

江 群, 杨 帆, 朱墨染, 等. 玉米秸秆生物炭固定化 *Acinetobacter lwoffii* DNS32 性能研究[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(2): 382–386.

JIANG Qun, YANG Fan, ZHU Mo-ran, et al. The degradation properties of immobilized bacteria using corn stover-derived biochars as carriers[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(2): 382–386.

玉米秸秆生物炭固定化 *Acinetobacter lwoffii* DNS32 性能研究

江 群, 杨 帆, 朱墨染, 赵璐璐, 闫立龙, 张 颖*

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘 要:用玉米秸秆制备生物炭,并以其作为固定化菌剂的廉价载体,与阿特拉津降解菌 *Acinetobacter lwoffii* DNS32 制备成具有吸附-降解性能的新型菌剂,用以降解水溶液中阿特拉津。结果表明:固定化菌剂可在 40 h 内将 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿特拉津降解 94%,降解率比游离菌高 24%;固定化菌剂在 pH=5 和 pH=10 时,降解率分别为 42% 和 35%,说明其具有更好的 pH 适应性;温度为 10 ℃ 时,固定化菌剂的降解率比游离菌高 14%,说明其具有更好的耐寒性。为期 30 d 的模拟修复阿特拉津污染的实验表明:生物炭固定化菌剂在 30 d 后仍然具有活性,该固定化菌剂具有高效且持久的阿特拉津污染修复效果。

关键词:生物炭;固定化菌剂;阿特拉津;生物降解

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)02-0382-05 doi:10.11654/jaes.2016-1018

The degradation properties of immobilized bacteria using corn stover-derived biochars as carriers

JIANG Qun, YANG Fan, ZHU Mo-ran, ZHAO Lu-lu, YAN Li-long, ZHANG Ying*

(College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The biodegradation of atrazine in aqueous solution by immobilized bacteria using corn stover-derived biochars were studied. The degradation bacteria screened by cooperators in our laboratory was named as *Acinetobacter lwoffii* DNS32. Those strains grew well on corn stover-derived biochars, and the degradation rate of immobilized bacteria could reach 94% at 40 h, which implied that their degradation efficiency was higher than that of free bacteria (70%). At pH=5 and pH=10, the degradation rate of immobilized bacteria was 42% and 35% respectively, which showed they had better adaptability to pH. At 10 ℃, the degradation rate of immobilized bacteria was 14% higher than that of free bacteria, which certified that they had better cold tolerance. In the simulation experiments treating atrazine pollution water, immobilized degradation bacteria were still active after 30 d, indicated that immobilized bacteria had efficient and lasting repairing effect for atrazine contaminated water.

Keywords: biochar; immobilized bacteria; atrazine; bio-degradation

阿特拉津是一种三氮苯类农药,其化学结构非常稳定,属于长残留有机污染物,目前在北方玉米田除草中仍广泛应用。资料表明,每年松花江水体和周边

土壤中均有阿特拉津被检出^[1]。阿特拉津对土壤、水体的污染及其对生态环境的危害已引起广泛重视^[2]。微生物修复技术是目前环境中有机污染物最有效的修

收稿日期:2016-08-09

作者简介:江 群(1990—),女,硕士研究生,研究方向为固废资源化利用及环境污染修复。E-mail:jiangqun_neau@163.com

* 通信作者:张 颖 E-mail:zhangying_neau@163.com

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(316000413);中国博士后科学基金会项目(2015M581417);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z15012)

Project supported: The Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China(31600413); The China Postdoctoral Science Foundation(2015M581417); The Heilongjiang Postdoctoral Sustentation Fund, China(LBH-Z15012)

复方法之一。固定化微生物技术因其可以克服游离菌易受环境因素影响、降解效率低、不易回收等缺点而备受关注。但传统固定化载体,如海藻酸钠、沸石等存在寿命短或吸附能力小等劣势。

