

不同培养基对富集筛选脱色真菌菌群的效果比较*

贾振杰 李慧君 杨清香** 张 昊 陈建军

(河南师范大学生命科学学院 河南省环境污染控制技术重点实验室 新乡 453007)

摘要 利用活性黑 RB5 和活性红 M-3BE 作为筛选因子,从染料脱色效果、菌群产酶能力以及菌群中的微生物丰富度三方面比较了酵母培养基 A、产漆酶真菌培养基 B 和白腐真菌培养基 D 在脱色真菌富集筛选方面的效果。富集筛选结果共得到 11 组具有明显脱色效果的真菌群,其中 5 组来自于 D 培养基, A 和 B 培养基各获得 3 组。来自 A 培养基的 3 组菌群显示出最好的脱色效果和最大的菌群丰富度,对 50mg/L 的活性红 M-3BE 和酸性红 A 溶液的脱色率最高达到 99.53% 和 97.42%,从中分离到了 16 株真菌,初步鉴定分属于水霉科、曲霉科(红曲霉属)、节壶菌科和白粉菌科,而 B 和 D 培养基中所获得的菌群脱色效果稍差,从中仅得到 3 株和 2 株真菌,初步鉴定属于酵母和青霉。A、B 两种培养基在各种染料存在下更易产生木质素过氧化物酶,产漆酶能力较弱,而 D 培养基产漆酶活性较高。

关键词 真菌 染料脱色 培养基 酶

中图分类号:Q939.99 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0629-04

Effects of Different Media on Enriching and Screening Fungi Culture with the Abilities of Decolorizing Various Synthetic Dyes*

JIA Zhen-Jie LI Hui-Jun YANG Qing-Xiang** ZHANG Hao CHEN Jian-Jun

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Key Laboratory of Environmental Pollution Control Technology of Henan Province, Xinxiang 453007)

Abstract In this paper 3 different media (A for yeast cultivation; B, for laccase producing; D, for white rot fungi cultivation) were compared in enriching and screening decolorizing fungi culture using Reactive Black 5 (RB5) and Reactive Red (M-3BE) from the following three points: decolorization effects, abilities of producing enzymes and diversity of microbial community. 11 groups of fungi with obvious decolorization effects were obtained after enrichment for near one month. Among them, 6 groups came from medium D, the other two 3 groups from medium A and B, respectively. However, the 3 groups from medium A exhibited the highest microbial diversity and best decolorization results with 99.53% and 97.42% color removal rate of Reactive Red M-3BE and Acid Red. From them, 16 strains of fungi were isolated and primarily identified as *Saprolegniaceae*, *Eurotiaceae* (*Monascus* went), *Erysiphaceae* and *Physodermataceae*. Fungi groups from medium B and D exhibited a bit lower color removal rate of various dyes and only 3 and 2 isolates primarily classified as *Saccharomycetaceae* and *Eurotiaceae* (*Penicillium*) were obtained from them. Fungi cultures in medium A and B could produce lignin peroxidase, and those in medium D could be detected higher activity of laccase. All the fungal cultures exhibited very weak activity of manganese dependant peroxidase.

Key words Fungi, Decolorization of dyes, Medium, Enzyme

染料废水因所含染料种类多,易变化,色度明显以及难生物降解而一直成为难处理的废水之一。与很多物化处理法相比,生物处理法具有运行费用低无二次污染等优点,成为处理含有机物废水的首选方法^[1]。目前已经报道了许多不同种类的生物

具有对染料的脱色能力,如细菌、真菌、藻类、放线菌等,特别是白腐真菌类,由于这类菌能够产生非底物特异性的降解酶类而显示出巨大的应用潜力^[2]。然而,单株菌在实际废水处理中的应用目前还很难实现,一方面是菌株的产酶和脱色难以适应

* 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(No. NCET-05-0612) 国家自然科学基金(No. 20677014)资助

** 通讯作者 Tel 0373-3326703, E-mail: yangqx66@163.com

收稿日期:2006-09-27,修回日期:2006-12-18

变化的染料废水组分,另一方面是不能解决其它菌群的污染问题^[3]。因此,如果筛选到具有高效脱色能力的混合菌群用于实际废水处理有望克服以上问题。然而在以往报道的混合菌群脱色处理中,多采用混合细菌菌群,这些菌群在好氧状况下的脱色效果不好,在厌氧状况下虽然脱色率较高,却容易产生更难生物降解并且具有更强毒性的中间产物^[2~4]。有关混合真菌脱色的报道还很少。

