评价。对实验所得数据和模型的预测值进行方差分析(Analysis of variance, ANOVA),观察模型的实际拟合

表 2 PVA-硅藻土固定化荧蒽降解菌 FA1 的

Box-Behnken 优化设计

Table 2 Box-Behnken design for optimal immobilization parameters for fluoranthene degradation by strain FA1 immobilized on PVA-Diatomite matrix

编号	菌浓度	PVA 浓度	硅藻土浓度	粒径	响应 Y (荧蒽降解率)	
	x_1	x_2	x_3	x_4	实际值/%	预测值/%
1	0	0	0	0	96.94	96.74
2	0	0	0	0	96.86	96.74
3	0	0	-1	1	70.13	64.68
4	-1	0	-1	0	81.58	79.41
5	0	-1	0	-1	79.46	82.72
6	1	0	0	1	84.82	87.10
7	0	0	1	-1	71.87	76.73
8	0	0	1	1	87.52	88.56
9	1	0	1	0	93.31	96.73
10	-1	1	0	0	65.05	65.26
11	-1	0	0	1	70.12	75.79
12	0	0	0	0	96.61	96.74
13	0	1	0	1	57.42	55.41
14	-1	0	1	0	89.76	89.61
15	0	0	0	0	96.58	96.74
16	0	-1	-1	0	82.45	86.55
17	0	1	-1	0	51.11	54.85
18	-1	0	0	-1	84.76	81.82
19	0	0	0	0	96.70	96.74
20	1	0	-1	0	84.03	85.43
21	1	1	0	0	70.49	70.53
22	0	1	0	-1	56.54	59.33
23	0	-1	0	1	85.57	84.04
24	0	1	1	0	76.06	71.29
25	0	-1	1	0	96.01	91.61
26	-1	-1	0	0	90.58	89.96
27	1	-1	0	0	98.65	97.85
28	1	0	0	-1	90.01	83.67
29	0	0	-1	-1	80.73	79.11

效果。

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \tag{2}$$

式中: Y 表示响应值; β_0 是模型的截距项; β_i 为 x_i 的线性效应; β_{ij} 为 x_i 与 x_j 之间的交互效应; β_{ii} 表示 x_i 的二次效应; ε 为随机误差。

1.5.3 优化结果验证及载体可重复利用性

根据 RSM 的优化结果,以硼酸法制备降解菌 FA1 的 PVA-硅藻土载体,参照 1.4 的方法设置荧蒽的土水反应体系,向体系接入包埋高温灭活菌体的载

体作为空白,反应 20 d 后取样测定荧蒽的降解率,与模型的预测结果对比。为了考察载体的可重复利用性,按照上述实验设置进行连续多次的荧蒽降解实验,将载体接入降解体系中,反应 10 d 后取出,测定体系中荧蒽残留量,并将载体重新接入至相同的新鲜降解体系,如此循环进行 8 次降解实验。

1.6 荧蒽测定

盐酸调节待测样品的 pH 值至 2.0 左右,加入二氯甲烷静置 2 h 后,以 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 1 h,超声萃取 1 h,将混合液以 $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,重复萃取 2 次^[9]。收集有机相,无水 Na_2SO_4 除水后真空旋转蒸发,以甲醇定容至 10 mL,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, HPLC 测定。HPLC 条件为: HPEclipse XDB-C8 柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$), 甲醇:水=80:20, 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, DAD 检测器,检测波长 235 nm,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 菌株 FA1 固定化载体的筛选

在此前的多环芳烃生物降解研究中,课题组从活性污泥中分离出一株以荧蒽为唯一碳源和能源且生长良好的草螺菌属细菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1^[14]。为了提高菌株对荧蒽的降解效果和易于生物修复应用,采用不同材料和方法固定化菌株 FA1,考察其对土水系统中荧蒽的降解效果,以 FA1 的游离菌为对照,筛选出固定化效果最好的载体以便进一步优化,结果如图 1 所示。

