

刘亚平. 能够快速固定重金属的复合发酵菌液的制备及应用[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(1): 259–263.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.048

能够快速固定重金属的复合发酵菌液的制备及应用

刘亚平

(河北省地质环境监测院/河北省地质资源环境监测与保护重点实验室, 河北石家庄 050000)

摘要:在纯培养和模拟培养条件下对巨大芽孢杆菌 A1 和枯草芽孢杆菌 A2 组成的复合发酵菌液对水体及土壤中重金属的固定作用进行研究。结果表明, 单一或复合发酵菌液与含 Cu^{2+} 溶液的体积比为 2 : 1 时, 对 Cu^{2+} 的去除效果最好, 且复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除率比 A1 和 A2 的单独发酵菌液高; 菌株 A1 和 A2 的发酵菌液在体积比为 2 : 1 复合时对水体中重金属的去除效果最好; 初始 Cu^{2+} 质量浓度为 40 mg/L 时, 复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除率最大; 沉淀时间为 24 h 时, 复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除率达到 98% 以上; 高温下去除效果更好; 复合发酵菌液对土壤中有有效态 Cu 的固定效果比单一的好, 且 15 d 内对有效态 Cu 的固定率可达到 80.26%。因此, 复合菌在减缓重金属污染土壤方面具有重要的应用价值。

关键词:复合发酵菌液; 生物矿化; 水中重金属; 有效态重金属

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)01-0259-04

经济的快速发展使工业、农业机械化进入迅猛发展的时代, 近年来, 农耕时污水灌溉和工业生产时废水排放等一些经济活动, 使得大量重金属排放到水体和土壤中, 水体和土壤中的重金属含量逐渐增加, 已经成为严重影响土壤和水环境质量的一类重要污染物^[1]。重金属的特性致使其在环境中很难被降解, 并且在土壤及水体中又可通过各种物理、生物和化学过程而滞留, 其活性也会随着环境条件的改变而发生变化, 因此, 对重金属所污染的环境的治理存在难度大和易反复的问题。常规的修复重金属的物理化学法具有成本高、易二次污染、土壤生产功能丧失或下降等缺点^[2]。而生物法中的植物法由于受植物生长周期、土壤环境质量以及气候等的影响, 存在占用耕地资源、修复周期长和效果差等缺点。当前国内外专家学者所关注的焦点, 已经从物理法、化学法以及植物法这些常规的方法转向了更具有科研价值的微生物法上^[3]。微生物法主要是利用微生物的吸附、吸收和代谢等过程降低土壤中重金属的有效性或水相中重金属离子的浓度, 但被微生物吸附或吸收后的重金属可能会随着细胞的死亡而再次释放, 重新造成污

染^[4]。因此, 找到一种能够将重金属固定成稳定形态, 不会因环境因子的改变或微生物本身的存活与否而重新释放的方法已然成为当前科研领域的研究热点^[5]。自然界中存在很多类微生物, 它们可以通过代谢活动或者分泌酶来降解含磷或含碳有机物从而释放大量的 PO_4^{3-} 或 CO_3^{2-} , 在特定的条件下通过成矿作用形成性质稳定的结晶物质^[6-7]。如果将这几种微生物在特定条件下进行富集培养并通过人工干预来强化其对环境中重金属的固定作用, 将会实现土壤重金属污染的快速高效修复, 而且存在环境友好、不易产生二次污染、成本低和可实现边修复边生产的优点^[8]。如李哲等利用氧化木糖无色杆菌对土壤中的 Pb 和 Cd 进行了矿化固定研究, 通过使用菌株所制备成的发酵液, 能够将土壤中的 Pb 和 Cd 固定为稳定的矿物态, 以减少小白菜和水稻对 Pb 和 Cd 的吸收, 从而降低其环境危害性^[9-10]。王明明等研究了磷酸盐矿化菌对 Zn^{2+} 的生物矿化机制, 发现其在碱性条件下更易形成稳定的矿物形态^[11]。碳酸盐矿化和磷酸盐矿化是生物矿化的 2 种重要方式, 一些研究结果表明, 自然界中存在很多这种功能性菌株, 但目前的研究基本上停留在发现菌株以及研究其矿化机制上面, 并且是单一的菌株, 很少有研究探讨 2 种功能性复合菌株对重金属的固定作用^[12-13]。因此, 本研究尝试利用已发现的 2 种功能性菌株的复合菌液, 研究其对土壤及水体中重金属的固定作用、单一和复合菌对重金

收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 国家地下水监测工程检测能力配套建设方案(编号: 201716)。

作者简介: 刘亚平(1990—), 女, 河北石家庄人, 助理工程师, 主要从事实验测试工作。E-mail: 979170437@qq.com。

属的固定作用的影响等,以期为微生物矿化修复重金属提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,前者具有碳酸盐矿化功能,本研究中将其命名为菌株 A1,后者具有磷酸盐矿化功能,本研究中将其命名为菌株 A2,通用下文。

碳酸盐矿化菌培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 5 g/L,氯化钠 5 g/L,尿素 20 g/L,调节 pH 值至 7.2~7.4,尿素需配制成尿素溶液后加入培养基中,因尿素高温易变性,影响试验结果。

磷酸盐矿化菌培养基:植酸钠 1 g/L,牛肉膏 3 g/L,氯化钠 5 g/L,蛋白胨 5 g/L,调节 pH 值至 7.0~7.2,于 121 °C 下高温高压灭菌 25 min。

LB 固体培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 10 g/L,氯化钠 5 g/L,调节 pH 值至 7.0~7.2,121 °C 下高温高压灭菌 25 min。

供试土壤:采自河北省涞源县独立山城矿开发园区(114°29′24.52″E,39°13′42.14″N),基本理化性质:pH 值为 6.23,总氮含量 101.2 mg/kg,速效磷含量 23.8 mg/kg,速效钾含量 232.5 mg/kg,有机质含量 4.36%,总 Cu 含量 257 mg/kg,有效态 Cu 含量 84.5 mg/kg。以下土培试验均用此供试土壤。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液的制备 首先将菌株 A1、A2 的菌体细胞分别划线于 LB 固体培养基上,在 28 °C 下培养 24 h,然后向长满菌体细胞的平板中加入无菌水,用烧红灭菌过的接种环将菌体细胞刮离固体培养基进入无菌水中,将含有菌体细胞的悬浊液倒入离心管中,在涡旋振荡器上振荡均匀后,再用无菌水分别将 2 种菌株清洗离心,反复 3 次,最后将菌株 A1 和 A2 的菌悬液 $D_{600\text{nm}}$ 调节为 0.3 左右,即为试验用菌悬液。该菌悬液用于以下的所有接种试验。

1.2.2 单一或复合发酵菌液的制备 发酵菌液 A1 的制备:将目标菌株 A1 接种至碳酸盐矿化菌培养基中,置于 28 °C、160 r/min 的恒温摇床中进行振荡培养,培养 36 h 后,发酵菌液 A1 制备完成。

发酵菌液 A2 的制备:将目标菌株 A2 接种至磷酸盐矿化菌培养基中,置于 28 °C、160 r/min 的恒温摇床中振荡培养,培养 36 h 后,发酵菌液 A2 制备完成。

复合发酵菌液的制备:将发酵菌液 A1 和 A2 按一定比例混合,制备成复合发酵菌液。

1.2.3 单一发酵菌液和复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除 向 20 mL 质量浓度为 40 mg/L 的氯化铜溶液中分别加入 10、20、40 mL 发酵菌液 A1、发酵菌液 A2 和复合发酵菌液,分别在室温下沉淀 12 h 后,过 0.45 μm 滤膜,利用原子吸收分光光度计测定滤液中 Cu^{2+} 含量,计算去除率。去除率 = (去除前 Cu^{2+} 质量浓度 - 去除后 Cu^{2+} 质量浓度) / 去除前 Cu^{2+} 质量浓度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 发酵菌液的混合比例对重金属去除的影响 将菌株 A1 和 A2 的发酵菌液分别按 1:4、1:2、1:1、2:1 和 4:1 的体积比混合均匀,制备成复合发酵菌液。将各混合比例的复合发酵菌液按照与含 Cu^{2+} 溶液体积比为 2:1 的比例分别加入到 Cu^{2+} 溶液中,室温下沉淀 12 h 后,过滤,测定上清液中的 Cu^{2+} 质量浓度,分别计算去除率。

1.2.5 不同初始 Cu^{2+} 质量浓度对去除效果的影响 经前期大量试验验证,得出在复合发酵菌液 A1:A2 的体积比为 2:1 时,去除效果最佳。因此,将 20 mL 体积比为 2:1 的复合发酵菌液分别加入到 10 mL Cu^{2+} 质量浓度为 10、20、40、60 mg/L 的 Cu 溶液中,混合均匀,室温下沉淀 12 h 后,测定上清液中 Cu^{2+} 质量浓度,计算去除率。

1.2.6 沉淀时间对复合菌液去除 Cu^{2+} 的影响 将 20 mL A1:A2 体积比为 2:1 的复合发酵菌液加入到 10 mL Cu^{2+} 质量浓度为 40 mg/L 的 Cu 溶液中,混合均匀,在室温下分别沉淀 0、6、12、18、24、30、36 h 后(分别做 3 组平行试验,共 15 个小三角瓶),测定上清液中 Cu^{2+} 质量浓度,并计算去除率。

1.2.7 温度对复合发酵菌液去除 Cu^{2+} 效果的影响 将 20 mL A1:A2 体积比为 2:1 的复合发酵菌液加入到 10 mL Cu^{2+} 质量浓度为 40 mg/L 的 Cu 溶液中,混合均匀后分别在 4、21(室温)、50 °C 下沉淀 24 h 后,测定上清液中 Cu^{2+} 质量浓度,计算去除率。

1.2.8 单一和复合发酵菌液对土壤中有效态重金属的固定 称取 100 g 土壤平整铺入小花盆中,按照土液比 2 g:1 mL 的比例分别加入 50 mL 发酵菌液 A1、50 mL 发酵菌液 A2 及 50 mL 复合发酵菌液,并搅拌均匀,期间按照正常的水肥管理方法进行管理。分别在培养 0、3、6、9、12、15 d 后取样,测定土壤中有效态 Cu 含量,比较单一或复合发酵菌液对土壤中有效态 Cu 的固定效果。

1.2.9 测定方法 土壤中有效态 Cu 的测定:利用 DTPA 法浸提出土壤中有效态的 Cu,用 0.45 μm 针式过滤器过滤后,用空气乙炔原子吸收分光光度计测定^[14]。

溶液中 Cu^{2+} 的测定:将溶液过 0.45 μm 针式过滤器,然后用原子吸收分光光度计测定 Cu^{2+} 质量浓度。

1.3 数据处理与分析

所有试验重复 3 次,试验数据利用 Excel 2010 进行处理,用“平均值 \pm 标准差”表示,用 DPS 7.05 软件进行误差分析。

2 结果与分析

2.1 单一和复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除

从图 1 中可以看出,无论加入量多少,复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除率均高于单一发酵菌液的去除率,且加入量为 40 mL(菌液与重金属溶液体积比为 2:1)时,去除效率最高,可达到 96.4%。

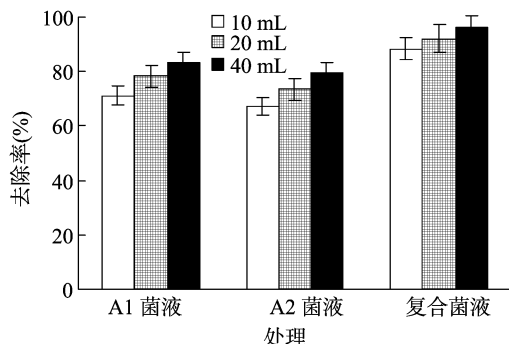


图1 单一和复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除

2.2 发酵菌液的混合比例对 Cu^{2+} 去除的影响

从图 2 中可以看出,发酵菌液随着 A1 占比增大,对 Cu^{2+} 的去除率逐渐增加,当发酵菌液 A1:A2 体积比为 2:1 时,溶液中 Cu^{2+} 的去除率可达到最大,为 98%,A1 占比继续增大时,去除率反而会呈现降低趋势。

2.3 不同初始 Cu^{2+} 质量浓度对去除效果的影响

从图 3 中可以看出,随着 Cu^{2+} 初始质量浓度的增加,复合发酵菌液对其去除率呈现先升高后降低的趋势,当初始质量浓度为 40 mg/L 时,去除率达到最大,为 96.8%。但当初始质量浓度更大时,发酵菌液对溶液中 Cu^{2+} 的去除率则出现下降趋势。

2.4 沉淀时间对去除 Cu^{2+} 的影响

由图 4 中可以看出,复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除率随着沉淀时间的延长而不断增大,到 24 h 时达到最大,最大去除率可达到 98% 以上,随后去除率

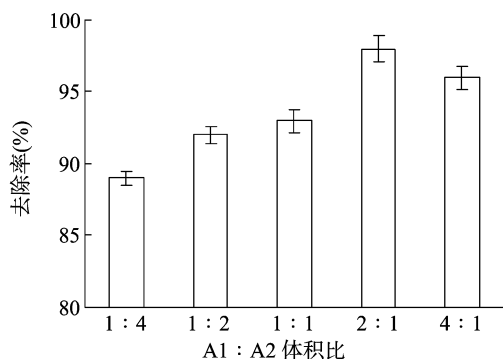


图2 不同混合比的发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除

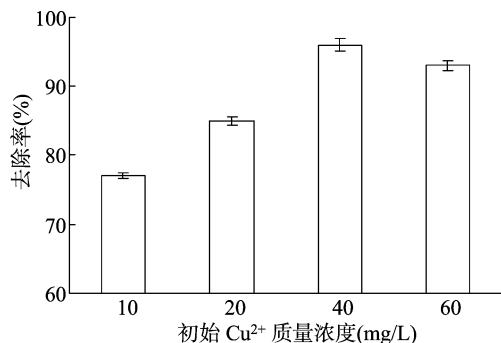


图3 复合发酵菌液对不同质量浓度的 Cu^{2+} 的去除

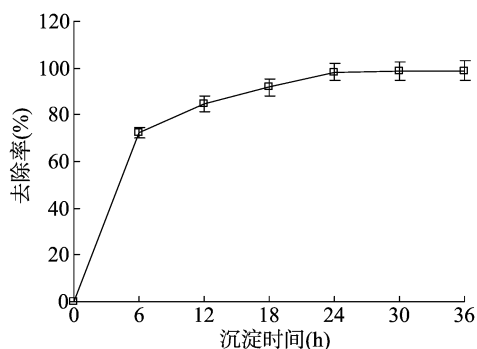


图4 沉淀时间对去除 Cu^{2+} 的影响

趋于稳定。

2.5 温度对复合发酵菌液去除 Cu^{2+} 效果的影响

从图 5 中可以看出,高温下的去除率高于低温时,且增幅为 17.7%,室温下的去除率和高温时相差无几,说明只有低温会抑制复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的去除作用。

2.6 单一和复合发酵菌液对土壤中有有效态重金属的固定

从图 6 中可以看出,复合发酵菌液对土壤中有有效态 Cu 的固定效果高于单一发酵菌液,在培养 3~9 d 快速固定有效态 Cu,且在 15 d 内,复合发酵菌液对有效态 Cu 的固定率可达到 80.26%,分别高出单一 A1、A2 发酵菌液固定率 13.04%、17.45%。

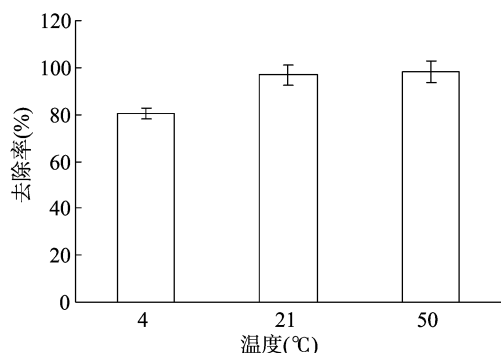
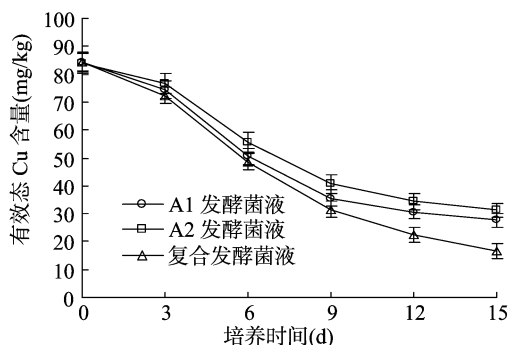
图5 温度对复合发酵菌液去除 Cu^{2+} 效果的影响

图6 单一和复合发酵菌液对土壤中有效态重金属的固定

3 讨论与结论

自然界中的很多微生物都具有固定重金属的能力,但能够固定后使其稳定不释放的方法不多见,而当前大多数学者都把目光集中在了如何使土壤或者水体中的重金属失去毒性,保持其原有的微量元素的可利用性。但暂时的使重金属失去毒性很容易,要长期稳定地保持这种效果就比较难处理。一些专家学者利用微生物的吸附、吸收或者胞吞作用去除重金属的危害,这样的方式效果很明显,但一段时间后,随着细胞的死亡,重金属被重新释放,再次污染水体或者土壤。随着研究的不断深入,已经有一些研究发现了能够有效固定重金属,且能保持一段时间内不会因为自然环境的改变或者细胞的死亡而重新造成毒害作用的方法——生物矿化法^[15]。目前已有一些关于生物矿化作用的研究成果,如钱春香等研究了一株枯草芽孢杆菌的碳酸盐矿化作用对 Cu^{2+} 的去除机制,结果表明,在碱性条件下更利于生物矿化作用的产生且产生的矿化产物更加稳定^[12]。之后,钱春香团队的王明明等利用国外进口的具有磷酸盐矿化作用的菌株,对 Zn^{2+} 的生物矿化作用机制进行研究,结果也表明了碱性条件是产生生物矿化作用的重要因素,在碱性

环境下能够生成较稳定的产物^[11]。但目前的研究仍停留在单一碳酸盐矿化作用或磷酸盐矿化作用,复合的矿化效果是否会更好还没有被具体报道。因此,本文利用能够碳酸盐矿化的巨大芽孢杆菌和能够磷酸盐矿化的枯草芽孢杆菌进行了复合矿化效果研究,结果表明复合发酵菌液的效果确实会高于单一发酵菌液,且在菌液 A1 : A2 体积比为 2 : 1 时矿化效果最好。随后又研究了初始 Cu^{2+} 质量浓度、沉淀时间和温度对矿化效果的影响,从而发现初始质量浓度越大,矿化效果越好,但在 Cu^{2+} 质量浓度超过 40 mg/L 时,矿化效果会受到抑制作用;矿化效果也会随着时间的延长越来越好,当沉淀时间超过 24 h 后逐渐趋于稳定,无明显变化;在温度越高时,矿化效果越好。最后,研究了单一和复合发酵菌液对土壤中有有效态 Cu 的固定效果,通过土培试验得知,复合发酵菌液对土壤中有有效态 Cu 的固定效果高于单一发酵菌液,且在 15 d 内,复合发酵菌液对有效态 Cu 的固定率可达到 80.26%。以上所有研究表明,复合发酵菌液的生物矿化作用高于单一发酵菌液,但复合发酵菌液中的单一因素如何共同对重金属离子产生生物矿化作用还在进一步研究。

综上所述,本研究可得出以下结论:复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的矿化效果高于单一的,且在发酵菌液 A1 : A2 体积比为 2 : 1 时矿化效果最好。分别在 Cu^{2+} 初始质量浓度为 40 mg/L、沉淀时间为 24 h 和高温时,复合发酵菌液对 Cu^{2+} 的矿化效果最好, Cu^{2+} 的最大去除率可分别达到 96.8%、98.4% 和 98.1%。土培试验表明,复合发酵菌液对土壤中有有效态 Cu 的固定作用高于单一发酵菌液的作用,且 15 d 内固定率可达到 80.26%。

参考文献:

- [1]高璐,沙迪,张雪萍. 松嫩平原耕作黑土 Cu、Pb、Zn 的污染现状分析[J]. 中国农业通报,2011,27(6):261-265.
- [2]Lee J, Park K Y, Cho J, et al. Releasing characteristics and fate of heavy metals from phytoremediation crop residues during anaerobic digestion[J]. Chemosphere, 2018, 191:520-526.
- [3]周广麒,任铮宇,杨洪泽,等. 微生物菌体对 Cd^{2+} 等重金属离子的吸附研究[J]. 生物技术通报,2013(6):155-159.
- [4]Andreazza R, Pieniz S, Okeke B C, et al. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(1):66-74.
- [5]Kumari D, Pan X L, Lee D J, et al. Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium*

王 琪,张永波,贾亚敏,等. 有机肥和生物炭对重金属污染农田土壤肥力的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(1):263-267.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.049

有机肥和生物炭对重金属污染农田土壤肥力的影响

王 琪¹,张永波¹,贾亚敏¹,李爱民²,王建武²,杨永亮²,张利明²

(1. 太原理工大学水利科学与工程学院,山西太原 030024; 2. 山西省地质调查院,山西太原 030006)

摘要:为了揭示有机肥和生物炭施入对重金属污染农田土壤肥力和修复植物生长的影响,采用田间定位试验的方法,以山西忻州金矿周边重金属污染土壤为研究对象,检测施用有机肥、生物炭之后,不同修复植物根际土壤的 pH 值、有机质含量、阳离子交换量及酶活性等的变化。结果表明,施用有机肥和生物炭后,重金属污染土壤中的有机质含量、阳离子交换量、全氮及全磷含量、脲酶和过氧化氢酶活性都有不同程度的提高,土壤 pH 值、全钾含量均有下降。与对照相比,施用生物炭之后,黑麦草根际土壤的阳离子交换量、全氮含量、过氧化氢酶活性分别提高了 12.40%、7.35%、16.21%,施用有机肥后,苜蓿根系的有机质含量显著增加了 73.81%。施用有机肥和生物炭可以提升重金属污染土壤的肥力,有助于修复植物的生物量积累和修复效果的提高。

关键词:有机肥;生物炭;重金属污染土壤;阳离子交换量;土壤酶;土壤肥力;植物修复

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)01-0263-05

2014 年,由原环境保护部与国土资源部发布的《全国土壤污染状况调查公报》指出,我国耕地土壤中的重金属含量超标面积达 7.6 万 km²,造成不同程度的农作物污染和经济损失,而矿区周边农田土壤的污染情况更加严峻^[1-3]。国内外学者针对土壤重金属污染的修复技术进行了大量研究,其中经济安全、环境友好的植物修复成为土壤污染修复研究

的新方向^[4]。但因修复植物大多植株矮、根系短、生物量小等,在田间试验中的修复效率较低,而通过强化措施确保土壤肥力以及修复植物的修复效果是现阶段农田重金属污染修复研究的热点^[5]。

有机肥中的有机质含量高、肥效持续时间长,富含氮(N)、磷(P)、钾(K)等大量元素和镁(Mg)、锌(Zn)、铁(Fe)、锰(Mn)、硼(B)等微量元素,在保肥增产方面有着化肥不可比拟的优势。生物质炭通常用树木、农业废弃物、动植物组织等生物质在无氧或者部分缺氧及相对低温(<700℃)的条件下裂解炭化形成炭材料,由 60% 以上的 C、N、H、O 以及碱性矿物质组成,其表面含有丰富的含氧官能团和多孔结构,具有很强的离子吸附性,常用作土壤

收稿日期:2018-11-14

基金项目:山西省应用基础研究项目(编号:201701D221223)。

作者简介:王 琪(1992—),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事重金属污染土壤修复研究。E-mail:arieswang92@163.com。

通信作者:张永波,博士,教授,主要从事矿山地质及环保研究。

E-mail:zfstzhang@sina.com。

undae at low temperature [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 94: 98-102.

[6] Zhu X J, Li W L, Zhan L, et al. The large-scale process of microbial carbonate precipitation for nickel remediation from an industrial soil [J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 149-155.

[7] 成 亮, 钱春香, 王瑞兴, 等. 碳酸盐矿化菌株 A 固结土壤 Cd²⁺ 的生物矿化过程[J]. 硅酸盐学报, 2008, 36(增刊 1): 215-221.

[8] 许燕波, 钱春香, 陆兆文. 微生物矿化修复铅离子污染的研究[J]. 化工时刊, 2012, 26(6): 14-17.

[9] 李 哲, 张 欢, 张秀芳, 等. 一株碳酸盐矿化菌的分离鉴定及其对 Cu 的固定作用[J]. 环境科学学报, 2017, 37(10): 3687-3695.

[10] 李 哲, 陈潼樾, 冷 粟, 等. 一株氧化木糖无色杆菌对 Pb 的生物矿化作用及其应用效果研究[J]. 农业环境科学学报, 2017,

36(10): 2014-2020.

[11] 王明明, 钱春香. 磷酸盐矿化菌矿化重金属离子 Zn²⁺ 的研究[J]. 功能材料, 2013, 44(3): 393-395.

[12] 钱春香, 许燕波, 胡黎明, 等. 一种微生物固结污染体系中 Cu²⁺ 的研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(12H): 33-36.

[13] 赵 越, 姚 俊, 王天齐, 等. 碳酸盐矿化菌的筛选与其吸附和矿化 Cd²⁺ 的特性[J]. 中国环境科学, 2016, 36(12): 3800-3806.

[14] 刘凤芝, 马锦秋. 土壤监测分析实用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.

[15] Podda F, Zuddas P, Minacci A, et al. Heavy metal coprecipitation with hydrozincite [Zn₅(CO₃)₂(OH)₆] from mine waters caused by photosynthetic microorganisms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 5092-5098.