

曹瑶瑶, 葛 静, 生弘杰, 等. 精氨酸改性生物质炭固定阴沟肠杆菌 TMX-6 的优化及降解噻虫嗪的效果[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(9): 1749-1757.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.019

精氨酸改性生物质炭固定阴沟肠杆菌 TMX-6 的优化及降解噻虫嗪的效果

曹瑶瑶, 葛 静, 生弘杰, 冯发运, 万 群, 马丽雅, 张雷刚, 余向阳

(江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所/江苏省食品质量安全重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014)

摘要: 噻虫嗪的广泛使用对生态环境和人体健康造成直接或潜在的安全隐患。为实现残留噻虫嗪的快速降解, 本研究在精氨酸改性生物质炭(Arg@ BC) 的基础上, 通过单因素试验和正交试验, 明确 Arg@ BC 与阴沟肠杆菌 TMX-6 制备 Arg@ BC/TMX-6 炭基菌剂的优化方案, 并对不同剂型的 TMX-6 对噻虫嗪的降解能力进行比较。结果表明, Arg@ BC 中精氨酸含量与 Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量呈正相关关系, 对生物质炭进行精氨酸改性可提高生物质炭对带负电细菌的捕获性能。Arg@ BC/TMX-6 制备的最优条件为 Arg@ BC 质量浓度 50 g/L、精氨酸与生物质炭重量比 5.0 : 10.0、固定化 12 h。Arg@ BC/TMX-6 对噻虫嗪降解率(50.69%) 高于相当量的 Arg@ BC 与 TMX-6 的降解率之和, 即精氨酸改性生物质炭再固定 TMX-6 有利于提高 TMX-6 对噻虫嗪的降解能力。本研究结果为进一步利用炭基材料固定降解微生物应用于农药污染土壤的修复提供了理论依据。

关键词: 噻虫嗪; 精氨酸; 生物质炭; 农药残留; 农药降解

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024) 09-1749-09

Optimization of immobilization of *Enterobacter cloacae* TMX-6 by arginine-modified biochar and its degradation effect on thiamethoxam

CAO Yaoyao, GE Jing, SHENG Hongjie, FENG Fayun, WAN Qun, MA Liya, ZHANG Leigang, YU Xiangyang

(Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: The widespread use of thiamethoxam poses a direct or potential safety hazard to the ecological environment and human health. In order to achieve the rapid degradation of residual thiamethoxam, on the basis of arginine modified biochar (Arg@ BC), the optimal preparation scheme of carbon-based microbial agent Arg@ BC/TMX-6 prepared by Arg@ BC and *Enterobacter cloacae* TMX-6 was determined by single factor and orthogonal experiments, and the degradation ability of

different formulations of TMX-6 to thiamethoxam was compared. The results showed that the arginine content in Arg@ BC was positively correlated with the fixed amount of TMX-6 in Arg@ BC/TMX-6. Arginine modification could improve the capture performance of biochar to negatively charged bacteria. The optimal conditions for the preparation of Arg@ BC/TMX-6 were as follows: the mass concentration of Arg@ BC was 50 g/L, the weight ratio of arginine to biochar was 5.0 : 10.0, and the immobilization

收稿日期: 2023-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32302406、42007133、31772197),
江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22) 3074]

作者简介: 曹瑶瑶(1988-), 女, 山西长治人, 博士, 助理研究员, 主要从事农产品产地污染修复研究。(E-mail) yaoyao@ jaas.ac.cn

通讯作者: 张雷刚, (E-mail) leigang.zh@ 163.com; 余向阳, (E-mail) yuxy@ jaas.ac.cn

time was 12 h. The degradation rate (50.69%) of thiamethoxam by Arg@BC/TMX-6 was higher than the sum of the degradation rates of Arg@BC and TMX-6, that is, arginine-modified biochar re-immobilized TMX-6 was beneficial to improve the degradation ability of TMX-6 to thiamethoxam. The results of this study provide a theoretical basis for the further use of carbon-based materials to immobilize degrading microorganisms for the remediation of pesticide-contaminated soil.

Key words: thiamethoxam; arginine; biochar; pesticide residues; pesticide degradation

新烟碱类农药引发的环境污染对生态环境和人体健康造成严重威胁。噻虫嗪是第二代烟碱类高效低毒杀虫剂,被广泛用于水稻、马铃薯、苹果等作物的虫害防治。但噻虫嗪施用后近 70% 的药物活性成分通过降雨、地表径流等方式残留于土壤及水体,导致土壤和水体环境恶化^[1-2],且噻虫嗪对蜜蜂、鸟类和水生动物等具有生物毒性^[3-5]。因此,加强噻虫嗪的管理及其污染农田的治理对于生态环境安全具有重要意义。

利用微生物进行有机污染物的生物降解是常用的污染物治理措施^[6-8]。但外源微生物在自然环境可利用营养物有限及与土著微生物资源竞争中的劣势,导致其生存增殖受限。生物质炭作为重要的微生物固定化材料,因其比表面积大、孔隙度高、性能稳定等优点,在土壤原位修复领域具有得天独厚的优势^[9-14]。然而,生物质炭对不同微生物活性及其生长的影响存在菌株差异性,且其在营养供给等方面相对欠缺^[15-18],因此,生产实践中需要对生物质炭进行定向改性调控,以提高其性能^[19-21]。由于精氨酸具有带正电的侧链和较高的等电点,因此,利用精氨酸进行生物质炭的改性可提高其对带负电细菌的捕获性能^[22]。