游离菌 FA1 对土水系统中荧蒽的 25 d 降解率为 65.94%,与游离菌相比,除了海藻酸钠载体外,其余 4 种 PVA 复合载体对荧蒽的 25 d 降解率均明显增加。其中,硼酸法制备的 PVA-硅藻土载体的表现最为优异,在反应的最开始阶段即能够迅速降解荧蒽,反应进行 15 d 后,对土水系统中荧蒽的降解率超过 87%,反应 25 d 后,对荧蒽的降解率达 97.74%,体系中的荧蒽几乎完全被去除。此外,在接种了含灭活降解菌的 PVA-硅藻土载体(硼酸法)的对照体系中,荧蒽浓度无显著变化(减少量小于 2%),说明反应体系中荧蒽浓度的降低主要是由载体对荧蒽的降解造成的。对降解菌进行固定后,提高了单位体积介质中的微生物密度。荧蒽通过扩散作用从载体外部进入载体内部,形成浓度梯度,使其内部的微环境与游离菌株所处的环境不同,载体内生物细胞受到的污染物毒害压力较小^[10],有利于细胞的生理特性以及降解所需生物酶

的活性保持,从而有效提高了对荧蒽的降解效率。Li 等^[8]研究表明,经固定化处理后 *Zoogloea* sp. 对土水体系中菲和芘的降解效果有了明显提高,降解率超出游离态 *Zoogloea* sp. 的两倍。

在实验的几种载体中,海藻酸钠载体的表现最为脆弱,对荧蒽的降解效果远低于其他载体(图 1)。20 $^\circ\text{C}$ 下海藻酸钠载体 6 d 内的质量变化率较小,随着温度的升高,载体颗粒的稳定性和机械强度随之下降^[7]。本实验在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行,降解过程中海藻酸钠载体的溶胀现象明显,部分载体颗粒在反应进行 5 d 后即膨胀碎裂,其对荧蒽的降解也随之处于停滞状态。这可能是由于载体颗粒的膨胀和碎裂阻碍了氧气的传导,反应体系中溶解氧锐减,妨害了微生物的生长和代谢并使其失去活性所致。

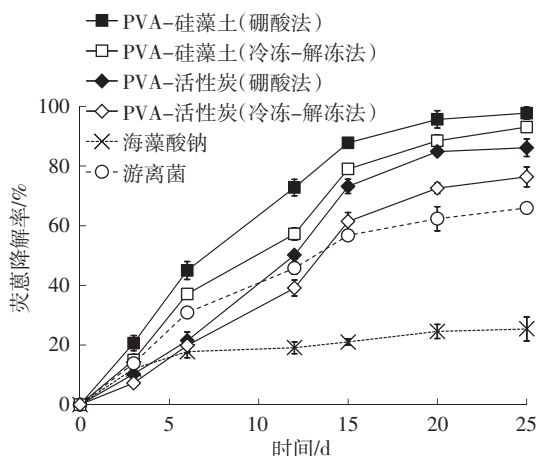


图 1 游离和固定化菌株 FA1 对土水体系中荧蒽的降解

Figure 1 Fluoranthene degradation by free and immobilized cells of strain FA1 in soil-water system

从图 1 可以看出,在反应进行 25 d 内,以硼酸法或冷冻-解冻法制备的 PVA-硅藻土载体对荧蒽的降解率始终优于 PVA-活性炭载体。与硼酸法不同,使用冷冻-解冻法制备 PVA 复合载体时,由于方法本身的特点,不易制备球形载体。虽然两种方法制备的 PVA 复合载体形状不同,但含有不同载体反应体系的降解菌初始浓度是一致的。实验结果表明硼酸法制备的 PVA 复合载体(PVA-硅藻土和 PVA-活性炭载体)对荧蒽的降解率比相应冷冻-解冻法制备的载体高,与 Li 等^[8]的研究结果一致。但是在喹啉的生物降解过程中,与硼酸法制得的 PVA 载体相比,冷冻-解冻法制备的 PVA 载体对喹啉的降解速率更高^[20]。这些结果说明利用复合载体来固定降解菌时,其对污染物的降解效果不仅受载体成分的影响,还和载体的制