生物炭是生物质在限氧条件下高温热解产生的,主要由芳香烃和单质碳或具有类石墨结构的碳组成,一般含有 60%以上的 C 元素^[3]。丰富的芳香化结构和脂肪族链状结构^[4]使其具有极强的吸附能力和抗氧化能力^[5-7]。Yu 等^[8]认为生物炭分散在其他营养物中可以减缓释放肥料,因此提高了肥料的利用效率。而且,生物炭可以降低污染物的流动性。例如,小麦秸秆生物炭以 1%(W/W) 比例添加到土壤中,对敌草隆的吸附比未修复的土壤增加了 80%~86%^[9]。

针对传统固定化载体寿命短、吸附能力小和成本高等不足,以及生物炭具有多孔结构的特点,本研究拟使用生物炭为载体,固定化 *Acinetobacter lwoffii* DNS32,以期实现吸附-降解一体化修复阿特拉津的效果。本研究选用农业废弃物玉米秸秆作为制备生物炭的原料,不仅可以降低成本,还可以达到废弃物资源化利用的附加目的。研究秸秆生物炭固定化 *Acinetobacter lwoffii* DNS32 的性能,其目的在于验证以上设想的可行性及探究生物炭固定化微生物的降解效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 阿特拉津降解菌

所用菌株 DNS32^[10]是实验室从阿特拉津污染土壤中筛选的一株降解菌,属于 *Acinetobacter lwoffii*,能以阿特拉津为唯一氮源生长。其最适温度范围比常规菌株低 5~10 ℃,在寒冷地区具有较高的应用价值。

无机盐培养基: KH_2PO_4 0.4 g, K_2HPO_4 1.6 g, MgSO_4 0.2 g, NaCl 0.1 g, 葡萄糖 3.0 g, 溶解于 1000 mL 蒸馏水中制得^[13]。使用时加入阿特拉津使其浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

LB 培养液: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 121 ℃ 灭菌 30 min, 备用。

1.1.2 玉米秸秆

制备生物炭的原料是玉米秸秆,收集于东北农业大学园艺站。将风干的玉米秸秆剪成 0.5~1.0 cm 的小块,再放到烘箱中烘 24 h,备用。

1.2 实验方法

1.2.1 生物炭的制备与表征

将准备好的玉米秸秆置于真空管式炉中,通入氩气限氧,以 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温到 750 ℃,并恒温持续 2 h 炭化。降温后取出,磨粉,即得到生物炭。

生物炭的结构形态在扫描电镜 (SEM, ZEISS SUPRA 40, 德国) 下观察。

称取 100 mg 生物炭用去离子水定容到 100 mL, 超声 2 h 后备用。使用之前再超声处理 30 min。

1.2.2 固定化降解菌的制备

取 15 mL 生物炭母液于 50 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL OD_{600} 值为 1.0 的菌悬液中, 在 30 ℃、 $125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡 2 h, 使微生物吸附挂膜。

1.2.3 生物炭固定化降解菌的生长及其对阿特拉津的降解

将制备好的固定化菌剂投入到阿特拉津含量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐培养液中, 每隔 8 h 取样一次, 测菌的生长量 (OD_{600}) 及其对阿特拉津的降解率。为排除吸附作用的影响, 在取样前先将溶液摇匀, 取 5 mL 混合菌液, 涡旋 5 s 后萃取。设等量的游离菌为空白对照。每个实验设 3 组平行。

1.2.4 固定化降解菌的生长条件

根据唯一差别原则, 设置 pH 分别为 5、6、7、8、9、10, 研究酸碱性对固定化降解菌的影响; 其他培养条件不变, 设置温度分别为 10、20、25、30、35、40 ℃, 研究温度对固定化降解菌的影响。设等量的游离菌为空白对照。每个实验设 3 组平行。

1.2.5 固定化降解菌在模拟污染水中的修复效果

将生物炭固定化降解菌按质量比投入到阿特拉津含量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 1 L 模拟污水中, 每天按时取 5 mL 样液, 测定阿特拉津的残留量。当阿特拉津快降解完时, 再加入 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的阿特拉津和适量的葡萄糖, 再次定容到 1 L 并每天取样。如此反复直到第 30 d 为止。设等量游离态的菌株作为对照。

