

辛基酚聚氧乙烯醚混合菌的构建及响应面优化

刘文斌,张海涛,杨海君*,刘亚宾,许云海 (湖南农业大学植物保护学院,湖南 长沙 410128)

摘要: 为提高辛基酚聚氧乙烯醚(OPnEO)的生物降解效果,在本实验室已筛选出的 H1、TXBc10、OPQb11、TXBa23 四株 OPnEO 高效降解菌的基础上,首次从构建 OPnEO 混合菌的角度,着重探究了四菌株等比例不同组合降解 OPnEO 的效果.结果表明,混合菌 L9(H1:TXBc10:TXBa23 为 1:1:1)培养 7d 后对初始浓度 500mg/L OPnEO 的降解率最高,达到 56.44%,比各单一菌株降解效果有明显提高.运用单因素试验考察了影响 L9 的相关因素,初步确定 L9 降解 OPnEO 的最适外加碳源和氮源分别为葡萄糖和胰蛋白胨,最适初始 pH 值为 7.0,最适温度为 28 °C,最适接种量为 4%. Plackett-Burman 试验筛选获得影响 OPnEO 降解率的 3 个显著因子为 L9 接种量、温度及初始 pH 值.最陡爬坡试验逼近 3 个显著因子的最大响应区域,采用 Box-Behnken 试验设计及响应面法分析,确定 L9 的最优降解条件为 50mL 反应体系中接种量 4.16%、温度 28.20 °C、初始 pH 值 7.13、葡萄糖与胰蛋白胨浓度均为 2%、OPnEO 初始浓度 500mg/L、180r/min 培养 7d,该条件下混合菌 L9 对 OPnEO 降解率达 62.15%,比未优化条件提高了 5%左右.

关键词: 辛基酚聚氧乙烯醚(OPnEO); 混合菌; 响应面法; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2016)08-2444-09

Construction of mixed flora effective degrading octylphenyl polyethoxylates (OPnEO) and optimization of degrading conditions using response surface method. LIU Wen-bin, ZHANG Hai-tao, YANG Hai-jun*, LIU Ya-bin, XU Yun-hai (College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China). *China Environmental Science*, 2016,36(8): 2444~2452

Abstract: In order to heighten the biodegradation effect of the non-ionic surfactant octyl phenol ethoxylates (Octylphenyl polyethoxylates, OPnEO) in the laboratory, four mixed degradation bacteria (H1, TXBc10, OPQb11, TXBa23) were screened to degrade OPnEO. The construction of OPnEO mixed flora centers on the degradation effects of four bacterial strain of different ratios on OPnEO. The degradation rate of hybrid strain L9 (H1:TXBc10:TXBa23 1:1:1) to OPnEO reached 56.44% (highest), slightly higher than the degradation effect of each single strain. The factors related to degradation efficiency of L9 were optimized as follows: optimum carbon and nitrogen sources were sucrose and tryptone, respectively; optimum initial pH value was 7.0, the optimum temperature was 28 °C; optimum inoculation amount was 4%. To further the degradation rate, three significant factors affecting the degradation OPnEO were screened in Plackett-Burman experimental design: L9 mixed bacteria inoculation, temperature, and initial pH value. Then steepest ascent approached the maximum response area of the three significant factors. Using Box-Behnken experimental design and response surface analysis, the optimal conditions for the degradation of OPnEO by mixed bacteria L9 were confirmed as follows: inoculation 4.16%, temperature 28.20 °C, initial pH value 7.13, sucrose concentration 500mg/L, tryptone concentration 500mg/L, OPnEO initial concentration of 500mg/L, 180r/min cultured 7d. Under these conditions, the degradation rate of OPnEO by L9 reached 62.15%, about 5% higher than non-optimized OPnEO of experimental conditions. These results can effectively solve the current problem of environmental pollution such as tanning, washing, pesticides and other industries caused by OPnEO, and will offer new ideas to the study of other types of biodegradable surfactants pollutants.

Key words: octylphenyl polyethoxylates (OPnEO); mixed flora; response surface methodology; biodegradation

收稿日期: 2016-01-18

基金项目: 湖南省自然科学基金(2015JJ2079);长沙市科技计划(K1403022-31)

* 责任作者, 副教授, 1227677453@qq.com

辛基酚聚氧乙烯醚(OPnEO)是继脂肪醇聚氧乙烯醚之后,性能优异的第二大类非离子表面活性剂.广泛用于洗涤、纺织、皮革、造纸、农药等领域.然而,OPnEO 自然降解性较差^[1],生物积累性强^[2-3],加之其降解产生的低分子量低聚物具有很强的环境雌激素效应^[4-6],使其在使用过程中不可避免地产生了系列严重的环境污染.目前已在城市污水、地面水和饮用水、工业废水、河流及其底泥沉积物、海洋及其沿岸沉积物中检测到 OP 及其 OPEO1 和 OPEO2 的存在^[7].

