

研究报告

绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对偶氮染料刚果红的脱色作用

司静¹ 闫志辉² 崔宝凯^{1*} 张忠民³

(1. 北京林业大学 微生物研究所 北京 100083)

(2. 内蒙古锡林郭勒盟草原工作站 内蒙古 锡林浩特 026000)

(3. 济宁学院 山东 济宁 273155)

摘要: 【目的】在无营养条件下, 利用白腐真菌绒毛栓孔菌(*Trametes pubescens*)菌丝体对染料进行脱色可减少试验成本, 提高染料处理的实用性。【方法】将该菌株液体培养的菌丝体在无营养条件下对染料进行脱色, 并对其中脱色效果较好的偶氮染料刚果红的脱色过程进行分析。在此过程中, 测定了该菌株分泌的胞外胞内酶活力, 优化影响因子如初始 pH 值、温度、染料浓度和盐度, 同时利用气相色谱-质谱联用技术分析无营养条件下偶氮染料刚果红的降解产物。植物毒性试验测定刚果红经绒毛栓孔菌菌丝体脱色前后的毒性变化。【结果】菌丝体对偶氮染料刚果红有较好的脱色效果, 在初始 pH 值为 2.0, 温度为 30 °C, 染料浓度为 80 mg/L, 盐度为 2.5% (质量体积比) 时, 150 r/min 转速下培养 7 d 后脱色率可达 80.52%。在此过程中, 菌丝体可被连续使用 2 次, 且其所分泌的酶系可降解染料。此外, 通过气相色谱-质谱联用分析得到刚果红的降解产物为苯胺、联苯胺和叠氮苯。植物毒性试验显示在无营养条件下的绒毛栓孔菌菌丝体对染料有明显的脱毒作用。【结论】研究发现绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下的偶氮染料废水处理中具有广阔的应用前景。

关键词: 绒毛栓孔菌菌丝体, 连续添加染料, 降解产物分析, 植物毒性试验

Decolorization of azo dye Congo Red by *Trametes pubescens* pellets without addition of nutritionSI Jing¹ YAN Zhi-Hui² CUI Bao-Kai^{1*} ZHANG Zhong-Min³

(1. Institute of Microbiology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(2. Grassland Station of Xilinguole League, Inner Mongolia, Xilinhot, Inner Mongolia 026000, China)

(3. Jining University, Jining, Shandong 273155, China)

Abstract: [Objective] White-rot fungus *Trametes pubescens* pellets without addition of nutrition treatment, a novel design, was used to lower the running cost as well as to enhance convenient availability for dye decolorization. [Methods] Liquid cultured pellets of *T. pubescens* were used to

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-11-0585); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. BLYJ201304)

*通讯作者: Tel: 86-10-62336309; ✉: baokaicui2013@gmail.com

收稿日期: 2013-03-06; 接受日期: 2013-04-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-25

decolorize various dyes without addition of nutrition and then the removal process of the azo dye Congo Red with higher decolorization rate was analyzed. During the decolorization process, the extracellular and intracellular enzyme activities were monitored and the impact factors such as initial pH value, temperature, dye concentration and salinity were optimized. Moreover, metabolites of the dye Congo Red degraded by *T. pubescens* pellets without addition of nutrition were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). Phytotoxicity experiment was carried out before and after dye decolorization to assess the toxic nature of the metabolites. **[Results]** The pellets could decolorize azo dye Congo Red. After a 7-day incubation period, the highest dye removal of 80.52% was observed under 150 r/min shaking speed at initial pH 2.0, temperature at 30 °C, dye concentration 80 mg/L and salinity 2.5% (W/V). The pellets performed good persistence in repetitive decolorization operations, as well as high potentials toward the degradation of dye Congo Red which could be attributed to the presence of biotransformation enzymes. Additionally, degraded metabolites were identified as naphthalene amine, biphenyl amine and naphthalene diazonium, as evidenced by GC-MS. Phytotoxicity experiment confirmed that the azo dye Congo Red degraded by *T. pubescens* pellets without addition of nutrition resulted in its detoxification. **[Conclusion]** These findings demonstrate that the *T. pubescens* pellets have potentials for the azo dye effluents treatment applications without addition of nutrition.

Keywords: *Trametes pubescens* pellets, Continuous addition of dye, Degraded metabolites characterization, Phytotoxicity

近年来,合成染料已被广泛应用于纺织、皮革、药物、纸浆造纸、塑料、地毯、印刷、电镀和化妆品制造等多种工业领域^[1]。随着这些工业的飞速发展和生产规模的不断扩大,所排放的工业废水量日益增多,据统计,世界上染料的年产量达到 8×10^6 t,其中至少 10%的染料进入到自然水体中^[2-3]。这些染料废水由于具有水量大、成分复杂、变化大、生化性差、色度、化学需氧量(Chemical oxygen demand, COD)及生物需氧量(Biological oxygen demand, BOD)高等特点,已成为国内外工业废水处理难点之一,因而受到研究者的重视和广泛关注^[4]。染料废水对环境最直接的污染是其色度的污染,水体中即使只含有 1 mg/L 左右浓度的染料就可产生较高的色度,这不仅会影响水体的美观性,还会使水体的透光性和气体溶解度减小,从而阻碍光照的投射,造成自然水体的污染、水生动植物的死亡、生态系统的失衡,直接或间接对人体产生危害^[5]。此外,一些合成染料具有一定的毒性和致癌作用,以最为常见的偶氮染料为例,由于结构中含偶氮键($-N=N-$),与一个或多个芳香环系统($OH-$, NH_2- 或 $SH-$)通过共轭体系连接构成发色团,因而难以被降解,且其