备方法密切相关。

2.2 菌株 FA1 固定化参数的优化

根据 2.1 的实验结果,对 PVA-硅藻土载体(硼酸法)的制备参数采用响应曲面法(RSM)进行优化。RSM 法已被成功应用于诸多生物处理工程的条件优化^[17-18],该方法将体系的响应作为一个或多个因素的函数,通过相对较少的组合试验来建立回归方程模型,并对各影响因素的水平及交互作用进行评价,从而快速确定系统的最佳条件。本文以响应值(荧蒽降解率)最大化为条件,采用 4 因素的 Box-Behnken 实验设计来考察菌浓度、PVA 浓度、硅藻土浓度以及粒径对载体固定化效果的影响,在各因子的编码值范围内(-1~+1)求取其最优解。Box-Behnken 设计和相应的实验结果如表 2 所示。通过 Design Expert 软件对实验数据进行二次多项回归拟合,获得荧蒽降解率对四个独立变量的二次多项回归模型为:

$$Y=96.74+3.29x_1-13.00x_2+5.38x_3-0.65x_4-0.66x_1x_2+0.27x_1x_3+2.36x_1x_4+2.85x_2x_3-1.31x_2x_4+6.56x_3x_4-2.06x_1^2-13.78x_2^2-6.88x_3^2-12.58x_4^2$$
 (3)

对所得的模型及模型的各项系数进行方差分析(ANOVA),确定其统计显著性(表 3)。由方差分析结果可以看出,模型 $P<0.0001$,远小于显著水平 0.05,说明根据实际降解数据拟合得到的模型是显著的,且 R^2 为 0.948,反映出模型的预测值与实验所得荧蒽降解率吻合良好,说明模型的统计具有显著性。通常情

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model

来源	自由度	均差	平方和	F 值	P>F value
模型	14	338.73	4 742.18	18.2	<0.000 1
x_1 -菌浓度	1	129.76	129.76	6.97	0.019 4
x_2 -PVA 浓度	1	2 029.3	2 029.3	109.04	<0.000 1
x_3 -硅藻土浓度	1	346.69	346.69	18.63	0.000 7
x_4 -粒径	1	5.06	5.06	0.27	0.210 3
x_1x_2	1	1.73	1.73	0.093	0.765
x_1x_3	1	0.3	0.3	0.016	0.090 4
x_1x_4	1	22.33	22.33	1.2	0.291 9
x_2x_3	1	32.43	32.43	1.74	0.208
x_2x_4	1	6.84	6.84	0.37	0.554 1
x_3x_4	1	172.27	172.27	9.26	0.008 8
x_1^2	1	27.49	27.49	1.48	0.244 3
x_2^2	1	1 231.68	1 231.68	66.18	<0.000 1
x_3^2	1	307.35	307.35	16.52	0.001 2
x_4^2	1	1 027.32	1 027.32	55.2	<0.000 1
误差	4	0.025			
模型决定系数 $R^2=0.948$					变异系数 $CV=5.25\%$

况下变异系数 CV(Coefficient of variation)值越低,实验的可信度越好。本实验设计的 CV 值为 5.25%,说明所建模型具有良好的可靠性,可以利用该模型进行分析和荧蒽降解预测。对模型中各项变量的显著性检验表明: x_1 (菌浓度)、 x_2 (PVA 浓度)和 x_3 (硅藻土浓度)对荧蒽降解率的线性效应显著,对响应值(荧蒽降解率)的影响程度依次为 PVA 浓度>硅藻土浓度>菌浓度; x_2 、 x_3 和 x_4 (粒径)对响应值的曲面效应显著,并且菌浓度(x_1)和硅藻土含量(x_3)之间、硅藻土含量(x_3)和粒径(x_4)之间存在着较强的交互作用。