就目前的研究报道来看,对非离子表面活性剂污染治理的研究主要集中在烷基酚和壬基酚,且研究重点均放在该类表面活性剂的危害、吸附行为、测定方法、降解菌的筛选与鉴定以及应用方面^[8-16].而作为产量高、环境雌激素效应强的 OPnEO 污染的生物治理技术最近才发展起来,且主要集中在 OPnEO 高效降解菌的筛选及分离菌对 OPnEO 降解能力等理论研究方面^[17-20].大部分降解菌虽可直接应用,但这些分离、筛选得到的降解菌往往在实际污染环境中的耐受性差、可利用性低,甚至某些降解菌在实际利用中失活.虽然优势混合菌在废水污染物的降解及废物资源化中已有较多报道^[21-22],但其在降解表面活性剂特别是 OPnEO 污染的研究才刚刚开始,鲜有报道.

本研究将在前期实验已筛选的 H1、TXBc10、OPQb11、TXBa23 四株辛基酚聚氧乙烯醚(OPnEO)高效降解菌的基础上,通过等比例组合实验,构建出高效降解 OPnEO 的混合菌.并利用响应面法(RSM)优化混合菌降解 OPnEO 的条件以提高其降解效率.

1 材料与方法

1.1 实验材料与培养基

1.1.1 菌种来源 醋酸钙不动杆菌 H1 (*Acinetobacter calcoaceticus* H1)^[18]、气单胞菌 TXBc10(*Aeromonas* sp. TXBc10)、柠檬酸细菌 OPQb11(*Citrobacter* sp. OPQb11)、假单胞菌 TXBa23(*Pseudomonas* sp. TXBa23)^[19]均由本实验室从湖南裳海迪瑞特服装有限公司污水处理

的曝气池和排污口废水中筛选获得.

1.1.2 培养基 LB 培养基:酵母浸出物 5.0g,胰蛋白胨 10.0g,NaCl 10.0g, TX-100(OPnEO, n=9-10)0.5g, H₂O 1000mL, pH7.0, 若配制固体培养基, 则加 1.5-2%琼脂.无机盐培养基(MS):K₂HPO₄ 0.4g, KH₂PO₄ 0.4g, NaCl 0.1g, (NH₄)₂SO₄ 0.04g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, MnSO₄·H₂O 0.01g, Fe₂(SO₄)₃·H₂O 0.01g, NaMoO₄·2H₂O 0.01g, H₂O 1000mL, pH7.0.

1.2 实验方法

1.2.1 辛基酚聚氧乙烯醚高效降解菌的活化 将保存在-80℃冰箱中的 OPnEO 高效降解菌 H1、TXBc10、OPQb11、TXBa23 取出溶化后,分别接种到 50mL LB 培养基中,28℃、180r/min 振荡培养 14~16h 后,挑选部分茁壮的菌落接种到新的 LB 培养基中培养,重复此步骤 2~3 次,从而得到生长良好的菌落.

1.2.2 混合菌的构建 将 LB 培养基中培养 24h 的菌液离心(10000r/min)后,用生理盐水(NaCl 0.85%)重悬制成菌悬液,并在 600nm 下测其光密度,并加入适量无菌生理盐水调节菌浓度,使 4 菌株 OD₆₀₀ 均为 1.0 左右,然后将浓度一致的 4 种菌等比例混合,构建不同的混合菌,并将其按 4%接种到 50mL 含 500mg/L OPnEO 的无机盐液体培养基中,振荡培养(28℃、pH7.0、180r/min)7d 后取样,用高效液相色谱法(AGILENT 1100)测定 OPnEO 含量^[23-24],计算 OPnEO 的降解率.选取降解率最高的混合菌进行后续试验.

1.2.3 环境因素对混合菌降解效率的影响 通过单因素试验,分别研究温度、pH 值、底物浓度、接种量、外加碳源和氮源对混合菌降解 OPnEO 的影响.将混合菌接种到含 500mg/L OPnEO 的无机盐液体培养基中,180r/min 振荡培养 7d 后取样,并用高效液相色谱法(AGILENT 1100)测定 OPnEO 含量,计算 OPnEO 的降解率.标准试验:接种量为 4%、28℃、pH7.0、180r/min、50mL 无机盐培养基反应体系.温度分别为 15、20、25、28、30、35 和 40℃;pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0;底物浓度分别为 50、100、200、500、800、1000 和 1500mg/L;接种量分别为 0.5%、

1%、2%、4%、8%和 10%;外加碳源分别为葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、柠檬酸、乳糖、乙酸钠、山梨醇、明胶和木糖,外加氮源分别为牛肉膏、尿素、硝酸钾、胰蛋白胨、硝酸铵、酵母粉、乙酸铵、氯化铵和硫酸铵,添加量均为 2%。

1.2.4 L9 降解 OPnEO 的最优条件研究 在单因素试验的基础上,采用 N=12Plackett-Burman 试验设计研究温度、pH 值、底物浓度、接种量、培养时间、外加碳源和氮源 7 个因素对混合菌降解 OPnEO 的影响(表 1),每个处理 3 个重复.根据 Plackett-Burman 试验结果,利用最陡爬坡路径方法确定重要因子的最适浓度范围^[25],并根据最陡爬坡试验结果进行 Box-Behnken 试验设计,利用 Design-Expert.8.05b 软件分析最优值。