降解产物多为联苯胺等一些致癌的芳香类化合物,被排放到自然水体后,在水体中富集,经过食物链富集进入人体后可引发人类恶性肿瘤,导致膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌等恶性疾病^[6-7]。

目前,对染料色度的脱除主要采用物理化学方法,例如光氧化、电凝法、吸附、反渗透、膜过滤、絮凝、臭氧氧化、深层注射、离子交换、焚烧和有机溶剂提取等,但这些方法存在诸多缺点,例如成本高、效率低、可产生难降解的污染物,并同时造成二次污染等^[8]。生物学方法由于高效稳定,且对环境友好,不产生二次污染,因而受到科学家们的广泛关注,其主要是通过生物降解和生物吸附两方面发挥作用,生物降解是由微生物分泌的胞外氧化酶进行脱色;而生物吸附主要是通过菌丝体的自身结构与染料等大分子物质相契合所致^[9-10]。据报道,已有大量微生物可被应用于染料脱色中,白腐真菌作为微生物中的一大类群,在自然界的物质和能量循环过程中充当着极其重要的分解者角色,而由于可分泌漆酶(Laccase)、过氧化物酶(Lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)等多种胞外酶系及自身结构等特

点,其在染料脱色方面的重要作用也逐渐被发现^[11]。迄今为止,多数文献均集中在优化脱色条件方面,但并未考虑染料废水处理的实际情况,缺乏对极端条件下白腐真菌脱除染料色度的研究^[12]。此外,实际染料废水中通常含一种高浓度的染料或是多种染料的组合,因此寻找一种高效稳定且能够对多种染料均有脱色作用的白腐真菌菌株就显得十分必要^[13]。

绒毛栓孔菌(*Trametes pubescens*)作为一种白腐真菌,是重要的生物资源^[14],前期研究已发现其产漆酶活力较高^[7],且对染料也有较好的脱色效果^[15]。本研究旨在将获得的绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对染料进行脱色,筛选出其中效果相对较好的染料,对其脱色过程中的影响因子进行优化,探索连续添加染料对菌株脱色能力的影响,并对目标染料降解产物进行分析及植物毒性试验,为染料废水的无污染化处理奠定理论基础,同时也为白腐真菌的应用提供一个新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 绒毛栓孔菌(*T. pubescens*)菌株 Cui 7571,采自广东省车八岭自然保护区,现保藏于北京林业大学微生物研究所。

1.1.2 染料: 将供试染料分别配制成 50 mg/L 的溶液,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后避光保存备用。各染料的索引编号、化学分类及最大吸收波长等特性见表 1。

1.1.3 试剂: 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS),Sigma;其它试剂均为分析纯。

1.1.4 培养基: 固体培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, 酵母浸粉 5.00, 琼脂粉 20.00, KH_2PO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, pH 自然, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min,待指温可触时加入终浓度为 0.01 g/L 已过滤除菌的维生素 B1,充分混匀备用。液体培养基(g/L): 葡萄糖 20.00, 酵母浸粉 5.00, KH_2PO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05, pH 自然, 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min,待指温可触时加入终浓度为 0.01 g/L 已过滤除菌的维生素 B1,充分混匀备用。

1.2 方法

1.2.1 活化及培养: 于固体平板培养基上活化, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 6 d 备用。

1.2.2 种子发酵: 取 250 mL 三角瓶分装 100 mL 液体培养基,接种 5 个直径 1 cm 菌饼,于摇床 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 5–6 d。内切式匀浆机将种子发酵菌液制成悬液,充分振荡,以 5% (体积比)的接种量加入含 100 mL 基础产漆酶培养基的 250 mL 三角瓶中,于摇床 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养。

1.2.3 染料脱色作用: 以 5% (体积比)悬液接种量分别加入仅含 100 mL 终浓度为 50 mg/L 不同染料溶液的 250 mL 三角瓶中,于摇床 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 避光振荡培养,7 d 后测定培养基吸光度 A 的变化,设 3 次重复。同等条件下以添加培养基及未接种菌丝体的培养体系分别作为对照。染料脱色率计算方法如下: $T = (A_0 - A_t) \times 100\% / A_0$; 其中, A_0 为对照的吸光度, A_t 为 t d 样品吸光度。通过比较脱色率筛选出脱色效果相对较好的作为目标染料进行以下试验。