1.3 阿特拉津残留量测定

将含有阿特拉津的 5 mL 样液倒入分液漏斗中, 加入等体积的 CHCl_3 萃取 (浓度低于检出限, 用旋转蒸发仪浓缩后, 再用 CHCl_3 定容至 1 mL)。然后用 GC-14C 型气相色谱仪 (岛津) 对样品进行检测。FID 检测器和 N2000 色谱工作站: 色谱柱为内涂 14% OV-1701 大口径毛细管柱 ($30 \text{ m} \times 0.53 \text{ mm}$); 温度条件: 进样口 250 ℃, 柱温 200 ℃, 检测器 250 ℃, 非程序升温; 气体流量: 氮气 50 kPa、氢气 50 kPa、空气 50 kPa、尾吹 100 kPa; 不分流进样, 进样量 1 μL , 利用峰

高计算阿特拉津浓度。

2 结果与讨论

2.1 材料表征

所制备的生物炭扫描电镜如图1所示。可以看出,生物质炭化过程完好地保留了原生物质的细微孔隙结构,使其具有丰富的孔隙结构,从而增大了比表面积。这使得生物炭具有很强的吸附能力,使其可以作为固定化载体制备出具有吸附-降解一体化的固定化降解菌剂。

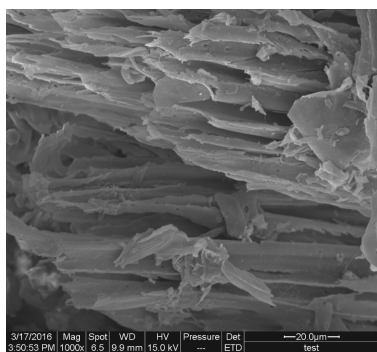


图1 生物炭的扫描电镜图

Figure 1 SEM of biochars

2.2 固定化降解菌的生长和降解率

图2表明,游离态 DNS32 在 16 h 之前为生长延滞期,16~40 h 为对数生长期,40~72 h 为稳定期。固定化降解菌的生长趋势与游离态菌株具有类似的生长行为,证明生物炭具有较好的生物相容性。同时可以观察到 24 h 之后,固定化降解菌比游离态菌株生长得更快。这可能是由于生物炭多孔结构给微生物提供了更好的生长环境,可降低菌体与阿特拉津的接触,从而缓解阿特拉津及菌代谢过程中产生的有害物质对菌株的毒害作用^[11-12]。Pietikäinen 等^[13]认为,个体较小且生长速度较快的微生物生长更适合在生物炭的孔隙结构中生长,当生物炭的孔径大于微生物时,微生物便有可能进入生物炭孔隙并利用其中的养分。Samonin 等^[14]更明确指出,不动杆菌能够进入孔径大小为 2~4 μm 的孔隙中生长代谢。

如图3所示,第8 h,游离菌降解率为 12%,固定化降解菌的降解率仅 7.5%。这可能是由于开始阶段,固定化降解菌与阿特拉津的接触面积比游离菌小。但第 32 h 时,固定化降解菌的降解率为 68%,比游离菌的降解率高 20%,且之后均高于游离态降解率,如第 40 h 时,固定化菌剂阿特拉津降解率达 94%,游离菌