表 1 Plackett-Burman 试验因素及水平

Table 1 Plackett-Burman experimental factors and levels

因素编码	因素	低(-1)	高(1)
X ₁	Dummy1	-1	1
X ₂	葡萄糖(%)	2	3
X ₃	OPnEO(mg/L)	400	600
X ₄	Dummy2	-1	1
X ₅	接种量(%)	2	4
X ₆	胰蛋白胨(%)	2	3
X ₇	温度(°C)	28	35
X ₈	培养时间(d)	4	7
X ₉	Dummy3	-1	1
X ₁₀	初始 pH	5	7
X ₁₁	Dummy4	-1	1

注:Dummy1~4为空白因素。

2 结果与分析

2.1 混合菌降解 OPnEO 效率

不同混合菌降解 OPnEO 的效率明显不同.与单一菌株相比,有些混合菌能在一定程度上提高 OPnEO 的降解率,另一些混合菌的降解率却下降.由此可见,单纯的把各单菌株简单的组合在一起,降解效果并不一定会提高,这可能是菌株间的拮抗作用所致.在所有混合菌组合中,9 号混合菌(命名为 L9, H1:TXBc10:TXBa23=1:1:1)的降解率最高,为 56.44%,比单菌株高 8.63%~15.44%,选其进行后续试验。

表 2 混合菌降解 OPnEO 的效率

Table 2 Effect of OPnEO degradation by the mixed bacteria

序号	H1	TXBc10	OPQb11	TXBa23	降解率(%)
1	1	1	0	0	48.31
2	0	0	1	1	37.08
3	1	0	1	0	44.22
4	1	0	0	1	45.07
5	0	1	0	1	47.11
6	0	1	1	0	38.53
7	0	1	1	1	43.64
8	1	0	1	1	42.32
9	1	1	0	1	56.44
10	1	1	1	0	43.17
11	1	1	1	1	42.03
12	1	0	0	0	43.20
13	0	1	0	0	46.03
14	0	0	1	0	41.00
15	0	0	0	1	47.81

注:表中"1"代表接种菌株,"0"代表未接种菌株.各菌株间等比例投加,总接种量为4%。

2.2 环境因素对 L9 降解效率的影响

2.2.1 温度对 L9 降解效率的影响 由图 1 可知,温度对 L9 降解 OPnEO 有显著性影响.随着温度的升高,L9 的降解效率先升高后降低.在 25~30°C 时,L9 的降解率较高;当温度低于 25°C 或高于 30°C 时,L9 的降解率显著下降.当温度为 28°C 时,L9 的降解率最高,为 56.24%,分别为 15°C 和 40°C 的 2 倍和 4 倍,这表明 L9 与大多数环境微生物对温度的敏感程度一致,过高或过低的温度都会严重影响菌株体内相关酶的活性,从而导致菌株代谢能力降低、生长受到抑制。

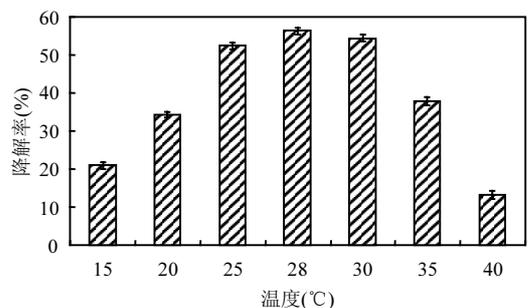


图 1 温度对 L9 降解 OPnEO 的影响

Fig.1 Effect of temperature on the OPnEO degradation by L9

2.2.2 pH 值对 L9 降解率的影响 由图 2 可知,pH5~10 时 L9 对 OPnEO 的降解率出现了较大的起伏.当 pH 在 7~9 时, L9 对 OPnEO 具有较高的降解率,且当 pH 为 7.0 时,L9 对 OPnEO 降解效果达到最佳,此时 OPnEO 的降解率为 55.68%,故初步判断最适 pH 为 7.0.而当 pH 为 5 或 10 时,L9 对 OPnEO 的降解能力急剧降低,这与过高或过低的 pH 值会使微生物体内酶失活,不利于微生物生长繁殖有关.总之,L9 适应中性偏弱碱性环境,与大多数微生物对 pH 的适应范围基本一致.

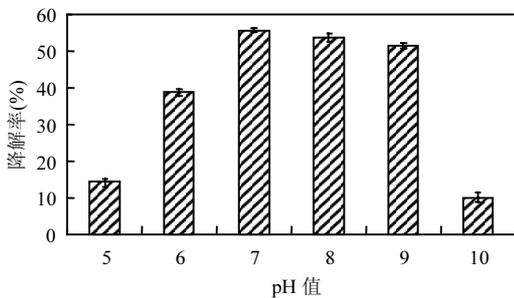


图 2 pH 值对 L9 降解 OPnEO 的影响

Fig.2 Effect of pH on the OPnEO degradation by L9

2.2.3 底物浓度对 L9 降解效率的影响 由图 3 可知,在 OPnEO 浓度低于 200mg/L 时,L9 对 OPnEO 的降解速率随 OPnEO 初始浓度的增加而迅速下降,变化十分明显.说明混合菌 L9 在低浓度的 OPnEO 环境中迅速生长,并能有效利用 OPnEO;当 OPnEO 浓度为 200~800mg/L 时,L9 对 OPnEO 的降解率受浓度的影响不大,降解率基本保持在 50%左右,说明 L9 能够适应较高 OPnEO 浓度环境.考虑到 L9 的实际应用环境和实际应用价值,选择底物浓度为 500mg/L 作为后续研究;而当 OPnEO 浓度高于 1000mg/L 时,L9 对 OPnEO 的降解率又开始出现大幅下降,到 1500mg/L 时,降解率下降到 31.3%.

效率并没有明显增加,反而有少许下降.

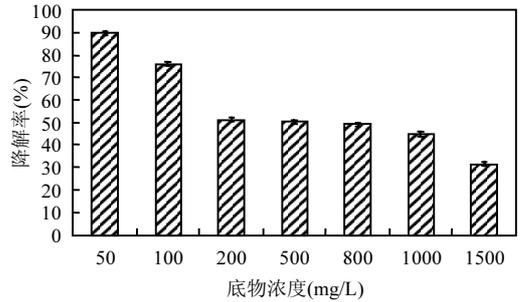


图 3 底物浓度对 L9 降解 OPnEO 的影响

Fig.3 Effect of Substrate concentration on the OPnEO degradation by L9

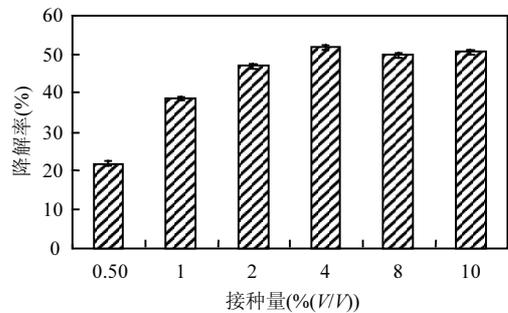


图 4 接种量对 L9 降解 OPnEO 的影响

Fig.4 Effect of inoculum amount on the OPnEO degradation by L9

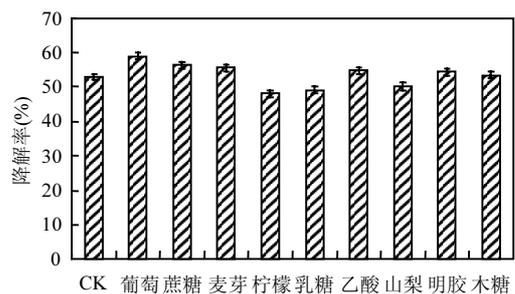


图 5 外加碳源对 L9 降解 OPnEO 的影响

Fig.5 Effect of carbon source on the OPnEO degradation by L9

2.2.4 接种量对 L9 降解效率的影响 由图 4 可知,接种量对于 L9 降解 OPnEO 的影响比较明显,随着 L9 接种量的增加,L9 对 OPnEO 的降解率大幅增加,但并不成简单线性关系.当接种量达到 4%时,此时 L9 对 OPnEO 的降解效果达到最佳,降解率为 51.8%.再继续增加接种量, L9 的降解

2.2.5 外加碳、氮源对 L9 降解效率的影响 从图 5 可知,添加外加碳源对 L9 降解 OPnEO 的效果有一定的促进作用,且葡萄糖能有效提高 L9 对 OPnEO 的降解,其次蔗糖、麦芽糖和乙酸钠也对 L9 的降解效果有一定促进作用.而柠檬酸和

乳糖的存在则会抑制 L9 对 OPnEO 的降解效果,这可能与菌株体内酶活受到影响有关.从图 6 中可以看出,胰蛋白胨能提高 L9 对 OPnEO 的降解能力,且有机氮源对 L9 降解能力的促进作用均高于无机氮源.

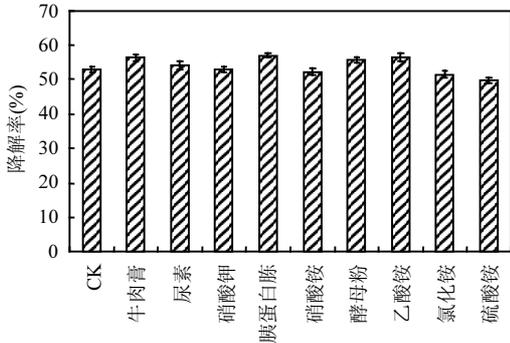


图6 外加氮源对 L9 降解 OPnEO 的影响
Fig.6 Effect of nitrogen source on the OPnEO degradation by L9

2.3 响应面法优化 L9 降解性能

2.3.1 PB 试验设计结果分析 运用 Design-Expert.8.05b 软件进行数据处理分析,结果如表 3 和表 4 所示.从表 3 中可以看出,试验组 3 对 OPnEO 的降解率最高,达到 60.83%;试验组 9 的降解率最低,仅有 11.22%.将试验数据采用 Design-Expert.8.05b 软件分析后,可得方程为

$$Y=40.91+0.97X_2-1.18X_3+4.57X_5-1.59X_6-6.02X_7-0.88X_8+11.19X_{10}$$

式中, X_2 为葡萄糖含量,%; X_3 为 OPnEO 浓度,mg/L; X_5 为 L9 接种量,%; X_6 为胰蛋白胨含量,%; X_7 为温度, $^{\circ}\text{C}$; X_8 为培养时间,d; X_{10} 为初始 pH.得到模型的 P 为 0.0042,表明所得回归方程显著,即该模型在研究的整个回归区域拟合性很好;复相关系数 $R^2=0.9765$,表明相关性比较好;校正决定系数 $\text{Adj } R^2=0.9355$,表明 93.55%的试验数据的变异性可用此回归模型来解释;通常情况下变化系数(C_v)越低,试验的精确度和可信度越高, C_v 值等于 9.00%,表明此 PB 试验的精确度和可信度较好;精密度指有效信号和噪声的比值,大于 4.0 即视为合理,在本试验精密度为 16.508,远大于 4.0.从回归分析结果表 4 可知,L9 的接种量(L9 菌悬液

与培养液体积比)、温度以及初始 pH 值对 L9 降解 OPnEO 的效率存在显著影响,其中初始 pH 的 P 值最小($P=0.0005$),说明其对 L9 降解 OPnEO 的效率影响最显著,其次是温度($P=0.0048$),再次为 L9 的接种量($P=0.0127$).而其他 4 个因素,葡萄糖浓度、OPnEO 浓度、胰蛋白胨浓度以及培养时间的 P 值均大于 0.05,对 L9 降解 OPnEO 的效率没有明显影响.由此可知,初始 pH、温度和 L9 的接种量为影响 L9 降解 OPnEO 效率的关键因素.

表 3 Plackett-Burman 试验设计与结果

Table 3 Design and its response value of Plackett-Burman experiment

编码	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	TBC 降解率(%)
1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	58.01
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	43.25
3	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	60.83
4	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	28.10
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	31.24
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	30.86
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	51.84
8	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	44.11
9	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	11.22
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	54.60
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	33.67
12	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	43.24

注: X_1 ~ X_{11} 含义同表1.

表 4 Plackett-Burman 试验分析结果

Table 4 Analytic result of Plackett-Burman experiment

因素	效应	F 检验	$Pt>F$	重要性
X_2	0.97	0.83	0.4125	6
X_3	-1.18	1.23	0.3299	5
X_5	4.57	18.47	0.0127	3
X_6	-1.59	2.24	0.2087	4
X_7	-6.02	32.08	0.0048	2
X_8	-0.88	0.69	0.4537	7
X_{10}	11.19	110.97	0.0005	1

注: X_1 ~ X_{11} 含义同表1.

2.3.2 最陡爬坡试验结果与分析 根据 Plackett-Burman 试验筛选出的 3 个显著因素估计系数的正负效应,依次增大或减小,其他因素根

据单因素试验结果分别取最佳值,设计最陡爬坡试验.结果如表 5 所示,随着 L9 接种量、初始 pH 的增加和温度的减小,L9 对 OPnEO 的降解率呈现先增大后减小的趋势.当 L9 接种量为 4%,初始 pH 为 7.0,温度为 28℃时,L9 对 OPnEO 的降解效率达到最大.因此,序号 3 的试验为最大响应值区域,故以此为中心点进行后续响应面分析.

表 5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of steepest ascent

编号	接种量(%)	温度(℃)	初始 pH 值	OPnEO 降解率 (%)
1	2	30	6.0	41.21
2	3	29	6.5	54.82
3	4	28	7.0	60.43
4	5	27	7.5	58.26
5	6	26	8.0	50.72

2.3.3 响应面分析法确定最佳降解条件 通过最陡爬坡试验确定 3 个显著因子的最适范围后,以 L9 接种量 4%、温度 28℃、初始 pH 值 7.0 为中心点实施响应面分析,各因素水平见表 6.以 OPnEO 降解率为响应值,设计 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验,试验设计及结果见表 7 和表 8.

表 6 Box-Behnken 设计因子及水平

Table 6 Factors and levels of Box-Behnken design

编号	因子	水平		
		-1	0	1
A	接种量(%)	3	4	5
B	温度(℃)	27	28	29
C	初始 pH	6.5	7.0	7.5

运用 Design Expert 软件对 17 个试验点的响应面值进行回归分析,得二次多项式方程

$$Y=61.29+0.97A+2.03B+4.52C-0.84AB+0.33AC+0.89BC-2.81A^2-5.34B^2-9.26C^2$$

式中:Y 为 OPnEO 降解率;A、B、C 分别为 L9 接种量、温度、初始 pH 的编码值.相关系数 $R^2=0.9530$,说明方程的拟合度比较好,可以用该方程进行试验结果预测.

表 7 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 7 Box-Behnken experimental design and result

试验序号	A:接种量水平	B:温度水平	C:初始 pH 值水平	OPnEO 降解率(%)
1	1	-1	0	52.30
2	-1	0	1	49.69
3	0	0	0	61.02
4	1	0	-1	48.10
5	0	0	0	60.43
6	-1	1	0	55.68
7	0	0	0	61.95
8	-1	0	-1	45.31
9	0	1	-1	41.43
10	0	0	0	61.73
11	-1	-1	0	50.17
12	0	0	0	61.32
13	1	1	0	54.43
14	0	-1	-1	38.92
15	0	1	1	56.24
16	0	-1	1	50.17
17	1	0	1	53.80

表 8 Box-Behnken 试验回归分析结果

Table 8 Result of regression analysis of the Box-Behnken design

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
常数	769.98	9	85.55	15.76	0.0007	极显著
A	7.57	1	7.57	1.39	0.2763	不显著
B	32.89	1	32.89	6.06	0.0434	显著
C	163.26	1	163.26	30.07	0.0009	极显著
AB	2.86	1	2.86	0.53	0.4918	不显著
AC	0.44	1	0.44	0.08	0.7852	不显著
BC	3.17	1	3.17	0.58	0.4699	不显著
A ²	33.13	1	33.13	6.10	0.0428	显著
B ²	120.07	1	120.07	22.12	0.0022	显著
C ²	361.04	1	361.04	66.50	< 0.0001	极显著

运用 Design-Expert.8.05b 软件对该模型进行回归方差分析和显著性检验,得到模型 P 值为 0.0007,远小于 0.01,表明该模型极显著,即该模型在被研究的整个回归区域拟合性很好;模型的变异系数(C_v)为 4.39%,说明模型的精密度较好,试验的可信度较高.结合响应面分析 3 维图(图 7),可直观的看出各因素之间的交互作用,表明响应值与各因素间并不是简单的线性关系,且响应值存在 1 极值点.

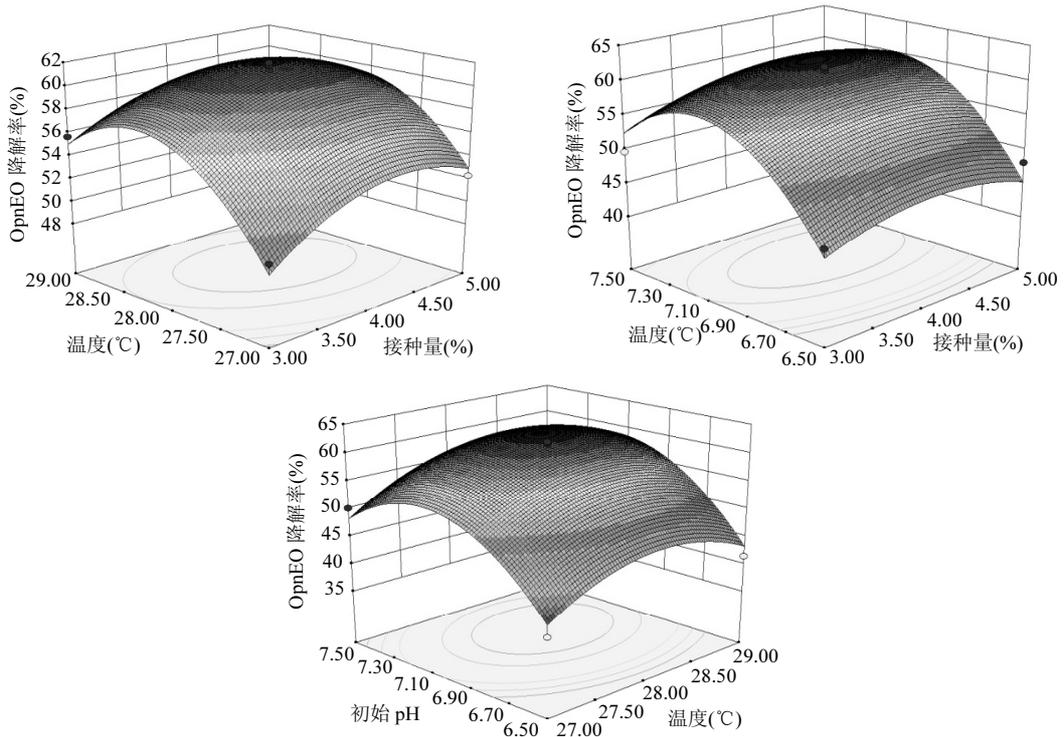


图7 L9 各因素及其交互作用的响应面图

Fig.7 Factors and its interaction response surface chart

分析表 8 数据可知,3 个显著因子对响应值的影响排序为:初始 pH 值(C)>温度(B)>L9 接种量(A).其中,C、C²对 Y 的影响差异极显著,B、A²和 B²对 Y 的影响高度显著,而 A、AB、AC 和 BC 对 Y 的影响不显著.

对模型构建的方程进行偏导微分处理,得到方程的 3 个解:A=4.16,B=28.20,C=7.13,即:L9 接种量 4.16%、温度 28.20℃、初始 pH7.13.此时,L9 对 OPnEO 降解率达到最大预测值,为 62.15%.

2.3.4 验证试验 由模型可知,三个显著因素 L9 接种量 4.16%、温度 28.20℃、初始 pH7.13 时,L9 对 OPnEO 降解率达到最大预测值 62.15%.为验证模型预测结果的准确性和有效性,按照优化后的 OPnEO 降解条件进行摇瓶试验,重复试验 3 次.结果显示,实际检测 OPnEO 的降解率分别为 61.95%、60.81%、61.02%,平均值为 61.26%,与预测值 62.15%接近,两者之间具有良好的拟合性,表明该模型能比较真实的预测各因素对 L9 降解 OPnEO 的影响.同时,与未优化试验组之前

结果比较发现,优化后的最佳降解条件可使 L9 对 OPnEO 的降解率提高 4.82%.

3 讨论

虽然在多数领域中高效混合菌的作用已得到肯定,部分成果也已经在实践中得到应用^[27-30],但在降解表面活性剂,特别是 OPnEO 污染的研究报道尚不多见.故本实验选择在前期已筛选的 H1、TXBc10、OPQb11、TXBa23 四株辛基酚聚氧乙烯醚(OPnEO)高效降解菌的基础上,采用等比混合的方式构建混合菌.结果发现,混合菌对 OPnEO 的降解效果并不一定都比单菌株高,甚至有些混合菌比各单菌株的降解率还低,这与何丽媛等^[31]的研究结果相一致.由此可见,如果只是简单的把能利用同一底物的单菌株组合在一起,不一定会取得理想的效果.这是由于当前对于具有协同作用关系的混菌筛选还停留在一个随机的过程上,对混合菌体系中各菌间相互关系和作用机理缺乏深入研究,从而不能有效地协调

各菌株之间的关系,使其达到最佳水平,发挥最大效应.上述问题都严重地阻碍了混合菌的发展和实际应用.

因此,从生理、代谢和遗传角度深入研究菌株间的关系和协同作用机理,对提高混合菌的稳定性和协同作用效率具有重要作用.在此基础上引入一些新兴的生物技术,如利用细胞融合技术和基因工程技术把具有互利协同关系的微生物构建工程菌,可使其既具有混菌培养的功能,又拥有纯培养菌株营养要求单一、易于调控、生理代谢稳定等优点;采用固定化微生物技术固定高效优势混合菌,以使其可多次重复使用,降低成本,增加效率,提高环境耐受能力,这些都对混合菌的理论发展和实际应用有重要意义.

4 结论

4.1 通过对四菌株(H1、TXBc10、OPQb11 和 TXBa23)进行等比例组合实验,获得了一组高效降解 OPnEO 的混合菌 L9(H1:TXBc10:TXBa23=1:1:1),其在总接种量 4%,28℃,pH7.0,180r/min 培养 7d 对初始浓度为 500mg/L 的 OPnEO 降解率达到 56.44%,比降解效果最好的单一菌株(表 1 试验组 15TXBa23,47.81%)提高了 8.63%.

4.2 运用单因素试验考察了影响混合菌 L9 降解的相关因素,初步确定混合菌 L9 降解 OPnEO 的最适外加碳源和氮源分别是葡萄糖和胰蛋白胨,最适 pH 值 7.0,最适温度 28℃,最适接种量 4%.应用响应面法分析,确定混合菌 L9 的最优降解条件为 50mL 反应体系中接种量 4.16%、温度 28.20℃、初始 pH 值 7.13、葡萄糖浓度 2%、胰蛋白胨浓度 2%、OPnEO 初始浓度 500mg/L、180r/min 培养 7d,该条件下混合菌 L9 对 OPnEO 的降解率达 62.15%,通过验证实验实际检测的平均值为 61.26%,比未优化条件下提高了 4.82%.

参考文献:

- [1] Chiu T Y, Paterakis N, Cartmell E, et al. A critical review of the formation of mono- and dicarboxylated metabolic intermediates of alkylphenol polyethoxylates during wastewater treatment and their environmental significance [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2010,40(3):199-238.
- [2] Servos M R. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates [J]. *Water Quality Research Journal of Canada*, 1999,34(1):123-177.
- [3] Tsuda T, Takino A, Kojima M, et al. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa [J]. *Chemosphere*, 2000,41(5):757-762.
- [4] 宫向红,徐英江,任利华,等.辛基酚对鲤的雌激素效应 [J]. *水产学报*, 2010(3):410-414.
- [5] 朱毅,舒为群,田怀军,等.辛基酚体外类雌激素效应观察 [J]. *第三军医大学学报*, 2003,25(8):673-675.
- [6] Nice H E, Morrill D, Crane M, et al. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003,256:293-300.
- [7] Van Ry D A, Dachs J, Gigliotti C L, et al. Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson River estuary [J]. *Environmental Science & Technology*, 2000,34(12):2410-2417.
- [8] Zhang G, Hao H U, Sun W L, et al. Sorption of Triton X-100 on soil organic matter fractions: Kinetics and isotherms [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009,21(6):795-800.
- [9] Di Gioia D, Michelles A, Pierini M, et al. Selection and characterization of aerobic bacteria capable of degrading commercial mixtures of low-ethoxylated nonylphenols [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008,104(1):231-242.
- [10] Chang B V, Chiang B W, Yuan S Y. Biodegradation of nonylphenol in soil [J]. *Chemosphere*, 2007,66(10):1857-1862.
- [11] 杨海君,杨成建,肖启明.十二烷基聚氧乙烯醚降解菌的分离、鉴定及降解特性 [J]. *中国环境科学*, 2007,27(6):768-772.
- [12] 杨海君,杨成建,曾清如,等.十二烷基聚氧乙烯醚 Brij-30 降解菌的分离及其对土壤微生物和 Brij-30 降解的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2008,27(3):953-958.
- [13] 杨海君,颜丙花,范芙蓉,等.土壤环境中 2 株典型非离子表面活性剂降解菌的应用效果 [J]. *环境科学研究*, 2009,22(5):617-621.
- [14] Yan B H, Yang H J, Wei J H, et al. Isolation from tannery wastewater and characterization of bacterial strain involved in nonionic surfactant degradation [C]//*Advanced Materials Research*, 2011,183:22-26.
- [15] Hotta Y, Hosoda A, Sano F, et al. Ecotoxicity by the biodegradation of alkylphenol polyethoxylates depends on the effect of trace elements [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009,58(2):1062-1067.
- [16] 刘易,王峰.辛基酚的好氧生物降解及微生物群落特征 [J]. *环境工程学报*, 2012,6(8):2903-2908.

- [17] 杨海君,杨成建,罗琳.辛基酚聚氧乙烯醚降解菌的分离鉴定及其生长和降解特性[J].环境化学,2008,27(4):444-447.
- [18] 关向杰,贺强礼,黄水娥,等.一株辛基酚聚氧乙烯醚降解菌的筛选,鉴定及其降解[J].中国环境科学,2014,34(6):1556-1563.
- [19] 颜丙花.制革废水中辛基酚聚氧乙烯醚降解菌的选育及其降解特性研究[D].湖南农业大学硕士学位论文,2010.
- [20] Tasaki Y, Yoshikawa H, Tamura H. Isolation and characterization of an alcohol dehydrogenase gene from the octylphenol polyethoxylate degrader *Pseudomonas putida* S-5 [J]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2006,70(8):1855-1863.
- [21] 冯树,周樱桥,张忠泽.微生物混合培养及其应用[J].微生物学通报,2001,28(3):92-95.
- [22] 杨家华,郭志宏.EM技术及其在水环境保护中的应用研究进展[J].环境科学与技术,2007,30(6):112-114.
- [23] Loyo-Rosales J E, Schmitz-Afonso I, Rice C P, et al. Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2003,75(18):4811-4817.
- [24] Mao I F, Lu Y Y, Chen M L. A simplified method for simultaneous quantitation of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in meat and fish using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 2006, 86(10):713-722.
- [25] 贺强礼,刘文斌,杨海君,等.1株对叔丁基邻苯二酚降解菌的筛选鉴定及响应面法优化其降解[J].环境科学,2015,(7):055.
- [26] Yu-Duo C, Gao H. The Application and Function of Microbial Technology in the Process of Water Pollution Repair [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2014.
- [27] 赵硕伟,沈嘉澍,沈标.复合菌群的构建及其对石油污染土壤修复的研究[J].农业环境科学学报,2011,30(8):1567-1572.
- [28] 王鑫,王学江,刘免,等.高效石油降解菌群构建及降解性能的研究[J].海洋环境科学,2014(4):576-579.
- [29] Akbar S, Sultan S, Kertesz M. Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014,30(10):2755-2766.
- [30] Boonchan S, Britz M L, Stanley G A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2000,66(3):1007-1019.
- [31] 何丽媛,党志,唐霞,等.混合菌对原油的降解及其降解性能的研究[J].环境科学学报,2010,30(6):1220-1227.

作者简介: 刘文斌(1990-),男,湖南益阳人,湖南农业大学微生物学专业硕士研究生,主要研究方向为环境污染与治理。

航天科技助推大气污染治理

气动脱硫除尘技术作为航天科技集团十一院控股企业航天环境工程有限公司的核心技术,在国内为数不多的具有自主知识产权的节能高效脱硫除尘领域发挥了突出作用。

气动脱硫塔作为气动脱硫除尘技术的平台装备,烟气在旋流器的作用下,形成具有一定速度的向上的旋转气流,将单元上端注入的吸收液托住反复高速旋切,形成一段动态稳定的气液悬浮层,从而增加气液接触时间,气相与液相的聚散组合往复发生,气动力转换的动能大大地增强了气相到液相的传质能力,远高于一般的喷淋法和托盘法的气液传质时间和强度,能够以较小的液气比达到更高的脱硫效率和除尘效率。该技术对电、袋除尘后烟气中粉尘的二次捕集效率高,可达80%以上。可灵活选择Ca法、Mg法、海水法等多种湿式脱硫工艺。

近年来,烟气超低排放成为火电行业技术和产业热点。航天环境公司抓住机遇,以湿法气动脱硫除尘工艺为核心,建立了自有的“气动脱硫塔+高效除尘除雾器”的烟气超低排放工艺路线。其中大唐国际临汾热电厂烟气超低排放脱硫除尘一体化改造工程,投运期间脱硫塔入口SO₂浓度为5111mg/Nm³时,出口SO₂浓度仅为16.9mg/Nm³;入口粉尘浓度为27.9mg/Nm³时,出口粉尘浓度仅为3.1mg/Nm³。出口SO₂和粉尘的排放浓度均远低于超低排放限值。该技术还可用于石化、冶金等领域,满足不同地区、不同用户对于超低排放的需要。

摘自《中国环境报》

2016-07-26