1.2.4 连续添加目标染料对菌丝体脱色能力的影响: 以 5% (体积比)悬液接种量加入仅含 100 mL 终浓度为 50 mg/L 目标染料溶液的 250 mL 三角瓶中,于摇床 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 避光振荡培养,7 d 后测定培养基吸光度 A 的变化,设 3 次重复。同时将脱色 7 d 后的菌丝体接种到新的染料溶液中,继续进行脱色试验,每 7 d 一个循环,直至检测不到脱色率,以此探索无营养条件下连续添加染料对绒毛栓孔菌菌丝体脱色能力的影响。脱色率计算方法见 1.2.3。

1.2.5 酶系测定: 将脱色体系于第 3 天收集培养液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min,所得上清液用于测定脱色过程中绒毛栓孔菌菌丝体所分泌的胞外酶活性变化。同时将所得菌丝体经去离子水洗涤 5 次,研钵研碎,收集后加入少量 50 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(pH 7.4),4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却匀浆,12 000 r/min 离心 30 min,所得上清液即用于

测定其胞内酶活性变化。3.0 mL 反应体系中, 含 1.0 mmol/L ABTS、50 μ L 上清液和 0.1 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 5.0), 室温下反应 3 min 后, 于 420 nm 处测定吸光度, 用以测定漆酶的活性^[16]。2.5 mL 反应体系中含 100 mmol/L 正丙醇、250 mmol/L 酒石酸、10 mmol/L H_2O_2 和 50 μ L 上清液, 室温下反应 3 min 后, 于 300 nm 处测定吸光度, 用以测定木素过氧化物酶的活性^[17]。3.0 mL 反应体系中, 含 50 mmol/L 邻苯二酚、2.1 mmol/L 抗坏血酸、50 μ L 上清液和 50 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(pH 7.4), 室温下反应 3 min 后, 于 265 nm 处测定吸光度, 用以测定酪氨酸酶的活性^[18]。5.0 mL 反应体系中含 50 μ mol/L 二氯酚靛酚(Dichlorodiiisopropylether, DCIP)、50 μ mol/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine diuncleotide hydrogen, NADH)、0.1 mL 上清液和 50 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(pH 7.4), 室温下反应 3 min 后, 于 595 nm 处测定吸光度, 用以测定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-二氯酚靛酚(Nicotinamide aenine diuncleotide hydrogen-dichlorodiiisopropylether, NADH-DCIP)还原酶的活性^[19]。2.5 mL 反应体系中含 1 mmol/L $MnSO_4$ 、10 mmol/L H_2O_2 、50 μ L 上清液和 50 μ mol/L 酒石酸钠缓冲液(pH 4.5), 室温下反应 3 min 后, 于 238 nm 处测定吸光度, 用以测定锰过氧化物酶的活性^[20]。定义 1 min 内催化氧化 1 μ mol 底物所需的酶量为 1 个酶活力单位(IU)。

1.2.6 目标染料脱色过程中影响因子的优化:依次对无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体对目标染料脱色过程中的影响因子: 初始 pH 值(1.0–10.0)、温度(15–50 $^{\circ}C$)、染料浓度(10–500 mg/L)和盐度(NaCl 0.5%–5.0%, 质量体积比)进行优化, 于摇床 28 $^{\circ}C$ 、150 r/min 避光振荡培养, 7 d 后测定培养基吸光度 A 的变化, 设 3 次重复。脱色反应体系及脱色率计算方法见 1.2.3。

1.2.7 目标染料降解产物分析:目标染料完全脱色后, 经抽滤得到培养液, 利用与培养液相同体积的

乙酸乙酯重复 3 次萃取染料降解产物, 随后加入适量无水硫酸钠进行干燥, 过滤后在旋转蒸发器中减压挥发至干。为确定在无营养条件下经绒毛栓孔菌作用的目标染料降解产物, 将样品溶于 2.0 mL 色谱甲醇用于气相色谱-质谱联用分析(Gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS)。气相色谱分析条件: PE-5MS 毛细管色谱柱, 柱箱初始温度为 80 $^{\circ}C$, 保持 2 min 后, 以 10 $^{\circ}C/min$ 的速率升温至 150 $^{\circ}C$, 然后再以 25 $^{\circ}C/min$ 的速率升温至 280 $^{\circ}C$, 最后保持 7 min, 程序总运行时间为 18 min。载气为高纯氦气(纯度为 99.999%以上), 流量为 1.0 mL/min。进样口温度为 280 $^{\circ}C$, 手动进样, 进样量为 1.0 μ L, 分流比为 20:1; 质谱分析条件: 传输线温度为 280 $^{\circ}C$; 电子轰击(EI)方式电离; 电离能量为 70 eV; 倍增电压为 470 V; 离子源温度为 250 $^{\circ}C$; 溶剂延迟 2.3 min; 扫描方式: 质量扫描范围为 15–300 amu; SIM 扫描方式定量。