本文针对目前的状况,以富集筛选高效脱色的真菌菌群为目标,研究了常用的3种不同真菌培养基组成对脱色菌群富集筛选的效果。

1 材料与方法

1.1 培养基

酵母菌培养基 A 的组成见文献 5]

产漆酶培养基 B:麦麸 4.5 g,酵母浸粉 1.5 g,葡萄糖 1 g, NH_4Cl 0.5 g,盐溶液 100 mL。

盐溶液: KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.1 g, KCl 0.5 g,溶于 1 L 自来水中 pH 5.0。

培养基 D 的组成见文献 6]

1.2 样品来源

长有褐色或乳白色锈斑的树皮、腐烂落叶土、朽木、印染厂排污口污泥。

1.3 染料

活性黑 RB5($\lambda_m = 596 \text{ nm}$)、活性红 M-3BE($\lambda_m = 541 \text{ nm}$)、酸性红($\lambda_m = 516 \text{ nm}$)、活性艳兰 KNR($\lambda_m = 600 \text{ nm}$)配成 10mg/mL 的母液,放入 4℃ 冰箱保存。

1.4 富集驯化筛选

每种样品分别取 1g 加入到有 100 mL 上述 3 种不同的培养基中,摇床 28℃、140 r/min,培养 5d ~ 7d。将培养液静置 1h,弃上清。分别加入含有 50mg/L 活性黑 RB5、活性红 M-3BE 的新鲜培养液进行富集培养 5d ~ 7d,同法将染料浓度升高至 100mg/L 继续富集培养,获得高效脱色的混合菌群用于后续研究。

1.5 混合菌群的脱色研究

取等量上述获得的混合菌群分别加入上述 4 种染料,使染料的终浓度为 50mg/L,28℃、140 r/min 脱色培养,每隔一定时间取样在每种染料最大吸收波长处比色测定脱色率^[7]。脱色率计算如下。

$$\text{脱色率} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$$

A_0 、 A_t 分别表示初始时刻和 t 时刻染料在最大吸收波长处的 OD 值。

1.6 酶活的测定

取反应液在 5000 r/min 离心 10 min 后取上清,得到粗酶液。木质素过氧化物酶(LiP)的测定采用 Tien & Kirk 的方法^[8]。酶活力单位定义为每 min 氧化 1 μmol 的黎芦醇成黎芦醛所需要的酶量。锰依赖过氧化物酶的测定采用紫外吸收法^[9]。酶活力单位定义为在 240 nm 的波长下每 min 引起 0.1 个 OD 值上升所需酶量。漆酶的测定采用 ABTS 法^[10],利用柠檬酸-磷酸缓冲体系,在 420 nm 下测定 3 min 内吸光度的变化,酶活力单位定义为每 min 引起 0.1 个 OD 值上升所需酶量。

1.7 菌群微生物多样性检测

将每个组合的培养液摇匀,经适当稀释后在相应的固体培养基平板上进行培养和计数,28℃ 培养 3d 后观察每种培养基中可培养菌株的丰富度,并进行单菌落分离,用不加染料的相应斜面保存纯菌种,根据菌落形态和菌体的显微观察特征进行初步分类。

2 结果分析

2.1 不同培养基对脱色菌群的富集效果比较

本实验对 4 个样品采用 3 种培养基和 2 种染料(活性红 M-3BE 和活性黑 RB5)进行富集,共设计了 30 组合。经过近一个月的富集培养后,在 A 培养基中得到对活性红 M-3BE 有较好脱色效果的菌群 3 组,分别为 A1R、A2R、A5R,没有得到对活性黑 RB5 脱色的菌群;在 B 培养基中得到对活性红脱色的菌群 B1R、B3R,对活性黑 RB5 脱色的菌群 B6B;在 D 培养基中得到对活性红较好脱色的菌群 D1R、D4R、D5R 和对活性黑 RB5 脱色的菌群 D6B 和 D7B。脱色结果如表 1 所示。

由以上结果可知, A 培养基所富集的菌群对于活性红 M-3BE 的脱色明显优于 B 和 D 培养基富集的菌群,但是 A 培养基对于 4 种菌源样品的富集中没有得到对活性黑 5 明显脱色的菌群。通过对菌群脱色过程的观察发现,从 3 种培养基富集得到的活性红脱色菌群主要以降解脱色为主,离心后的菌体上仅附着少量残余染料,96h 培养后菌体和溶液颜色不变,而富集得到的活性黑 5 脱色菌群却具有明