由响应曲面三维图(图 2),可以直观地看出各因

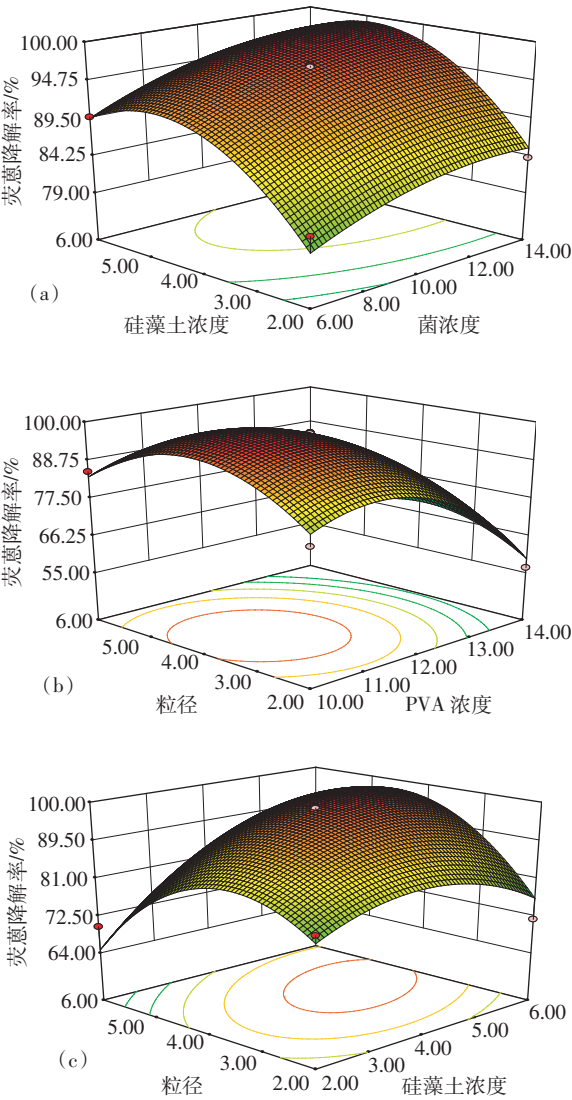


图 2 PVA-硅藻土载体(硼酸法)的影响因子对荧蒽降解率的响应曲面

Figure 2 Response surface plotting effects of immobilization parameters of PVA-diatomite matrix (boric acid method) on fluoranthene degradation

素之间的相互影响和关系,且各因素对响应值的影响并不是简单的线性关系,与表 3 中模型的方差分析结果一致。

如图 2(a)所示,在试验水平范围内,要使得荧蒽降解率最大化,硅藻土浓度应控制在 4%~6%之间,菌浓度的设置范围则为 8%~12%。当硅藻土浓度在 5%以下时,PVA-硅藻土载体对土水系统中荧蒽的降解率随着硅藻土含量的增加而增加;而当菌浓度增加时,荧蒽降解率的上升幅度较小。改性硅藻土具有较好的孔状结构^[16],在一定范围内增加载体中硅藻土的含量有助于增加载体内部的孔隙和连通性,提高载体的传质效率,进而提高固定化菌株对污染物的降解能力。载体中固定的微生物量过少不利于降解反应的快速进行,但微生物量过多不仅会引起诸如碳源、营养源和氧气上的竞争,还将占据更多的载体孔隙空间,降低载体的传质性能^[21]。因为固定化材料和降解微生物的差异,已有报道中微生物的包埋量各不相同^[22-23]。在 Lee 等^[22]利用不同载体固定混合菌株来降解柴油的研究中,混合降解菌的包埋量为 10^9 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 。Chorao 等^[23]利用固定在海藻酸钠载体中的 *Rhodococcus rhodochrous* 降解 2-氨基苯并噻唑时,采用的微生物包埋量为 10^8 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 。