1.2.8 目标染料及其降解产物和经菌处理的染料溶液的植物毒性试验:目标染料完全脱色后, 抽滤得到经菌处理的染料溶液以进行植物毒性试验; 同时将乙酸乙酯提取的目标染料降解产物干燥并溶解于 50 mL 去离子水中, 使其终浓度达到 80 mg/L 进行植物毒性试验。利用常见种子菜豆(*Phaseolus mungo*)、高粱(*Sorghum vulgare*)和小麦(*Triticum aestivum*)为材料, 每天分别用 5.0 mL 溶液浇灌以保持种子萌发所需要的湿度, 以去离子水和染料溶液处理作为对照。将种子于室温下萌发, 7 d 后测定种子的萌发率(%)、胚芽、胚根生长状况及长度(cm)。

1.2.9 数据分析:所得结果以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。利用 SPSS 18.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA)、 t 检验和 LSD 检验, ** $P < 0.05$ 和 * $P < 0.01$ 分别为差异显著和差异极显著。

2 结果与分析

2.1 绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对染料的脱色作用

绒毛栓孔菌作为一种常见的白腐真菌, 在本研究中被应用于不同染料的脱色试验中, 结果如表 1

所示。在无营养条件下, 由于其所分泌的多种酶系及菌丝体自身对染料的吸附作用, 使得绒毛栓孔菌菌丝体对 12 种结构不同的染料均具有较好的脱色效果。其中, 尤其以对偶氮染料刚果红的脱色效果最佳, 培养 7 d 后脱色率可达到 73.83%, 是噻嗪染料亚甲基蓝脱色率的 3.78 倍, 因此选取刚果红作为目标染料进行以下试验。

此外, 与添加培养基条件下所得到的脱色率相比, 未添加培养基并未明显减弱绒毛栓孔菌对染料的脱色效果, 脱色率并没有大幅度降低, 说明在无营养条件下利用白腐真菌绒毛栓孔菌对合成染料进行脱色的处理方式具有一定的可行性, 可减少培养基成本, 提高染料处理的实用性。

2.2 连续添加偶氮染料刚果红对菌丝体脱色能力的影响

将已进行过染料脱色的菌丝体连续使用, 发现绒毛栓孔菌菌丝体对刚果红仍有较好的脱色效果,

结果见表 2, 说明菌丝体在无营养条件下吸附饱和后仍能够再生, 可继续使染料脱色, 反复使用后菌丝体由白变红至褐色后逐渐褪色, 且生长代谢能力显著下降, 出现退化现象等。3 次催化偶氮染料刚果红脱色的培养阶段均在 7 d 内呈上升趋势, 到第 7 天时脱色率分别达 73.83%、36.48%和 9.74%, 综合脱色效果等因素考虑确定, 无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体在对染料刚果红的脱色过程中可被连续使用 2 次。

2.3 酶系测定

在无营养条件下, 绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红的脱色过程中可检测到多种酶类, 如漆酶、木素过氧化物酶、锰过氧化物酶、酪氨酸酶和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-二氯酚靛酚还原酶等^[21]。如表 3 所示, 在培养体系中添加与不添加染料使得胞内、胞外酶活存在显著差异, 说明染料可能是诱导绒毛栓孔菌菌丝体分泌酶系的重要因素之一^[22]。

表 1 绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对不同染料的脱色作用					
Table 1 Decolorization of various dyes by <i>T. pubescens</i> pellets without addition of nutrition					
染料 Dye	索引编号 Color index number	化学分类 Chemical class	最大吸收波长 Wavelength (nm)	脱色率 Decolorization rate (%)	
				未添加培养基 Without addition of media	添加培养基 With addition of media
活性艳蓝 X-BR Reactive Brilliant Blue X-BR	61205	蒽醌类	603	47.16±2.36	44.13±1.54
分散蓝 B Disperse Blue B	61500	蒽醌类	640	42.33±2.10	46.15±2.31
刚果红 Congo Red	22120	偶氮类	497	73.83±1.87	73.34±1.67
甲基红 Methyl Red	13020	偶氮类	523	67.71±1.55	62.23±1.48
苏丹黑 B Sudan Black B	26150	偶氮类	498	65.23±1.63	68.32±2.04
台盼蓝 Trypan Blue	23850	偶氮类	607	66.62±2.54	67.28±1.38
中性红 Neutral Red	50040	杂环类	553	60.31±3.05	69.84±1.57
亚甲基蓝 Methylene Blue	52015	噻嗪类	661	19.54±1.84	14.21±2.45
结晶紫 Crystal Violet	42555	三苯甲烷类	595	55.34±1.57	65.20±2.48
乙基紫 Ethyl Violet	42600	三苯甲烷类	596	57.16±1.84	59.92±3.02
维多利亚蓝 B Victoria Blue B	44045	三苯甲烷类	599	50.20±1.29	53.45±1.68
亮绿 Brilliant Green	42040	三苯甲烷类	623	51.48±1.84	57.12±1.45

注: 结果以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示。
Note: Each value is the mean value \pm standard error mean of triplicate.