显的吸附脱色特征,菌体附着上与溶液同样的深蓝色,培养 48h 后菌体上吸附的染料开始解吸附,使脱色率不仅没有升高反而下降,96h 时脱色率测定值下降到 20% 左右。

2.2 混合菌群对其它染料的脱色研究

将所得到的 11 组混合菌群对 50mg/L 酸性红 A 和活性艳兰 KNR 溶液进行脱色处理,结果表明,这些混合菌群多数在 24h 之前能够快速脱色,之后脱色速度缓慢。图 1 比较了 3 种培养基中所获得的菌群 24h 时对酸性红 A 和活性艳兰 KNR 溶液的脱色状况。

表 1 三种培养基的富集筛选结果比较(24h 内染料的脱色率%)

菌群	培养基 A			培养基 B			培养基 D				
	A1R	A2R	A5R	B1R	B3R	B6B	D1R	D4R	D5R	D6B	D7B
RB5						59.7				68.7	74.1
M-3BE	99.5	98.8	80.3	78.0	39.2		68.8	61.6	56.8		

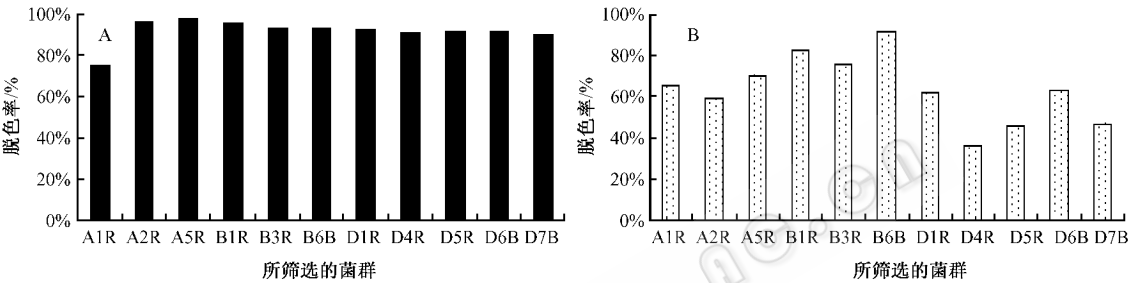


图 1 所筛选的脱色菌群 24 h 内对酸性红 A 和活性艳兰 KNR 的脱色比较
A 菌群对酸性红的脱色,B 菌群对活性艳兰 KNR 的脱色

由图 1 可知,所选的 11 组混合菌群对酸性红 A 的脱色效果明显好于其它染料,除 A1R 外,其它菌群对酸性红 A 的脱色率均接近 100%。而对活性艳兰 KNR 的脱色,从 B 培养基中筛选的菌群(B1R、B5R、B6B)要优于其它两种培养基筛选的菌群。A、B 和 D 3 种培养基富集的菌群对活性艳兰 KNR 的脱色率分别为 59.7% ~ 70%、77% ~ 92.3% 和 36.1% ~ 62.9%。

2.3 不同培养基对菌群产酶的比较

将上述 11 组菌群在不同染料存在状况下进行木质素降解酶类的检测,在检测中发现 11 个组合在对活性黑 5 存在的条件下均没有酶活性,因此表 2 中仅列出了其它染料条件下的产酶情况。

由表 2 可知,A 培养基中所得到的菌群多数可以产生木质素过氧化物酶,但都不能产生锰依赖过氧化物酶,而产漆酶的能力明显与染料的类型有关,B 培养基中所得到的菌群也有易于产生木质素过氧化物酶的趋势,D 培养基中所得到的菌群产木质素过氧化物酶的能力显然比较差,但在酸性红、活性艳兰存在条件下 D1R、D4R 和 D6B 有较高的漆酶活性。另外,染料类型不同诱导产酶能力不同,

酸性红 A 比活性红 M-3BE 更易于诱导产生各种酶,这与前面所筛的混合菌群对酸性红 A 的脱色要比对活性红 M-3BE 的脱色好的结果相一致。

值得注意的是在对 KNR 进行脱色时,A2R、A3R、D1R、D5R 均有较高的漆酶活性,但脱色率却不是很高,在 59.68% ~ 69.93% 之间。而从培养基 B 筛选出的混合菌群在活性艳兰 KNR 存在条件下却不能产生漆酶,但能够产生明显的木质素过氧化物酶,酶活在 213 U/L ~ 253 U/L 之间,与其对活性艳兰 KNR 的高脱色率(图 1)相一致,说明木质素过氧化物酶活性高的菌群对活性艳兰的脱色更有利。

