

生物炭固定SM3菌剂的制备及其对三唑酮的降解研究

王莹, 林凤翔, 岳星雨, 张赛, 吴宗彬, 施艳红

引用本文:

王莹, 林凤翔, 岳星雨, 张赛, 吴宗彬, 施艳红. 生物炭固定SM3菌剂的制备及其对三唑酮的降解研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2604–2612.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1151>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

农业环境科学学报. 2017, 36(2): 382–386 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1018>

微生物固定化生物炭对水体铵态氮去除效果的研究

吴梦莉, 李洁, 智燕彩, 李刚, 赖欣, 居学海, 张贵龙

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1071–1078 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1368>

固定化Pseudomonas citronellae SJTE-3菌剂对水中炔雌醇的去除作用

王雁秋, 彭万里, 梁如冰

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1803–1810 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0277>

生物质炭固定化融合菌株F14方法的研究及其对茚的去除

张松, 侯彬, 纪婷婷, 刘阳, 黄飞, 秦梓菲, 卢静

农业环境科学学报. 2018, 37(3): 464–470 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1337>

铁还原条件下铁负载生物质炭固定三价砷的能力及其稳定性

朱晓东, 杨敏, 吴松, 施维林, 周东美

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2735–2742 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0548>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王莹, 林凤翔, 岳星雨, 等. 生物炭固定SM3菌剂的制备及其对三唑酮的降解研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2604-2612.

WANG Y, LIN F X, YUE X Y, et al. Preparation of biochar immobilized SM3 bacterial agent and degradation of triadimefon[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2604-2612.



开放科学 OSID

生物炭固定SM3菌剂的制备及其对三唑酮的降解研究

王莹, 林凤翔, 岳星雨, 张赛, 吴宗彬, 施艳红*

(安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘要:针对环境中存在的三唑酮污染问题,本研究以生物炭为载体,一株三唑酮高效降解菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)SM3为固定化菌种,采用吸附法制备成固定化菌剂。从4种生物炭中优选出具有比表面积较大、吸附性能好等特点的固定化载体,并对其制备条件进行优化,在此基础上,评估生物炭固定化菌剂的稳定性及其对三唑酮的降解效果。结果显示,4种生物炭中,油茶壳生物炭比表面积及孔隙大、官能团含量丰富、固定化菌剂对三唑酮降解效果优于其他3种,选择其作为固定化SM3菌的载体。单因子优化试验表明,在载体投加量 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,SM3接菌量5%,固定温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,固定时间36 h所制备的固定化菌剂对三唑酮的降解率可达93.27%。最佳条件下制备的固定化菌剂在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及室温($25\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下存放28 d后对三唑酮的降解率仍可达到81.73%和58.18%,菌剂降解效果具有良好的稳定性。油茶壳生物炭固定化SM3菌剂的制备,为解决环境中三唑酮污染问题提供了良好的生物修复材料。

关键词:生物炭;三唑酮;微生物固定化技术;生物降解

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)12-2604-09 doi:10.11654/jaes.2022-1151

Preparation of biochar immobilized SM3 bacterial agent and degradation of triadimefon

WANG Ying, LIN Fengxiang, YUE Xingyu, ZHANG Sai, WU Zongbin, SHI Yanhong*

(School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To address the problem of triadimefon contamination in the environment, this study prepared an immobilized bacterial agent by adsorption method using biochar as a carrier and an efficient triazolone degrading bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* (SM3) as an immobilized strain. The immobilized carriers with characteristics of large specific surface area and good adsorption performance were preferably selected from four types of biochar, and their preparation conditions were optimized, based on which the stability of biochar immobilized bacterial agents and their degradation effects on triazolone were evaluated. The results showed that among these four, *Camellia oleifera* biochar had large specific surface area and pore space, rich functional groups, and better degradation effect of immobilized bacterial agent on triadimefon than the other three, and hence was selected as the carrier for immobilization of SM3 bacteria. The single-factor optimization test showed that the degradation rate of triadimefon by the immobilized bacterial agent reached 93.27% when prepared at a carrier dosage of $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, SM3 inoculum of 5%, immobilization temperature of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and immobilization time of 36 h. The degradation rate of the immobilized bacterial agent prepared under the optimal conditions was reported reaching 81.73% and 58.18% for triadimefon after 28 d at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and at room temperatures ($25\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$), with the bacterial agent displaying good stability. The preparation of immobilized SM3 bacterial agent from *Camellia oleifera* biochar thus provides a good bioremediation material to reduce triadimefon pollution in the environment.

Keywords: biochar; triadimefon; microbial immobilization technology; biodegradation

收稿日期:2022-11-11 录用日期:2022-12-06

作者简介:王莹(1997—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向为环境污染微生物修复。E-mail:w1731591874@163.com

*通信作者:施艳红 E-mail:shiyh@ahau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(31972981)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31972981)

三唑酮(Triadimefon)是一种广谱、内吸性强的三唑类杀菌剂,因其具有高效、低毒以及持效期长的特性而被广泛用于保护农作物不受锈病、白粉病和其他真菌病害的侵害^[1-3]。随着国家政策和农业种植结构的调整,三唑酮在我国的使用量持续增加^[4],但由于农药的有效利用率极低,导致约70%~90%的农药残留在土壤中^[4-6]。残留的三唑酮经土壤吸附解吸后,又通过雨水径流进入水体环境中,由于三唑酮能够在生物体内累积代谢并且表现出毒性效应,从而对水环境和土壤环境生态系统产生危害^[7-8]。此外,三唑酮可通过食物链进入人体对人类健康构成潜在威胁^[9-10],研究表明三唑酮对哺乳胚胎产生毒性导致胚胎畸形,还可诱导啮齿动物的肿瘤发生^[11-12]。因此,如何实现环境中三唑酮的去除,成为当前亟待解决的重要问题。