表 2 无营养条件下连续添加偶氮染料刚果红对绒毛栓孔菌菌丝体脱色能力的影响							
Table 2 Influence of continuous addition of azo dye Congo Red on the decolorization capacity of <i>T. pubescens</i> pellets without addition of nutrition							
循环周期 Cycle	染料脱色率 Decolorization rate (%)						
	1 th day	2 th day	3 th day	4 th day	5 th day	6 th day	7 th day
1	13.20±3.54 [*]	25.61±3.65	30.24±2.11 ^{**}	52.47±2.64 ^{**}	60.37±2.15 ^{**}	68.35±2.55 [*]	73.83±3.31 ^{**}
2	6.61±2.21	10.54±2.74 [*]	15.34±1.10 ^{**}	30.46±3.04 ^{**}	34.27±2.14	35.37±1.26 [*]	36.48±3.34 ^{**}
3	3.54±3.04	4.58±2.57	5.34±3.54 [*]	6.45±2.68 [*]	8.37±3.14 ^{**}	9.35±2.57	9.74±1.78 ^{**}

注：结果以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示。^{*} $P < 0.05$ ：差异显著；^{**} $P < 0.01$ ：差异极显著。
Note: Each value is the mean value \pm standard error mean of triplicate. The P value less than 0.05 indicates significantly different; The P value less than 0.01 indicates utmost significantly different.

表 3 无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红脱色第 3 天时测定的胞内胞外酶活变化				
Table 3 Extracellular and intracellular enzymes activities monitored during the decolorization process of azo dye Congo Red by <i>T. pubescens</i> pellets without addition of nutrition after a 3-day incubation period				
酶系 Enzymes	对照 Control		脱色后 After decolorization	
	胞外 Extracellular	胞内 Intracellular	胞外 Extracellular	胞内 Intracellular
漆酶 Laccase (U/mL)	5.64±0.25 ^{**}	1.05±0.07	13.84±0.22 ^{**}	7.64±0.13 ^{**}
木素过氧化物酶 Lignin peroxidase (U/mL)	3.55±0.17 [*]	0.86±0.09 ^{**}	9.56±0.51	3.60±0.04 ^{**}
锰过氧化物酶 Manganese peroxidase (U/mL)	0.57±0.06 [*]	0.57±0.21 [*]	3.98±0.31 ^{**}	—
酪氨酸酶 Tyrosinase (U/mL)	1.78±0.51	0.68±0.18 [*]	11.64±0.08 ^{**}	2.87±0.08 ^{**}
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-二氯酚靛酚还原酶 NADH-DCIP reductase (U/mL)	3.10±0.34	—	7.17±0.57	2.04±0.74 [*]

注：结果以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示。^{*} $P < 0.05$ ：差异显著；^{**} $P < 0.01$ ：差异极显著。
Note: Each value is the mean value \pm standard error mean of triplicate. The P value less than 0.05 indicates significantly different; The P value less than 0.01 indicates utmost significantly different.

2.4 偶氮染料刚果红脱色过程中影响因子的优化

2.4.1 初始 pH 值：在无营养条件下，利用绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红进行脱色，探索初始 pH 对此过程的影响，结果如图 1A 所示。在初始 pH 值为 1.0–6.0 范围内，绒毛栓孔菌对偶氮染料刚果红的脱色效果较好，尤其当 pH 值为 2.0 时，培养 7 d 后染料脱色率可达 74.51%。说明在偏酸性的条件下进行染料脱色可得到相对较高的脱色率，这可能是由于酸性环境使得带负电荷的染料与带正电荷的菌丝体细胞壁之间的静电力增强，进而使得染料的脱色率上升^[23]。而当初始 pH 值在 7.0–10.0 范围内，无营养条件下偶氮染料刚果红的脱色率明显下降。由于最大脱色率在初始 pH 值为

2.0 处获得，因此以下试验均采用初始 pH 2.0。
2.4.2 温度：菌丝体生长需要一个限定的温度范围，但这与其代谢特性的展现和化合物的形成所需的温度又可能不尽相同^[24-25]。在无营养条件下，利用绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红进行脱色，探索温度对此过程的影响，结果如图 1B 所示。温度在 20–40 °C 范围内，染料脱色率均维持在 60% 以上，尤其当温度为 30 °C 时无营养条件下的绒毛栓孔菌菌丝体对染料刚果红的脱色效果最佳，脱色率可达 75.14%。当温度低于 20 °C 或高于 40 °C 时，染料脱色率迅速下降，尤其当温度为 10 °C 时脱色率仅为 21.51%，这可能是由于较低温度使得菌丝体的代谢能力停滞，分泌酶系减少，进而使得