阴沟肠杆菌 TMX-6 具有较强的噻虫嗪降解能力^[23]。为进一步提高 TMX-6 的降解性能,本研究在利用精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)的基础上,通过单因素试验和正交试验,分析精氨酸与生物质炭重量比、改性生物质炭(Arg@BC)质量浓度及改性生物质炭与 TMX-6 的固定化时间对制备的炭基菌剂降解噻虫嗪能力的影响,明确 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂的优化制备方案,并对不同材料对噻虫嗪的降解能力进行比较,解析 Arg@BC/TMX-6 降解噻虫嗪的增效机理,以期炭基材料固定化微生物技术应用于农药污染土壤的修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 生物质炭与菌悬液的制备

生物质炭(BC)购自南京勤丰众成生物质新材

料有限公司,噻虫嗪原药(97.9%)购自济南绿霸农药有限公司,精氨酸(98.0%)购自上海源叶生物科技有限公司。

无机盐液体培养基(MSM)的配制:称取 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g K_2HPO_4 、0.2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.08 g CaSO_4 ,置于容量瓶中,用去离子水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 ,121 °C 高压灭菌 20 min。

称取 10 mg 噻虫嗪原药,用乙腈定容至 10 mL,配置成 1.0 g/L 噻虫嗪溶液,于超净工作台用 MSM 培养基将其稀释,得到 10 mg/L 的噻虫嗪溶液。

精氨酸改性生物质炭:采用 Zhang 等^[22]方法,制备精氨酸改性生物质炭 Arg@BC,并装袋密封备用。

LB 液体培养基和 LB 固体培养基的制备:称取 5.0 g 酵母粉、10.0 g 胰蛋白胨和 10.0 g NaCl,加入 950 mL 离子水,用 NaOH 调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,并定容至 1 000 mL。在 1.0 L LB 液体培养基中加入琼脂 17.5 g 获得 LB 固体培养基。上述培养基均需在 121 °C 高温高压下灭菌 20 min。

菌悬液制备:将本团队前期筛选得到的阴沟肠杆菌 TMX-6,在固体 LB 平板培养基上划线接种,30 °C 恒温培养箱中培养 1 d,用接种环从斜面上剥取单菌落接入 200 mL LB 液体培养基中,30 °C 恒温培养 12 h,混匀得到菌悬浮液原液,通过平板涂布计数法测得其 TMX-6 含量为 4.17×10^{10} CFU/mL;采用 Tecan Spark 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司产品)测定悬浮液 600 nm 处的吸光度(OD_{600}),用磷酸盐缓冲溶液(PBS)将菌悬液进行稀释使得其 OD_{600} 为 1.00,测得其 TMX-6 含量为 0.6×10^{10} CFU/mL,并作为备用菌悬浮液^[23]。

1.2 炭基菌剂(Arg@BC/TMX-6)制备的单因素试验设计

将精氨酸(Arg)与生物质炭(BC)按重量比为 0.1 : 10.0、0.5 : 10.0、1.5 : 10.0、2.5 : 10.0、5.0 : 10.0 和 7.5 : 10.0 制备精氨酸改性生物质炭(Arg@

BC),改性后利用氨基酸含量检测试剂盒(北京索莱宝公司产品)测定改性后生物质炭中的精氨酸含量,以明确不同的 Arg 与 BC 配制重量比对 Arg@BC 中精氨酸含量的影响,得到适宜的 Arg 与 BC 配制重量比。

分别称取 Arg 与 BC 配制重量比为 0.1 : 10.0、0.5 : 10.0、1.5 : 10.0、2.5 : 10.0、5.0 : 10.0 和 7.5 : 10.0 的精氨酸改性生物质炭 1.25 g,利用 OD_{600} 为 1.00 的菌悬液分别定容至 25 mL,得到不同 Arg 与 BC 配制重量比下质量浓度为 50 g/L 的混合溶液,于 ZQZY-70BF 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司产品)30 ℃ 恒温固定 12 h,经离心收集固体后置于 -20 ℃ 冰箱预冻 12 h,再利用 ALPHA1-2/LD-plus 型真空冷冻干燥机(德国 Marin Christ 公司产品)干燥 48 h 即得精氨酸改性生物质炭基菌剂(Arg@BC/TMX-6)。测定 Arg 与 BC 配制重量比对 Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量(单位质量的精氨酸改性生物质炭所固定的菌落总数)的影响,方法是将 1.0 g 精氨酸改性生物质炭基菌剂加入 10 mL 带有钢珠的无菌水中,静置 20 min,于振荡培养箱 200 r/min 振荡 30 min,得到母液菌悬液。利用梯度稀释法和平板计数法测定母液菌悬液中 TMX-6 数量,从而得到精氨酸与生物质炭配制重量比对 TMX-6 单位固定量的影响。

利用上述适宜的 Arg 与 BC 配制重量比制备 Arg@BC,分别称取 0.25 g、0.50 g、1.25 g、2.50 g、5.00 g、12.50 g 的 Arg@BC,利用 OD_{600} 为 1.00 的菌悬液定容到 25 mL,得到 Arg@BC 质量浓度分别为 10 g/L、20 g/L、50 g/L、100 g/L、200 g/L 和 500 g/L 的混合溶液。然后将混合溶液置于 ZQZY-70BF 振荡培养箱,30 ℃ 恒温振荡固定 12 h,将菌株负载到生物质炭上,通过真空冷冻干燥获得精氨酸改性生物质炭基菌剂。测定精氨酸改性生物质炭基菌剂的 TMX-6 单位固定量,考察 Arg@BC 质量浓度对 TMX-6 单位固定量的影响。

以 Arg 与 BC 配制重量比 5.0 : 10.0 制备的 Arg@BC,利用 OD_{600} 为 1.00 的菌悬液定容得到 Arg@BC 质量浓度为 50 g/L 的混合溶液,于振荡培养箱 30 ℃ 恒温固定 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 后,通过真空冷冻干燥获得精氨酸改性生物质炭基菌剂。测定 TMX-6 单位固定量,考察固定时间对精氨酸改性生物质炭基菌剂的 TMX-6 单位固定量的影响。

1.3 Arg@BC/TMX-6 制备的正交试验设计

根据单因素试验结果,选取 Arg@BC 质量浓度、Arg 与 BC 配制重量比和固定化时间 3 个因素各自较优的 3 个水平(表 1),利用 SPSS 20.0 软件设计 3 因素 3 水平正交试验方案(表 2),进行炭基菌剂的制备及其 TMX-6 单位固定量的测定。此外,取上述各处理得到的 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂 0.5 g 分别加入 10 mL 10 mg/L 噻虫嗪溶液,于 30 ℃ 恒温避光环境下 180 r/min 振荡培养 3 d,采用 AB Sciex Exion 液相色谱结合 AB Sciex Qtrap 5500+ 三重四极质谱(HPLC-MS/MS)(美国 AB SCIEX 公司产品)方法测定培养液中噻虫嗪浓度,计算得到噻虫嗪降解率。每样品测定 3 次。最终以 TMX-6 单位固定量、噻虫嗪降解率为评价指标,确定 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂制备的最优工艺条件。

表 1 炭基菌剂制备的正交试验因素和水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels for the preparation of carbon-based microbial agents

水平	Arg@BC 质量浓度(g/L)	Arg 与 BC 配制重量比	固定时间(h)
1	10	2.5 : 10.0	8
2	50	5.0 : 10.0	12
3	100	7.5 : 10.0	16

Arg:精氨酸;BC:生物质炭;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭。

表 2 正交试验设计

Table 2 Orthogonal experimental design

处理	Arg@BC 质量浓度(g/L)	Arg 与 BC 配制重量比	固定时间(h)
1	10	2.5 : 10.0	8
2	10	5.0 : 10.0	16
3	10	7.5 : 10.0	12
4	50	2.5 : 10.0	16
5	50	5.0 : 10.0	12
6	50	7.5 : 10.0	8
7	100	2.5 : 10.0	12
8	100	5.0 : 10.0	8
9	100	7.5 : 10.0	16

Arg:精氨酸;BC:生物质炭;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭。

培养液中噻虫嗪浓度 HPLC-MS/MS 检测方法如下:取 5 mL 混匀的培养液至 50 mL 离心管,加入 5 mL 乙腈后振荡 10 min,再加入 1.0 g NaCl 振荡 1

min, 于台式离心机(德国 Eppendorf 公司产品)5 000 r/min 离心 5 min, 吸取 2 mL 上清液过 0.22 μm 有机滤膜后转移至进样瓶, 利用 AB Sciex Exion 液相色谱与 AB Sciex Qtrap 5500+ 三重四极杆质谱联用系统(HPLC-MS/MS)测定, 色谱柱为 Kinetex F5 (100 cm \times 30 mm, 2.6 μm)。具体检测条件: 流动相为体积比 4:1 的乙腈与 0.1% 甲酸水混合溶液, 流速 0.2 mL/min, 进样量 5 μL , 测定时间 5 min。质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 电喷雾电离, 毛细管电压为 4 000 V, 雾化气压力 310.1 kPa, 采用多反应监测模式(MRM)检测。

1.4 不同材料对噻虫嗪降解能力的比较

在上述正交试验的基础上, 以噻虫嗪降解率为依据优选出 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂的适宜制备工艺; 同时, 根据适宜的质量浓度和固定化时间, 制备 BC/TMX-6。根据 TMX-6 菌数量及材料质量等量添加的原则, 将 0.5 g Arg@BC/TMX-6、0.6 mL TMX-6 菌悬浮液原液、0.5 g 生物质炭(BC)、0.5 g BC/TMX-6、0.5 g Arg@BC、0.5 g Arg@BC 和 0.6 mL TMX-6(Arg@BC+TMX-6)、0.08 g Arg 和 0.42 g BC(Arg+BC)、0.08 g Arg 和 0.42 g BC/TMX-6(Arg+BC/TMX-6)分别加入 10 mL 10 mg/L 噻虫嗪溶液, 以不添加炭基菌剂和菌液的噻虫嗪自然降解为对照(CK), 于振荡培养箱 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 恒温避光培养 3 d, 采用 HPLC-MS/MS 方法测定初始溶液中和培养 3 d 后溶液中噻虫嗪质量浓度, 进而计算得到各处理下噻虫嗪的降解率。

1.5 生物质炭固定化 TMX-6 的扫描电镜表征

电镜扫描 TMX-6 菌体样品制备: 活化培养 TMX-6 至 OD_{600} 值为 1.00, 5 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次后加入 2.5% 戊二醛, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h; 并于 5 000 r/min 离心 5 min, PBS 溶液清洗 3 次, 按乙醇体积分数为 30%、50%、70%、80%、90% 的顺序梯度脱水, 每次加入后静置 15 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 最后 100% 乙醇洗涤 3 次得到 TMX-6 重悬菌液。吸取 TMX-6 重悬菌液滴加于玻片表面, 保鲜膜封口后烘箱烘干, 转移至样品台, 另将真空冷冻干燥后的 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂和 BC/TMX-6 炭基菌剂平铺在样品台上, 进行喷金处理。使用 EVO LS10 场发射扫描电子显微镜(德国蔡司公司产品)观察 TMX-6 在培养液和炭基材料上的微观结构。

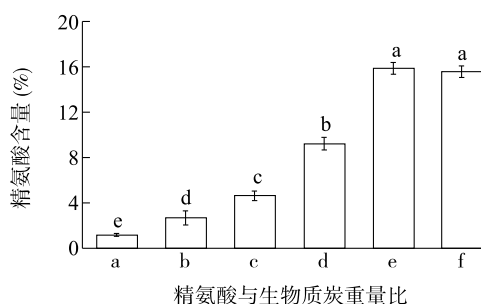
1.6 数据分析与处理

采用 Excel 2016 和 Origin 9.0 软件绘制图、表, 利用 SPSS 20.0 软件和 Duncan's 检验法进行方差分析和差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 Arg@BC/TMX-6 制备的单因素试验结果

不同精氨酸(Arg)与生物质炭(BC)重量比处理下制得的精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)中精氨酸含量变化如图 1 所示。从图中可以看出, 当 Arg 与 BC 重量比由 0.1:10.0 增加到 5.0:10.0 时, Arg@BC 中精氨酸含量逐步升高, Arg 与 BC 重量比为 5.0:10.0 时, Arg@BC 中精氨酸含量达到最大值(15.91%); 而当 Arg 与 BC 重量比进一步增加至 7.5:10.0 时, Arg@BC 中精氨酸含量没有显著变化。因此, 制备精氨酸改性生物质炭的精氨酸与生物质炭最适重量比为 5.0:10.0。产生该结果的主要原因是精氨酸改性生物质炭主要通过精氨酸与生物质炭上官能团($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 等)的络合作用^[23], 而生物质炭上官能团数量是一定的, 且官能团间在结合过程中存在空间位阻, 导致络合饱和后进一步增加精氨酸时, 新增的 Arg 无法与生物质炭络合。



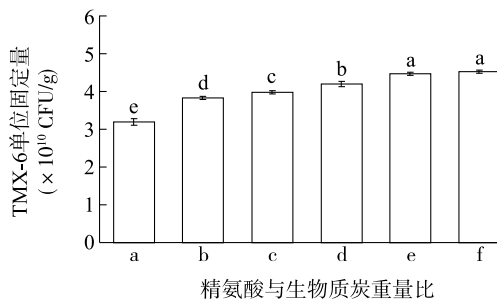
a:0.1:10.0; b:0.5:10.0; c:1.5:10.0; d:2.5:10.0; e:5.0:10.0; f:7.5:10.0。

图1 不同精氨酸(Arg)与生物质炭(BC)重量比处理下制备的精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)中精氨酸含量变化

Fig.1 Changes of arginine content in arginine modified biochar (Arg@BC) under different weight ratios of arginine (Arg) to biochar (BC)

不同精氨酸与生物质炭重量比的精氨酸改性生物质炭制备的 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量如图 2 所示。从图中可以看出, 随着精氨酸与生物质炭重量比由 0.1:10.0 增加至 5.0:10.0, Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量呈现上

升趋势,当 Arg 与 BC 重量比达 5.0 : 10.0 时,Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 菌单位固定量高达 4.48×10^{10} CFU/g。当 Arg 与 BC 重量比进一步提高至 7.5 : 10.0 时,Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量没有显著变化。由于 Arg 具有带正电的侧链和较高的等电点,利用精氨酸改性可提高生物质炭对带负电细菌的捕获性能^[23],且生物质炭对微生物的吸附性能与其表面电荷数量呈显著正相关^[24-25]。从图 1 和图 2 还可以看出,随着精氨酸与生物质炭重量比的变化,Arg@ BC/TMX-6 中 Arg 含量与 TMX-6 单位固定量有相同的变化趋势,这说明,两者之间存在正相关关系。



a: 0.1 : 10.0; b: 0.5 : 10.0; c: 1.5 : 10.0; d: 2.5 : 10.0; e: 5.0 : 10.0; f: 7.5 : 10.0。

图2 精氨酸与生物质炭重量比对 Arg@ BC/TMX-6 炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量的影响

Fig.2 Effects of different weight ratios of arginine to biochar on the fixed amount of TMX-6 in Arg@ BC/TMX-6

生物质炭作为吸附性能良好的材料,具有较高的比表面积和丰富的孔隙结构,为微生物附着提供了充足的吸附位点^[25]。精氨酸改性生物质炭质量浓度对 Arg@ BC/TMX-6 炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量的影响如图 3 所示。从图中可以看出,当精氨酸改性生物质炭质量浓度为 10 g/L 时,制备的炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量最高;随着精氨酸改性生物质炭质量浓度的增加,制备的炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量逐步降低。产生该现象的原因可能是精氨酸改性生物质炭质量浓度相对菌悬液中 TMX-6 数量始终处于饱和状态,精氨酸改性生物质炭质量浓度对 Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量的影响表现出一定的饱和效应。此外,本研究制备的 Arg@ BC/TMX-6 炭基菌剂对 TMX-6 菌的单位固定量达 1×10^{10} CFU/g 数量级,与任宏洋等^[26]的研究结果一致。

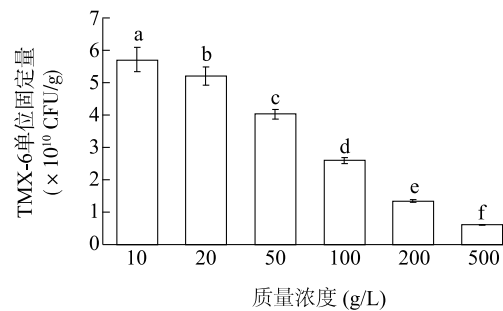


图3 精氨酸改性生物质炭质量浓度对 Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量的影响

Fig.3 Effects of mass concentration of arginine modified biochar on the fixed amount of TMX-6 in Arg@ BC/TMX-6

固定时间对 Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量的影响如图 4 所示。从图中可以看出,随着固定化时间的延长,精氨酸改性生物质炭中 TMX-6 单位固定量呈现先增加后降低的趋势。固定时间为 12 h 时,精氨酸改性生物质炭中 TMX-6 单位固定量最高。其原因可能是当固定时间小于 12 h 时,精氨酸改性生物质炭主要表现为吸附 TMX-6,直至 12 h 时 TMX-6 固定量达到吸附饱和。此后进一步延长固定时间,TMX-6 固定量将显著降低,主要原因可能有两个,一是精氨酸改性生物质炭中营养成分有限,短时间内菌株 TMX-6 可逐步吸附,而在时间延长后,细菌生长所需养分的减少,导致部分菌株产生衰亡和细菌数量下降;二是细菌固定在生物质炭上为动态过程,即存在吸附-解吸附作用,在固定初始阶段,载体固定化菌株主要表现为吸附优势,随着时间延长,菌株在生物质炭载体上以解吸附为主,故生物质炭载体固定菌株过程是先增加后减少。因此,本研究中最优固定化时间宜选取 12 h。

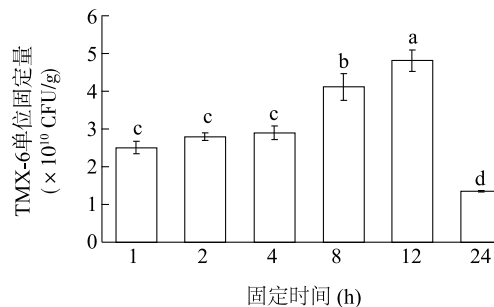


图4 固定时间对 Arg@ BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量的影响

Fig.4 Effects of immobilization time on the immobilization amount of TMX-6 in Arg@ BC/TMX-6

2.2 Arg@BC/TMX-6 制备的正交试验结果

Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂制备正交试验结果如表 3 所示。从表中可以看出,精氨酸改性生物质炭质量浓度 10 g/L、精氨酸与生物质炭重量比 7.5 : 10.0、固定时间 12 h 的 3 号处理制备的 Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量最高,达 5.88×10^{10} CFU/g。结合 3 个因素 3 个水平下的 TMX-6 单位固定量平均值(表 4)可知,3 个因素对 TMX-6 单位固定量影响从高到低依次为:精氨酸改性生物质炭质

量浓度、固定时间、精氨酸与生物质炭重量比,即精氨酸改性生物质炭质量浓度对 Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量影响最大。这说明,精氨酸改性生物质炭表面吸附位点的饱和效应在固定化过程中起着决定性作用。从 TMX-6 单位固定量角度考虑,根据正交试验结果,预测的优化方案为精氨酸改性生物质炭质量浓度 10 g/L、Arg : BC 重量比 5.0 : 10.0、固定时间 12 h。

表 3 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂制备的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of preparation of Arg@BC/TMX-6

处理	Arg@BC 质量浓度 (g/L)	Arg 与 BC 重量比	固定时间 (h)	TMX-6 单位固定量 ($\times 10^{10}$ CFU/g)	反应溶液 pH	噻虫嗪降解率 (%)
1	10	2.5 : 10.0	8	$3.85 \pm 0.21d$	$7.21 \pm 0.04f$	$20.55 \pm 3.17d$
2	10	5.0 : 10.0	16	$5.34 \pm 0.10b$	$7.38 \pm 0.07e$	$27.54 \pm 1.10c$
3	10	7.5 : 10.0	12	$5.88 \pm 0.20a$	$7.44 \pm 0.06e$	$36.25 \pm 0.88b$
4	50	2.5 : 10.0	16	$2.91 \pm 0.21f$	$8.08 \pm 0.07d$	$32.37 \pm 4.70bc$
5	50	5.0 : 10.0	12	$4.96 \pm 0.17c$	$8.53 \pm 0.01c$	$50.69 \pm 0.65a$
6	50	7.5 : 10.0	8	$3.41 \pm 0.14e$	$8.62 \pm 0.04bc$	$27.41 \pm 4.27c$
7	100	2.5 : 10.0	12	$2.49 \pm 0.16g$	$8.63 \pm 0.01bc$	$19.11 \pm 0.08d$
8	100	5.0 : 10.0	8	$2.39 \pm 0.11g$	$8.82 \pm 0.06a$	$17.48 \pm 0.86d$
9	100	7.5 : 10.0	16	$2.96 \pm 0.08f$	$8.73 \pm 0.04ab$	$29.72 \pm 1.43c$

Arg:精氨酸;BC:生物质炭;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭。

表 4 正交试验中不同水平下 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂中 TMX-6 单位固定量的平均值

Table 4 The average value of immobilization amount of TMX-6 in Arg@BC/TMX-6

水平	Arg@BC 质量浓度 (g/L)	Arg 与 BC 重量比	固定时间 (h)
1	5.02	3.08	3.22
2	3.76	4.23	4.44
3	2.61	4.09	3.74

Arg:精氨酸;BC:生物质炭;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭。

精氨酸改性生物质炭质量浓度 50 g/L、精氨酸与生物质炭重量比 5.0 : 10.0、固定化时间 12 h 条件下制备的 Arg@BC/TMX-6 降解噻虫嗪的效果最好,降解率为 50.69%,显著高于其他处理(表 3)。3 个因素 3 个水平下的噻虫嗪降解率平均值如表 5 所示。从表 5 中可以看出,3 个因素对噻虫嗪降解率的影响从高到低依次为精氨酸改性生物质炭质量浓度、固定时间、精氨酸与生物质炭重量比,即精氨酸改性生物质炭质量浓度对 Arg@BC/TMX-6 降解噻

虫嗪的效果影响最大。根据正交试验结果得到的噻虫嗪降解率建立响应面,预测的 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂最优制备方案与处理 5 一致。噻虫嗪的降解过程主要依赖微生物的降解作用,一般来说,TMX-6 固定量越多,噻虫嗪降解率越高。本试验中处理 5 的 TMX-6 单位固定量(4.96×10^{10} CFU/g)显然低于处理 3 (5.69×10^{10} CFU/g),但其噻虫嗪降解率却显著高于处理 3。造成这种现象的原因可能是噻虫嗪降解率不但受 TMX-6 固定量的影响,还与环境 pH 值相关。处理 5 反应液的碱性更强,有利于促进噻虫嗪的降解,这与 Li 等^[27]的研究结果一致。所以,本研究选取处理 5 的制备方案,即精氨酸改性生物质炭质量浓度 50 g/L、精氨酸与生物质炭重量比 5.0 : 10.0、固定时间 12 h,为 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂的最优制备方案。

2.3 Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 的表征

TMX-6 在培养液和精氨酸改性生物质炭上的微观结构如图 5 所示。从培养液中分离收集到的 TMX-6 呈杆状、两端钝圆形,直径约 0.4 μm ,长度约

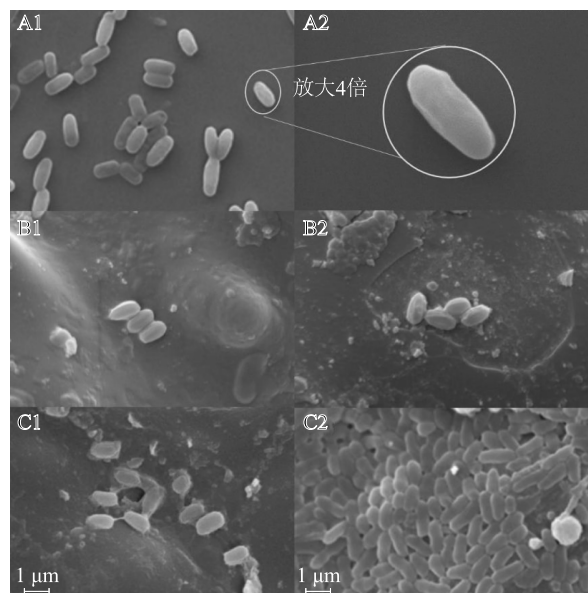
1.0 μm ,属典型的肠杆菌结构(图 5A1 和图 5A2)。生物质炭因其 Zeta 电位高、比表面积和孔隙度大,容易吸附微生物,是微生物良好的栖息地^[25-26]。TMX-6 在生物质炭表面附着时,呈现零星的散落菌体分布,如图 5B1 和图 5B2 所示。TMX-6 在精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)表面附着时,虽然不同部位的 TMX-6 附着量存在一定的差异,但总体的附着数量明显增加(图 5C1 和图 5C2),即精氨酸改性能显著提高生物质炭上 TMX-6 的固定量。

表 5 正交试验中 Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂中噻虫嗪降解率的极差分析结果

Table 5 Range analysis results of degradation rate of thiamethoxam by Arg@BC/TMX-6 in orthogonal test

水平	Arg@BC 质量浓度 (g/L)	Arg 与 BC 重量比	固定时间 (h)
1	28.11	24.01	21.81
2	36.82	31.90	35.35
3	22.10	31.13	29.88

Arg:精氨酸;BC:生物质炭;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭。



A1:培养液中的 TMX-6 菌落形态;A2:放大的 TMX-6 菌外形;B1、B2 为 TMX-6 在生物质炭表面附着状况;C1、C2 为 TMX-6 在精氨酸改性生物质炭表面附着状况。

图 5 TMX-6 菌株在不同材料上的分布状况

Fig.5 Distribution of TMX-6 strain on different materials

2.4 不同剂型 TMX-6 对噻虫嗪降解能力的比较

不同剂型 TMX-6 对噻虫嗪降解能力如图 6 所示。从图 6 可以看出,Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂处

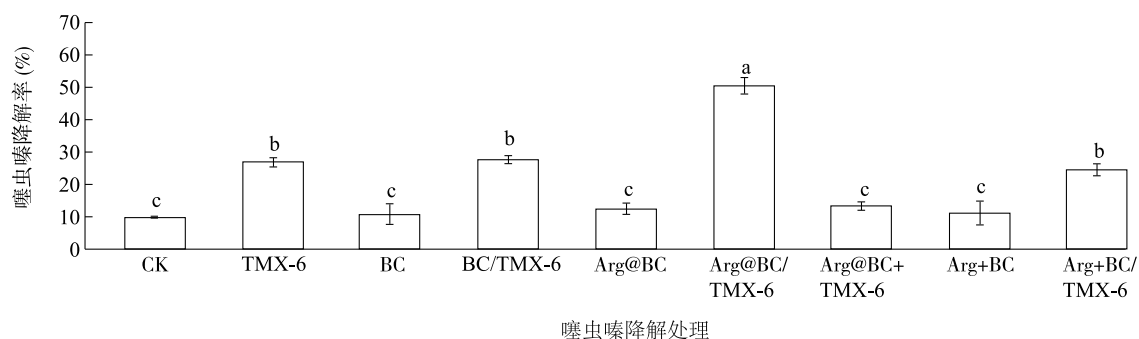
理的噻虫嗪降解率为 50.69%,显著高于其他处理,其次为 TMX-6 处理、Arg+BC/TMX-6 处理和 BC/TMX-6 处理;而 Arg@BC、BC、Arg+BC、Arg@BC+TMX-6 等处理的噻虫嗪降解率与噻虫嗪自然降解对照(CK)无显著差异。这说明精氨酸、生物质炭对噻虫嗪降解没有明显的促进作用,菌株 TMX-6 是噻虫嗪降解的主导因子。图 6 中还可以看出,Arg@BC+TMX-6 处理对噻虫嗪的降解率显著低于 TMX-6 处理,可能是由于 Arg@BC 的强碱性降低了 TMX-6 的存活率和生物活性,导致其噻虫嗪降解率降低。加入 TMX-6 后,噻虫嗪降解率得到显著提升,Arg+BC/TMX-6 处理、TMX-6 及 BC/TMX-6 的噻虫嗪降解率分别为 24.52%、26.92%、27.64%,均高于 CK,但 3 个处理间噻虫嗪降解率没有显著差异,表明精氨酸作为外源添加物时,不能增强 BC/TMX-6 对噻虫嗪的降解效果,其原因可能是添加精氨酸并未提升生物质炭对 TMX-6 的捕获性能,虽然添加精氨酸可为 TMX-6 提供营养源,但噻虫嗪降解效果没有明显增效说明 TMX-6 难以利用游离的精氨酸。

此外,Arg@BC/TMX-6 对噻虫嗪的降解率(50.69%)显著高于相当量的精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)和 TMX-6 的降解率之和,具有“1+1>2”的增效作用,原因可能是一方面精氨酸改性生物质炭可以为微生物提供一定的营养物质,有利于提高微生物的生物活性^[28];另一方面精氨酸改性生物质炭通过高吸附性能捕获噻虫嗪分子,有利于促进降解菌 TMX-6 对其降解^[29-31]。

3 结论

精氨酸与生物质炭重量比为 5.0:10.0 时制备的精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)中精氨酸含量最高,主要原因为精氨酸与生物质炭上官能团($-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 等)的络合存在空间位阻效应,该条件下结合位点达到平衡。同时,Arg@BC 中精氨酸含量与 Arg@BC/TMX-6 中 TMX-6 单位固定量呈正相关关系,说明精氨酸改性可提高生物质炭对带负电细菌的捕获性能。

精氨酸改性生物质炭(Arg@BC)的质量浓度由 10 g/L 增加至 500 g/L, TMX-6 单位固定量呈现逐渐减少的趋势,而随着固定化时间的延长, TMX-6 单位固定量呈先增后减的趋势,原因主要是 Arg@BC 的添加量相对 TMX-6 数量始终处于过饱和状态,而菌株



CK:自然降解对照;BC:生物质炭;BC/TMX-6:生物质炭固定的 TMX-6;Arg@BC:精氨酸改性生物质炭;Arg@BC/TMX-6:精氨酸改性生物质炭固定的 TMX-6;Arg@BC+TMX-6:分别添加精氨酸改性生物质炭和 TMX-6;Arg+BC:分别添加 Arg 和 BC;Arg+BC/TMX-6:分别添加精氨酸和生物质炭固定的 TMX-6。

图 6 不同剂型 TMX-6 对噻虫嗪的降解能力

Fig.6 Degradation ability of different formulations of TMX-6 to thiamethoxam

固定化是动态过程,即存在吸附-解吸附作用。在固定初始阶段,Arg@BC 载体主要表现为吸附优势,随着时间延长,菌株在 Arg@BC 载体上以解吸附为主。结合 TMX-6 单位固定量和噻虫嗪降解率的正交实验结果,最终优选的精氨酸改性生物质炭基菌剂制备条件为 Arg@BC 质量浓度 50 g/L、精氨酸与生物质炭重量比 5.0 : 10.0、固定化时间 12 h。

Arg@BC/TMX-6 炭基菌剂对噻虫嗪降解率 (50.69%) 高于相当量的 Arg@BC 和菌株 TMX-6 的噻虫嗪降解率之和,即利用精氨酸进行生物质炭改性,再进行 TMX-6 固定制备的精氨酸改性生物质炭基菌剂具有“1+1>2”的增效作用,表明生物质炭经过精氨酸改性后可以显著增强生物质炭固定噻虫嗪降解菌 TMX-6 能力,进而提高其对噻虫嗪的降解率。本研究结果为进一步利用炭基材料进行农药污染土壤修复提供支撑和依据。

参考文献:

- [1] 田雨. 毒死蜱污染土壤的固定化微生物强化修复研究[D]. 泰安:山东农业大学,2020.
- [2] 董素侠. 韭菜植株对噻虫嗪的吸收、转运和代谢[D]. 杭州:浙江大学,2021.
- [3] CHENG H, TANG G, WANG S, et al. Combined remediation effects of biochar and organic fertilizer on immobilization and dissipation of neonicotinoids in soils[J]. Environment International, 2022, 169: 107500.
- [4] JACTEL H, VERHEGGEN F, THIÉRY D, et al. Alternatives to neonicotinoids[J]. Environment International, 2019, 129: 423-429.
- [5] RADOLINSKI J, WU J, XIA K, et al. Plants mediate precipitation-driven transport of a neonicotinoid pesticide[J]. Chemosphere, 2019, 222: 445-452.
- [6] 韩永和,何睿文,李超,等. 邻苯二甲酸酯降解细菌的多样性、降解机理及环境应用[J]. 生态毒理学报,2016, 11(2): 37-49.
- [7] 沈思,王晓瑜,王海霞,等. 细菌降解邻苯二甲酸酯的研究进展[J]. 生物工程学报,2019, 35(11): 2104-2120.
- [8] MAHTO K U, VANDANA, PRIYADARSHANEE M, et al. Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 379: 134759.
- [9] FENG F, CHEN X, WANG Q, et al. Use of *Bacillus-siamensis*-inoculated biochar to decrease uptake of dibutyl phthalate in leafy vegetables[J]. Journal of Environmental Management, 2020, 253: 109636.
- [10] LIU J, YU M, QU Y, et al. Compensation of the magnetic force imaging by scanning directions[J]. Micron, 2017, 102: 15-20.
- [11] XIONG B, ZHANG Y, HOU Y, et al. Enhanced biodegradation of PAHs in historically contaminated soil by *M. gilvum* inoculated biochar[J]. Chemosphere, 2017, 182: 316-324.
- [12] 迟青山. 生物炭与细菌微生物互作对小白菜生长的影响及益生菌的分离表征[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [13] MUKHERJEE S, SARKAR B, ARALAPPANAVAR V K, et al. Biochar-microorganism interactions for organic pollutant remediation: challenges and perspectives[J]. Environmental Pollution, 2022, 308: 119609.
- [14] 杨宗政,许文帅,吴志国,等. 微生物固定化及其在环境污染治理中的应用研究进展[J]. 微生物学通报,2020, 47(12): 4278-4292.
- [15] LIU H, WANG X, SONG X, et al. Generalists and specialists decomposing labile and aromatic biochar compounds and sequestering carbon in soil[J]. Geoderma, 2022, 428: 116176.
- [16] THUNSHIRN P, WENZEL W W, PFEIFER C. Pore characteristics of hydrochars and their role as a vector for soil bacteria: a critical review of engineering options[J]. Critical Reviews in Environ-

- mental Science and Technology, 2022, 52(23): 4147-4171.
- [17] 杨彩霞. 混合生物炭固定化微生物降解土壤中 PAHs[D]. 沈阳:辽宁大学, 2022.
- [18] ZHENG X, XU W, DONG J, et al. The effects of biochar and its applications in the microbial remediation of contaminated soil: a review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 438: 129557.
- [19] 张秀霞, 秦丽姣, 黄聪聪, 等. 微生物固定化载体的选择及其性能[J]. 化工进展, 2011, 30(12): 2781-2786.
- [20] 李振伟. 改性生物炭固定化微生物对石油污染土壤的修复研究[D]. 青岛:中国石油大学(华东), 2018.
- [21] WU C, ZHI D, YAO B, et al. Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation: a review[J]. Environmental Research, 2022, 212: 113226.
- [22] ZHANG M, HE L, ZHANG X, et al. Improved removal performance of gram-negative and gram-positive bacteria in sand filtration system with arginine modified biochar amendment[J]. Water Research, 2022, 211: 118006.
- [23] 詹红林, 葛静, 程江峰, 等. 内生菌定殖水稻对稻田土壤中毒死蜱降解的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 278-282.
- [24] 黄茜. 生物质炭固定化微生物对水中壬基酚的去除效果研究[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
- [25] 任静, 沈佳敏, 张磊, 等. 生物炭固定化多环芳烃高效降解菌剂的制备及稳定性[J]. 环境科学学报, 2020, 40(12): 4517-4523.
- [26] 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.
- [27] LI Y, SU P, LI Y, et al. Adsorption-desorption and degradation of insecticides clothianidin and thiamethoxam in agricultural soils[J]. Chemosphere, 2018, 207: 708-714.
- [28] ZHANG M, XIA H, RIAZ M, et al. Various beneficial microorganisms colonizing on the surface of biochar primarily originated from the storage environment rather than soil environment[J]. Applied Soil Ecology, 2023, 182: 104700.
- [29] 元妙新. 固定化细菌增强修复多环芳烃污染土壤及影响因素[D]. 杭州:浙江大学, 2011.
- [30] 赵淑雯, 张倩茹, 张楚晨, 等. 土壤污染修复中的生物炭-微生物交互作用研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(7): 1423-1435.
- [31] FENG F, SUN X, JIANG W, et al. *Stenotrophomonas pavanii* DJL-M3 inoculated biochar stabilizes the rhizosphere soil homeostasis of carbendazim-stressed rice[J]. Environmental Pollution, 2023, 329: 121723.

(责任编辑:石春林)