



响应面法优化黑曲霉固定化条件及其对土壤中溴氰菊酯的降解特性研究

张晓菲, 倪晓菁, 张子仪, 彭博权, 周舒扬, 阮心依, 方幽文, 梁馨月, 周天逸, 王倩, 刘鹏*

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321004

张晓菲, 倪晓菁, 张子仪, 彭博权, 周舒扬, 阮心依, 方幽文, 梁馨月, 周天逸, 王倩, 刘鹏. 响应面法优化黑曲霉固定化条件及其对土壤中溴氰菊酯的降解特性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4574-4593.

ZHANG Xiaofei, NI Xiaojing, ZHANG Ziyi, PENG Boquan, ZHOU Shuyang, RUAN Xinyi, FANG Youwen, LIANG Xinyue, ZHOU Tianyi, WANG Qian, LIU Peng. Optimization of immobilization conditions of *Aspergillus niger* for degrading deltamethrin in soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4574-4593.

摘要: 【目的】通过研究吸附包埋法固定黑曲霉(*Aspergillus niger*)的最佳制备工艺, 初步探讨固定化黑曲霉对溴氰菊酯(deltamethrin, DM)及其中间产物 3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)的降解机制, 并将其应用于农业种植中以评价固定化黑曲霉的实际应用效果。【方法】以生物炭、海藻酸钠为固定化载体, 通过单因素和响应面法对固定化黑曲霉(immobilized *Aspergillus niger*)的制备工艺进行优化。同时, 利用高效液相色谱法分析 DM 和 3-PBA 的含量变化。【结果】海藻酸钠浓度、生物炭浓度和菌液接种量为 DM 去除率的显著影响因子, 当三者分别为 25.27、1.28 和 125.28 g/L 时, 是黑曲霉固定化的最佳制备条件; 在施加固定化黑曲霉后, 土壤中 DM 半衰期由 7.6 d 缩短至 5.2 d, 黑曲霉对 3-PBA 也具有降解作用, 在 21 h 达到最低浓度 1.45 mg/kg; 修复后的土壤可显著提高番茄种子发芽率, 株高、根长等 6 个生长指标较 DM 单独处理组也有不同程度的恢复; 在经固定化黑曲霉修复 28 d 后, 污染土壤根系酶活和微生物数量均得到不同程度改善。【结论】通过对黑曲霉固定化方案的优化, 可显著提高其对土壤中 DM 的去除率; 固定化黑曲霉能加快 DM 降解速度, 对 3-PBA 具有同步降解作用, 且其能增强污染土壤中番茄对 DM 的耐受性。

关键词: 黑曲霉; 溴氰菊酯; 固定化; Plackett-Burman 设计; 响应面法; 半衰期

资助项目: 国家自然科学基金(32001224, 41571049); 2022 年国家级大学生创新创业训练计划项目(202210345025)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32001224, 41571049) and the 2022 National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202210345025).

*Corresponding author. E-mail: sky79@zjnu.cn

Received: 2023-04-12; Accepted: 2023-07-05; Published online: 2023-08-22

Optimization of immobilization conditions of *Aspergillus niger* for degrading deltamethrin in soil

ZHANG Xiaofei, NI Xiaojing, ZHANG Ziyi, PENG Boquan, ZHOU Shuyang, RUAN Xinyi, FANG Youwen, LIANG Xinyue, ZHOU Tianyi, WANG Qian, LIU Peng*

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To optimize the embedding-based immobilization conditions of *Aspergillus niger*, preliminarily study the degradation mechanism of deltamethrin (DM) and its intermediate product 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) by immobilized *A. niger*, and further evaluate the performance of immobilized *A. niger* applied to agricultural cultivation. [Methods] With biochar-doped sodium alginate as an immobilized carrier, we employed single factor test and response surface methodology to optimize the immobilization conditions of *A. niger*. The content of DM and 3-PBA was determined by high performance liquid chromatography. [Results] Sodium alginate concentration, biochar concentration, and inoculum size were significant factors affecting DM removal rate, with the optimal values of 25.27, 1.28, and 125.28 g/L, respectively, for *A. niger* immobilization. After the application of immobilized *A. niger*, the half-life of DM in soil was shortened from 7.6 d to 5.2 d. Moreover, *A. niger* had a degradation effect on 3-PBA, which reached the lowest concentration of 1.45 mg/kg at the time point of 21 h. Impressively, the restoration with *A. niger* immobilization significantly improved the germination rate of tomato seeds, and recovered 6 growth indicators such as plant height and root length to varying degrees compared with the DM alone group. After 28 days of remediation by immobilized *A. niger*, both root enzyme activity and microbial number in the contaminated soil were improved to different degrees. [Conclusion] After optimization of the immobilization scheme of *A. niger*, the removal rate of DM in soil was significantly improved. The immobilization of *A. niger* can not only accelerate the degradation of DM and simultaneously degrade 3-PBA, but also enhance the tolerance of tomato to DM in the contaminated soil.

Keywords: *Aspergillus niger*; cypermethrin; immobilization; Plackett-Burman design; response surface methodology; half-life period

溴氰菊酯(deltamethrin, DM)作为拟除虫菊酯类农药(pyrethroids, PYRs)代表性种类之一^[1], 主要使用于蔬菜种植^[2], 其大规模不合理使用不仅降低了土壤肥力、造成农药残留、破坏生态系统^[3], 还间接威胁生物生存和人类健康^[4]。DM残留在环境介质和生物体内, 已被国内外学者报道了66次^[5]。随着PYRs的大量使用, 其主

要中间产物3-苯氧基苯甲酸(3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA)在土壤、农产品的检出率也越来越高^[6], 其半衰期长达180 d, 较DM更易在环境中积累^[7]。目前常用的DM污染治理方法主要有物理法、化学法、生物法和光降解法^[8], 其中物理法难以从根本上去除污染物^[9], 化学法易造成二次污染^[10], 光降解法不适用于深层

土壤污染物的治理^[11], 而微生物法具有环境适应能力强、无二次污染等优点, 成为国内外生物修复的探讨重点^[2-6]。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)属于曲霉属真菌, 是一类生态友好型工业发酵菌种, 对多种农药有极强的耐受性和分解作用^[12]。近年来, 黑曲霉在修复 PYRs 污染中的作用逐渐成为研究热点, Deng 等^[13]的研究发现, 从中国砖茶中提取出的 *Aspergillus niger* Yat 能有效降解氯氰菊酯、DM, 且 PYRs 对菌株本身生长无显著影响。目前, 国内外相关研究多为直接施加游离菌种, 而游离菌在高毒环境下代谢活性易受损^[14], 且投加位置和用量难以确定。因此, 固定化菌种在农药降解领域的运用更具优势。传统微生物固定化方式包括吸附法、交联法和包埋法^[15]。现常采用 2 种或 2 种以上方法的复合固定化法, 吸附-包埋法作为主要的固定化手段, 可获得单一方法无法达到的性能和处理效果^[16], 当前以生物炭为吸附剂、海藻酸钠为包埋剂的固定化微生物技术已经比较成熟^[17]。

响应面法是使用恰当的试验设计方法进行试验, 将变量与结果进行函数拟合, 进而实现多变量优化的方法^[18]。相较于正交试验对孤立的试验点进行分析, 响应面优化法可以得到连续预测模型, 准确分析拟设置的多水平变量, 是解决复杂问题的有效方法。近来, 响应面法已成功用于微生物固定的优化设计, 如陈显玲等^[19]采用该法探究 5 个因素(戊二醛浓度、CaCl₂ 浓度、海藻酸钠浓度、固定化时间和交联时间)对固定化酶相对酶活的影响, 结果表明, 优化后的固定化条件可大幅度提高菊糖蔗糖酶酶学性质。

目前, 微生物法去除 DM 残留的研究多集中于治理污染水源^[20]、分离筛选可降解微生物^[21]和优化降解的环境条件^[22], 有关固定化黑曲霉

技术修复污染土壤还未见报道。基于上述背景, 本研究着眼于固定化技术, 以改善 DM 污染土壤为目标, 通过响应面法探究固定化黑曲霉对土壤中 DM 特性的变化, 评估固定化黑曲霉对 DM 污染土壤的修复效果及应用潜力, 通过比较番茄种子在修复后土壤中的生长状况, 探明固定化黑曲霉的实际应用效果, 为治理 DM 污染土壤提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种

黑曲霉(*Aspergillus niger*) (保藏编号: ACCC 32589)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 经验证其对 DM 具有降解能力。

1.1.2 土壤样品

试验土样采集于浙江师范大学校内, 该样品未经 DM 等 PYRs 污染。除去植物根、茎、碎石子和多余残渣, 碾碎, 过 1 mm 土壤筛, 风干后 4 °C 保存备用。

1.1.3 供试植物

番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.), 品种为‘中蔬四号’。

1.2 菌株的培养

黑曲霉孢子悬液制备的方法流程参考文献[23]。采用血球计数板测定孢子悬液的浓度(约为 1.6×10^7 CFU/mL), 并以 1% (体积分数)的比例接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基中, 在摇床(35 °C、160 r/min)上培养 7 d, 形成大小均匀的菌丝球, 用于后续黑曲霉固定化试验^[24]。

1.3 DM 污染土壤的制备

取 1 000 g 土壤样品, 加入无菌水至土壤最大持水量的 60%, 加入农药得到浓度为 100.0 mg/kg 的 DM 污染土壤^[25]。

1.4 单因素试验

以 DM 去除率和小球机械强度为指标, 分别考察海藻酸钠浓度(5、10、20、30 和 50 g/L)、生物炭浓度(0.1、0.5、1.0、2.0 和 5.0 g/L)、氯化钙浓度(5、10、20、30 和 50 g/L)、固定化时间(1、2、3、4 和 5 h)、制球器直径(1、2、4、6 和 8 mm)和菌液接种量(20、50、100、150 和 200 g/L)对 DM 去除率的影响。