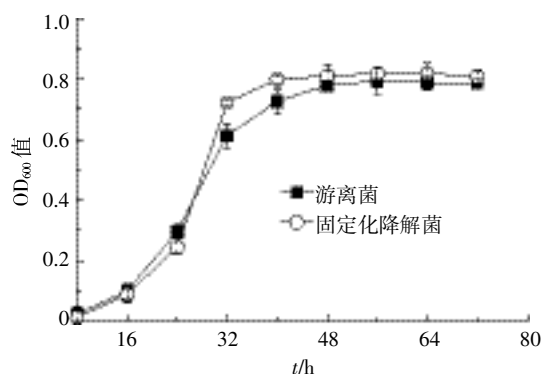


图2 固定化降解菌株生长曲线

Figure 2 Effects of biochar on the growth curve of DNS32

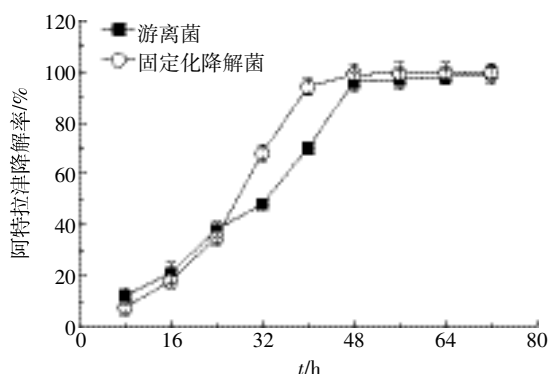


图3 固定化菌剂和游离菌的降解率

Figure 3 Degradation rate of immobilized bacteria and free bacteria

仅 70%,说明后期固定化菌剂比游离菌更高效。这与固定化菌和游离态菌的生长曲线(图2)保持一致。Chen 等^[15]也有类似报道,他们认为生物炭固定菌剂可以提高土壤中多环芳烃的生物降解效率。然而,也有很多研究发现,生物炭吸附有机污染物会降低污染物的生物可利用性,降低降解菌的降解效率^[16-18]。产生不同结果的原因可能与菌株的种类以及生物炭与污染物的相互作用有关。

2.3 固定化降解菌生长条件

图4是 pH 对固定化降解菌降解率的影响(游离菌作对照),可以看出,生物炭固定化降解菌比游离菌能更好地抵抗 pH 的变化。固定化微生物和游离菌的最适 pH 均为 7~8,但在最适 pH 的条件下,生物炭固定化降解菌的降解率比游离菌高。pH=5 时固定化降解菌和游离菌的降解率分别为 34%和 42%,pH=10 时固定化降解菌和游离菌的降解率分别为 23%和 35%,即强酸强碱条件下,固定化降解菌的降解率均高于游离菌,表明固定化菌更能适应自然环境。阿特拉津本身是弱碱性,DNS32 将阿特拉津降解成无毒的

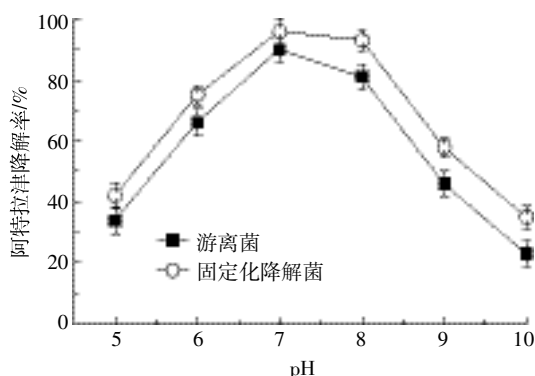


图4 pH对固定化降解菌降解率的影响

Figure 4 Effects of pH on atrazine degradation rate

氢氰酸^[2],随着阿特拉津降解,培养液自身的pH会下降。所以偏碱条件利于偏酸条件。

图5为温度对固定化和游离态降解菌降解率的影响。可以看出,固定化微生物对温度的敏感性比游离菌小,其最适温度均为25~30℃。在最适温度下,固定化降解菌的降解率与游离菌几乎相等。温度为10℃和20℃时,固定化降解菌的降解率分别比游离菌高出14%和17%,说明固定化降解菌更耐低温;温度为40℃时,两种菌剂降解率仅相差7%,说明高温条件下,固定化菌剂的耐性没有低温高,可能与酶的活性有关。