活性艳蓝 KNR 是蒽醌衍生物,它是一大类有毒难降解的有机污染物的代表,侯红漫等人在每升含有 100mg 的染料和 30000 U 纯化漆酶的反应体系中,经 50℃ 摇床水浴处理,4h 有脱色现象出现,到 12h 脱色反应基本稳定,脱色率达 70%^[11],在本次试验中,利用混合菌群对 KNR 进行脱色,在 24h 时,B6B 的脱色率最高可达 92.32%。

2.4 不同培养基中可培养菌株的丰富度比较

考虑到所筛选的真菌菌群中微生物多样性越高越有利于适应实际废水变化复杂的染料成分,因

此对这 3 种培养基富集的菌群多样性进行了研究。从 A 培养基中分离菌种 16 株,根据菌落形态和菌体显微观察特征可初步划分到水霉科、曲霉科(红曲霉属)、节壶菌科和白粉菌科中,从 B 和 D 培养基中共分离出菌种 5 株,初步分类到酵母科和青霉属

中。由此可见,培养基 A 中可培养菌株的丰富度最好,B 和 D 培养基都较差。A 培养基在组成上最简单,更适应于进一步的反应器研究和实际废水配比实验。

表 2 3 种培养基筛选的菌群在不同染料状况下的产酶 (U/mL)

		M-3BE			酸性红 A			活性艳兰 KNR		
		LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP	LiP	Lac	MnP
培养基 A	A1R	17	-	-	210	-	-	70	-	-
	A2R	20	-	-	180	23	-	-	1055	-
	A5R	-	-	90	72	10	-	90	1910	-
培养基 B	B1R	27	-	-	60	-	-	253	-	-
	B3R	-	-	10	-	-	-	213	-	-
	B6B	-	-	-	240	60	-	227	27	-
培养基 D	D1R	-	-	-	-	16	-	-	2787	-
	D4R	-	-	-	63	3307	-	-	90	-
	D5R	223	-	-	-	-	-	-	-	-
	D6R	-	-	-	-	10	-	-	3940	-
	D7R	-	-	30	-	-	40	-	-	1003

注:LiP 木质素过氧化物酶,MnP 锰依赖过氧化物酶,lac 漆酶,- 表示未测到酶活性

从这些脱色菌群中共分离到的 21 株真菌菌株经研究发现有 8 株具有较高和广泛的脱色性能。相关数据将在另外一篇文章中报道。

参考文献

[1] Safia M , Xama K , Datta M . Dyes and Pigments , 2007 , **74**(3) :723 ~ 729 .
[2] Kapdan I , Kargi F , McMullan G , *et al* . Bioprocess Engineering , 2000 , **22** : 347 ~ 351 .
[3] He F , Hu W , Li Y . Chemosphere , 2004 , **57** :293 ~ 301 .
[4] Chen B , Chen S , Li M , Chang J ,Process Biochemistry , 2006 , **41** : 1574 ~ 1581 .

[5] Yang Q , Yediler A , Yang M , *et al* , Biochemical engineering journal , 2005 , **24** :249 ~ 253 .
[6] 张朝晖 ,夏黎明 ,柯世省 .高校化学工程学报 1999 ,**13**(2) :135 ~ 140 .
[7] 程永前 ,蒋大和 ,陆雍森 .给水排水 2006 ,**32**(3) :52 ~ 55 .
[8] Tien M , Kirk T K . Methods in Enzymology , 1988 , **161** :238 ~ 249 .
[9] 杨晓宽 ,路福平 ,杜连祥 .天津科技大学学报 ,2004 ,**19**(2) :29 ~ 32 .
[10] 堵国成 ,赵政 ,陈坚 .江南大学学报(自然科学版) ,2003 ,**2**(1) :83 ~ 90 .
[11] 侯红漫 ,周集体 ,王竟 ,等 .林产化学与工业 2004 ,**24**(1) :48 ~ 52 .
[12] 肖继波 ,胡勇有 ,应用与环境生物学报 2005 ,**11**(6) :763 ~ 766 .