污染环境微生物修复技术因具有成本低、效果好、环境友好、无二次污染等优点得到了国内外众多学者的关注^[13-17],但在实际污染环境应用中存在细菌存活率低、与土著微生物竞争大以及降解活性降低等问题^[18-19]。微生物固定化技术(MIT)是利用化学、物理等方法,将游离的微生物限制在特定的空间区域内,同时保持微生物的活性^[20],具有细胞密度高、稳定性好、能够重复使用等优点^[21-22],而MIT的关键是载体。生物炭孔隙率高,传质性能好,成本低,无毒性^[23],可为微生物提供栖息地,被认为是一种高效的微生物固定化载体^[24]。

近年来研究者多关注于生物炭对重金属、有机污染物的吸附去除作用,而对生物炭固定化微生物联合作用降解去除环境中的农药残留研究甚少^[25-27]。生物炭不仅富含孔隙结构为微生物生长提供庇护,还可以作为营养物质促进其生长^[28],以生物炭为载体的固定化技术不仅提高了微生物的降解效率,而且增强了微生物的生存活力,对于环境中污染物的除去具有重大潜力^[29-31]。

本研究通过对比以油茶壳、污泥、鸡粪和玉米秸秆为原料得到的4种生物炭为载体,制备成固定化菌剂,考察固定化后菌株对三唑酮的降解效果,选取降解效果最优的生物炭作为最终的微生物固定化载体;采用单因素试验法优化菌剂制备过程中生物炭的投加量、接菌量、固定化温度以及固定化时间,以期获得降解效果好且持效期长的固定化菌剂,为环境中三唑酮污染的生物修复提供效果较好的功能材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

课题组前期分离筛选获得的一株三唑酮高效降解菌SM3,经鉴定为*Stenotrophomonas maltophilia*。

1.1.2 供试药品

供试药品三唑酮标准品(纯度 $\geq 98.7\%$)购于北京伊诺凯科技有限公司。

1.1.3 供试生物炭

以油茶壳、污泥、玉米秸秆和鸡粪作为生物炭原料,用超纯水将原料清洗洁净,60℃烘干24h后粉碎过10目筛,在热解温度为500℃条件下N₂(流速5L·min⁻¹,99.99%)热解3h,将制好的生物炭研磨并过筛后干燥保存备用。以油茶壳、污泥、玉米秸秆和鸡粪作为生物炭原料的生物炭分别命名为CC、SC、RC、MC。

1.1.4 供试培养基及试剂

活化培养基:琼脂粉2g、蛋白胨2g、牛肉膏0.6g、氯化钠1g、pH值7.4,加蒸馏水定容至200mL,121℃灭菌20min。

LB培养基:胰蛋白胨2g、酵母粉1g、氯化钠2g、pH值7.4,加蒸馏水定容至200mL,121℃灭菌20min。

无机盐培养基:K₂HPO₄ 0.1g、CaSO₄ 0.04g、(NH₄)₂SO₄ 0.1g、MgSO₄·7H₂O 0.2g、NaCl 0.1g、FeSO₄·7H₂O 0.002g、pH值7.4,加蒸馏水定容至1L,121℃灭菌20min。

1.1.5 三唑酮检测条件

检测仪器为Agilent1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。色谱柱为C18柱(5μm,250mm×4.6mm;Agilent Zorbax RRHDEclipse Plus)。柱温30℃,流动相V_{甲醇}:V_水为60:40,流速1.0mL·min⁻¹,检测波长220nm,进样量10μL。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的制备

将SM3菌株在活化培养基中活化后提纯接入LB培养基中,在30℃、150r·min⁻¹下培养至OD₆₀₀=1.0,5000r·min⁻¹下离心8min,弃上清液获得菌体,再以0.85%生理盐水配制成菌悬液(OD₆₀₀=1.0)备用。

1.2.2 生物炭固定化菌剂的制备

采用吸附法来制备生物炭固定化菌剂,在50mL锥形瓶中放入2g生物炭,121℃灭菌20min后将冷

却的生物炭加入LB培养基中,接入一定量的菌悬液,在30℃、150 r·min⁻¹下固定化培养一定时间后取出,用300目筛过滤出生物炭固定化菌剂后再用0.85%的无菌生理盐水清洗菌剂,除去游离菌体,重复操作3次即得到生物炭固定化菌剂。

1.2.3 样品前处理

取含有三唑酮的样品溶液5 mL,加入乙腈溶液10 mL,振荡30 min后进行超声萃取30 min,加入氯化钠3 g涡旋3 min,以12 000 r·min⁻¹高速离心2 min。取上清液过0.22 μm有机滤膜后待测。

1.2.4 生物炭表征

采用扫描电镜(Hitachi S-4800)观察生物炭以及固定化菌剂的表面形态特征;利用全自动比表面积和孔隙分析仪(TriStar II)测得生物炭的比表面积及孔隙特征;以全自动元素分析仪(Vario EL cube)测得生物炭的C、N、H、O元素含量;以傅立叶红外光谱仪(Nicolet iS50)测定生物炭表面官能团。

1.2.5 生物炭固定化菌剂降解效果测定

将50 mg生物炭固定化菌剂投入5 mL无机盐培养基中,加入20 mg·L⁻¹三唑酮置于30℃、150 r·min⁻¹的恒温摇床中,7 d后取样,以高效液相色谱法测定体系中三唑酮含量,并计算降解率。

1.2.6 生物炭固定化菌剂制备条件优化

基础制备条件:将生物炭固定化菌剂(载体投加量为10 mg·mL⁻¹,接菌量为5%,固定温度30℃,固定时间24 h),投入三唑酮浓度为20 mg·L⁻¹无机盐培养基中,以未投加固定化菌剂的样品为对照,7 d后测定三唑酮的残留量并计算降解率,每个处理设置3个平行。采用单因素实验法,依次改变以下单一条件,研究不同固定化条件下所制备的生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解效果,获得菌剂的最佳制备条件。

(1)生物炭投加量(mg·mL⁻¹):10、20、40、80;

(2)SM3接菌量(%):1、3、5、10、20;

(3)固定化时间(h):12、24、36、48、72;

(4)固定化温度(℃):15、20、25、30、35。

1.2.7 优化后生物炭固定化菌剂扫描电镜观察及对三唑酮的降解试验

菌剂扫描电镜观察:以0.1 mol·L⁻¹的磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤生物炭固定化菌剂,加入2.5%戊二醛溶液固定12 h后用磷酸缓冲液洗涤2次,在乙醇溶液中梯度脱水后进行临界点干燥,喷金后进行扫描电镜分析。

菌剂对三唑酮的降解:将最佳条件下制备的生物

炭固定化菌剂、生物炭、菌悬液投入200 mL无机盐培养基中(三唑酮浓度为20 mg·L⁻¹),每隔1 d,连续10 d取样,测定三唑酮的残留浓度并计算降解率。

1.2.8 生物炭固定化菌剂的存储效果

最佳固定化条件下制备的油茶壳生物炭固定化菌剂、培养等量游离菌,于室温(25~35℃)和4℃条件下保存0、7、14、21 d和28 d后分别投入无机盐培养基中(三唑酮浓度为20 mg·L⁻¹),7 d后测定三唑酮的浓度并计算降解率。

1.2.9 统计与结果分析

采用以下公式来计算降解率:

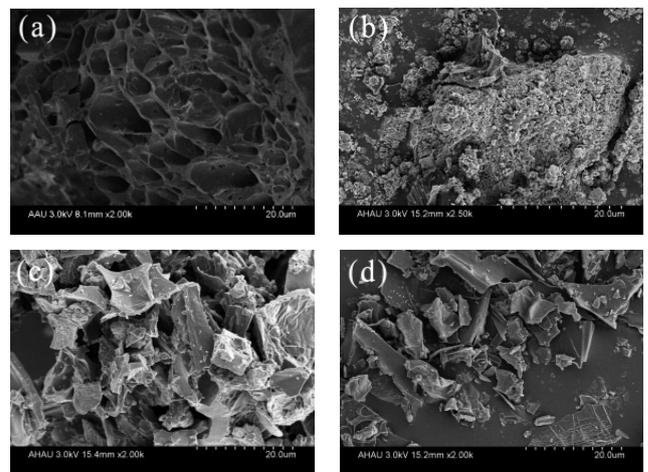
$$D = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

式中: D 为三唑酮降解率,%; C_0 为空白对照组三唑酮浓度,mg·L⁻¹; C_t 为 t 时刻体系中三唑酮残留浓度,mg·L⁻¹。重复测试3次。实验数据以平均值±标准误差表示,利用SPSS和Graphpad 8.0软件处理实验数据和绘图。

2 结果与讨论

2.1 生物炭表面微观结构

通过扫描电镜观察4种生物炭的表面结构如图1所示,可以看出不同原材料所制成的生物炭在外貌形态上有明显不同。CC具有明显的孔隙结构,表面分布着凹凸不平的褶皱有利于微生物附着;SC颗粒紧密堆积,呈现块状聚集,无明显孔洞结构;RC和MC表观类似排列凌乱,没有明显孔隙结构。生物炭孔隙



(a)CC, (b)SC, (c)RC, (d)MC

图1 生物炭扫描电镜图(×2 000倍)

Figure 1 Scanning electron microscopy(SEM) of biochar (×2 000 times)

结构能为微生物提供栖息地,并且提高微生物对外界环境压力的抵抗力^[13]。

2.2 生物炭元素、比表面积以及孔隙结构

不同生物炭元素分析结果如表1所示,C元素为几种生物炭的主要组成元素,含量均在54.76%以上。C/N值对微生物的生长影响较大,最适合细菌生长的C/N值为20:1~25:1,比值低于20导致微生物生长繁殖所需的能量来源受限,而高于25会导致微生物缺少N元素活力变差,降解有机质的能力变差^[32],相同热解温度下4种生物炭的C/N值表现为RC>MC>SC>CC,其中CC的C/N值为38.56,最接近25:1;生物炭中的(O+N)/C、O/C值分别反映了生物炭的极性、亲水性大小,比例越大极性、亲水性越大^[33],CC的(O+N)/C比值较高,说明其具有更多的极性官能团;生物炭中有机质的芳香性以及碳化程度可以通过C/H比值的大小来评价,C/H比值大于1通常表明生物炭芳香化以及碳化程度较高^[34],芳香化程度较高有利于有机污染物的吸附^[21],4种生物炭的比值均大于1说明都具有较高的芳香化程度,表现为RC>CC>SC>MC,其中RC和CC的C/H值较大,分别为59.96和53.06。

生物炭的比表面积和孔隙结构如表2所示,GUO等^[35]的研究表明总孔孔容、孔径较大有利于微生物进入生物炭获取养分,4种生物炭的孔径均为介孔结构(2~50 nm),平均孔径最小的是SC(0.73 nm)远小于其他3种生物炭(4.35~6.35 nm),4种生物炭中总孔

孔容最大的是CC(0.034 cm³·g⁻¹)。生物炭比表面积对生物炭固定化微生物的数量影响相比于孔隙体积更大,因为孔隙缺少足够的营养物质,而比表面积较大可以为微生物提供更多吸附位点与外界进行物质交换^[36]。4种生物炭的比表面积表现为CC>RC>MC>SC,其中CC最大为56.79 m²·g⁻¹。通过综合比较可以看出油茶壳生物炭芳香化程度高、比表面积大、孔隙体积较大,有利于微生物附着生长。

2.3 生物炭表面官能团分析

通过FTIR可以用来测定生物炭的表面官能团。图2显示的是相同温度下(500℃)油茶壳、污泥、鸡粪和玉米秸秆4种生物炭的红外光谱图,图中可见4种生物炭共同吸收峰的波数和属性:3 445 cm⁻¹(—OH伸缩振动)、2 921 cm⁻¹和2 850 cm⁻¹(烷烃中C—H对称与不对称伸缩振动)、1 631 cm⁻¹(烯烃中C=C伸缩振动)、1 386 cm⁻¹(醇类或酚类中—OH面内弯曲)、539 cm⁻¹(无机物质伸缩振动产生)^[37]。羧基和羟基的存在将增加生物炭的阳离子交换能力的反应性,有利于对污染物的吸附且羧基、酰胺基等官能团有利于微生物细胞的黏附与增殖^[38]。BC在1 036 cm⁻¹(醇类酚类C—O伸缩振动)、1 317 cm⁻¹(烷烃C—H弯曲)、879 cm⁻¹(羧酸—OH弯曲)等多处还有明显吸收峰,可见原材料不同其官能团种类和含量均有不同,相比其他3种生物炭油茶壳生物炭官能团数量最为丰富,有利于污染物的吸附以及微生物的增殖,适合用作固定化载体^[39-40]。

2.4 生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解效果

4种生物炭固定化菌剂对于三唑酮的降解效果如图3所示,其中CC固定化菌剂对于三唑酮的降解率为81.95%,高于其他3种生物炭固定化菌剂以及游离菌对于三唑酮的降解率。SC固定化菌剂对于三唑

表1 生物炭元素组成

Table 1 Elemental composition of biochar

| 生物炭类型 Type of biochar | 元素组成 Element composition/% | | | | 原子比 Atomic ratio | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------|------|------|---------------------|---------|--------|-------|
| | C | O | N | H | O/C | (O+N)/C | C/N | C/H |
| CC | 54.76 | 18.68 | 1.42 | 1.03 | 0.34 | 0.37 | 38.56 | 53.06 |
| SC | 64.96 | 5.48 | 1.20 | 1.56 | 0.08 | 0.10 | 54.13 | 42.29 |
| RC | 74.83 | 10.43 | 0.64 | 1.25 | 0.20 | 0.15 | 116.92 | 59.96 |
| MC | 56.86 | 13.65 | 0.97 | 1.88 | 0.24 | 0.26 | 58.62 | 30.21 |

表2 生物炭比表面积和孔隙结构

Table 2 Specific surface area and pore structure of biochar

| 生物炭类型 Type of biochar | 比表面积 Specific surface area/(m ² ·g ⁻¹) | 平均孔径 Average aperture/ nm | 总孔孔容 Total hole capacity/ (cm ³ ·g ⁻¹) |
|--------------------------|--|---------------------------------|---|
| CC | 56.79 | 4.35 | 0.034 |
| SC | 0.94 | 0.73 | 0.001 |
| RC | 42.58 | 6.85 | 0.023 |
| MC | 23.63 | 5.84 | 0.011 |

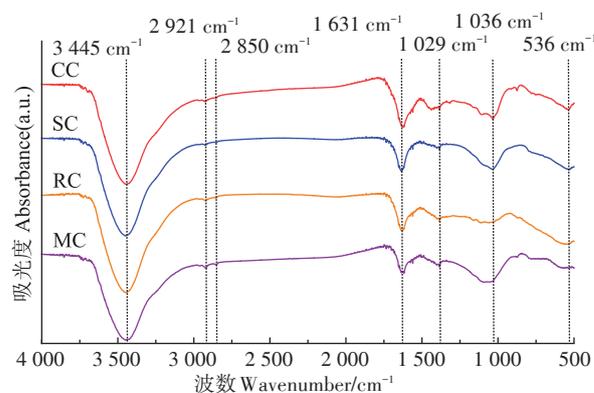
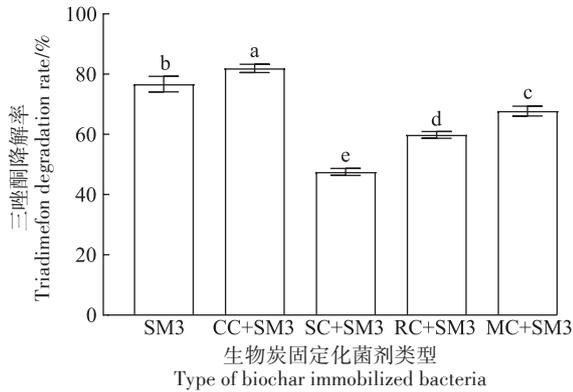


图2 傅里叶红外光谱分析(FTIR)

Figure 2 Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR)



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同
 Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). The same below

图3 不同类型生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解

Figure 3 Degradation of triadimefon by different types of biochar immobilized bacteria

酮的降解效果最差仅为47.53%，因为污泥生物炭孔隙分布较少且比表面积小可供微生物吸附的位点较少。RC和MC固定化菌剂的降解效率均低于SM3的降解效率。因此综合以上的SEM表面微观结构观察、元素分析以及比表面积和孔隙分析，最终选定比表面积大、孔隙结构丰富、官能团丰富，且制备的固定

化菌剂三唑酮降解效率高的油茶壳生物炭作为SM3的固定化载体，进行后续固定条件优化。

2.5 固定化菌剂中生物炭的投加量优化

将油茶壳生物炭投加量为 $10\sim 80\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 所制成的固定化菌剂投入含有 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三唑酮的无机盐培养基中，测定其对三唑酮的降解效果。如图4a所示，生物炭投加量在 $10\sim 80\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 所制成的固定化菌剂对于三唑酮的降解率呈现先增加后降低的趋势。当固定化菌剂制备时的生物炭投加量在 $10\sim 20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，菌剂对三唑酮的降解率从69.64%增加到86.09%，随后逐渐减小。这是因为在一定的时间内，载体投加量的不同会导致单位质量的生物炭所固定高效降解菌的数量差异，降解效果亦有所不同^[41]。结合生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解效果，在菌剂的制备过程中生物炭的最佳投加量为 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 固定化菌剂中接菌量优化

接菌量为1%~20%所制备的生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解效果如图4b所示，从图中可知，接菌量在5%时所制备的固定化菌剂对于三唑酮的降解率最高达87.54%。当接菌量在1%~5%时，随着接菌量的增加所制备的固定化菌剂对三唑酮的降解率随之增加；当接菌量>5%时，菌剂对三唑酮的降解率逐

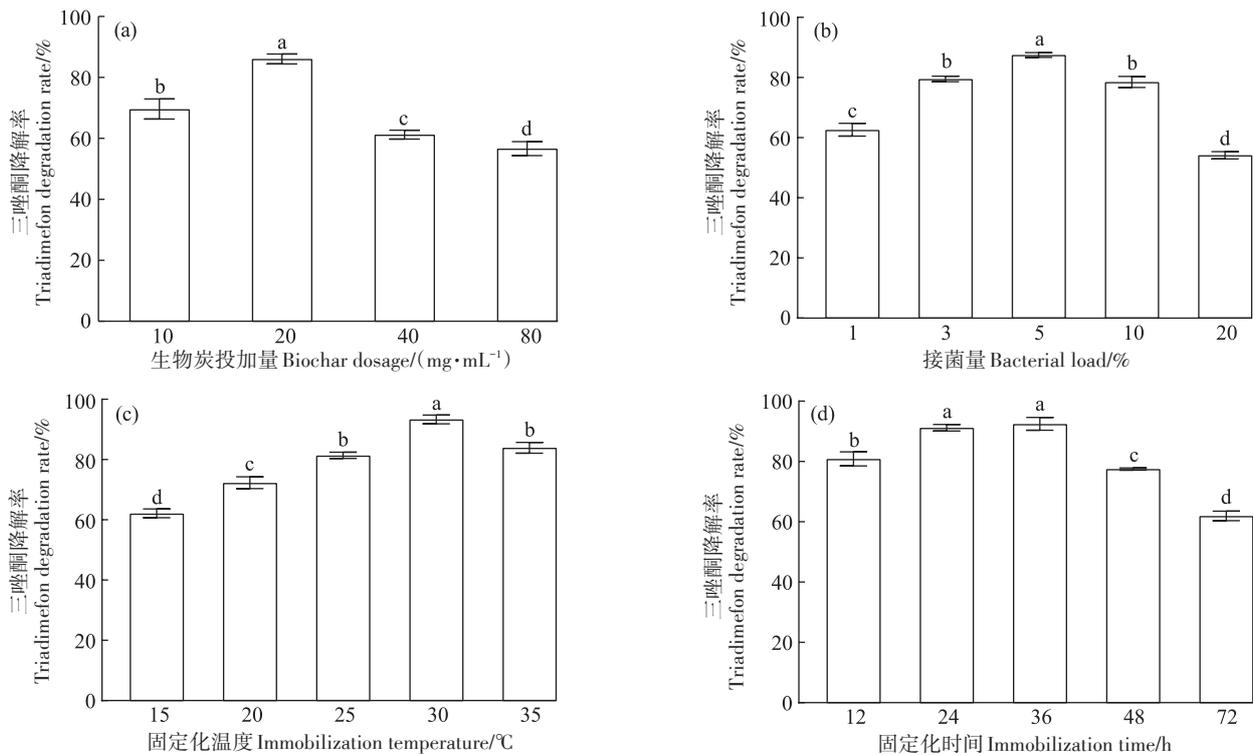


图4 不同固定化条件下所制备油茶壳生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解

Figure 4 Degradation of triadimefon by biochar immobilizing agent prepared under different immobilization conditions

渐减小,主要是由于接菌量过大而养分有限,经过短时间生长后,菌群迅速进入衰亡期,微生物大量死亡^[42],导致固定的细菌数目减少,最终影响菌剂对三唑酮的降解。因此在菌剂的制备过程中最佳的接菌量为5%。

2.7 固定化菌剂中固定化温度优化

由固定化温度为15~35℃所制备的生物炭固定化菌剂对于三唑酮的降解效果如图4c所示,当固定化温度<30℃时制备的固定化菌剂对三唑酮的降解率随温度的升高而增大,在30℃时达到最大为93.35%;当固定化温度为35℃时,降解率下降至83.93%。本研究中的SM3生长的最适温度为30℃,高于或低于最适温度均不利于微生物的生长,从而对生物炭固定化微生物产生影响^[43],因此菌剂的最佳固定化温度选定为30℃。

2.8 固定化菌剂中固定化时间优化

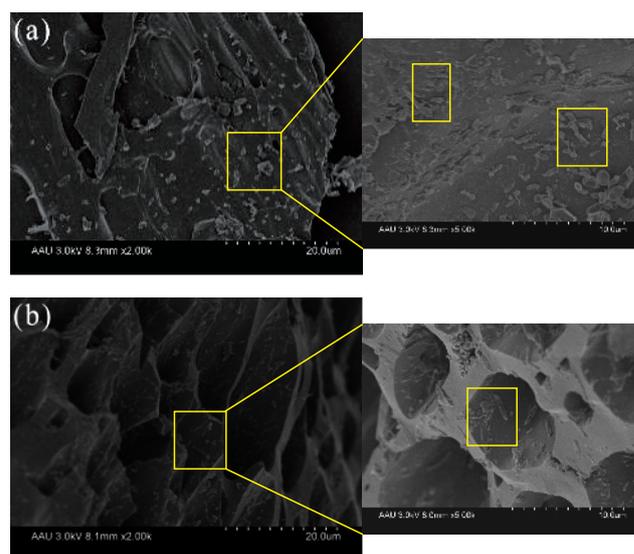
固定化时间为12~72h所制备的生物炭固定化菌剂对三唑酮的降解效果如图4d所示,随着固定化时间的增加,固定化菌剂对三唑酮的降解率先增加后减小。当固定化时间<36h,所制成的菌剂对三唑酮的降解率持续增加,从80.91%增加到92.49%;当固定化时间>36h时,降解率开始逐渐减小,固定化时间72h时菌剂对三唑酮的降解率仅为61.98%,较36h的降解率减少了30.51个百分点。这个过程主要与降解菌的生长相关,固定化时间过短,降解菌还处于生长迟缓期,导致生物炭固定的降解菌数目较少,固定化时间太大会使降解菌进入衰亡阶段,同样导致固定的数目较少,最终都会导致固定化菌剂对三唑酮降解率降低^[44]。因此36h为最佳的固定化时间,此时降解菌有着较高的活性。

2.9 固定化菌剂的电镜观察及对三唑酮的降解试验

综上所述可以得出油茶壳生物炭固定化菌剂制备的最佳条件:生物炭载体的投加量为20 mg·mL⁻¹,SM3接菌量为5%,固定温度为30℃,固定时间为36h。将此条件下所制备的固定化菌剂(SCC)进行扫描电镜观察,如图5所示,图5a显示大量的SM3细菌被固定在油茶壳生物炭凹凸不平的表面上,图5b显示孔隙中也负载了大量的SM3,说明油茶壳生物炭较大的比表面积和丰富的孔隙给微生物提供了大量的附着位点,所制备的菌剂也具备了对三唑酮的高效微生物降解条件。

将最佳条件下制备的生物炭固定化菌剂、生物炭、菌悬液投入200 mL无机盐培养基中,加入20 mg·L⁻¹三唑酮,连续10 d取样,三唑酮的降解率随时间变化如图6所示,经破碎取样后吸附在生物炭上的三唑

酮被解吸出来,只有少量三唑酮被降解,可能是由于生物炭上的部分物质与三唑酮发生反应,在第1天后三唑酮的降解率保持在10%以下,因此在没有降解菌的参与下,生物炭对三唑酮仅是吸附作用;游离菌在1 d之前降解速率较慢仅达到7.10%,随后降解速度逐渐增加,是因为降解菌需要一定时间适应新的营养环境^[44],其中游离菌在第5天之后降解率开始平缓,10 d的降解率达到65.25%;SCC在第1天的降解率比SM3高,主要是因为生物炭可以给微生物提供庇护使其能更快适应新的环境,在第8天的降解率为92.94%,之后趋于平缓,最终10 d的降解率达到



a: 表面 Surface; b: 孔隙 Pore

图5 油茶壳生物炭固定化菌剂扫描电镜图

Figure 5 Scanning electron microscopy (SEM) of *Camellia oleifera* biochar immobilized bacteria

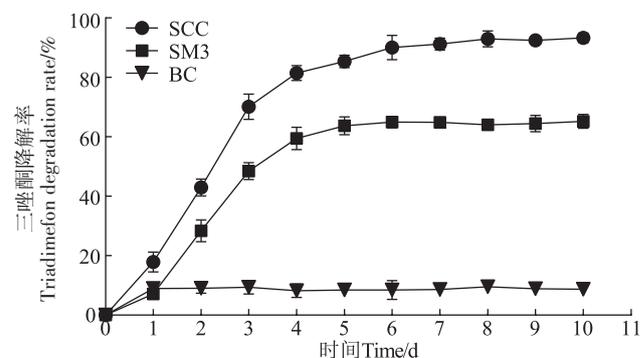


图6 油茶壳固定化菌剂(SCC)、油茶壳生物炭(CC)、游离菌(SM3)对三唑酮的降解

Figure 6 Degradation of triadimefon by *Camellia oleifera* biochar immobilized bacteria(SCC), *Camellia oleifera* shell biochar(CC), free bacteria(SM3)

93.29%。SCC对三唑酮的降解率相比于SM3提高了28.04个百分点,且固定化菌剂上的降解菌作用时间比游离菌时间长,因为生物炭本身也可以为微生物提供营养物质,增强了微生物的活性^[45]。

2.10 固定化菌剂存储时间对降解的影响

为了探究固定化菌剂能否在长时间内保持降解活性,将最佳条件下制备的油茶壳生物炭固定化菌剂(SCC)以及游离菌(SM3)在4℃和室温环境(25~35℃)条件下存放0~28 d后,分别检测SCC和SM3对三唑酮的降解率,结果如图7所示。在4℃条件下油茶壳生物炭固定化菌剂存放28 d后对三唑酮的降解率为81.73%,比初始降解率92.20%仅降低了10.47个百分点,表明SCC即使存储时间较长还能保持着较高的降解活性,但SM3在存储了28 d之后较0 d的74.05%降低了29.30个百分点,可能是低温破坏了原来的协调一致性,影响微生物的生活机能导致微生物活性下降^[39];常温条件下存放的SCC和SM3对三唑酮的降解率随时间均有变化且SM3变化较大,其中SCC

在室温下14 d还能保持较高的活性,对三唑酮降解率为79.24%,随后降解率减小,存放28 d后降解率为58.18%,相比于存放0 d的92.20%降低了34.02个百分点,而SM3在存放7 d后其降解率相比0 d的降低了39.52个百分点,存放14 d后对三唑酮的降解率仅为7.34%,存放14 d之后基本失活。因此生物炭固定化菌剂在实际环境中能够较好地保持SM3的活性,增强SM3的降解能力。

3 结论

(1)本研究通过对比4种生物炭的理化性质,及其相应的固定化菌剂对三唑酮的降解效果,选定了比表面积大、孔隙度高、官能团含量高的油茶壳生物炭作为固定化三唑酮高效降解菌SM3的载体。

(2)通过单因素实验确定了油茶壳生物炭固定化菌剂制备的最佳条件为油茶壳生物炭投加量为20 mg·mL⁻¹,SM3接菌量为5%,在30℃的固定温度下固定化培养36 h。相较游离菌,固定在载体上的SM3降解能力更强,本实验制备的生物炭固定化菌剂在10 d内对三唑酮的降解率为93.29%。

(3)生物炭固定化菌剂稳定性较高,在4℃和室温环境条件下(25~35℃)生物炭固定化菌剂存放28 d后对三唑酮的降解率分别为81.73%和58.18%,为后续的降解应用提供参考。

参考文献:

- [1] HOU L, JIN X, LIU N, et al. Triadimefon in aquatic environments: Occurrence, fate, toxicity, and ecological risk[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2022, 34(1):1-17.
- [2] KONG Z, QUAN R, FAN B, et al. Stereoselective behaviors of the fungicide triadimefon and its metabolite triadimenol during malt storage and beer brewing[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 400: 123238.
- [3] FAN X, FU Y, NIE Y, et al. Keystone taxa-mediated bacteriome response shapes the resilience of the paddy ecosystem to fungicide triadimefon contamination[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 417: 126061.
- [4] YU S M, LI X, HE S H, et al. Uptake and translocation of triadimefon by wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in hydroponics and soil conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423:127011.
- [5] RANI L, THAPA K, KANOJIA N, et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 283:124657.
- [6] 赵永福. 如何用高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中三唑酮的残留量[J]. *中国质量技术监督*, 2019(9):64-65. ZHAO Y F. Determination of triadimenone residues in soil by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *China Quality Supervision*,

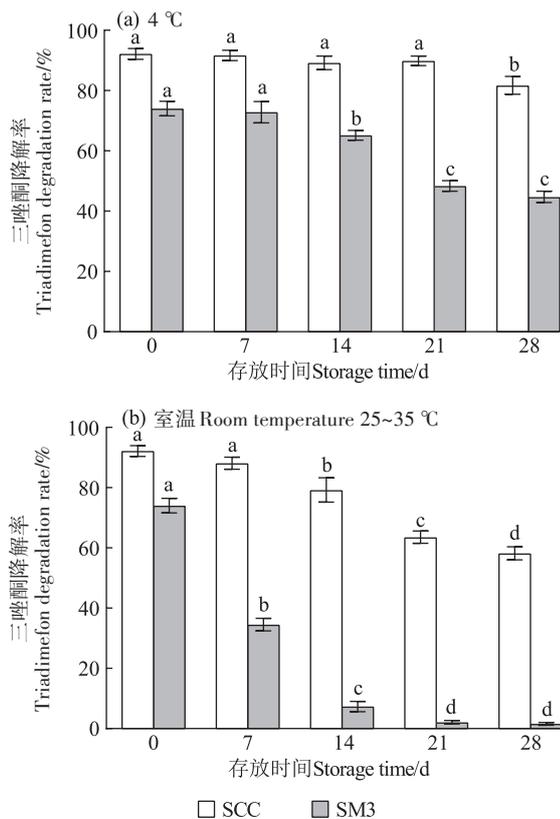


图7 生物炭固定化菌剂(SCC)以及游离菌(SM3)存放不同时间后对三唑酮的降解效果

Figure 7 Degradation of triadimefon by biochar immobilized bacteria (SCC) and free bacteria (SM3) after storage for different periods of time

- 2019(9):64-65.
- [7] 雷雨豪,张翠芳,王壮,等.环境激素农药三唑类杀菌剂在土壤中的残留与风险评估[J].*农药*, 2019, 58(9):660-663. LEI Y H, ZHANG C F, WANG Z, et al. Residues and risk assessment of environmental hormone pesticide triazole fungicides in soil[J]. *Agrochemicals*, 2019, 58(9):660-663.
- [8] HUANG T, JIANG H, ZHAO Y, et al. A comprehensive review of 1, 2, 4-triazole fungicide toxicity in zebrafish (*Danio rerio*): A mitochondrial and metabolic perspective[J]. *Science of the Total Environment*, 2021:151177.
- [9] TENG M, ZHAO F, ZHOU Y, et al. Effect of propiconazole on the lipid metabolism of zebrafish embryos (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(16):4623-4631.
- [10] LIU N, JIN X, ZHOU J, et al. Predicted no-effect concentration (PNEC) and assessment of risk for the fungicide, triadimefon based on reproductive fitness of aquatic organisms[J]. *Chemosphere*, 2018, 207:682-689.
- [11] LIU S, CHANG J, ZHU G. Developmental toxicity of triadimefon in embryo-larval stages of zebrafish[C]//International Conference on Digital Manufacturing & Automation. IEEE, 2010:552-555.
- [12] DI RENZO F, BROCCIA M L, GIAVINI E, et al. Stage-dependent abnormalities induced by the fungicide triadimefon in the mouse[J]. *Reproductive Toxicology*, 2011, 31(2):194-199.
- [13] CHUAPHASUK C, PRAPAGDEE B. Effects of biochar-immobilized bacteria on phytoremediation of cadmium-polluted soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(23):23679-23688.
- [14] GONG Y Z, NIU Q Y, LIU Y G, et al. Development of multifarious carrier materials and impact conditions of immobilised microbial technology for environmental remediation: A review[J]. *Environmental Pollution*, 2022:120232.
- [15] 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.
- [16] SHI Y, YE Z, HU P, et al. Removal of prothioconazole using screened microorganisms and identification of biodegradation products via UPLC-QqTOF-MS[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 206:111203.
- [17] 林凤翔,叶壮,胡芑,等.一株丙硫菌唑降解菌的筛选及其降解条件的优化[J].*安徽农业大学学报*, 2022, 49(2):279-285. LIN F X, YE Z, HU P, et al. Screening of a prothioconazole-degrading strain and optimization of its degradation performance[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2022, 49(2):279-285.
- [18] ZHANG H, YUAN X, XIONG T, et al. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 398:125657.
- [19] SUN T, MIAO J, SALEEM M, et al. Bacterial compatibility and immobilization with biochar improved tebuconazole degradation, soil microbiome composition and functioning[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 398:122941.
- [20] JIANG Y, YANG F, DAI M, et al. Application of microbial immobilization technology for remediation of Cr(VI) contamination: A review [J]. *Chemosphere*, 2022, 286:131721.
- [21] WU C, ZHI D, YAO B. Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation: A review[J]. *Environmental Research*, 2022:113226.
- [22] ZHAO C, LIU J, DENG Y, et al. Uranium(VI) adsorption from aqueous solutions by microorganism-graphene oxide composites via an immobilization approach[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 236:117624.
- [23] ZHANG Z, FAN Z, ZHANG G, et al. Application progress of microbial immobilization technology based on biomass materials[J]. *Bioresources*, 2021, 16(4):8509-8524.
- [24] GAN Y, YE Z, ZHAO Q, et al. Spatial denitrification performance and microbial community composition in an up-flow immobilized biofilter for nitrate micro-polluted water treatment[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 258:120913.
- [25] UDAY V, HARIKRISHNAN P S, DEOLI K, et al. Current trends in production, morphology, and real-world environmental applications of biochar for the promotion of sustainability[J]. *Bioresource Technology*, 2022:127467.
- [26] LIANG J, LI X, YU Z, et al. Amorphous MnO₂ modified biochar derived from aerobically composted swine manure for adsorption of Pb(II) and Cd(II) [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(6):5049-5058.
- [27] YU W, LIAN F, CUI G, et al. N-doping effectively enhances the adsorption capacity of biochar for heavy metal ions from aqueous solution[J]. *Chemosphere*, 2018, 193:8-16.
- [28] LIU J, DING Y, MA L, et al. Combination of biochar and immobilized bacteria in cypermethrin-contaminated soil remediation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 120:15-20.
- [29] 王佳颖,何枫,杨冬臣,等.生物炭固定化YB1菌剂对烟嘧磺隆降解效果的研究[J].*河北农业大学学报*, 2019, 42(6):91-96. WANG J Y, HE Z, YANG D C, et al. Study on degradation of nicosulfuron by biochar immobilized YB1 bacterium[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2019, 42(6):91-96.
- [30] KONG L, GAO Y, ZHOU Q, et al. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 343:276-284.
- [31] 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 Q, YANG F, ZHU M R, 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.
- [32] YANG Y, LIU H, YANG X, et al. Plant and soil elemental C:N:P ratios are linked to soil microbial diversity during grassland restoration on the Loess Plateau, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 806:150557.
- [33] CHEN T, ZHANG Y, WANG H, et al. Influence of pyrolysis temperature on characteristics and heavy metal adsorptive performance of biochar derived from municipal sewage sludge[J]. *Bioresource Technology*

- gy, 2014, 164:47-54.
- [34] 汤嘉雯, 陈金焕, 王凯男, 等. 加拿大一枝黄花生物炭对 Cd²⁺ 的吸附特性及机理[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(6): 1339-1348. TANG J W, CHEN J H, WANG K N, et al. Characteristics and mechanism of cadmium adsorption by *Solidago canadensis*-derived biochar[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(6): 1339-1348.
- [35] GUO M, SONG W, TIAN J. Biochar-facilitated soil remediation: Mechanisms and efficacy variations[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2020, 8:521512.
- [36] 简敏菲, 高凯芳, 余厚平. 不同裂解温度对水稻秸秆制备生物炭及其特性的影响[J]. 环境科学学报, 2016, 36(5): 1757-1765. JIAN M F, GAO K F, YU H P. Effects of different pyrolysis temperatures on the preparation and characteristics of biochar from rice straw[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(5): 1757-1765.
- [37] TASKIN E, DE CASTRO BUENO C, ALLEGRETTO I, et al. Multianalytical characterization of biochar and hydrochar produced from waste biomasses for environmental and agricultural applications[J]. *Chemosphere*, 2019, 233:422-430.
- [38] OH T K, CHOI B, SHINOBI Y, et al. Characterization of biochar derived from three types of biomass[J]. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 2012, 57(1): 61-66.
- [39] 李名峰, 邵晨, 李晋. 生物炭性质对微生物附着性能的影响探究[J]. 当代化工研究, 2022(18): 30-33. LI M F, SHAO C, LI J et al. Study on the effects of biochar characterizations on microbial[J]. *Modern Chemical Research*, 2022(18): 30-33.
- [40] YANG F, WANG C, SUN H. A comprehensive review of biochar-derived dissolved matters in biochar application: Production, characteristics, and potential environmental effects and mechanisms[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9(3): 105258.
- [41] 张闻, 赵延君, 王加宁, 等. 生物炭固定化石油降解菌剂的制备[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 341-345. ZHANG W, ZHAO Y J, WANG J N, et al. Preparation of biochar immobilized petroleum degrading bacterial agent[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43(6): 341-345.
- [42] YANG X, LI F, NING H, et al. Screening of pig-derived zearalenone-degrading bacteria through the zearalenone challenge model, and their degradation characteristics[J]. *Toxins*, 2022, 14(3): 224.
- [43] ZHANG J, LIANG S, WANG X, et al. Biodegradation of atrazine by the novel *Klebsiella variicola* strain FH-1[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019:4756579-12.
- [44] 任宏洋, 马伶俐, 王兵, 等. 生物炭基固定化菌剂对石油类污染物的高效降解[J]. 环境工程学报, 2017, 11(11): 6177-6183. REN H Y, MA L L, WANG B, et al. Efficient degradation of petroleum pollutant by immobilized bacteria based on biochar material[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(11): 6177-6183.
- [45] HUANG J, WANG J, WANG S, et al. Different biochars as microbial immobilization substrates for efficient copper II removal[J]. *Spectroscopy Letters*, 2020, 53(9): 712-725.

(责任编辑:叶飞)