1.5 土壤中 DM 的测定

采用高效液相色谱法^[26]测定土壤中 DM 的含量, 色谱条件参照文献^[26]。取土样 4 g 于试管中, 加入石油醚:丙酮=3:1 的混合溶液 10 mL, 振荡 1–2 min。在 60 °C 条件下水浴萃取 10 min, 静置后倒出上层溶剂。将无水乙醇和浓硫酸与上层溶剂按 3:1:1 加入试管中进行纯化, 振荡 1–2 min, 静置后上层石油醚相即为待测液。对照 DM 标准曲线, 测定土壤中 DM 的浓度。按照公式(1)计算 DM 的降解率。

$$\text{降解率}(\%) = (c_0 - c_1) / c_0 \times 100 \quad (1)$$

式中: c_0 为降解前 DM 溶液的浓度(mg/kg); c_1 为降解后 DM 溶液的浓度(mg/kg)。

1.6 小球机械强度的测定

随机选取大小形状相近的 15 粒固定化黑曲霉, 使用 KY-20 数显颗粒强度测定仪对其施加压力, 直至其发生不可逆形变^[27]。读取其临界承受压力表示机械强度, 做 3 次平行试验。

1.7 菌株的固定化

采用吸附-包埋法对黑曲霉进行固定化, 以生物炭为吸附剂、海藻酸钠为包埋剂, 在无菌环境下完成操作全过程。首先, 将一定比例的黑曲霉菌丝球、生物炭和海藻酸钠在 500 mL 的烧杯中混合搅拌均匀, 制球器置于距氯化钙(CaCl_2)溶液液面 10 cm 左右, 将混合液匀速滴入 CaCl_2 溶液中, 滴加过程在磁力搅拌器上完成。24 h 后将固定好的黑曲霉小球过滤, 使用

蒸馏水清洗 2–3 次, 用洁净的滤纸吸去水分, 保存于 4 °C 冰箱备用。

1.8 响应面法优化

1.8.1 Plackett-Burman (PB) 试验设计

根据单因素试验结果, 采用 Plackett-Burman 两水平法^[28], 确定影响 DM 去除率的显著因素。以 DM 去除率为响应值, 将影响黑曲霉固定化的 6 个因素(CaCl_2 浓度、海藻酸钠浓度、生物炭浓度、菌液接种量、制球器直径和固定化时间)作为 PB 试验的 6 个因子(A、B、C、D、E、F), 并设置 3 个虚拟项(G、H、I)作误差分析, 每组均重复 3 次取平均值。

1.8.2 最陡爬坡试验与 Box-Behnken (BB) 试验设计

根据 PB 试验结果, 以各显著影响因子为中心起点, 确定最陡爬坡试验的方向与步长, 将其余因子设定为单因素试验得到的最佳条件, 以此找到响应面试验的中心点。根据最陡爬坡试验确定的中心点, 通过 Box-Behnken 中心组合设计^[29], 针对显著影响因子进行三因素三水平试验设计, 以 DM 去除率为响应值, 绘制响应曲面, 确定最佳黑曲霉固定化条件并验证。

1.9 固定化黑曲霉对土壤中 DM 的降解特性

最佳黑曲霉固定化方案确定后, 设计 4 个处理组: CK (空白对照, 无 DM); T1 (100.00 mg/kg DM); T2 (100.00 mg/kg DM+20.00 g/kg 游离黑曲霉); T3 (100.00 mg/kg DM+20.00 g/kg 固定化黑曲霉)。每组设置 3 个重复, 分别于处理后 2 h 及 1、3、7、14、21 和 28 d 采集土样, 测定 T1、T2 和 T3 土壤中 DM 和其代谢产物 3-PBA 的浓度, DM 浓度测定试验方法与 1.5 相同。

1.10 土壤中 3-PBA 的测定

取土样 4 g 于试管中, 加入 30 mL 乙腈, 40 kHz、300 W 超声提取 30 min, 取 2.0 mL 提取液用乙腈定容至 10 mL, 混匀, 通过 18 900×g 离

心 10 min。上清液用有机相滤膜(0.45 μm)过滤, 弃去初滤液, 取续滤液用于高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 检测^[30], 色谱条件参照文献[30]。

1.11 番茄生长状况的测定

分别于 4 个处理组中播种番茄种子, 每组 10 颗, 置于直径 20 cm 的圆形花盆中, 于培养箱中(25 $^{\circ}\text{C}$, 光照 80%, 相对湿度 90%)培养 28 d 后, 测定番茄幼苗的各项生长指标(株高、根长、干重和鲜重)。

1.12 土壤中酶活和微生物数量的测定

种植盆栽 7、14、21 和 28 d 后, 分别测定蔗糖酶(invertase, INV)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、脲酶(urease, URE)活性和真菌、细菌、放线菌的数量。蔗糖酶活性采用硫代硫酸钠滴定法^[31]测定, 过氧化氢酶活性采用 KMnO_4 容量法^[32]测定, 脲酶活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法^[33]测定。利用孟加拉红培养基法^[34]、牛肉膏蛋白胨法^[35]和高氏一号培养基法^[36]分别测定真菌、细菌和放线菌的数量。

1.13 数据分析

采用 SPSS 21.0 对试验数据进行统计分析, 通过单因素方差分析法和 Duncan 法计算平均值和标准误, 利用 *t*-test 检测显著性差异。使用 Origin 8.5 制图, 并利用 Design Expert 8.0.6 进行响应面分析绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素对 DM 去除率和小球机械强度的影响

2.1.1 海藻酸钠浓度的影响

海藻酸钠浓度是影响固定化黑曲霉机械强度的主要因素, 由图 1A 可知, 小球机械强度随着海藻酸钠浓度的增加显著增强($P=0.0082$), 且当浓度为 50 g/L 时, 机械强度最高达 2 260 mN。

而 DM 去除率随海藻酸钠浓度的增加, 呈现先升高后降低的趋势, 当浓度为 20 g/L 时, DM 去除率达到峰值 59.98%, 此时机械强度为 1 540 mN。由于海藻酸钠浓度影响载体成型, 浓度过高会导致固定化黑曲霉形成不规则的蝌蚪状颗粒, 易造成尾部断裂和菌液泄露。因此, 综合 DM 去除率和小球成型情况, 选择海藻酸钠浓度为 20 g/L 作为其最佳浓度。

2.1.2 生物炭浓度的影响

由图 1B 可知, 生物炭浓度对固定化黑曲霉的机械强度及 DM 去除率均有较大影响。当生物炭浓度为 1.0 g/L 时, DM 去除率达到最高 62.53%, 此时机械强度为 1 258 mN。而当生物炭浓度超过 2.0 g/L 时, 机械强度增长趋势减缓。生物炭可为微生物的生理活动提供良好的环境条件, 在一定浓度范围内能提高固定化黑曲霉的 DM 去除率; 而浓度过高则导致菌液扩散不均匀, 形成的固定化黑曲霉颗粒大小不一。综上所述, 选择 1.0 g/L 作为生物炭的最佳浓度。

2.1.3 氯化钙浓度的影响

图 1C 表示氯化钙浓度对固定化黑曲霉的机械强度和 DM 去除率的影响, 分析可知该因素的影响趋势与生物炭近似。当氯化钙浓度为 20 g/L 时, 固定化黑曲霉的 DM 去除率最高, 达 63.50%, 此时机械强度为 1 238 mN。氯化钙作为交联剂能影响固定化小球的机械强度, 浓度过高时机械强度过大, 导致菌株不易进入; 浓度过低则易导致颗粒破裂及菌液流失。因此, 选择氯化钙浓度为 20 g/L 作为其最佳浓度。