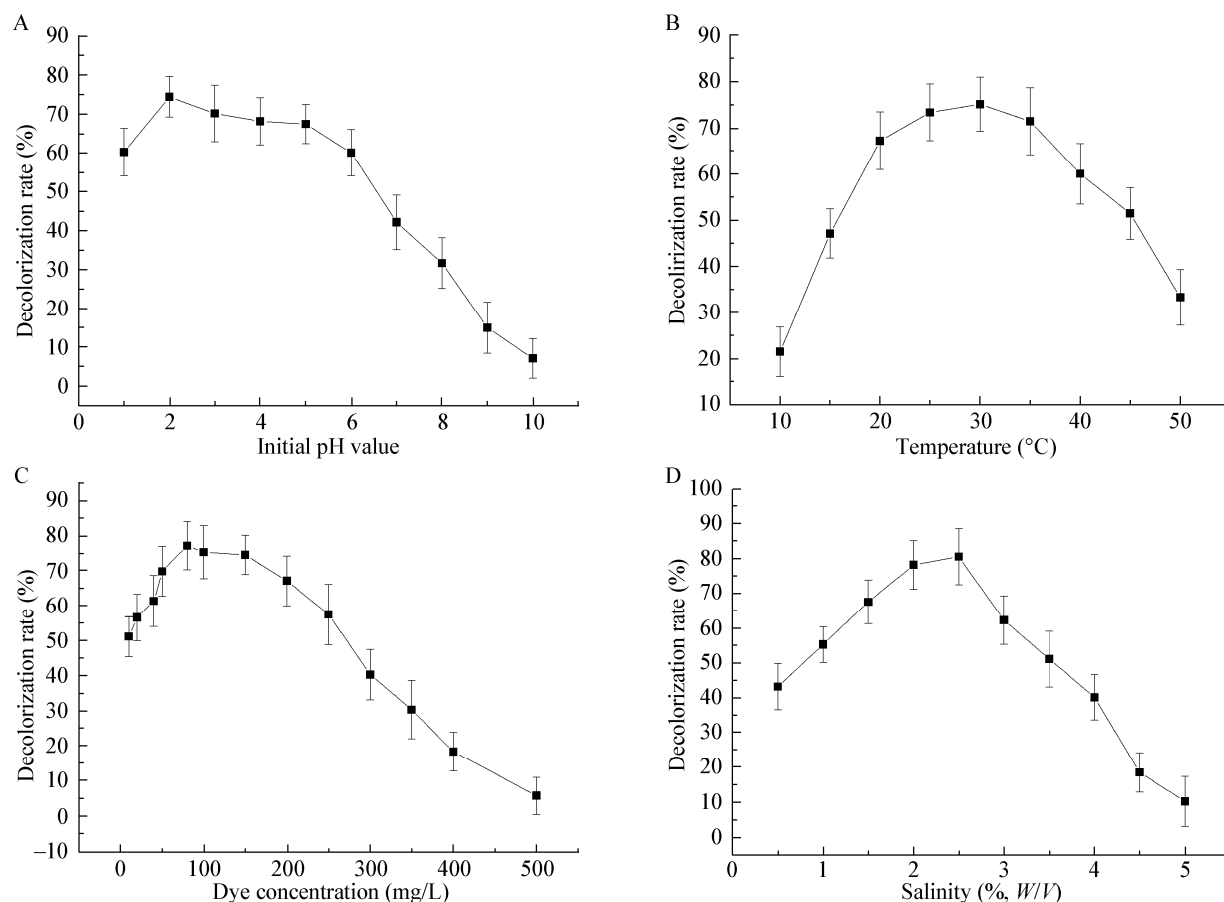


图1 无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红脱色过程中影响因子的优化

Figure 1 Optimization of impact factors during the decolorization process of azo dye Congo Red by *T. pubescens* pellets without addition of nutrition

注: A: 初始 pH 值; B: 温度; C: 染料浓度; D: 盐度。

Note: A: Initial pH value; B: Temperature; C: Dye concentration; D: Salinity.

其对染料的脱色能力下降。因此以下试验所需温度均采取 30 °C。

2.4.3 染料浓度: 为探索无营养条件下的绒毛栓孔菌菌丝体对染料刚果红的耐受力 and 适应性, 对浓度为 10–500 mg/L 的刚果红进行了摇床培养脱色试验。结果如图 1C 所示, 随着染料浓度的不断上升, 其脱色率也不断增大, 当浓度为 80 mg/L 时, 染料脱色率可达 77.14%, 说明绒毛栓孔菌菌丝体具备处理高浓度偶氮类染料的能力。但超过 250 mg/L 后, 脱色率随着染料浓度的增大呈迅速递减趋势, 尤其当染料浓度为 500 mg/L 时, 染料脱色率仅为 5.71%, 说明较高浓度的染料超过了东

方栓孔菌菌丝体的承受负荷限度, 对染料的脱色效果反而起抑制作用^[26]。因此以下试验染料浓度均采取 80 mg/L。

2.4.4 盐度: 当初始 pH 值为 2.0、温度为 30 °C、染料浓度为 80 mg/L 时, 探索盐度 (NaCl 0.5%–5.0%, 质量体积比) 对无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体催化染料脱色能力的影响, 结果见图 1D。当盐度在 1.5%–2.5% (NaCl, 质量体积比) 范围内, 脱色率迅速上升, 最佳盐度为 2.5% (质量体积比), 此时染料脱色率为 80.52%。这可能是由于添加一定浓度的 NaCl 使得颗粒状菌丝体的直径减小, 吸附表面积增大, 同时盐的离子效应又使得染