如图 2(b)所示,当粒径一定时,随着 PVA 浓度的增加,载体对荧蒽的降解率随之先增加后减小;当 PVA 浓度一定时,随着粒径的增加,载体对荧蒽的降解率表现出相同的变化规律。载体的比表面积随着粒径的减小而增大;与之相反,传质阻力随着载体粒径的增加而增大^[17]。据 Idris 等^[9]的报道,PVA 浓度为 12%的载体在保持酶活性和稳定性方面较之 10.5%浓度的 PVA 载体更具优势,但高浓度 PVA 所制备载体的内部孔隙相对较小,固定在其中的降解菌细胞容易凝结在一起,妨碍氧气和基质的传输速率,使得生物降解效率下降。从响应曲面图 2(b)可以直接判断出 PVA 浓度和粒径应该分别设置在 10%~12%和 3.0~5.0 mm 的范围内。类似地,从响应曲面图 2(c)可以看出荧蒽降解率随着硅藻土浓度或粒径的增加呈现出先上升后下降的趋势。为了荧蒽降解率的最大化,硅藻土浓度和粒径的取值范围分别为 3%~5%和 3.5~4.5 mm。

通过对回归模型(式 3)进行求导和解逆矩阵,确定 PVA-硅藻土载体(硼酸法)的最佳水平分别为:菌浓度 9.6%、PVA 浓度 11.2%、硅藻土浓度 4.5%、粒径 4.0 mm,此条件下载体中降解菌 FA1 的包埋量为 6.3×10^8 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 。将该最优水平代入回归模型(式 3)

求解,得到优化条件下载体对荧蒽降解率的理论预测值为 99.98%。

2.3 模型验证及载体可重复使用性

为了检验所建模型预测结果的可靠性,根据优化后的结果制备 PVA-硅藻土载体(硼酸法),进行土水体系中荧蒽的降解实验,测得荧蒽的 20 d 降解率为 99.46%,该结果与模型的理论预测值 99.98%非常接近,证明了回归模型的有效性和采用响应曲面法优化固定化参数的可行性。

载体的可重复利用性是其可否应用于实际修复的重要依据之一。为了考察对优化后 PVA-硅藻土载体的可重复使用性,将载体接入荧蒽的土水反应体系,进行连续多次的荧蒽降解实验,每次降解反应持续 10 d。结果表明,在实验设置的 8 次循环降解过程中,固定在载体内的菌株 FA1 对荧蒽的 10 d 降解率并无显著差异。使用 80 d 以后,载体的形态保持完好,且在反应过程中无明显溶胀和成分析出现象。

3 结论

(1)海藻酸钠载体在 30 ℃下稳定性较差,易溶胀碎裂。荧蒽降解菌 *Herbaspirillum chlorophenolicum* strain FA1 经 PVA 复合载体固定后,对荧蒽的降解率明显增加。其中,PVA-硅藻土载体(硼酸法或冷冻-解冻法)对荧蒽的降解率高于 PVA-活性炭载体;硼酸法制备的 PVA-硅藻土和 PVA-活性炭载体对荧蒽的降解效果优于相应冷冻-解冻法制得的载体。

(2)采用响应曲面法对 PVA-硅藻土载体(硼酸法)的 4 个主要参数进行优化,确定其最佳水平分别为:菌浓度 6.3×10^8 CFU $\cdot$ g $^{-1}$ 、PVA 浓度 11.2%、硅藻土浓度 4.5%、粒径 4.0 mm。在此条件下固定的菌株 FA1 对荧蒽的 20 d 降解率达 99.46%。

参考文献:

- [1] Rybicki B A, Nock N L, Saveria A T, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in prostate carcinogenesis[J]. *Cancer Letters*, 2006, 239(2): 157-167.
- [2] Brody J G, Moysich K B, Humblet O, et al. Environmental pollutants and breast cancer-epidemiologic studies[J]. *Cancer*, 2007, 109(12): 2667-2711.
- [3] 沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京:化学工业出版社, 2002: 51-53.
SHEN De-zhong. Bioremediation of contaminated environment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 51-53.
- [4] Hickey A M, Gordon L, Dobson A D W, et al. Effect of surfactants on fluoranthene degradation by *Pseudomonas alcaligenes* PA-10[J]. *Ap-*

- plied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(4):851-856.
- [5] Lei A P, Hu Z L, Wong Y S, et al. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2):273-280.
- [6] Naidu R. Recent advances in contaminated site remediation[J]. *Water Air Soil Pollution*, 2013, 224:1-11.
- [7] 翟晓萌, 李道棠. 海藻酸钠固定化包埋微生物处理有机微污染源水[J]. *环境科学*, 2000, 21(6):80-84.
- ZHAI Xiao-meng, LI Dao-tang. Organic micropolluted source water treatment by immobilized cells[J]. *Environmental Science*, 2000, 21(6):80-84.
- [8] Li P, Wang X, Stagnitti F, et al. Degradation of phenanthrene and pyrene in soil slurry reactors with immobilized bacteria *Zoogloea* sp.[J]. *Environmental Engineering Science*, 2005, 22(3):390-399.
- [9] Idris A, Zain N A M, Suhaimi M S. Immobilization of baker's yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovative immobilization technique[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(4):331-338.
- [10] Partovinia A, Naeimpoor F. Phenanthrene biodegradation by immobilized microbial consortium in polyvinyl alcohol cryogel beads[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85:337-344.
- [11] Willumsen P A, Arvin E. Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*[J]. *Environmental Science & Technology*, 1999, 33(15):2571-2578.
- [12] Gordon L, Dobson A D W. Fluoranthene degradation in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10[J]. *Biodegradation*, 2001, 12(6):393-400.
- [13] Fuchedzhieva N, Karakashev D, Angelidaki I. Anaerobic biodegradation of fluoranthene under methanogenic conditions in presence of surface-active compounds[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153:123-127.
- [14] Xu H X, Wu H Y, Qiu Y P, et al. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenolicum* from activated sludge[J]. *Biodegradation*, 2011, 22:335-345.
- [15] 雷萍, 裴麦茜, 温晓玫, 等. 优势黄杆菌对蒽、菲、芘混合物的降解特征研究[J]. *西安交通大学学报*, 2004, 38(6):657-660.
- LEI Ping, NIE Mai-qian, WEN Xiao-mei, et al. Study to degradation characters of preponderant flavobacterials strains in a mixture of anthracene, phenanthrene and pyrene[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2004, 38(6):657-660.
- [16] 石太宏, 贾世国, 陈颖, 等. 改性天然矿物吸附废水中重金属离子的研究进展[J]. *水处理技术*, 2009, 35(4):18-23.
- SHI Tai-hong, JIA Shi-guo, CHEN Ying, et al. Removal of heavy metal ions from wastewater by modified natural ores as adsorbents: A review[J]. *Technology of Water Treatment*, 2009, 35(4):18-23.
- [17] Gummadi S N, Ganesh K B, Santhosh D. Enhanced degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas* sp. in agar-agar matrix using statistical approach[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(2-3):136-141.
- [18] Annadurai G, Ling L Y, Lee J F. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 151(1):171-178.
- [19] 平立凤, 李振, 赵华, 等. 土壤样品中多环芳烃分析方法研究进展[J]. *土壤通报*, 2007, 38(1):179-184.
- PING Li-feng, LI Zhen, ZHAO Hua, et al. Advance in analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(1):179-184.
- [20] Wang J L, Quan X C, Han L P, et al. Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*[J]. *Water Research*, 2002, 36(9):2288-2296.
- [21] 李婷, 任源, 韦朝海. 固定化 *Lysinibacillus cresolivorans* 的 PVA-SA-PHB-AC 复合载体制备及间甲酚的降解[J]. *环境科学*, 2013, 34(7):2899-2905.
- LI Ting, REN Yuan, WEI Chao-hai. Preparation of PVA-SA-PHB-AC composite carrier and *m*-cresol biodegradation by immobilized *Lysinibacillus cresolivorans*[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(7):2899-2905.
- [22] Lee Y C, Shin H J, Ahn Y, et al. Biodegradation of diesel by mixed bacteria immobilized onto a hybrid support of peat moss and additives: A batch experiment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183:940-944.
- [23] Choroa C, Charmantray F, Besse-Hoggan P, et al. 2-Aminobenzothiazole degradation by free and Ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous*[J]. *Chemosphere*, 2009, 75:121-128.