

固定化混合菌高效降解残杀威的条件优化

李启武¹, 金红玉², 舒倩², 干兴利², 杨海君², 邢宏霖^{1*}

(1.国家环境保护重金属污染监测重点实验室, 湖南 长沙 410014; 2.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:从海利(常德)农药化工有限公司废水处理池污水中分离得到2株耐盐残杀威降解细菌CS1和CS2,经形态特征、生理生化鉴定及16S rDNA序列分析,2菌株均属于不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。以处于对数生长期的CS1和CS2菌株菌悬液分别按照体积比为1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1复配成混合菌剂,结果CS1和CS2菌悬液体积比为1.5:1(M6)时,对残杀威的降解率最高,达到72.68%。采用海藻酸钠(SA)-活性炭、聚乙二醇(PVA)-活性炭及PVA-SA-活性炭3种组合材料对M6进行包埋,PVA-SA-活性炭固定化M6对残杀威的降解率为73.22%。采用正交试验对影响残杀威降解效率的4个主要因素(残杀威质量浓度、培养基盐度、温度和pH值)进行优化,M6降解残杀威的最佳组合为残杀威质量浓度200 mg/L、盐度3%、pH 6.5、温度30℃,对残杀威的降解率达77.34%;对固定化混合菌M6降解残杀威的影响大小依次为温度、残杀威质量浓度、盐度、pH值。

关键词:残杀威;不动杆菌;混合菌;固定化微球;降解;条件优化

中图分类号:X592 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2019)06-0624-08

Optimization of propoxur degradation by immobilized mixed bacteria

LI Qiwu¹, JIN Hongyu², SHU Qian², GAN Xingli², YANG Haijun², XING Honglin^{1*}

(1.State Key Laboratory for Monitoring Heavy Metal Pollution in Environmental Protection, Changsha, Hunan 410014, China; 2.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Two strains of salt-resistant propoxur-degrading bacteria CS1 and CS2 were isolated from the waste water treatment tank of Hali (Changde) Pesticide Chemical Co., Ltd., and identified as *Acinetobacter* sp. through morphological characteristics, physiological and biochemical identification and 16S rDNA sequence analysis. The suspensions of CS1 and CS2 strains in the logarithmic growth stage were compounded into mixed bacterial agents according to the volume ratio of 1:1, 1:1.5, 1:3, 1.5:1, 2:1, 2.5:1 and 3:1, respectively. Results showed that when the liquid volume ratio of CS1 and CS2 suspensions was 1.5:1(M6), the degradation rate of propoxur was the highest, reaching 72.68%. M6 was embedded with sodium alginate (SA)-activated carbon, polyethylene glycol (PVA)-activated carbon and PVA-SA-activated carbon. A degradation rate of 73.22% was observed when the strains were embedded in PVA-SA-activated carbon. The orthogonal test was used to optimize the 4 main factors that affect the degradation efficiency of propoxur (propoxur mass concentration, medium salinity, temperature and pH). The optimal combination of the 4 factors for degradation of propoxur by M6 include propoxur mass concentration of 200 mg/L, salinity of 3%, pH 6.5 and temperature of 30℃, and the degradation rate of propoxur was up to 77.34%. Degradation of propoxur by immobilized mixed bacteria M6 was effected mostly by temperature, followed by propoxur mass concentration, salinity and pH.

Keywords: propoxur; mixed bacteria; immobilization; degradation; conditions optimization

残杀威(propoxur), 是世界卫生组织(WHO)推荐用于公共卫生害虫防治的 4 种氨基甲酸酯类杀虫剂之一^[1], 广谱、高效, 但在使用过程中易造成环境污染, 危害人体健康^[2-3], 美国环境保护署已将残杀威列入很有可能的人类致癌物名单^[4-5]。

目前主要应用物理吸附法、化学氧化法、生物氧化法等^[6-7]去除环境中的残杀威, 降低农产品中的残留。陈建秋等^[8]以橘皮为材料, 探究改性橘皮吸附水中残杀威的性能和吸附机理, 发现在 pH 值 2~4、温度 25 °C、残杀威质量浓度 61.46 mg/L 的 100 mL 残杀威溶液中投加 0.2 g 改性橘皮时, 对残杀威的吸附效果最好, 橘皮对残杀威的吸附可用 Langmuir 吸附等温式描述。何雷等^[4]采用臭氧氧化法去除水中的残杀威, 发现增加初始臭氧投量有助于对残杀威的快速去除。ANUSHA 等^[9]从城市固体废物中分离出 2 株能够在残杀威质量浓度为 100~200 mg/L 培养基中生长的奈瑟氏球菌亚种(*Nisseria subflava*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。KAMANAVALLI 等^[10]通过富集培养从土壤中分离获得以 2 g/L 残杀威作唯一碳源和氮源生长的细菌, 并鉴定为假单胞菌属 (*Pseudomonas genus*)。针对单菌易流失、耐受性不强、降解不稳定等缺陷^[11-12], 人们开展了混合菌和固定化微生物应用于污染治理的应用研究。袁鑫^[13]使用海藻酸钠和氧化石墨烯制备气凝胶载体, 同时利用异养硝化真菌 *Penicillium* sp.L1 制备并优化菌丝球, 最佳条件为 pH 值 7、接种量为 60 颗、培养时间为 3 d, 在摇瓶中以 2:1(模拟废水: 焦化废水)的比例配制混合废水, 研究 IS-MP 对焦化废水的处理能力, 结果 IS-MP 的处理效果优于游离细菌。戚鑫等^[14]以生物炭为固定化载体, 通过吸附和包埋方法制作复合钝化剂, 探究复合钝化剂对土壤理化性质和可提取态 U、Cd 的影响, 发现吸附固定量大小依次为微生物生物炭处理组、生物炭处理组、包埋固定微生物生物炭处理组, 随着添加量的增加, 钝化效果显著。

笔者以海利(常德)农药化工有限公司废水池水样为菌源, 通过筛选、分离、驯化, 得到以残杀威为唯一碳源和氮源的 2 株耐盐降解菌 CS1 和 CS2, 并进行鉴定; 分别研究单菌、混合菌、固定化混合

菌对残杀威的降解效果; 以海藻酸钠(SA)-活性炭、聚乙二醇(PVA)-活性炭、SA-PVA-活性炭为固定化材料对混合菌进行包埋, 通过正交试验优化了固定化混合菌高效降解残杀威的条件, 以期对残杀威废水的治理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

海利(常德)农药化工有限公司废水污水池水样。

残杀威为海利(常德)农药化工有限公司产品, 纯度大于 97%。

1.2 方法

1.2.1 残杀威降解菌的分离

1) 残杀威降解菌的分离。取废水处理池水样的上层清液 1 mL, 浓度梯度稀释后, 分别取 10^5 、 10^6 、 10^7 梯度的稀释液 1 mL 均匀涂布于 LB 固体培养基上(3 个平行样), 30 °C 恒温培养箱中培养 2~3 d, 待长出菌落后, 挑取单个菌落进行平板划线, 分别接种到 LB 液体培养基中, 待菌株生长至对数期, 分别取 1 mL 菌液至残杀威质量浓度 50 mg/L、盐度 1%、pH 值 7.0 的 MS 培养基中(3 个平行样), 200 r/min、30 °C 振荡培养 72 h。

2) 残杀威降解菌的鉴定。观察降解菌菌株的菌落特征; 通过革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色、荚膜染色等对降解菌进行染色, 观察菌体形态, 并进行电镜扫描观察; 按照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[15]对菌株进行生理生化特性的鉴定; 采用 CTAB 法提取菌株的 DNA, 经 PCR 扩增后, PCR 产物经琼脂糖电泳检测后送上海生工生物工程有限公司测序, 经 BLAST 软件与 GenBank 数据库中已收录的基因序列进行比对, 于 MEGA6.0 上用邻接法^[16]构建系统发育树。

1.2.2 降解菌单菌耐盐及降解残杀威能力的测定

1) 菌株耐盐能力测定。分别取 1 mL 处于对数生长期的降解菌菌液, 加入盐度为 1%、2%、3%、4%、5% 的 MS 培养基中(每组 3 个平行样), 在转速 200 r/min、pH 值 7.0、残杀威质量浓度 50 mg/L、30 °C 条件下振荡培养 72 h, 用紫外分光光度计测定

菌株的生长量。

2) 菌株对残杀威降解能力的测定。分别取 1 mL 处于对数生长期的单菌菌液加入至残杀威质量浓度为 50、100、150、200、250 mg/L 的 MS 培养基中(每组 3 个平行样),在转速 200 r/min、pH 7.0、盐度 1%、30 °C 条件下振荡培养 72 h,高效液相色谱法^[17-19]测定残杀威含量,对比各菌株对残杀威的降解率。

1.2.3 混合菌降解残杀威能力的测定

将处于对数生长期的对残杀威降解能力强的 2 株单菌菌株菌悬液分别按照体积比为 1 : 1(M1)、1 : 1.5(M2)、1 : 2(M3)、1 : 2.5(M4)、1 : 3(M5)、1.5 : 1(M6)、2 : 1(M7)、2.5 : 1(M8)、3 : 1(M9)复配成混合菌剂,取复配菌剂 1 mL 加入至残杀威质量浓度为 150 mg/L 的 MS 培养基中(每组 3 个平行样),在转速 200 r/min、pH 值 7.0、盐度 3%、30 °C 条件下振荡培养 72 h,高效液相色谱法测定残杀威含量,对比各混合菌组合对残杀威的降解率。

1.2.4 混合菌微球的制备

参照文献[20]的方法制备混合菌微球。

1) 称取 1.5 g 海藻酸钠于 48 mL 去离子水中,添加 0.5 g 活性炭,混匀,121 °C 灭菌 20 min,制备 SA-活性炭。当温度降至 30~40 °C 时,分别加入 5 mL 处于对数生长期的 M6 菌液,混匀,用 2.5 mL 无菌注射器滴入质量分数为 1% 的 CaCl_2 的饱和硼酸溶液(8 g/L)中成型,在 4 °C 冰箱中交联 24 h,用生理盐水(0.85%NaCl)和去离子水各洗涤 1 次,即得到 SA-活性炭固定化微球,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2) 称取 4.5 g 聚乙烯醇于 45 mL 去离子水中,添加 0.5 g 活性炭,混匀,121 °C 灭菌 20 min,制备 PVA-活性炭。当温度降至 30~40 °C 时,分别加入 5 mL 处于对数期生长的 M6 菌液,混匀,用 2.5 mL 无菌注射器滴入质量分数为 1% CaCl_2 的饱和硼酸溶液(8 g/L)中成型,在 4 °C 冰箱中交联 24 h,用生理盐水和去离子水各洗涤 1 次,即得到 PVA-活性炭固定化微球,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

3) 称取 0.5 g 海藻酸钠、4.0 g 聚乙烯醇以及 0.5 g 活性炭于 44.5 mL 去离子水中,混匀,121 °C 灭菌

20 min,制备 SA-PVA-活性炭。当温度降至 30~40 °C 时,分别加入 5 mL 处于对数期生长的 M6 菌液,混匀,用 2.5 mL 无菌注射器滴入 1% CaCl_2 的饱和硼酸溶液(8 g/L)中成型,在 4 °C 冰箱中交联 24 h,用生理盐水和去离子水各洗涤 1 次,即得到 SA-PVA-活性炭固定化微球,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

1.2.5 降解单菌和混合菌及固定化混合菌对残杀威的降解效果的测定

1) 设定初始残杀威质量浓度分别为 50、100、150、200、250、300、350、400 mg/L,在残杀威无机盐液体培养基中分别接入 1 mL 单菌、混合菌和 2 g 固定化混合菌颗粒,30 °C、pH 值 7.0、200 r/min 振荡培养 72 h,用高效液相色谱法测定残杀威的降解率。

2) 分别将 1 mL 单菌、混合菌和 2 g 固定化混合菌颗粒接入 50 mL 残杀威质量浓度为 150 mg/L 的无机盐液体培养基中,设定初始盐度分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6%,30 °C、pH 值 7.0、200 r/min 振荡培养 72 h,用高效液相色谱法测定残杀威的降解率。

3) 分别将 1 mL 单菌、混合菌和 2 g 固定化混合菌颗粒接入 50 mL 残杀威质量浓度为 150 mg/L、pH 值 7.0 的无机盐液体培养基中,置于 15、20、25、30、35、40 °C 下,200 r/min 振荡培养 72 h,用高效液相色谱法测定残杀威的降解率。

4) 分别将 1 mL 单菌、混合菌和 2 g 固定化混合菌颗粒接入 50 mL 残杀威质量浓度为 150 mg/L 的无机盐液体培养基中,设置 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,置于 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h,用高效液相色谱法测定残杀威的降解率。

2 结果与分析

2.1 残杀威降解菌菌株的特性及其鉴定

2.1.1 特性

从平板上单菌落中分离纯化得到 5 株对残杀威耐受能力较强的菌株,分别命名为 CS1、CS2、CS3、CS4、CS5。对 5 菌株进行残杀威降解能力测定,

结果(表 1)表明,当残杀威质量浓度为 50 mg/L 时,菌株对残杀威的降解率分别为 50.33%、54.12%、22.31%、12.23%、10.09% 残杀威质量浓度为 50~150 mg/L 时,CS1 和 CS2 菌株对残杀威的降解率呈上升趋势;当残杀威质量浓度大于 150 mg/L 时,CS1 和 CS2 菌株对残杀威的降解率呈下降趋势,降解能力受到抑制。降解菌对残杀威降解能力大小依次为 CS2、CS1、CS3、CS4、CS5。

表 1 降解菌对不同质量浓度残杀威的降解率

Table 1 Propoxur degradation rate at different concentrations of propoxur with different bacterial strains

残杀威质量 浓度/(mg·L ⁻¹)	降解菌对残杀威的降解率/%				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
50	50.33	54.12	22.31	12.23	10.09
100	53.07	57.66	3.33	2.36	1.11
150	56.12	61.07	1.13	0.19	0.18
200	39.78	48.31	0.25	0.13	0.22
250	20.11	34.31	0.21	0.18	0.15
300	8.33	11.15	0.22	0.19	0.15

降解菌菌株的耐盐能力如图 1 所示。CS1、CS2 菌株在盐度为 0%~1%,生长量呈上升趋势,当盐度大于 3%时,生长量下降,生长受到抑制;菌株 CS3、CS4、CS5 随着盐度的增加,生长量一直呈下降趋势。当盐度为 3%时,菌株 CS1、CS2 的生长量均达到最大,CS3、CS4、CS5 菌株几乎不生长,CS1、CS2 菌株耐盐能力明显强于 CS3、CS4、CS5 菌株。

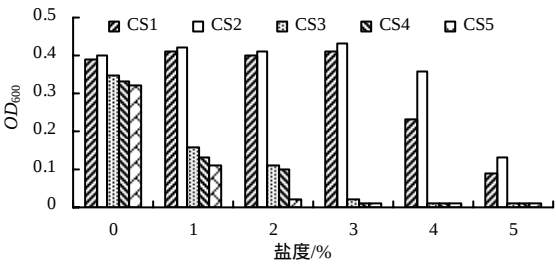


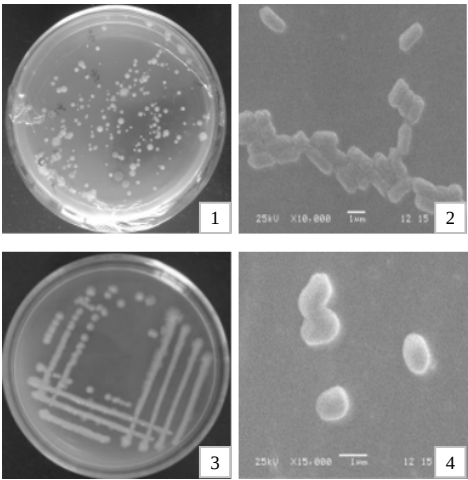
图 1 残杀威降解菌菌株的耐盐能力
Fig.1 Salt tolerance of different strains

2.1.2 菌株鉴定结果

对菌株 CS1 进行形态特征、生理生化鉴定,结果显示,菌株 CS1 菌落呈圆形,浅白色,边缘整齐,中间隆起,湿润有光泽,较黏稠,不产色素,无端

生鞭毛(图 2-1、图 2-2)。革兰氏染色阳性,过氧化氢酶阳性,吡啶试验阴性,甲基红试验阴性,VP 试验阴性,硝酸盐还原试验阳性,淀粉水解试验阴性,乳糖氧化发酵阴性,明胶液化试验阳性。

对菌株 CS2 进行形态特征,生理生化鉴定,结果显示,菌株 CS2 菌落呈圆形,淡黄色,边缘整齐,中间隆起,湿润有光泽,不黏稠,产色素,无端生鞭毛(图 2-3、图 2-4)。革兰氏染色阳性,过氧化氢酶阳性,吡啶试验阴性,甲基红试验阴性,VP 试验阴性,硝酸盐还原试验阳性,淀粉水解试验阳性,乳糖氧化发酵阴性,明胶液化试验阳性。



1、2 为 CS1 的菌落形态;3、4 为 CS2 的菌落形态。
图 2 降解菌菌株的菌落形态及扫描电镜观察结果

Fig.2 The colony morphology and scanning electron microscopy of the strains

CS1、CS2 菌株的 16S rDNA 经过 PCR 扩增,分别得到大小为 1 200 bp、1 300 bp 左右的片段。测序得到菌株 CS1 的 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1 105 bp,菌株 CS2 的 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1 233 bp。经过 BLAST 同源性比对,菌株 CS1 与 Uncultured bacterium(GenBank 登记号为 GQ073520.1)的同源性达 98%,菌株 CS2 与 Uncultured *Acinetobacter* sp.(GenBank 登记号为 KU514881.1)的同源性达 99%,确定菌株 CS1、CS2 为不动杆菌(图 3)。

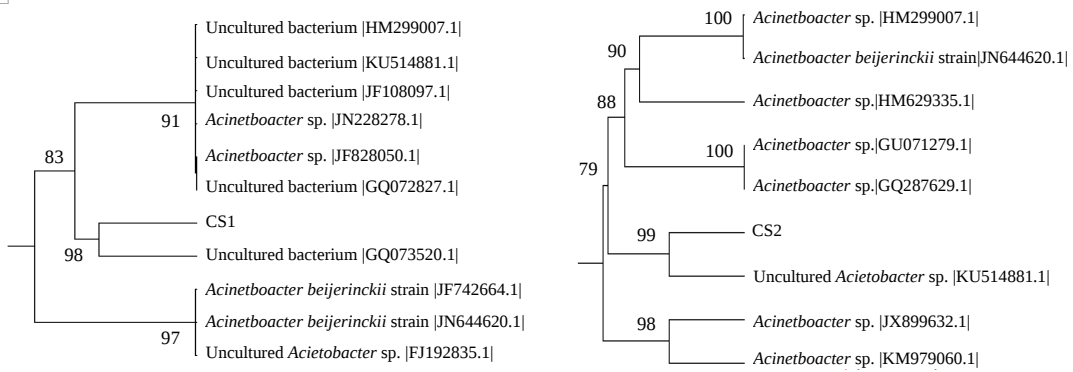


图 3 菌株 CS1 和 CS2 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree for strains CS1 and CS2

2.2 混合菌及其固定化混合菌对残杀威的降解能力

2.2.1 混合菌对残杀威的降解能力

对混合菌 M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9 进行残杀威降解试验，结果(图 4)混合菌对残杀威的降解率依次为 54.89%、55.16%、58.33%、61.33%、60.01%、74.68%、65.33%、50.14%、45.35%，其中 M6 对残杀威的降解率比单菌 CS1、CS2 对残杀威的降解率分别提高 18.56%、13.61%。

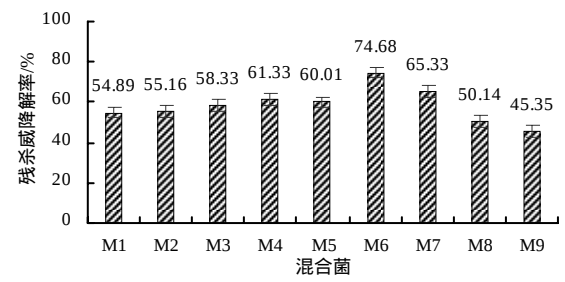
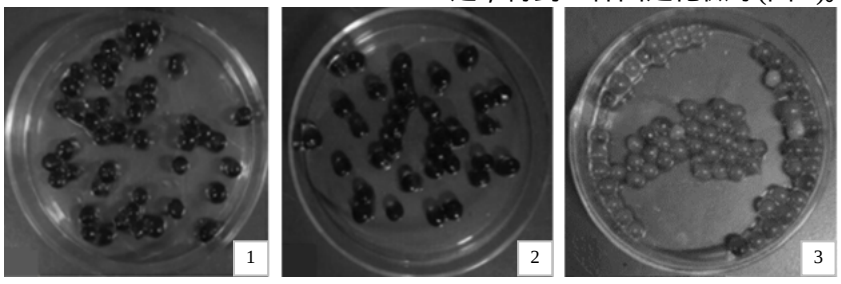


图 4 混合菌对残杀威的降解率

Fig.4 Degradation rate of mixed bacteria on propoxur

2.2.2 固定化混合菌对残杀威的降解能力

分别以 SA-活性炭、PVA-活性炭及 PVA-SA-活性炭作为固定化载体，对混合菌 M6 进行包埋固定，得到 3 种固定化微球(图 5)。



1 PVA-SA-活性炭包埋微球；2 PVA-活性炭包埋微球；3 SA-活性炭微球。

图 5 3 种固定化载体包埋小球

Fig. 5 Pellets embedded in different immobilization carriers

为获得对残杀威降解效率最高的固定化降解菌，将 3 种固定化微球各取 3 g，分别加至 50 mL 无机盐液体培养基中，加入 1 mL 混合菌 M6，残杀威质量浓度 150 mg/L、摇床转速 200 r/min、pH7.0、盐度 3%、30 ℃ 条件下培养 72 h，用高效液相色谱法测定残杀威含量，结果(表 2)SA-活性炭、PVA-活性炭及 SA-PVA-活性炭 3 种固定化混合菌 M6 微球对残杀威的降解率分别为 69.01%、62.61%、73.22%，SA-PVA-活性炭固定化混合菌 M6 微球对残杀威的降解效果最好。

表 2 混合菌 M6 固定化微球对残杀威的降解率

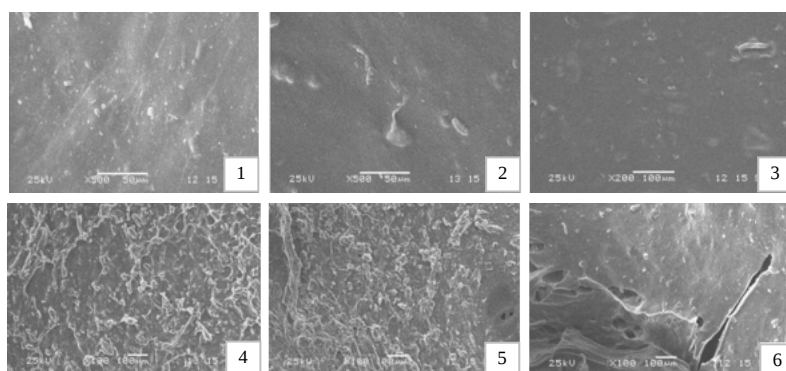
Table 2 Degradation rate of propoxur by immobilized M6

microspheres			
微球样品	保留时间/min	色谱峰面积	对残杀威降解率/%
CK	14.013	3 294.4	0.00
SA-活性炭	14.372	1 022.6	69.01
PVA-活性炭	14.464	882.9	62.61
SA-PVA-活性炭	14.357	1 231.8	73.22

3 种固定化微球降解残杀威前后的表征如图 6 所示。试验前，3 种固定化微球的表面都较光滑，

未出现坑洞,经过 72 h 降解残杀威,固定化微球的表面都变得粗糙,PVA-活性炭微球表面出现坑洞,SA-活性炭微球表面出现裂痕和坑洞,表明 SA-

PVA-活性炭固定化微球与 PVA-活性炭及 SA-活性炭相比,具有更好的强度和柔韧度,不易破损。



1、4 为 SA-PVA-活性炭包埋微球;2、5 为 PVA-活性炭包埋微球;3、6 为 SA-活性炭包埋微球。

图 6 混合菌固定化微球降解残杀威前后的表征

Fig.6 Characterization of differently immobilized microspheres before and after the propoxur degradation experiment

2.3 不同环境条件对单菌、混合菌 M6 及固定化混合菌 M6 降解残杀威的影响

2.3.1 残杀威质量浓度的影响

残杀威质量浓度对单菌 CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 降解残杀威的影响如图 7 所示。当残杀威质量浓度低于 150 mg/L 时,CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 对残杀威降解率影响不明显;当残杀威质量浓度大于 150 mg/L 时,CS1 和 CS2、M6 对残杀威的降解能力下降,固定化 M6 对残杀威的降解率依然保持在较高水平,说明过高浓度的残杀威对 M6 的生长代谢具有一定的抑制作用,但与 CS1 和 CS2、M6 相比,固定化 M6 对残杀威的耐受能力较强,对残杀威的降解效果最好。

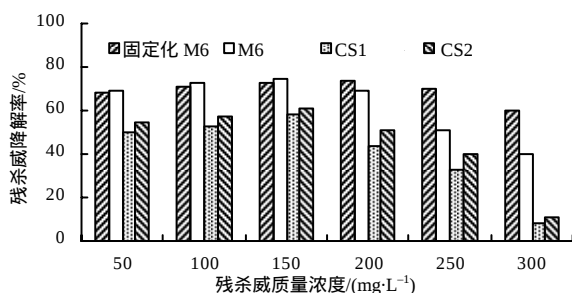


图 7 单菌、M6 及固定化 M6 在不同初始残杀威浓度下对残杀威的降解率

Fig.7 Degradation rate of initial propoxur concentration on the degradation of propoxur respectively with free cells of strains CS1, free cells of strains CS2, free mixed bacteria M6 and immobilized mixed bacteria M6

2.3.2 盐度的影响

盐度对 CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 降解残

杀威的影响如图 8 所示。当盐度低于 3% 时,CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 对残杀威的降解率均保持在较高水平;当盐度大于 3% 时,CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 对残杀威的降解率均下降,其中 CS1 和 CS2、M6 对残杀威的降解率明显下降,固定化 M6 对残杀威的降解率下降较缓慢,这说明低盐度对单菌、混合菌及固定化混合菌降解残杀威的影响并不大;盐度过高时,菌株对残杀威的降解受到抑制,随着盐度的增加,固定化混合菌对残杀威的降解能力下降幅度比单菌或混合菌的缓慢,说明固定化混合菌比单菌及混合菌的抗逆性强,在一定盐度范围内对混合菌 M6 起保护作用。当盐度 3%~6% 时,固定化混合菌 M6 对残杀威的降解效果最好。

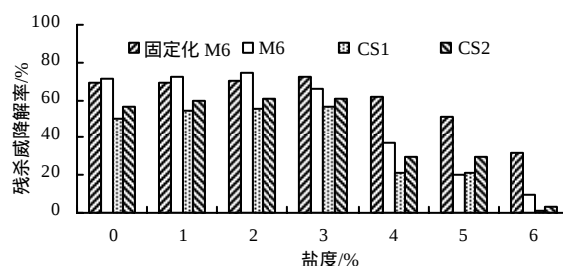


图 8 单菌、M6 和固定化 M6 在不同盐度下对残杀威的降解率

Fig.8 Degradation rate of sodium chloride concentration on the degradation of propoxur respectively with free cells of strains CS1, free cells of strains CS2, free mixed bacteria M6 and immobilized mixed bacteria M6

2.3.3 pH 值的影响

pH 值对单菌、M6 及固定化 M6 降解残杀威的

影响如图 9 所示。当 pH 值为 7 时,CS1 和 CS2 对残杀威的降解率达到最大值;当 pH 值为 7.5 时,固定化 M6 和 M6 对残杀威的降解率均达到最大值。当 pH 值偏低(低于 6.5)或偏高(大于 8.5)时,固定化 M6 对残杀威的降解率均高于 CS1 和 CS2 及 M6,这主要与固定化颗粒的结构有关,其外表面上负载的基团以及少量菌体都有缓冲作用,外层紧密,向内逐渐松散的结构,对混合菌有保护作用,使得固定化颗粒中的混合菌不易失活,这在一定程度上凸显出固定化技术在微生物处理环境废水中的优势。固定化 M6 在弱酸和弱碱性的条件下,对残杀威的降解效果均最好。

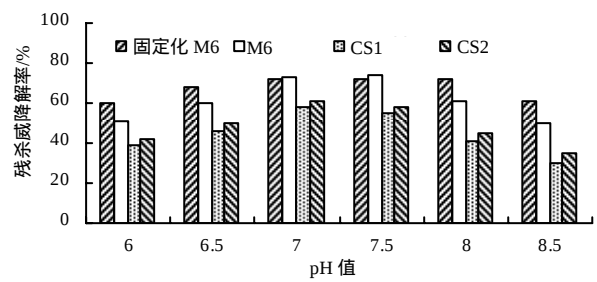


图 9 不同 pH 值下单菌、M6 及固定化 M6 对残杀威的降解率

Fig9 Degradation rate of pH value on the degradation of propoxur respectively with free cells of strains CS1, free cells of strains CS2, free mixed bacteria M6 and immobilized mixed bacteria M6

2.3.4 温度的影响

不同温度下 CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 对残杀威的降解率如图 10 所示。CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 降解残杀威的最佳温度为 20~35℃。在 15~20℃时,CS1 和 CS2、M6 及固定化 M6 降解残杀威的能力逐步提高,但固定化 M6 的降解率低于 CS1 和 CS2 及 M6 的;当温度高于 30℃时,CS1 和 CS2 及 M6 的降解能力低于固定化 M6 的,且 CS1 和 CS2 及 M6 的降解率明显下降。相比之下,固定化 M6 的降解率下降缓慢,在 40℃时,固定化 M6 对残杀威的降解率还能达到 52.13%,同时发现部分固定化颗粒发生变形,且培养液变浑浊,这说明温度过高导致了菌体细胞中酶体系失活,并破坏固定化颗粒结构,从而使残杀威的降解率下降。温度达到 35℃以上时,固定化 M6 对残杀威的降解效果最好。

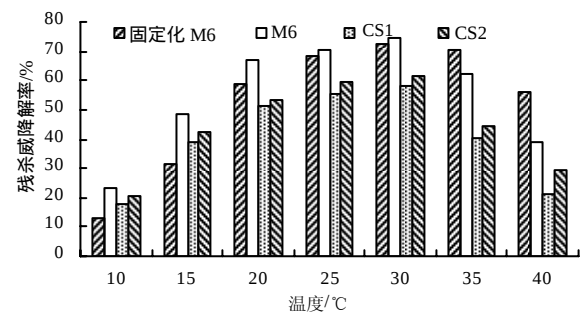


图 10 不同温度下单菌、M6 及固定化 M6 对残杀威的降解率

Fig.10 Degradation rate of temperature on the degradation of propoxur respectively with free cells of strains CS1, free cells of strains CS2, free mixed bacteria M6 and immobilized mixed bacteria M6

2.4 固定化混合菌降解残杀威的条件优化

选择对固定化 M6 降解残杀威有较大影响的因素——残杀威质量浓度、盐度、pH 值、温度进行正交试验(表 3),对固定化 M6 降解残杀威的条件^[21]进行优化,结果列于表 4。

表 3 正交试验因素和水平

Table 3 Orthogonal experimental design				
水平	残杀威质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	盐度/%	pH 值	温度/℃
1	150	2	6.5	25
2	200	3	7.0	30
3	250	4	7.5	35

从表 4 可知,固定化 M6 降解残杀威的最佳条件为:残杀威质量浓度 200 mg/L、盐度 3%、pH 值 6.5、温度 30℃,残杀威降解率达到 77.34%。由 R

表 4 固定化混合菌 M6 对残杀威的降解率

Table 4 Degradation rate of propoxur by immobilized mixed bacteria M6					
试验号	残杀威质量 浓度/(mg·L ⁻¹)	盐度/%	pH 值	温度/℃	残杀威 降解率/%
1	150	2	6.5	25	66.13
2	150	3	7.5	30	74.32
3	150	4	7	35	67.36
4	200	2	7.5	35	68.62
5	200	3	7	25	75.19
6	200	3	6.5	30	77.34
7	250	2	7	30	69.82
8	250	2	6.5	35	70.36
9	250	4	7.5	25	71.79
I	208.68	204.57	213.83	213.11	
II	221.15	219.87	212.37	221.51	
III	211.97	216.49	214.73	206.34	
K ₁	69.56	68.19	71.27	71.04	T=640.93
K ₂	73.72	72.29	70.79	73.84	
K ₃	70.65	72.16	71.58	68.78	
R	4.16	4.10	0.79	5.06	

值大小可知, 4 种因素对固定化混合菌 M6 降解残杀威的影响大小依次为温度、残杀威质量浓度、盐度、pH 值。

3 小结

对 2 株耐盐高效降解残杀威菌株 CS1 和 CS2 进行了形态特征、生理生化及 16S rDNA 基因序列分析, 确定菌株 CS1 和 CS2 均为 *Acinetobacter* sp.。

M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9 等 9 个混合菌组合中, M6 对残杀威的降解率为 74.68%, 降解效果最好; 利用 SA-活性炭、PVA-活性炭及 SA-PVA-活性炭 3 种固定化材料分别对 M6 进行包埋, 其中 SA-PVA-活性炭固定化混合菌 M6 微球对残杀威的降解率达到 73.22%, 降解效果最佳。

考察残杀威质量浓度、盐度、pH 值和温度对单菌 CS1 和 CS2、混合菌 M6 及固定化混合菌 M6 降解残杀威的影响, 结果固定化混合菌 M6 对残杀威的耐受能力比 CS1 和 CS2、M6 强。

采用正交试验优化 PVA-SA-活性炭固定化混合菌对残杀威降解率最佳条件, 结果固定化 M6 降解残杀威的最佳条件为: 残杀威质量浓度 200 mg/L、盐度 3%、pH 值 6.5、温度 30 °C, 对固定化混合菌 M6 降解残杀威的影响因素大小依次为温度、残杀威质量浓度、盐度、pH 值。

参考文献:

- [1] 项军. 残杀威和硫双威原药全组分分析研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [2] 张士瑾. 利用牙鲈鳃细胞 FG 和斑马鱼胚胎对氨基甲酸酯类杀虫剂残杀威和西维因的细胞毒性、遗传毒性和致畸性的毒性评估研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [3] 陈忠林, 何雷, 沈吉敏, 等. 高效液相色谱法测定水体中的痕量残杀威[J]. 中国给水排水, 2012, 28(10): 93-95.
- [4] 何雷. 臭氧氧化去除水中残杀威的实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011.
- [5] SARAJI M, ESTEKI N. Analysis of carbamate pesticides in water samples using single-drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(3): 1091-1100.
- [6] 汤小胜. 水体中几种污染物的吸附及高级氧化技术降解的研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2015.
- [7] 张强, 刘燕, 魏源源, 等. 饮用水消毒预处理工艺研究进展[J]. 化学通报, 2010, 73(11): 980-985.
- [8] 陈建秋, 杨轲, 胡志军, 等. 橘皮吸附水中残杀威的研究[J]. 环境工程学报, 2010, 4(7): 1488-1492.
- [9] ANUSHA J, KAVITHA P K, LOUELLA C G, et al. A study on biodegradation of propoxur by bacteria isolated from municipal solid waste[J]. International Journal of Biotechnology Applications, 2009, 1 (2): 26.
- [10] KAMANAVALI C M, NINNEKAR H Z. Biodegradation of propoxur by *Pseudomonas* species[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16 (4): 329-331.
- [11] 周慧君. 稠油降解菌群的构建及冻干菌剂制备[D]. 北京: 中国石油大学, 2017.
- [12] 甘良, 蓝星杰, 戴蓬博, 等. 放线菌混合菌剂对西瓜枯萎病的防治作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2017, 31(4): 516-523.
- [13] 袁鑫. 固定化微生物强化工业废水处理的研究[D]. 太原: 太原理工大学, 2019.
- [14] 戚鑫, 陈晓明, 肖诗琦, 等. 生物炭固定化微生物对 U、Cd 污染土壤的原位钝化修复[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(8): 1683-1689.
- [15] RE 布坎南刘, NE 杰本斯. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [16] GEORGE M G. Bergey's Manual Trust and Department Microbiology and Molecular Genetics[M]. East Lansing: Michigan State University, 1974.
- [17] GEORGE M G. Bergey's Manual Trust and Department of Microbiology and Molecular Genetics[M]. East Lansing: Michigan State University, 1974.
- [18] 张海涛, 刘文斌, 杨海君, 等. 一株耐盐高效苯酚降解菌的筛选、鉴定、响应面法优化与降解动力学研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(9): 3200-3207.
- [19] 刘文斌, 张海涛, 杨海君, 等. 辛基酚聚氧乙烯醚高效降解混合菌 L9 的固定化及其条件优化[J]. 环境工程学报, 2016, 10(10): 6056-6064.
- [20] PEREZ-RUIZ T, MARTINEZ-LOZANO C, GARCIA M D. Determination of N-methylcarbamate pesticides in environmental samples by an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection[J]. J Chromatogr A, 2007, 1164(1): 174-180.
- [21] WU J, XIANG B, XIA J. Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with high performance liquid chromatography to the determination of propoxur in environmental and beverage samples[J]. Microchim Acta, 2009, 166: 157-162.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维