2.4 固定化降解菌修复水中阿特拉津的效果

在为期30d修复模拟阿特拉津污染水的试验中,生物炭固定化降解菌表现出高效且持久的修复效果(图6)。在第7d第一次将阿特拉津降解到1%时,立刻加入100 mg·L⁻¹的阿特拉津;到第15d第二次将阿特拉津降解到仅剩3%,再加入100 mg·L⁻¹的阿特拉津。虽然在15d之后的降解率小于15d之前,但第30d时固定化降解菌仍然具有活性。这说明固定化微生物不仅可以高效降解阿特拉津,还可以持久发挥作用。

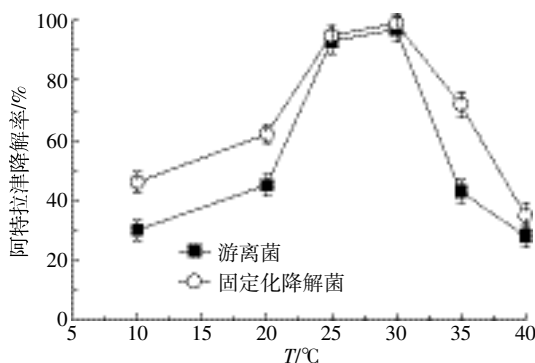


图5 温度对固定化降解菌降解率的影响

Figure 5 Effects of temperature on atrazine degradation rate

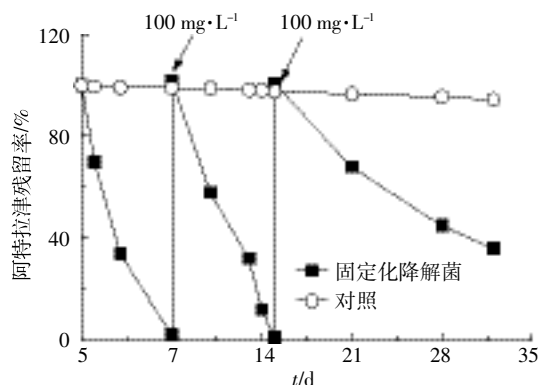


图6 生物炭固定化降解菌处理的阿特拉津残留率

Figure 6 Removal rate of atrazine by immobilized bacteria

3 结论

(1) 玉米秸秆生物炭固定化 DNS32 具有较高的降解阿特拉津的能力。该固定化菌剂可在40 h内将无机盐培养液中浓度为100 mg·L⁻¹的阿特拉津降解掉98%,比游离菌高28%;对pH和温度的敏感性比游离菌小。这表明该固定化菌剂比游离菌更适用于阿特拉津污染环境的治理。

(2) 生物炭固定化降解菌具有高效且持久的阿特拉津降解效果。在第30d时固定化降解菌仍然具有活性,表明生物炭是良好的固定化载体,其固定化降解菌可能在实际应用中发挥很好的作用。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Wang P J, Wang L, et al. The influence of facility agriculture production on phthalate esters distribution in black soils of Northeast China[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 506: 118-125.
- [2] 郭火生,等. 阿特拉津降解菌株 DNS32 的降解特性及分类鉴定与降解途径研究[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(9): 1234-1241.
- [3] Braida W J, Pignatello J J, Lu Y F. Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(2): 409-417.
- [4] Kramer R W, Kujawinski E B, Hatcher P G. Identification of black carbon derived structures in a volcanic ash soil humic acid by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(12): 3387-3395.
- [5] Oguntunde P G, Abiodun B J, Ajayi A E, et al. Effects of charcoal production on soil physical properties in Ghana[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2008, 171(4): 591-596.
- [6] Asai H, Samson B K, Stephan H M, et al. Biochar amendment techniques for upland rice production in northern Laos: 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield[J]. *Field Crops Research*, 2009,

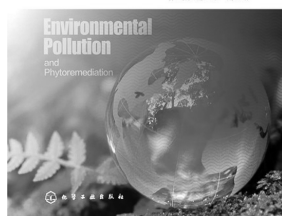
- 111(S1/2):81–84.
- [7] Piccolo A, Mbagwu J S C. Effects of different organic waste amendments on soil microaggregates stability and molecular sizes of humic substances[J]. *Plant and Soil*, 1990, 123(1):27–37.
- [8] Yu X Y, Ying G G, Kookana R S. Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil[J]. *Chemosphere*, 2009, 76:665–671.
- [9] Liang B, Lehmann J, Solomon D, et al. Black carbon increases cation exchange capacity in soils[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2006, 70(5):1719–1730.
- [10] 王志刚, 张颖, 郭火生, 等. 阿特拉津降解菌 *Acinetobacter* sp. DNS32 对无机氮源的响应[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8):1541–1546.
- WANG Zhi-Gang, ZHANG Ying, GUO Huo-sheng, et al. Response of an atrazine-degrading bacterium strain *Acinetobacter* sp. DNS32 to inorganic nitrogen source[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8):1541–1546.
- [11] Atkinson C J, Fitzgerald J D, Hipps N A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: A review[J]. *Plant and Soil*, 2010, 337(1/2):1–18.
- [12] Hamer U, Marschner B, Brodowski S, et al. Interactive priming of black carbon and glucose mineralisation[J]. *Organic Geochemistry*, 2004, 35(7):823–830.
- [13] Pietikäinen J, Kiikkilä O, Fritze H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus[J]. *Oikos*, 2000, 89(2):231–242.
- [14] Samonin V V, Elikova E E. A study of the adsorption of bacterial cells on porous materials[J]. *Microbiology*, 2004, 73(6):696–701.
- [15] Chen B L, Yuan M X, Qian L B. Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residue and biochar as carriers[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2012, 12(9):1350–1359.
- [16] Xia X H, Li Y R, Zhou Z, et al. Bioavailability of adsorbed phenanthrene by black carbon and multi-walled carbon nanotubes to *Agrobacterium*[J]. *Chemosphere*, 2010, 78:1329–1336.
- [17] Jones D L, Edwards G, Murphy D V. Biochar mediated alterations in herbicide breakdown and leaching in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(4):804–813.
- [18] Wang Y, Wang Y J, Wang L, et al. Reducing the bioavailability of PCBs in soil to plant by biochars assessed with triolein-embedded cellulose acetate membrane technique[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 174(5):250–256.

新书推荐



环境污染与植物修复

李雪梅 主编
韩阳 邵双 副主编



环境污染与植物修复

李雪梅 主编 韩阳、邵双 副主编

本书系统介绍了环境污染与植物的相互作用,着重阐述了植物对污染环境的修复功能。本书共分6章,分别阐述了环境污染物的种类、性质、来源及其迁移转化规律;典型污染物质对植物形态、生理代谢的影响和危害以及植物对环境污染的响应;植物对污染环境的净化功能;植物对污染环境的修复潜力及植物修复技术的应用实例;植物对环境污染的监测等内容。

※书号:9787122265258

※定价:85.0

※开本:16

※出版日期:2017年1月

生活垃圾焚烧飞灰安全处置与资源化利用的风险评估

钱光人 主编 周吉峙 施惠生 邹庐泉 副主编

本书系统总结了生活垃圾焚烧飞灰的组成特征与污染特性,梳理了国内外飞灰管理相关法律、法规与政策,以技术理论与实践案例相结合的方法,详细阐述飞灰中重金属、二噁英和氯盐解毒预处理技术体系以及飞灰在水泥原料、微晶玻璃和陶粒等领域的资源利用技术;构建了飞灰在安全处理处置中的风险评估模型,以此对国内典型地区飞灰原灰以及预处理解毒飞灰资源化过程和资源化产品应用过程可能涉及的环境风险进行了评估,期望研究成果对我国垃圾焚烧飞灰安全处理处置过程的风险管控提供决策支持。

※书号:9787122282958

※定价:85.0

※开本:16

※出版日期:2017年1月



如需更多图书信息,请登录 www.cip.com.cn

服务电话:010-64518888,64518800(销售中心)

网上购书可登录化学工业出版社天猫旗舰店:<http://hxgycbs.tmall.com>

邮购地址:(100011)北京市东城区青年湖南街13号 化学工业出版社

如要出版新著,请与编辑联系,联系电话:010-64519525。