2.1.4 固定化时间的影响

固定化时间对小球机械强度和 DM 去除率的影响如图 1D 所示。当固定化时间为 2 h 时, DM 去除率达到最高点 73.20%, 此时机械强度

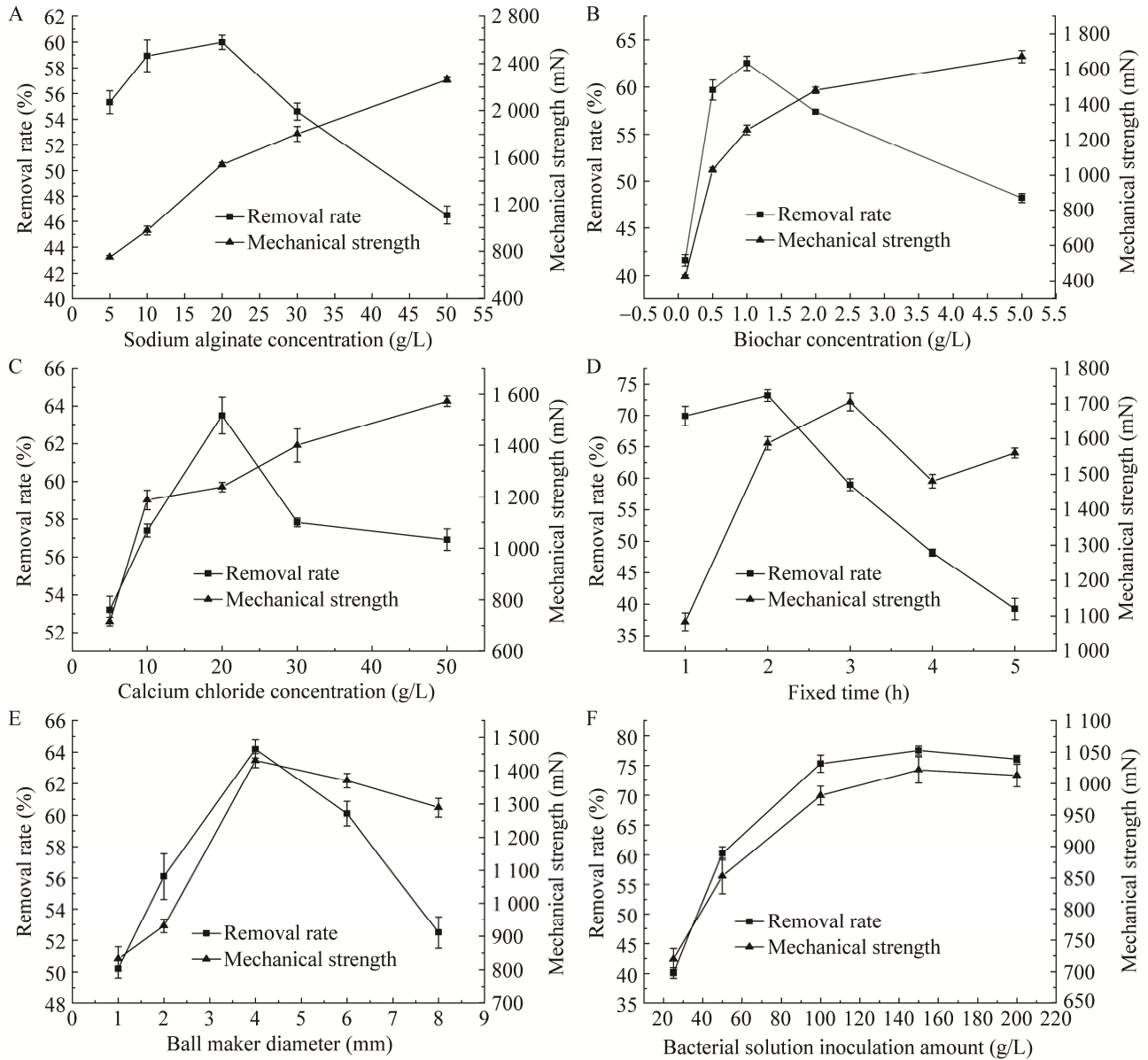


图 1 海藻酸钠浓度(A)、生物炭浓度(B)、氯化钙浓度(C)、固定化时间(D)、制球器直径(E)和菌液接种量(F)对 DM 去除率和小球机械强度的影响

Figure 1 Effect of sodium alginate concentration (A), biochar concentration (B), calcium chloride concentration (C), immobilization time (D), ball maker diameter (E), and bacterial inoculum (F) on the DM removal rate and the mechanical strength of the pellets. Error bars in figure represent standard deviation.

为 1 587 mN。而当固定化时间延长至 3、4 和 5 h 时, DM 去除率分别下降 14.21%、34.29% 和 48.09%。说明固定化时间过长会导致交联过度, 固定化颗粒内部孔径小, 菌株生存空间不足, 从而使黑曲霉的生理活动受到抑制。综合

DM 去除率和小球成型情况, 选择 2 h 为最佳固定化时间。

2.1.5 制球器直径的影响

分析图 1E 可得, 当制球器直径小于 4 mm 时, DM 去除率和固定化黑曲霉的机械强度均

随着直径的增大而提高,在 4 mm 条件下达到峰值,DM 去除率为 64.20%,小球机械强度为 1 430 mN。而随着制球器直径的继续增加,2 个指标均呈降低趋势。该结果与固定化黑曲霉的结构有关:直径过小,可结合的菌株数量不足;直径过大,则使固定化颗粒易破裂,同时内部菌株无法获取足够的营养,生理活动受到抑制。因此,选择 4 mm 直径的制球器用于后续试验。

2.1.6 菌液接种量的影响

由图 1F 可知,DM 去除率随着菌液接种量的增大而逐渐升高,而在菌液接种量提升至 100 g/L 后,DM 去除率的上升幅度减小。说明菌液接种量过大时,菌株间竞争营养和生存空间,产生抑制作用使 DM 去除率降低。此外,当菌液接种量为 150 g/L 和 200 g/L 时,固定化黑曲霉在液体培养基中出现破裂情况,载体碎屑沉于容器底部。因此,综合考虑 DM 去除率和固定化黑曲霉的机械强度,选择菌液接种量为 100 g/L 进行后续优化试验。

2.2 最佳固定化黑曲霉组合的确定

2.2.1 Plackett-Burman 试验结果

基于单因素试验结果,以氯化钙浓度(A)、海藻酸钠浓度(B)、生物炭浓度(C)、菌液接种量(D)、制球器直径(E)和固定化时间(F)为影响因子,试验因素水平设计见表 1。

表 1 Plackett-Burman 试验因素设计
Table 1 Plackett-Burman experimental factor

No.	Factor	Level	
		-1	1
A	Calcium chloride concentration (g/L)	20	30
B	Sodium alginate concentration (g/L)	20	30
C	Biochar concentration (g/L)	1.0	1.5
D	Bacterial solution inoculation amount (g/L)	100	150
E	Ball maker diameter (mm)	4	6
F	Fixed time (h)	2	3

PB 试验以 DM 去除率为响应值,旨在确定对 DM 去除率提高影响显著的因子,试验方案和结果见表 2,方差分析结果见表 3。各因素与去除率(Y)的多元回归方程为: $Y=63.74+0.13A+5.04B+3.66C+2.03D+0.77E-0.99F$,该模型 $P=0.0021$,说明回归方程显著;模型决定系数 $R^2=0.9620$,校正决定系数 $R_{adj}^2=0.9165$,证实模型的拟合度高,能对 PB 试验进行解释。在 $\alpha=0.05$ 显著水平上,固定化黑曲霉降解 DM 过程时,因素 B、C 的 P 值分别为 0.0004 和 0.0016 ($P<0.01$),差异极显著;而因素 D 的 P 值为 0.0187 ($P<0.05$),差异显著;因素 A、E、F 的 P 值大于 0.05,差异不显著。因而确定海藻酸钠浓度(B)、生物炭浓度(C)、菌液接种量(D)为显著因子,并设计 3 个因素的步长和方向,进行后续爬坡试验。

2.2.2 最陡爬坡试验结果

分析 PB 试验得到的多元一次方程可知,因素 B、C、D 在方程中的系数为正,表明其在模型中为正效应。根据经验总结,确定因素 B 的步长为 5 g/L,再通过效应值计算出因素 C、

表 2 Plackett-Burman 设计试验结果

Table 2 Plackett-Burman experimental designs										
No.	A	B	C	D	E	F	G	H	J	Removal rate (%)
1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	76.28
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	69.92
3	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	54.91
4	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	69.34
5	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	56.02
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	52.42
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	60.21
8	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	67.95
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	66.87
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	60.71
11	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	67.29
12	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	62.94

表 3 Plackett-Burman 试验结果方差分析表

Table 3 Analysis of variance for Plackett-Burman test results

Code	Factor	Effect	Sum of squares	Mean square	F level	P level	Significance
	Model		533.85	88.98	21.12	0.002 1	
A	Calcium chloride concentration (g/L)	0.13	0.21	0.21	0.05	0.832 9	
B	Sodium alginate concentration (g/L)	5.04	304.21	304.21	72.21	0.000 4	**
C	Biochar concentration (g/L)	3.66	161.04	161.04	38.22	0.001 6	**
D	Bacterial solution inoculation amount (g/L)	2.03	49.53	49.53	11.76	0.018 7	*
E	Ball maker diameter (mm)	0.77	7.18	7.18	1.70	0.248 7	
F	Fixed time (h)	-0.99	11.68	11.68	2.77	0.156 8	

*: Significant influence ($P<0.05$); **: Extremely significant influence ($P<0.01$).

D 的步长分别为 0.22 g/L 和 12.1 g/L, 最陡爬坡试验的设计和结果分析如表 4 所示, 试验 2 的去除率最高, 达到 75.31%。因此, 以试验 2 的方案作为响应面试验的中心点。

2.2.3 Box-Behnken (BB)中心组合设计及响应面分析

以最陡爬坡试验确定的响应面试验的中心点, 利用中心组合试验设计了三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 试验设计和各因素水平见表 5, DM 去除率的 BB 试验设计及结果见表 6, 以 DM 去除率(Y)为因变量, 海藻酸钠浓度(A)、生物炭浓度(B)和液接种量(C)为自变量, 拟合得到非线性回归方程: $Y=86.22+0.92A+3.06B+0.27C+0.70AB-1.02AC-0.22BC-9.04A^2-13.07B^2-8.07C^2$ 。

其中 15 号试验组的去除率最高, 其条件为海藻酸钠 25 g/L、生物炭 1.25 g/L、菌液接种量 125 g/L, 试验达到最高值 89.20%; 试验组 6号海藻酸钠 30 g/L、生物炭 1.25 g/L、菌液接种量 100 g/L 的 DM 去除率较高, 达到 70.84%。而 1 号试验组海藻酸钠 20 g/L、生物炭 1.00 g/L、菌液接种量 125 g/L, 去除率为 60.20%, 为所有试验组中的最小值。

BB 试验方差分析结果见表 7, 模型决定系数 $R^2=0.939 2$, 说明可由该回归模型对 DM 去除率进行解释的概率为 93.92%, 可信度高; 模型的 F 值为 12.01, P 值(Prob>F)为 0.17%, 远低于 0.01, 意味着该模型项极显著。其中 A^2 、 B^2 和 C^2 的模型都具有显著性, 失拟项 P 值为 0.882 9, 远高于 0.05, 不显著, 说明回归方程模

表 4 最陡爬坡试验设计及结果分析表

Table 4 Design and analysis of the results of the steepest climb test

No.	Sodium alginate concentration (g/L)	Biochar concentration (g/L)	Bacterial solution inoculation amount (g/L)	Removal rate (%)
1	20	1.00	100.0	63.27
2	25	1.22	112.1	75.31
3	30	1.44	124.2	56.89
4	35	1.66	136.3	35.69
5	40	1.88	148.4	24.56

表 5 Box-Behnken 试验因素设计

Table 5 Box-Behnken experimental factor

No.	Factor	Level		
		-1	0	1
A	Sodium alginate concentration (g/L)	20.00	25.00	30.00
B	Biochar concentration (g/L)	1.00	1.25	1.50
C	Bacterial solution inoculation amount (g/L)	100.00	125.00	150.00

表 6 Box-Behnken 中心组合设计的 3 个自变量得到的试验值

Table 6 Box-Behnken design for the four independent variables with the observed response for luminescent production

No.	The level of the variable encoded			True variable levels			Removal rate (%)
	A: Sodium alginate concentration	B: Biochar concentration	C: Bacterial solution inoculation amount	A: Sodium alginate concentration	B: Biochar concentration	C: Bacterial solution inoculation amount	Experimental value
1	-1	-1	0	20	1.00	125	60.20
2	1	-1	0	30	1.00	125	62.42
3	-1	1	0	20	1.50	125	64.40
4	1	1	0	30	1.50	125	69.42
5	-1	0	-1	20	1.25	100	68.73
6	1	0	-1	30	1.25	100	70.84
7	-1	0	1	20	1.25	150	69.42
8	1	0	1	30	1.25	150	67.45
9	0	-1	-1	25	1.00	100	60.32
10	0	1	-1	25	1.50	100	67.40
11	0	-1	1	25	1.00	150	63.20
12	0	1	1	25	1.50	150	69.40
13	0	0	0	25	1.25	125	77.90
14	0	0	0	25	1.25	125	88.30
15	0	0	0	25	1.25	125	89.20
16	0	0	0	25	1.25	125	87.60
17	0	0	0	25	1.25	125	88.10

表 7 以去除率为响应值的模型方差分析表

Table 7 Model analysis with removal rate as the response value

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squared	F-value	P-value (Prob>F)	Significance
Model	1 573.63	9	174.85	12.01	0.001 7	*
A	6.81	1	6.81	0.47	0.516 0	
B	74.91	1	74.91	5.15	0.057 6	
C	0.59	1	0.59	0.04	0.845 6	
AB	1.96	1	1.96	0.13	0.724 5	
AC	4.16	1	4.16	0.29	0.609 4	
BC	0.19	1	0.19	0.01	0.911 4	
A ²	344.09	1	344.09	23.64	0.001 8	**
B ²	719.26	1	719.26	49.41	0.000 2	**
C ²	274.21	1	274.21	18.84	0.003 4	**
Residuals	101.89	7	14.56			
Misfit	14.02	3	4.67	0.21	0.882 9	
Pure error	87.87	4	21.97			
Total regression	1 675.52	16				

*: Significant influence ($P < 0.05$); **: Extremely significant influence ($P < 0.01$).

拟较好, 模型稳定。同时, 由于 $R^2_{Adj}-R^2_{Pred}=0.861\ 0-0.784\ 1=0.076\ 9 (<0.2)$, 且 $R^2 (0.939\ 2)$ 和 $R^2_{Adj} (0.861\ 0)$ 接近 1, 即该模型的预测值与试验值高度吻合; 变异系数为 5.30%, 小于 10%, 证实回归模型具有较高的准确性和精密性。根据各因素 P 值大小, 二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对 DM 去除率的影响极显著 $P<0.01$ 。依据 F 值, 将 3 个因素对 DM 去除率的影响大小进行排序, 影响顺序为: 生物炭浓度>海藻酸钠浓度>菌液接种量。

各因素之间回归优化的等高线图如图 2 所示, 响应坡面的陡峭程度, 可说明该因素保持稳定水平时, 对其余 2 个因素的交互作用的影响大小。结果显示, 海藻酸钠和生物炭的响应曲面弧度最大, 二者对固定化小球降解土壤 DM 影响最为显著。图 2A 为生物炭浓度处于中心水平即 1.25 g/L 时, 海藻酸钠浓度和菌液接种量之间的交互作用, 说明去除率随着海藻酸钠浓度和菌液接种量浓度的提高先增加后降低。图 2B 为菌液接种量处于中心水平即 125 g/L 时, 海藻酸钠浓度和生物炭浓度之间的交互作用, 表明去除率随着海藻酸钠浓度和生物炭浓度的提高先增加后降低, 且其等高线形状最接近椭圆, 两者交互作用最显著。图 2C 为海藻酸钠浓度处于中心水平即 25 g/L 时, 菌液接种量和生物炭浓度之间的交互作用, 体现了去除率随着菌液接种量和生物炭浓度的提高先增加后降低, 等高线形状最不接近椭圆, 两者交互作用不显著。在海藻酸钠浓度为 25 g/L、菌液接种量为 125 g/L 时、生物炭浓度为 1.25–2.00 g/L 条件下, DM 去除率可超过 75.00%。当生物炭浓度小于 1.25 g/L 时, DM 去除率皆小于 70.00%。

分析三维响应面和等高线图, 同时运用中心组合设计, 可得固定化黑曲霉最佳方案: 海

藻酸钠浓度 25.27 g/L、生物炭浓度 1.28 g/L、菌液接种量 125.28 g/L。在黑曲霉最优值组合下, DM 的去除率达到 86.43%, 与预测值吻合度高。为了验证响应面设计结果的可靠性, 在预测的最优固定黑曲霉组合条件下, 进行 DM 污染土壤修复, 同时以初步组合修复结果作为对照, 结果显示, 在最优条件下 DM 的平均去除率为 $84.31\%\pm 2.17\%$, 比优化前的 $37.52\%\pm 3.95\%$, 提高 1.24 倍。上述试验结果表明, 回归方程比较准确地预测了三因素对 DM 去除效果的影响。

2.3 最佳黑曲霉固定化条件对 DM 污染土壤修复效果评价

2.3.1 固定化黑曲霉对 DM 降解动态的影响

数据统计分析结果见表 8、表 9, 在无黑曲霉施用, DM 在土壤中自行消解, 拟合降解方程可知其在土壤中的半衰期为 7.6 d。在施加游离黑曲霉后, DM 降解速度提升, 在第 21 天降解率可达 90% 以上, DM 半衰期缩减到 6.2 d。T3 组将固定化黑曲霉以先前得出的最佳方案施用, 在 14 d 降解率已达 90%, 28 d 降解率高达 98.02%, 半衰期为 5.2 d。数据表明, 黑曲霉可以显著缩短 DM 在土壤中的半衰期, 提升污染土壤的修复效率, 在最佳固定化黑曲霉方案下降解时间最短, 较游离黑曲霉效果更佳。

2.3.2 固定化黑曲霉对 DM 主要代谢产物的影响

3-PBA 是 DM 主要代谢产物, 是最常见的 PYRs 暴露生物标志物。从图 3 数据可知, 在加入 DM 后, 随胁迫时间的延长, 土壤中 3-PBA 浓度呈稳步上升趋势。在 14 d 前, 3-PBA 浓度随 DM 的自然降解增幅较大, 在 21 d 和 28 d 时, 增幅逐渐减缓, 浓度趋于稳定。加入黑曲霉修复后, T2 和 T3 中 3-PBA 浓度均呈先增加后降低的趋势, 以 9 h 为分界。由于黑曲霉能加快 DM 降解, T3 组中 3-PBA 浓度显著增加 ($P<0.05$), 在 9 h 达到最高, 为 50.93 mg/kg,

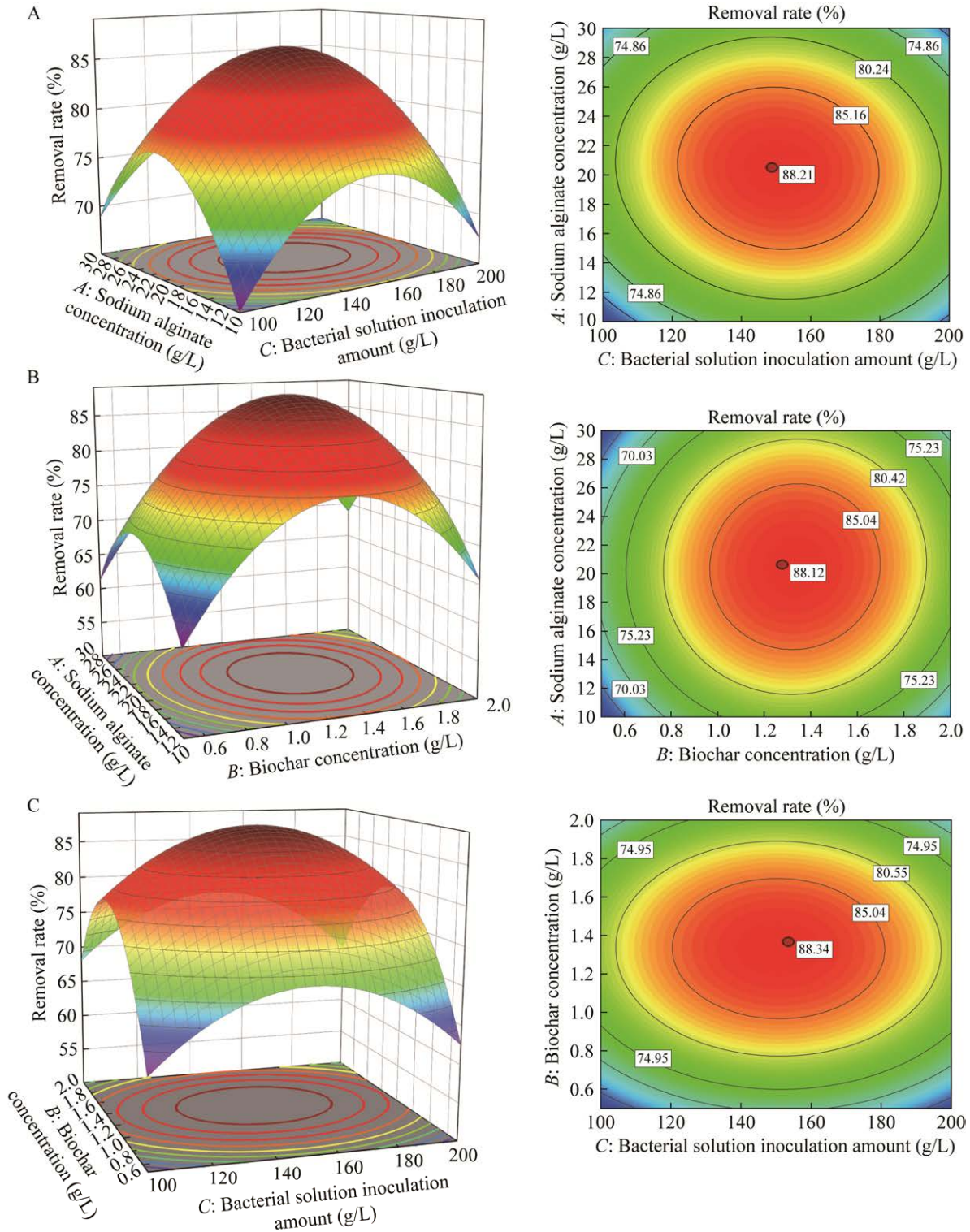


图 2 固定化黑曲霉制备条件响应面优化三维图及等高线图

Figure 2 Optimized 3D plot and contour plot of the prepared conditional response surface of *Aspergillus niger*. A: Sodium alginate concentration and bacterial solution inoculation amount. B: Sodium alginate concentration and biochar concentration. C: Biochar concentration and bacterial solution inoculation amount.

表 8 不同处理组 DM 在土壤中的降解动态测定结果

Table 8 Dynamic determination of DM in soil in different treatment groups

Sampling interval		2 h	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
DM residue (mg/kg)	T1	99.53±0.76a	65.76±0.34a	50.66±1.23a	38.19±1.04a	22.14±0.76a	11.94±0.12a	6.34±0.15a
	T2	97.25±1.87b	60.48±1.73b	47.57±0.96b	35.35±0.65b	19.76±0.85b	9.05±0.43b	4.23±0.12b
	T3	90.39±2.01c	52.17±1.42c	41.28±1.08c	18.04±0.87c	8.61±0.21c	3.94±0.26c	1.79±0.19c
DM degradation rate (%)	T1	–	33.80±0.34c	49.00±1.24c	61.55±1.04c	77.71±0.76b	87.98±0.12c	93.62±0.15c
	T2	–	37.81±1.90b	51.08±0.99b	63.65±0.66b	79.68±0.87b	90.69±0.44b	95.65±0.12b
	T3	–	42.28±1.57a	54.33±1.19a	80.04±0.96a	90.47±0.23a	95.64±0.29a	98.02±0.21a

The data in the table are mean±standard error, and the same letter after the same column of data indicates no significant difference at the $P<0.05$ level.

表 9 不同处理组 DM 在土壤中的降解动态方程
Table 9 Dynamic equation for degradation of DM in soil for different treatment groups

Treatment group	Digestion equations	Correlation coefficient	Half-life (d)
T1	$y=78.684e^{-0.091x}$	0.975 9	7.6a
T2	$y=79.651e^{-0.111x}$	0.981 1	6.2b
T3	$y=64.236e^{-0.133x}$	0.970 6	5.2c

The data in the table are mean±standard error, and the same letter after the same column of data indicates no significant difference at the $P<0.05$ level.

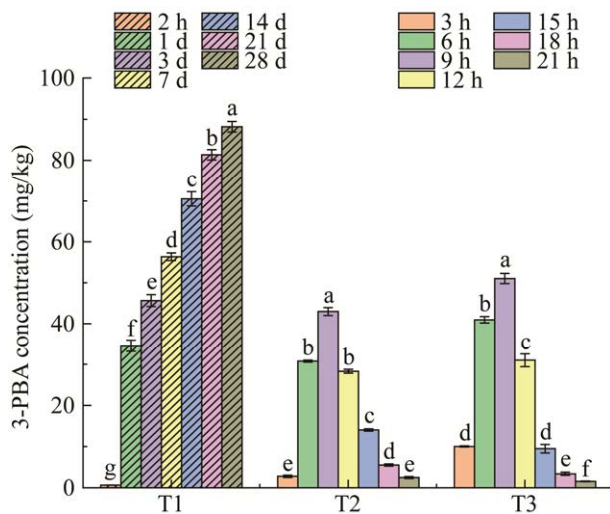


图 3 不同处理组 3-PBA 浓度统计图

Figure 3 Statistical plots of 3-PBA concentration in the different treatment groups. Error bars in figure represent standard deviation. Different lowercase letters indicate significant difference at the $P<0.05$ level.

随后浓度显著降低, 降幅逐渐减缓, 在 21 h 达到最低水平为 1.45 mg/kg。由此可得, 本研究所用黑曲霉对 3-PBA 也具有降解作用, 固定化黑曲霉可以显著加快污染土壤中 DM 降解速度, 大幅度提升修复效果。

此外, T2 最高浓度为 42.86 mg/kg, 最低浓度为 2.37 mg/kg, 可以看出固定化黑曲霉对 DM 污染修复效果和 3-PBA 降解能力优于游离型黑曲霉。

2.4 固定化黑曲霉的应用潜力评价

2.4.1 固定化黑曲霉对番茄生长状况的影响

在优化了黑曲霉的固定化条件之后, 将其应用于农业种植中, 测定番茄的生长指标, 以考察固定化黑曲霉的实际使用效果。如表 10 所示, CK 组番茄种子的各项指标均优于其他组, 发芽率和发芽势分别高达 81.63% 和 47.85%, 而经 DM 处理后的 T1、T2 和 T3 组的发芽率分别为 60.78%、70.15% 和 73.94%, 相比于 CK 组都有了一定程度的降低。各组番茄种子萌发和生长状况受抑制程度排序为: T1 组>T2 组>T3 组>CK 组。经过生物修复后的 DM 土壤对番茄仍具有一定毒性, T2、T3 组的根系活力分别为(63.920 0±2.241 9) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{g})$ 和(69.240 0±2.124 0) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 皆低于 CK 组的(79.770 0±2.174 0) $\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{g})$ 。经固定化黑曲霉

修复后的根冠比为 0.2746 ± 0.0106 ，高于未经 DM 处理的 CK 组 0.1394 ± 0.0055 。

2.4.2 固定化黑曲霉对土壤生物群落结构的影响

在最佳土壤环境条件下，由图 4 可以看出，处理 7 d 后 T1、T2 和 T3 根系土壤过氧化氢酶活性下降显著 ($P < 0.05$)，分别为 CK 的 47.14%、38.30% 和 21.29%；脲酶活性较 CK 组分别提高了 123.21%、73.21% 和 37.50%；蔗糖酶活性分别增强为 CK 的 1.80、1.60 和 1.10 倍，达到显著水平 ($P < 0.05$)。DM 的加入使土壤 CAT 活性大幅降低、氧化程度更低，对植株危害明显，而经黑曲霉降解处理后，过氧化氢酶活性均有了部分提升，其中 T3 相较 T1 恢复 50.24%。对比

CK 组，T1、T2 和 T3 的根系土壤蔗糖酶含量在 24 d 内均有所增加，T3 最高达 $0.7967 \text{ mg}/(\text{h} \cdot \text{g})$ ，证明植株通过脲酶加快对土壤中尿素的分解，抵御 DM 胁迫。

在经黑曲霉修复后，土壤 CAT、URE 和 INV 活性得到不同程度恢复，T3 最高分别提升为 34.30%、15.76% 和 31.15%，效果较 T2 更优，证实固定化形式对黑曲霉的保护作用更好，可缓解外界环境对微生物的不利影响，提高耐受性，延长使用寿命。

细菌、放线菌、真菌是土壤生态系统微生物体系的主要成分，几乎参与土壤中一切生物化学反应，是土壤质量的重要组成指标。由图 5 可以看出，污染后 7 d 土壤中细菌、真菌和放

表 10 不同处理组中番茄相关生长指标统计

Table 10 Statistics of tomato-related growth indexes in different treatment groups

Treatment group	Germination tendency		Plant height (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Root-to-head ratio	Root vitality ($\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{g})$)
	Germination rate (%)	Sprouting potential (%)						
CK	81.63	47.85	$5.26 \pm 0.36\text{a}$	$2.58 \pm 0.47\text{b}$	$0.83 \pm 0.01\text{b}$	$0.0592 \pm 0.0015\text{b}$	$0.1394 \pm 0.0055\text{b}$	$79.77 \pm 2.17\text{a}$
T1	60.78	40.01	$4.80 \pm 0.55\text{a}$	$2.65 \pm 0.40\text{b}$	$0.77 \pm 0.02\text{b}$	$0.0487 \pm 0.0046\text{b}$	$0.1201 \pm 0.0025\text{b}$	$57.63 \pm 1.66\text{c}$
T2	70.15	33.38	$5.10 \pm 0.31\text{a}$	$2.35 \pm 0.18\text{b}$	$0.54 \pm 0.02\text{c}$	$0.0295 \pm 0.0064\text{b}$	$0.1120 \pm 0.0067\text{b}$	$63.92 \pm 2.24\text{b}$
T3	73.94	47.37	$5.55 \pm 0.40\text{a}$	$4.99 \pm 0.67\text{a}$	$1.24 \pm 0.02\text{a}$	$0.0849 \pm 0.0059\text{a}$	$0.2746 \pm 0.0106\text{a}$	$69.24 \pm 2.12\text{b}$

The data in the table are mean \pm standard error, and the same letter after the same column of data indicates no significant difference at the $P < 0.05$ level.

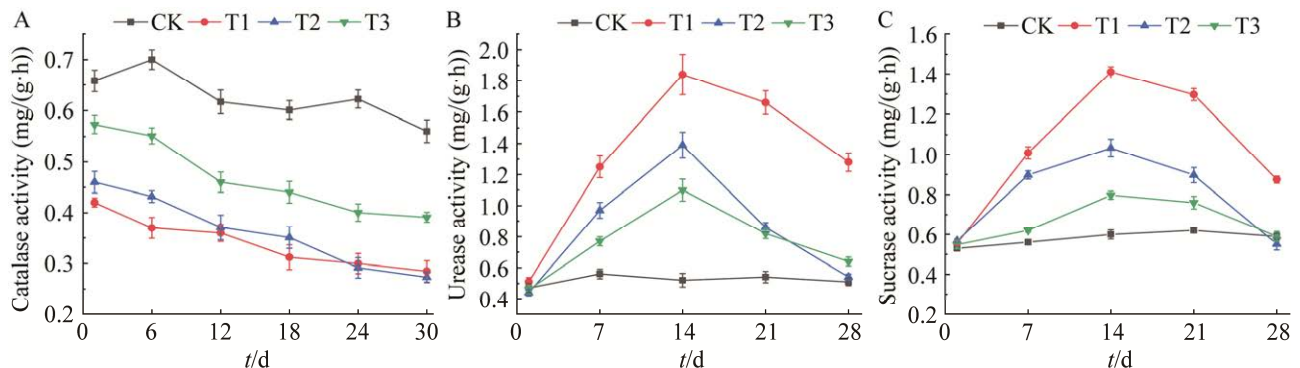


图 4 土壤酶活性测定统计图

Figure 4 Statistical diagram of soil enzyme activity determination. A: Catalase activity. B: Urease activity. C: Sucrase activity. Error bars in figure represent standard deviation.

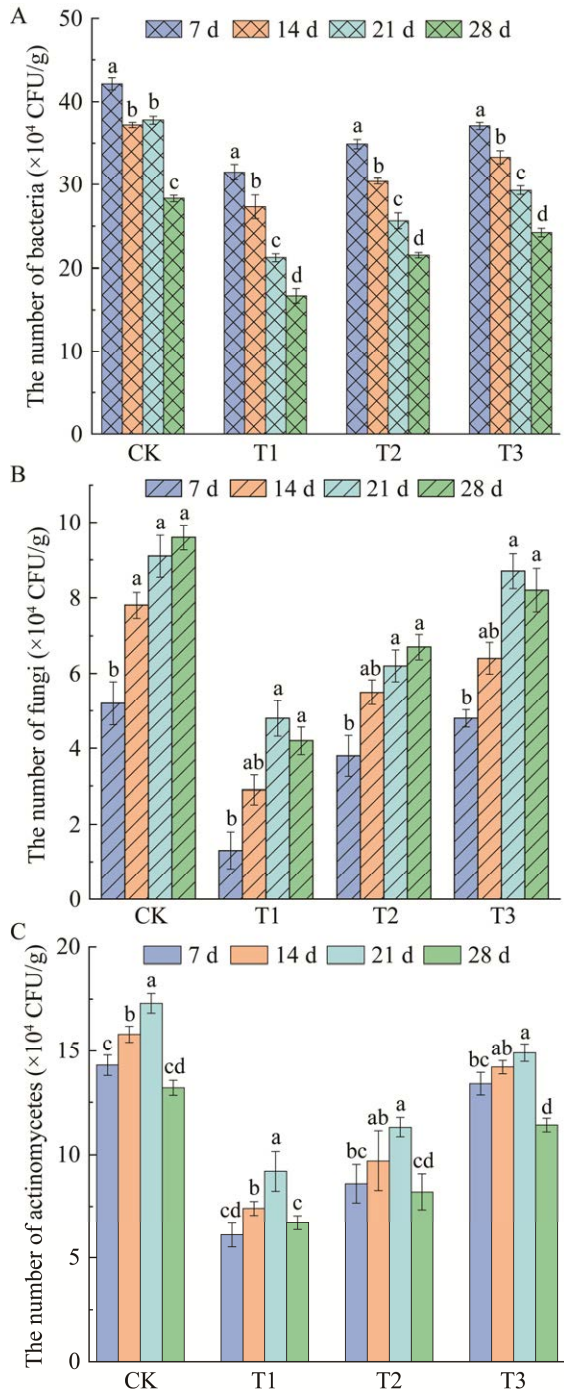


图 5 土壤中细菌(A)、真菌(B)和放线菌(C)数量统计图

Figure 5 Statistical diagram of the number of bacteria (A), fungi (B), and actinomycetes (C) in the soil. Error bars in figure represent standard deviation. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$.

线菌数量分别下降 25.18%、75.04%和 57.34%。而施用黑曲霉 28 d 后, 3 种微生物数量均有所回升, 其中 T3 组细菌、真菌和放线菌数量分别达到 CK 的 85.51%、85.42%和 86.36%, 对比 2 种施加方式, 发现固定化黑曲霉较游离黑曲霉改善效果更佳 ($P < 0.05$); T3 组真菌数量时 T1 组的 1.95 倍。针对细菌而言, 其数量随着时间的变化而减少, 且 CK 组的数量较稳定。通过观察比较放线菌变化趋势可知, 14 d 时正常土壤中放线菌的数量约为 15.80×10^5 CFU/g; 在添加 DM 的 T1 组中放线菌数量大幅降低, 菌落数为 7.40×10^5 CFU/g; 在经过固定化黑曲霉处理土壤后, 放线菌数量有明显的回升, 可达 14.20×10^5 CFU/g。相较 T1 组发现, 经黑曲霉修复后土壤微生物数量皆有适当回升, 其中真菌数量的恢复最显著, 14 d 效果最佳, 可达正常值的 95.60%; 且固定化黑曲霉修复效果明显优于游离组, 使三大类群的微生物数量更接近 CK。

3 讨论

DM 是 PYRs 中使用最广泛的一种, 主要在农业生产中用于防治病虫害, 长期使用 DM 容易积累, 对生物造成免疫、神经和生殖毒害^[37]。微生物法能够在温和的条件下高效地降解 PYRs, 因而被认为是一种绿色解决方案^[38], 如张靖雯等^[39]筛选得到暹罗芽胞杆菌(*Bacillus siamensis*) L5 降解菌, 通过固定化后对高效氯氰菊酯的降解率高达 81.26%。目前, 对固定化黑曲霉的研究方向多为修复污染废水^[40-42], 而应用于农药残留土壤的报道较少, 本研究以 DM 污染土壤为切入点, 挖掘固定化黑曲霉的潜在价值。现有报道大多利用海藻酸盐对黑曲霉进行固定, 如 Ding 等^[40]用海藻酸盐固定黑曲霉用于废水中钼离子的去除, 目前该技术已比较成熟。此

外, 有相关研究证实生物炭^[43]、氯化钙^[44]、固定化时间^[45]、包埋颗粒直径^[46]和菌液接种量^[42]等因素对黑曲霉固定化存在影响。本研究首次将 6 因素进行联合对比, 并从中确定出 3 个显著因子: 海藻酸钠浓度、生物炭浓度和菌液接种量。海藻酸钠能够在黑曲霉表面形成一层凝胶保护膜^[47], 保障高微生物密度^[48]和低生物毒性^[49]。生物炭表面积大、孔隙结构丰富, 可增强富集污染物能力, 从而提高去除效率^[50]。本研究利用生物炭和海藻酸钠对黑曲霉进行固定化, 在 1.28 g/L 的生物炭浓度下, DM 降解率高达 84.31%, 较优化前提高 1.24 倍, 生物炭表面相对疏松且不规则的凸起和褶皱为 DM 分子提供广阔的吸附位点^[51], 这与 Ogbonnaya 等^[52]得出生物炭有利于疏水有机污染物及其降解微生物吸附的结论相符, 可见生物炭固定化微生物的明显优势。此外, 随固定化黑曲霉菌液用量增多, DM 去除效果越好, 但当菌液接种量高于 100 g/L 时, 去除率增幅减缓。这是由于接种量提高, 黑曲霉菌体间的生存竞争剧增、加速溶胀, 致使固定化小球破裂、性能下降, 于波^[20]也发现同样现象。利用响应面优化法评估 3 个显著因子之间的关系, 可得固定化黑曲霉最佳方案: 海藻酸钠浓度 25.27 g/L、生物炭浓度 1.28 g/L、菌液接种量 125.28 g/L, 在此条件下 DM 的去除率可达 84.31%, 对于农残的生物修复具有推广意义。

农药进入土壤后会通过挥发、土壤降解等转化过程而得到分解^[53], 黑曲霉的加入可以加速土壤中 DM 的降解, 有效缩短农药半衰期, 达到改善污染土壤目的。结果表明, DM 在土壤中消解动态符合一级动力学方程, T1 中 DM 在土壤中的半衰期为 7.6 d, 在 14 d 降解率达到 77.71%, 这与宋国春等^[54]探究 DM 分别在油麦菜(*Lactuca sativa* L.)和土壤中的降解动态时得

出的结论相符。T2 中 DM 半衰期缩短为 6.2 d, 说明游离黑曲霉能促进 DM 的分解; 在施用固定化黑曲霉的条件下, T3 中 DM 半衰期进一步缩减至 5.2 d, 降解效果显著优于游离黑曲霉。进而证明, 本研究所得最佳黑曲霉固定化方案能够促进 DM 降解, 提高污染土壤修复效果的目的。3-PBA 作为最常见的 PYRs 暴露生物标志物^[55], 是许多常用 PYRs 的共享代谢物^[2]。T1 中 3-PBA 浓度随着 DM 加入时间延长不断降解而逐步升高, 即 DM 降解生成 3-PBA, 这与多数研究 PYRs 降解的结论相符^[56]。加入黑曲霉后, 3-PBA 浓度持续增加至 9 h 达到最高, 后浓度降低并趋于稳定, 在 21 h 达到最低水平。袁怀瑜等^[57]发现砖茶中分离得到的降解菌黑曲霉 Yat1 可在 22 h 内完全降解 100 mg/L 的 3-PBA, 与本研究结果相同。在试验后期, T2、T3 组中不能再检测出 3-PBA 浓度, 说明在 DM 分解后期, 3-PBA 产生后黑曲霉立即将其分解, 实现同步降解, 这与 Zhao 等^[6]发现部分米曲霉降解氯氰菊酯体系中未检测到 3-PBA 的结论一致。此外, 固定化黑曲霉对 3-PBA 降解能力高于游离型黑曲霉。3-PBA 比母体农药更难分解, 毒性更强, 其残留加重了对环境及农产品的污染^[57]。而固定化黑曲霉在加快 DM 降解的同时, 对 3-PBA 也具有消解作用, 进一步缓解 DM 污染对土壤的毒害作用。

将黑曲霉最佳固定化组合应用于农业种植中, 通过测定番茄的生长指标以考察固定化黑曲霉的实际作用效果。在本研究中, DM 污染下的番茄种子发芽率降低, 幼苗生长指标下降, 而经固定化黑曲霉修复后发芽率及生长状况均得以改善, 这与张哲^[58]发现黑曲霉可促进烟嘧磺隆污染下小麦(*Triticum aestivum* L.)生长的结果相似。黑曲霉在固定化作用下受到保护, 对 DM 土壤的改良效果优于游离黑曲霉。

该部分研究结果得出, 固定化黑曲霉可充分减少土壤中污染物, 缓解外界环境对植株的不利影响, 提高其对 PYRs 的耐受性。黑曲霉具有强大的酶系统, 可分泌高效的生物转化酶, 使土壤中的 DM 水解、氧化^[58], 从而有效缓解 DM 对植株的胁迫作用。土壤酶活性是指土壤中酶催化物质转化的能力, 能够反映营养物质的转化情况和肥力状况^[59]。脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶广泛存在于土壤中, 是能表征土壤生物活性的重要酶。本研究证实在固定化黑曲霉作用下土壤酶活性以及微生物数量均高于游离黑曲霉组, 这与李青云^[60]探究得出的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* Keratitis)固定化后对氯氰菊酯污染土壤的治理效果明显高于游离菌的结果相符。DM 污染后土壤中细菌、真菌和放线菌数量呈下降趋势, 而经过黑曲霉修复后, 微生物数量有所回升, 且固定化黑曲霉效果较游离态更佳。此外, 由于番茄根系分泌物选择性吸引土壤真菌, 黑曲霉表现出对番茄根系的趋向性是其解除土壤 DM 胁迫作用的重要前提。边照辉^[61]指出, 较低浓度的黑曲霉与番茄植株两者可以共同生长, 番茄根系分泌物能促进黑曲霉孢子萌发、菌丝生长及菌落的形成。这表明黑曲霉可通过改变土壤酶活性而减弱 DM 造成的影响。综上所述, 本研究所设计的利用固定化黑曲霉修复 DM 污染土壤的技术方法, 能有效减轻 DM 对番茄发芽和生长的不利影响, 保障番茄根际土壤酶活和微生物多样性, 保持高水平的 DM 降解率和长时间的菌种活性, 明显提升修复能力, 降低土壤生态毒性, 具有良好的市场前景。尽管本研究对黑曲霉的 DM 生物降解途径和代谢产物尚未明确, 在今后的研究中, 可对其降解产物和途径进行解析, 进一步探索其降解机理。

4 结论

DM 可被固定化黑曲霉高效降解, 通过响应面优化法确定最佳固定化方案, 最佳条件下的固定化黑曲霉能显著提升 DM 去除率, 最高可达 84.31%。固定化黑曲霉通过缩短土壤中 DM 半衰期和同步降解主要代谢产物 3-PBA, 显著提高 DM 降解效果, 实现对土壤污染物的高效、无害化降解。在盆栽试验中, 固定化黑曲霉能提高番茄种子发芽率, 改善其根际土壤中酶活和微生物数量, 验证了最佳固定化黑曲霉的实际应用效果。

参考文献

- [1] 刘亚莉, 王继忠, 彭书传, 陈天虎. 模拟巢湖流域氯菊酯的迁移转化和生态风险[J]. 环境科学, 2016, 37(12): 4644-4650.
LIU YL, WANG JZ, PENG SC, CHEN TH. Modeling the environmental behaviors and ecological risks of permethrin in Chaohu Lake[J]. Environmental Science, 2016, 37(12): 4644-4650 (in Chinese).
- [2] BRAGANÇA I, LEMOS PC, DELERUE-MATOS C, DOMINGUES VF. Pyrethroid pesticide metabolite, 3-PBA, in soils: method development and application to real agricultural soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(3): 2987-2997.
- [3] CHALÁNYOVÁ M, HUTTA M, PAGÁČ M. On-line flow-through extraction-preconcentration-large volume injection-RP LC for trace determination of pyrethroids in Slovak soil[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(2): 134-142.
- [4] SILVÉRIO FO, de ALVARENGA ES, MORENO SC, PICANÇO MC. Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids[J]. Pest Management Science, 2009, 65(8): 900-905.
- [5] TANG WX, WANG D, WANG JQ, WU ZW, LI LY, HUANG ML, XU SH, YAN DY. Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview[J]. Chemosphere, 2018, 191: 990-1007.
- [6] ZHAO TY, HU KD, LI JL, ZHU YT, LIU AP, YAO K, LIU SL. Current insights into the microbial degradation for pyrethroids: strain safety, biochemical

- pathway, and genetic engineering[J]. *Chemosphere*, 2021, 279: 130542.
- [7] TOPP E, AKHTAR MH. Mineralization of 3-phenoxybenzoate by a two-membered bacterial co-culture[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, 36(7): 495-499.
- [8] WANG WM. Experimental study on enhanced electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated soil[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2019, 8(6): 86-89.
- [9] BIROLI WG, BORGES EM, NITSCHKE M, ROMÃO LPC, PORTO ALM. Biodegradation pathway of the pyrethroid pesticide esfenvalerate by bacteria from different biomes[J]. *Water, Air & Soil Pollution*, 2016, 227(8): 271.
- [10] 孙全敏, 马明昊, 迟雪梅, 迟乃玉, 张庆芳. 一株基于高通量测序降解亚硝酸盐芽孢杆菌的筛选[J]. *中国调味品*, 2022, 47(7): 31-35.
SUN QM, MA MH, CHI XM, CHI NY, ZHANG QF. Screening of a nitrite-degrading *Bacillus* strain based on high-throughput sequencing[J]. *China Condiment*, 2022, 47(7): 31-35 (in Chinese).
- [11] MULLIGAN RA, REDMAN ZC, KEENER MR, BALL DB, TJEERDEMA RS. Photodegradation of clothianidin under simulated California rice field conditions[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(7): 1322-1327.
- [12] ZHAO F, ZHANG H, YAN PP, CHEN YW, WU Q, FANG M, WU YN, GONG ZY. Synthesis of coimmobilized microorganisms for the removal of cadmium from cadmium-contaminated rice flour[J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(8): 4509-4516.
- [13] DENG WQ, LIN DR, YAO K, YUAN HY, WANG ZL, LI JL, ZOU LK, HAN XF, ZHOU K, HE L, HU XJ, LIU SL. Characterization of a novel β -cypermethrin-degrading *Aspergillus niger* YAT strain and the biochemical degradation pathway of β -cypermethrin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 8187-8198.
- [14] SAYED MM, AFSHAR A. Selection of the most effective kinetic model of lactase hydrolysis by immobilized *Aspergillus niger* and free β -galactosidase[J]. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2021, 25(12): 101395.
- [15] 张红兵. 固定化微生物处理有机污染物[J]. *山西化工*, 2007, 27(1): 30-35.
ZHANG HB. Treatment of organic pollutants by immobilized microbial cells[J]. *Shanxi Chemical Industry*, 2007, 27(1): 30-35 (in Chinese).
- [16] GUO JY, CHEN C, CHEN WJ, JIANG JY, CHEN B, CHEN B, ZHENG F. Effective immobilization of *Bacillus subtilis* in chitosan-sodium alginate composite carrier for ammonia removal from anaerobically digested swine wastewater[J]. *Chemosphere*, 2021, 284: 131266.
- [17] 黄静, 梁密. 改性蛭石吸附-包埋法固定化脂肪酶的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(14): 103-107.
HUANG J, LIANG M. Lipase immobilization by modified vermiculite adsorption-embedding method[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(14): 103-107 (in Chinese).
- [18] FEKI F, KLISUROVA D, ALI MASMOUDI M, CHOURA S, DENEV P, TRENDAFILOVA A, CHAMKHA M, SAYADI S. Optimization of microwave assisted extraction of simmondsins and polyphenols from *Jobba (Simmondsia chinensis)* seed cake using Box-Behnken statistical design[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129670.
- [19] 陈显玲, 张鹏, 农秀丽, 卢丽婷, 杨福川, 麦雪兰, 黄安甲, 苏龙. 响应面法优化海藻酸钠固定菊糖蔗糖酶的研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(8): 73-77.
CHEN XL, ZHANG P, NONG XL, LU LT, YANG FC, MAI XL, HUANG AJ, SU L. Optimization of immobilizing conditions for inulosucrase with sodium alginate by response surface methodology[J]. *Feed Research*, 2022, 45(8): 73-77 (in Chinese).
- [20] 于波. 固定化黑曲霉对溴氰菊酯废水的修复[D]. 沈阳: 沈阳化工大学硕士学位论文, 2018.
YU B. Remediation of deltamethrin wastewater by immobilized *Aspergillus niger*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang University of Chemical Technology, 2018 (in Chinese).
- [21] 黄文源, 侯少锋, 龙友华, 李明, 吴小虎, 徐军, 刘新刚, 董丰收, 吴小毛, 郑永权. 溴氰菊酯降解菌的分离筛选与应用潜力评价[J]. *农药学报*, 2018, 20(5): 643-651.
HUANG WY, HOU SF, LONG YH, LI M, WU XH, XU J, LIU XG, DONG FS, WU XM, ZHENG YQ. Isolation, screening and application potential evaluation of deltamethrin-degrading microorganism[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2018, 20(5): 643-651 (in Chinese).
- [22] XIE WJ, ZHOU JM, WANG HY, CHEN XQ. Effect of nitrogen on the degradation of cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in soil[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5): 638-644.
- [23] GOLDMANN WM, AHOLA J, MANKINEN O,

- KANTOLA AM, KOMULAINEN S, TELKKI VV, TANSKANEN J. Determination of phenolic hydroxyl groups in technical lignins by ionization difference ultraviolet spectrophotometry ($\Delta\epsilon$ -IDUS method)[J]. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 2017, 61(2): 93-101.
- [24] EL-GHONEMY DH, ALI TH, HASSANEIN NM, ABDELLAH EM, FADEL M, AWAD GEA, ABDOU DAM. Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(3): 225-240.
- [25] SONG JY, IMANAKA HY, IMAMURA KY, KAJITANI KT, NAKANISHI KH. Development of a highly efficient indigo dyeing method using indican with an immobilized β -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(3): 281-287.
- [26] 刘世军, 唐绒绒, 唐志书, 雷甜甜, 王锦, 刘焱润. 高效液相色谱法检测大枣中溴氰菊酯残留[J]. *陕西农业科学*, 2019, 65(1): 67-68.
LIU SJ, TANG RR, TANG ZS, LEI TT, WANG J, LIU YR. Determination of deltamethrin residues in jujube by HPLC[J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 65(1): 67-68 (in Chinese).
- [27] 张泽钰, 李茹莹. 固定化微生物对河水的脱氮效果研究[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(1): 161-165.
ZHANG ZY, LI RY. Study on the nitrogen removal in river water by immobilized microorganisms[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(1): 161-165 (in Chinese).
- [28] SUBARA D, JASWIR I, RASHID ALKHATIB MF, ALI NOORBATCHA I. Understanding the significance variables for fabrication of fish gelatin nanoparticles by Plackett-Burman design[J]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2018, 290: 012006.
- [29] WANG ZJ, ZHANG XJ, YANG SH, LIU ZT, ZHANG JS, LI ZH, CHEN XQ, ZHANG Y. Optimization of the ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of *Pinus koraiensis* nuts oil by response surface methodology[J]. *Natural Product Research*, 2022, 42(4): 1478-6419.
- [30] 谢文军, 周健民, 王火焰, 陈小琴. HPLC 法测定土壤中 3-苯氧基苯甲酸[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 608-611.
XIE WJ, ZHOU JM, WANG HY, CHEN XQ. Determination of 3-phenoxybenzoic acid in soil using HPLC[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 608-611 (in Chinese).
- [31] 张宝成, 杨春秀, 王静. 两种櫟木根际土壤碳特征及酶活性[J]. *水土保持研究*, 2021, 28(3): 83-87.
ZHANG BC, YANG CX, WANG J. Characteristics of carbon and enzyme activity of rhizosphere soil of two *Aralia arborescens*[J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2021, 28(3): 83-87 (in Chinese).
- [32] ZHANG Y, JIAO L, XU WQ, CHEN YF, WU Y, YAN HY, GU WL, ZHU CZ. Defect-rich and ultrathin nitrogen-doped carbon nanosheets with enhanced peroxidase-like activity for the detection of urease activity and fluoride ion[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2022, 33(3): 1317-1320.
- [33] SHI LE, TANG ZX, YI Y, CHEN JS, XIONG WY, YING GQ. Immobilization of nuclease p1 on chitosan micro-spheres[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2011, 25(1): 83-88.
- [34] WU QB, ZHU YL, LIU YZ. Evaluating model of frozen soil environment change under engineering actions[J]. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 2002, 45(10): 893-902.
- [35] 谢夏, 杨建兰, 刘新育. 土壤中细菌菌落总数的测定条件优化[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(11): 92-95.
XIE X, YANG JL, LIU XY. Optimizing the determination conditions of total bacterial colonies in soil[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(11): 92-95 (in Chinese).
- [36] FILIPPOV M, TATARNIKOVA O, POZDNYAKOVA N, VOROBYOV V. Inflammation/bioenergetics-associated neurodegenerative pathologies and concomitant diseases: a role of mitochondria targeted catalase and xanthophylls[J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(2): 223.
- [37] WOJCIECHOWSKA M, STEPNOWSKI P, GOŁĘBIEWSKI M. The impact of insecticides containing deltamethrin and cyfluthrin on the composition of surface compounds in the larvae, females and males of *Tenebrio molitor*[J]. *Biomedical Chromatography*, 2022, 36(5): 14-29.
- [38] BUSTOS-TERRONES YA, ESTRADA-VÁZQUEZ R, RAMÍREZ-PEREDA B, BUSTOS-TERRONES V, RANGEL-PERAZA JG. Kinetics of a fixed bed reactor with immobilized microorganisms for the removal of organic matter and phosphorous[J]. *Water Environment Research*, 2020, 92(11): 1956-1965.
- [39] 张靖雯, 肖盈, 陈佳志. 复合固定化菌株 L5 降解高

- 效氯氰菊酯的特性研究[J]. 广东化工, 2021, 48(22): 116-118.
- ZHANG JW, XIAO Y, CHEN JZ. Study on the degradation of beta-cypermethrin by composite immobilized strain L5[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(22): 116-118 (in Chinese).
- [40] DING HL, LUO XG, ZHANG XN, YANG H. Alginate-immobilized *Aspergillus niger*: characterization and biosorption removal of thorium ions from radioactive wastewater[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 562: 186-195.
- [41] REN BQ, WANG JY, ZHANG WJ, KAN K, ZHAO LY, SONG XX, CUI CW. Removal of Cr(VI) from solution by free and immobilised spores of *Aspergillus niger*[J]. *Micro & Nano Letters*, 2017, 12(9): 615-617.
- [42] DING DX, TAN X, HU N, LI GY, WANG YD, TAN Y. Removal and recovery of uranium (VI) from aqueous solutions by immobilized *Aspergillus niger* powder beads[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(9): 1567-1576.
- [43] 喻清, 丁德馨, 李登科, 余园平, 罗艺, 王启方, 胡南. 固定化黑曲霉活性炭吸附铀的机理[J]. *中国有色金属学报*, 2016, 26(4): 936-945.
- YU Q, DING DX, LI DK, YU YP, LUO Y, WANG QF, HU N. Adsorption mechanism of uranium of immobilizing *Aspergillus niger* activated carbon[J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2016, 26(4): 936-945 (in Chinese).
- [44] JIAO J, GAI QY, WEI W, ZHANG YP, NIU LL, FU YJ, Wang X. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 112: 252-261.
- [45] 许超群, 万云宝, 张小龙, 龚大春, 田毅红, 郭金玲. 吸附交联法固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶[J]. *中国酿造*, 2016, 35(4): 83-87.
- XU CQ, WAN YB, ZHANG XL, GONG DC, TIAN YH, GUO JL. Immobilization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by adsorption and crosslinking method[J]. *China Brewing*, 2016, 35(4): 83-87 (in Chinese).
- [46] 潘利华, 罗建平, 姜绍通. 固定化黑曲霉 β -葡萄糖苷酶制备染料木素活性苷元的研究[J]. *生物工程学报*, 2007, 23(6): 1060-1064.
- PAN LH, LUO JP, JIANG ST. Study on isoflavone active aglycone preparation by immobilized β -glucosidase from *Aspergillus niger*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(6): 1060-1064 (in Chinese).
- [47] XU SS, ZHANG QL, BAI DM, CAI LN, LU T, YAO SJ. Removal process and mechanism of hexavalent chromium by adsorption-coupled reduction with marine-derived *Aspergillus niger* mycelial pellets[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2022, 49: 198-204.
- [48] ZHANG K, WU XL, LUO HB, WANG W, YANG SQ, CHEN J, CHEN W, CHEN J, MO Y, LI L. Biochemical pathways and enhanced degradation of dioctyl phthalate (DEHP) by sodium alginate immobilization in MBR system[J]. *Water Science and Technology*, 2021, 83(3): 664-677.
- [49] CHEN LH, ZHAO SJ, YANG YM, LI L, WANG DM. Study on degradation of oily wastewater by immobilized microorganisms with biodegradable polyacrylamide and sodium alginate mixture[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(12): 15149-15157.
- [50] LI X, WANG YX, LUO T, MA YS, WANG B, HUANG QY. Remediation potential of immobilized bacterial strain with biochar as carrier in petroleum hydrocarbon and Ni co-contaminated soil[J]. *Environmental Technology*, 2022, 43(7): 1068-1081.
- [51] QIAO L, WEN DH, WANG JL. Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5229-5234.
- [52] OGBONNAYA U, SEMPLE K. Impact of biochar on organic contaminants in soil: a tool for mitigating risk?[J]. *Agronomy*, 2013, 3(2): 349-375.
- [53] 乔禹欣. 双氟磺草胺在环境中的行为及降解机制的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2019.
- QIAO YX. Study on the behavior and degradation mechanism of florasulam in the environment[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [54] 宋国春, 李瑞娟, 刘同金, 杨万海, 于建垒. 溴氰菊酯在油麦菜和土壤中的残留动态及安全使用评价[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(12): 146-150.
- SONG GC, LI RJ, LIU TJ, YANG WH, YU JL. Residual dynamics and safety evaluation of deltamethrin in leaf lettuce and soil[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, 48(12): 146-150 (in Chinese).
- [55] MORGAN MK. Children's exposures to pyrethroid

- insecticides at home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2012, 9(8): 2964-2985.
- [56] 邓维琴, 刘书亮, 姚开. 微生物降解 3-苯氧基苯甲酸的研究进展[J]. *微生物学报*, 2015, 55(9): 1081-1088. DENG WQ, LIU SL, YAO K. Microbial degradation of 3-phenoxybenzoic acid-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(9): 1081-1088 (in Chinese).
- [57] 袁怀瑜, 刘书亮, 王志龙, 赵楠, 赖文. 3-苯氧基苯甲酸降解真菌的筛选及其降解特性[J]. *食品科学*, 2013, 34(7): 152-156. YUAN HY, LIU SL, WANG ZL, ZHAO N, LAI W. Isolation and identification of a 3-phenoxybenzoic acid-degrading fungus and its degradation characteristics[J]. *Food Science*, 2013, 34(7): 152-156 (in Chinese).
- [58] 张哲. 枯草芽孢杆菌 YB1 和黑曲霉 YF1 菌株对烟嘧磺隆的降解作用研究[D]. 保定: 河北农业大学博士学位论文, 2019. ZHANG Z. Study on the degradation of nicosulfuron by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [59] 靳玉婷, 李先藩, 蔡影, 胡宏祥, 刘运峰, 付思伟, 张博睿. 秸秆还田配施化肥对稻-油轮作土壤酶活性及微生物群落结构的影响[J]. *环境科学*, 2021, 42(8): 3985-3996. JIN YT, LI XF, CAI Y, HU HX, LIU YF, FU SW, ZHANG BR. Effects of straw return to field with chemical fertilizer on soil enzyme activity and microbial community structure of rice-oil rotation[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(8): 3985-3996 (in Chinese).
- [60] 李青云, 周茂钟, 刘幽燕, 唐爱星, 覃益民, 梁思婷, 韦滢军. 固定化铜绿假单胞菌 GF₃₁ 对氯氰菊酯降解的强化作用[J]. *化工学报*, 2013, 64(6): 2219-2226. LI QY, ZHOU MZ, LIU YY, TANG AX, QIN YM, LIANG ST, WEI YJ. Bioaugmentation strategy to enhance cypermethrin degradation by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* GF₃₁[J]. *CIESC Journal*, 2013, 64(6): 2219-2226 (in Chinese).
- [61] 边照辉. 番茄根系分泌物对根际微生物和线虫生防菌生长的影响[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019. BIAN ZH. Effects of tomato root exudates on the growth of rhizosphere microorganisms and nematode biocontrol bacteria[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019 (in Chinese).