料的溶解度减小,进而促进菌丝体对染料刚果红的脱色作用^[27]。而当盐度高于 2.5% (质量体积比)时,染料的脱色率迅速下降,这是由于过高的盐度会影响菌丝体颗粒表面的活性张力,进而影响其催化染料脱色的能力^[28]。

上述结果表明,初始 pH 值、温度、染料浓度和盐度等因子在无营养条件下的绒毛栓孔菌菌丝体催化染料刚果红脱色的过程中起着十分重要的作用,而此过程中既涉及菌丝体细胞壁的生物吸附作用,又与所分泌胞内及胞外酶系的生物降解作用密切相关。

2.5 偶氮染料刚果红降解产物分析

通过有机溶剂萃取和气相色谱-质谱联用分析得到,无营养条件下,绒毛栓孔菌菌丝体降解偶氮染料刚果红过程中所形成的代谢产物可以确定为萘胺(分子量 143,中波 143,保留时间 18.75 min,区域 12.23%)、联苯胺(分子量 169,中波 169,保留时间 14.20 min,区域 2.31%)和叠氮萘(分子量 156,中波 156,保留时间 20.34 min,区域 9.87%)。当存在酶激活染料分子的活性位点时,偶氮染料可以对称或不对称地进行共价键断裂^[22],他们代表了一个完整的共价电子系统,具有类似于木质素类的结构,为依赖于酶的激发态提供了充足的进入位点,进而使得染料化学键断裂,完成整个分子的降解过程^[29-30]。

2.6 偶氮染料刚果红及其降解产物和经菌处理的染料溶液的植物毒性试验

未经处理的染料废水可以引起十分严重的环境与健康问题,因此本研究对偶氮染料刚果红降解前后进行了植物毒性试验,为能够更好地利用水资源提供相应的理论依据。结果如表 4 所示,对照组去离子水、染料刚果红溶液、其脱色降解产物及经菌处理的染料溶液对菜豆、高粱和小麦种子进行浇灌后,种子萌发率(%)具有明显差异,3 种种子用去离子水、降解产物及经菌处理的染料溶液进行浇灌后种子萌发率均为 100%,但用未降解的染料刚果红溶液进行浇灌后种子的萌发率分别为 70%、

75%和 70%,说明未降解的染料溶液(80 mg/L)对种子的萌发率起到一定的抑制作用,而降解后的染料溶液毒性明显下降,不会对萌发率产生明显影响。4 种溶液浇灌种子萌发后的胚根、胚芽生长状况和长度(cm)也有明显区别,与对照组相比,未降解的染料刚果红溶液(80 mg/L)明显抑制了胚根和胚芽的生长,而经菌降解后的染料溶液及其产物处理得到的种子各部分长度数据均明显高于未降解溶液处理,且结果与对照组去离子水所得到的数据相近,表明白腐真菌绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红具有一定的脱毒作用。

3 讨论

目前,不同化学结构的染料常被混合应用于纺织制造业,以至于所排放的染料废水成分较为复杂^[31]。本研究中,绒毛栓孔菌菌丝体在无营养条件下对 12 种结构不同的染料均具有较好的脱色效果,说明该菌株具备对染料脱色的广谱适用性^[32]。此外,不添加培养基的这种处理方法可以有效地减少操作费用,提高染料脱色的便利实效性。

通过无营养条件下进行脱色试验发现,绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮染料刚果红的脱色效果最佳,且在此过程中胞内胞外酶活均高于未添加染料的培养体系,这是由于染料的添加诱导了菌丝体酶系的分泌,进而促进染料的脱色作用^[22]。同时,探索了连续添加染料对菌丝体脱色能力的影响,试验结果证明,绒毛栓孔菌菌丝体吸附饱和后仍可再生,且可被连续使用 2 次,这也从另一方面说明菌丝体的生物吸附与降解是两个独立而又相关的过程^[3,33]。

初始 pH 可显著影响整个染料脱色的过程,染料脱色程度与菌丝体对染料的摄取能力高低及所分泌的酶系活性大小密切相关,而此过程需要较为合适的 pH 以达到吸附和矿化染料的目的^[34]。本研究中,初始 pH 为 2.0 时染料刚果红的脱色率最高,说明酸性环境会使得菌丝体细胞壁的氢离子数量增加,与染料的相互作用力增大,从而提高染料的

表 4 偶氮染料刚果红及其在无营养条件下经绒毛柱孔菌丝体作用后所形成的降解产物对植物的毒性
Table 4 Phytotoxicity of azo dye Congo Red and its metabolites formed after degradation by *T. pubescens* pellets without addition of nutrition

参数 Parameters	菜豆 <i>P. mungo</i>				高粱 <i>S. vulgare</i>				小麦 <i>T. aestivum</i>			
	去离子水 Deionized water		降解产物 Metabolites		去离子水 Deionized water		降解产物 Metabolites		去离子水 Deionized water		降解产物 Metabolites	
	100	70	100	100	100	100	75	100	100	100	70	100
萌发率 Germination (%)	100	70	100	100	100	100	75	100	100	100	70	100
胚芽 Plumule (cm)	16.58±0.55**	6.24±0.33**	15.35±1.13*	15.07±1.31**	14.55±1.14**	7.02±0.21*	11.78±0.67**	11.64±0.54*	18.22±0.45**	7.34±0.68**	16.34±0.18**	16.05±0.21*
胚根 Radicle (cm)	3.12±0.10**	0.93±0.01*	2.43±0.15**	2.23±0.17**	7.56±0.08**	3.17±0.16**	5.94±0.56**	5.86±0.24**	3.47±0.23**	1.25±0.12**	2.97±0.16*	2.84±0.31**

脱色率^[35]。Aksu 和 Tezer (2000)研究发现, 染料的脱色是一个菌丝体进行物理吸附及生物降解的过程, 而温度的变化既可以引起菌丝体细胞壁表面发生物理变化, 又可以影响所分泌酶系的活性和稳定性^[36]。因此, 温度是一个影响染料脱色至关重要的因素, 本研究最佳温度为 30 °C。此外, 无营养条件下绒毛栓孔菌菌丝体催化染料脱色的过程中, 最佳染料浓度为 80 mg/L, 能够耐受浓度为 250 mg/L, 可见相对较高的染料浓度可以提高其脱色率, 这可能是由于高浓度染料可制造酸性环境, 激发真菌菌丝体的代谢性能^[37], 或者在脱色过程中将染料作为碳氮源加以利用^[38-39]。实际印染废水的盐度一般也较高, 而添加浓度为 2.5% (质量体积比) 的 NaCl 溶液, 反而促进了绒毛栓孔菌菌丝体对刚果红的脱色作用, 这一耐盐性能恰好可应用于实际脱色工艺中, 为染料废水的处理和回收提供了一种新型菌株^[40-41]。

由于大量酶系存在于微生物的微粒体及细胞质基质中, 使得其对染料具有显著的降解作用^[30,42]。对刚果红及其降解产物和经菌处理的染料溶液进行了植物毒性试验发现, 经菌丝体降解后的产物及染料溶液对植物的毒性大大降低, 说明白腐真菌绒毛栓孔菌菌丝体对偶氮刚果红具有一定的脱毒作用, 在处理染料废水中具有较高的应用价值和广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Hu Q, Xu Z, Qiao S, et al. A novel color removal adsorbent from heterocoagulation of cationic and anionic clays[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 308: 191-199.
- [2] Robinson T, McMullan G, Marchant R, et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative[J]. Bioresource Technology, 2001, 77: 247-255.
- [3] 司静, 崔宝凯, 贺帅, 等. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 736-741.
- [4] Kalpana D, Shim JH, Oh BT, et al. Bioremediation of the heavy metal complex dye Isolan Dark Blue 2SGL-01 by white rot fungus *Irpex lacteus*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 198: 198-205.
- [5] 韩国民, 何兴兵, 张鹏, 等. 多孔菌 *Trichaptum abietinum* 1302BG 自然条件下对合成染料刚果红和酸性品红的高效降解[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 147-151.
- [6] Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review[J]. Dyes and Pigments, 2003, 58: 179-196.
- [7] Si J, Cui BK, Dai YC. Decolorization of chemically different dyes by white-rot fungi in submerged cultures[J]. Annals of Microbiology, 2013, 63: 1099-1108.
- [8] Novotný Č, Svobodová K, Kasinath A, et al. Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2004, 54: 215-223.
- [9] Yang X, Wang J, Zhao X, et al. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 10536-10541.
- [10] 陈琼华, 周玉萍, 杨桃芳, 等. 灵芝漆酶催化直接耐晒翠蓝 GL 脱色条件的优化[J]. 微生物学通报, 2009, 36(12): 1812-1817.
- [11] Gomaa OM, Linz JE, Reddy CA. Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24: 2349-2356.
- [12] Anastasi A, Spina F, Prigione V, et al. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 3067-3075.
- [13] Grassi E, Scodeller P, Filiel N, et al. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65: 635-643.
- [14] 戴玉成, 杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 801-824.
- [15] 司静, 崔宝凯. 东方栓孔菌在染料脱色中的应用及其脱色条件的优化[J]. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(1): 70-77.
- [16] 司静, 崔宝凯, 戴玉成. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 405-416.
- [17] Kalyani DC, Patil PS, Jadhav JP, et al. Biodegradation of reactive textile dye Red BL1 by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 4635-4641.
- [18] Kandaswami C, Vaidyanathan CS. Oxidation of catechol in plants. IV. Purification and properties of the 3,4,3',4'-tetrahydroxydiphenyl-forming enzyme system from *Tecoma* leaves[J]. Journal of Biological Chemistry, 1973, 248: 4035-4039.
- [19] Salokhe MD, Govindwar SP. Effect of carbon source on the biotransformation enzymes in *Serratia marcescens*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999, 15: 259-263.
- [20] Hatvani N, Mecs I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process[J]. Process

- Biochemistry, 2001, 37: 491-496.
- [21] Enayatizamir N, Tabandeh F, Rodríguez-Couto S, et al. Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 10359-10362.
- [22] Kalme SD, