

改性核桃壳生物炭制备固定化PGPR的研究

韩亚杰¹, 时新强², 包慧芳³

(1. 石河子大学化学化工学院, 新疆石河子市, 832003; 2. 德蓝水技术股份有限公司, 新疆乌鲁木齐市, 830013; 3. 新疆农业科学院微生物应用研究所, 新疆乌鲁木齐市, 830013)

摘要 为提高植物根际促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)在土壤中的存活率和稳定性, 以改性生物炭制备PGPR的固定化菌剂。本文采用酸法改性核桃壳生物炭以加强其对微生物的固定化能力。研究改性剂的浓度、改性时间和改性温度对固定化PGPR的影响。研究表明, 4mol/L乙酸在70℃下改性30min的效果最佳, 改性生物炭固定化PGPR可在植物根际施用, 解决菌体受环境胁迫容易死亡等问题。

关键词 生物炭; 载体; 改性; PGPR

中图分类号: TQ424.1+9 文献标识码: B
文章编号: 1008-0899(2024)12-0009-03

PGPR直接施加到土壤中, 菌株易受环境胁迫引起部分菌体死亡, 导致促进植物生长效果不佳。为了提高PGPR在自然环境中的活力, 可以采用固定化微生物的方法。生物炭具有较好的内部孔隙、大的比表面积和较强的吸附能力, 被广泛用于食品、医药、载体、半导体等领域。生物炭表面含有羧基、氨基等官能团, 可以与PGPR的细胞膜发生互作效应为微生物的生长提供场所, 同时生物炭含有的氮、磷、钾等元素为微生物的生长补给营养, 增强其对环境胁迫的应对能力^[1]。

为了提高生物炭的负载能力, 可以通过改性来达到丰富生物炭表面官能团的目的。生物炭的改性可以采用物理和化学方法, 常用的化学改性技术有酸改性、碱改性、等离子体改性等。吴月^[2]通过改性生物炭固定化Bacillus subtilis168微球对玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)进行体外脱毒, 研究发现在饲料中添加0.8g/kg改性生物炭Bacillus subtilis168微球对ZEN染毒小鼠的肝脏损伤和生殖系统

损伤具有缓解作用。王雨行^[3]制备了Fe掺磁改性生物炭并负载乙草胺降解菌(*Catellibacterium caeni* sp. nov DCA-1T), 对土壤中铅、乙草胺的去除效果较好。刘守新等^[4]通过硝酸改性活性炭, 然后氮气中热处理, 发现改性后增加了活性炭表面酸性官能团数量, 进而提高了活性炭的吸附能力。

本实验采用乙酸对核桃壳生物炭进行改性, 以增加生物炭表面酸性官能团的含量, 扩大和增加生物炭表面孔隙结构, 提高生物炭对PGPR的吸附量。考察改性剂浓度、改性时间、改性温度的影响, 确定改性生物炭的最佳改性条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品

生物炭为核桃壳生物炭, 蛋白胨、酵母浸粉购自广东环凯微生物科技有限公司, 其它试剂均为分析纯。

1.1.2 培养基

LB培养基: 酵母浸粉5g, 蛋白胨10g, NaCl 10g, 蒸馏水1000ml, 121℃灭菌30min, 冷却后备用。PGPR为实验室保存的假单胞菌SCPG-7。

1.1.3 仪器

UV-2100紫外可见分光光度计, 优尼柯(上海)仪器有限公司; 5418R冷冻离心机, 德国Eppendorf公司; LRH-150恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; ZQZY-70BS恒温振荡, 上海知楚仪器有限公司。

基金来源: 石河子大学创新发展专项(CXFZ202104); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZK2021B06)。

作者简介: 韩亚杰(1978~), 女, 汉族, 辽宁昌图人, 博士, 研究方向: 环境微生物。

司;MLS-3750高压灭菌锅,日本三洋公司;SW-CJ-ZFD超净工作台,上海博讯实业有限公司;GZX-9140MBE电热鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃壳生物炭的预处理

将核桃壳生物炭用去离子水冲洗数遍放入烧杯,加入高纯水煮沸1.5h,然后放入高纯水中浸泡2h,再用高纯水冲洗数遍,放入干燥箱中,105℃干燥48h。即可得到备用生物炭。

1.2.2 核桃壳生物炭的改性

分别取一定浓度乙酸作为改性剂,在一定温度下改性核桃壳生物炭一定时间。用蒸馏水将生物炭洗至中性,烘干后用作载体材料制备固定化微生物。

1.2.3 改性生物炭固定微生物量的测定

(1)假单胞菌SCPG-7菌株接种至LB培养基,在37℃,120r/min过夜培养。

(2)将10mL菌液加入盛有0.1g改性生物炭的50mL离心管中,恒温150r/min保持10h后取出,静置分层,弃去上层清液,然后加入适量生理盐水(不晃动),4℃,1000r/min下离心5min,弃去上层清液。重复洗涤3次。

(3)向上述离心管中加入2mL生理盐水,漩涡仪将离心管中的液体剧烈振荡1min,然后4℃,1000r/min下离心分离5min,取上层液体过滤,用生理盐水定容至10mL,重复3次。

(4)紫外分光光度计在600nm处测定其吸光度A值。

2 结果与分析

2.1 生物炭的改性

2.1.1 酸浓度的影响

使用乙酸为改性剂,30℃时,在1、4、8和12mol/L乙酸浓度下,对生物炭改性60min,考察改性剂浓度对改性生物炭吸菌性能的影响。改性后生物炭对微生物的吸附量用吸光度A表示,得到数据如表1所示。

表1 乙酸浓度的影响

浓度mol/L	1	4	8	12
吸光度A	0.106	0.240	0.149	0.077

由表1可知,随着酸浓度的增加,改性生物炭对微生物的吸附量即吸光度A呈现先增大后减小的趋势。乙酸摩尔浓度为4mol/L时,改性生物炭的对微生物的吸附量达到最大值。

利用酸改性生物炭,可以改变生物炭的表面结构扩大孔隙,增加羧基、羟基的含量,去除表面灰质并将生物炭表面的碱性官能团中和,因此,在改性剂浓度适当范围内,随着浓度的增大,生物炭表面的活性基团也会增加;与此同时,在制备固定化微生物的过程中,带有羧基、羟基等反应性基团的大孔生物炭会与微生物发生键合反应,提高改性生物炭对微生物的吸附量并增加稳定性使其不易脱落^[9],因此,随着改性剂浓度的增大,改性生物炭对微生物的吸附量呈现出上升的趋势。随着浓度的继续增大,高浓度的酸可能会对生物炭造成过度腐蚀,使生物炭的原有组分被破坏,部分炭骨架被腐蚀,使其孔隙结构不佳,阻碍了生物炭的吸附性能,对吸附微生物造成了不利影响。所以,改性生物炭对微生物的吸附量会出现下降的趋势。

通过这组实验,发现了改性生物炭对微生物的吸附量与改性剂浓度之间的变化关系,确定了最佳的改性剂浓度,乙酸最佳的改性浓度为4mol/L。

2.1.2 改性时间的影响

在30℃下,采用4mol/L乙酸对生物炭进行改性,改性时间分别为30、60、90、150min,考察改性时间对生物炭吸菌性能的影响。改性后生物炭对微生物的吸附量用吸光度A表示,得到数据如表2所示。

表2 改性时间的影响

改性时间/min	30	60	90	150
吸光度A	0.203	0.161	0.141	0.117

由表2可知,4mol/L乙酸在改性时间为30min时,改性生物炭对微生物的吸附量达到最大值。

普通生物炭反应活性不足,通过合适的方法改变其性质可以使原有的结构发生变化,还可以引进新的功能基团,以增强其反应活性。使用酸改性生物炭,会中和生物炭表面的碱性官能团,生物炭的表面总碱度就会降低,表面总酸度则会增加,因此,在一定时间范围内,随着改性时间的延长,这种趋势会不断的发展,对制备固定化微生物有利的表面活性官能团会更多的暴露于生物炭表面,使生物炭

更容易吸附微生物^[6],因此,随着改性时间的延长,改性生物炭对微生物的吸附量呈现出上升的趋势;随着改性时间的继续延长,生物炭长时间浸泡在酸溶液中,可能会导致生物炭内部某些孔道被酸溶液过度蚀刻,减小了微孔面积和容积,对吸附微生物造成了不利影响。所以,改性生物炭对微生物的吸附量会出现下降的趋势。

通过这组实验,发现了改性生物炭对微生物的吸附量与改性时间之间的变化关系,确定了最佳的改性时间,4mol/L的乙酸最佳改性时间为30min。

2.1.3 改性温度的影响

分别在30,50,70和100℃下,采用4mol/L的乙酸改性30min,考察改性温度对改性生物炭吸菌性能的影响。改性后生物炭对微生物的吸附量用吸光度A表示,得到数据如表3所示。

表3 改性温度的影响

改性温度/℃	30	50	70	100
吸光度A	0.216	0.247	0.295	0.207

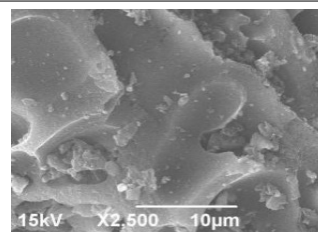
由表3可知,在70℃下,4mol/L乙酸改性30min,生物炭的对微生物的吸附量达到最大值。改性温度会对改性生物炭造成一定的影响,当温度条件温和时,有利于引进新的功能基团,且随着温度的升高,生物炭表面活性基团的数量也会随之增加,所以,高温有利于增加生物炭表面酸性官能团,在一定温度范围内,随着改性温度的升高,改性生物炭对微生物的吸附量呈现出上升的趋势;随着温度的继续升高,会破坏生物炭的结构,导致可以吸附微生物的活性基团流失,对吸附微生物造成了不利影响。所以,改性生物炭对微生物的吸附量会出现下降的趋势。

通过这组实验,发现了改性生物炭对微生物的吸附量与改性温度之间的变化关系,确定了最佳的改性温度,乙酸最佳改性温度为70℃。

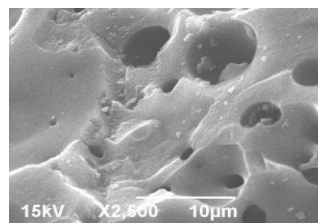
2.2 改性生物炭的电镜分析

对未经改性剂处理的核桃壳生物炭、以4mol/L的乙酸在70℃下改性30min生物炭进行电镜扫描分析,探究改性生物炭的负载能力和物理结构的关系,如图1(a)、(b)所示。

图1可知,未经改性剂处理的核桃壳生物炭图1(a)表面平整且致密,以4mol/L的乙酸在70℃下改性



(a)



(b)

图1 生物炭样品电镜照片

30min生物炭图1(b)表面粗糙,结构比较疏松,且较改性前出现了发达的孔隙,孔隙为口大、底小,在孔壁中分布有大量孔隙,这样的结构非常有利于微生物的固定化,且能保证固定化微生物的稳定性,使微生物不会轻易脱落。表明改性后的生物炭比改性前的生物炭能够吸附更多的微生物。

3 结论

核桃壳生物炭的乙酸改性最佳条件为乙酸浓度为4mol/L,在70℃下改性30min。乙酸改性生物炭孔隙结构较发达,表面应该分布大量的酸性官能团有利于吸附微生物,对假单胞菌SCPG-7的吸附量最大。

参考文献

- [1] 汪昆平,徐乾前.几种不同处理方法对活性炭表面化学性质的影响[J].环境工程学报,2012,6(2):373-380.
- [2] 吴月.生物炭固定化Bacillus subtilis168微球的制备及其对玉米赤霉烯酮的脱毒效果研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2023.
- [3] 王雨行.载菌生物炭对铅、乙草胺污染土壤修复效应与机制研究[D].沈阳:河北大学,2024.
- [4] 刘守新,隋淑娟,孙承林等.臭氧对活性炭表面化学结构及Cr6+吸附性质的影响.林产化学与工业,2006,26(1):33-36.
- [5] 周林成,李彦峰,侯英凤等.大孔载体固定化微生物处理污水研究[J].离子交换与吸附,2007,23(6):531-539.
- [6] 汪昆平,徐乾前.几种不同处理方法对活性炭表面化学性质的影响[J].环境工程学报,2012,6(2):373-380.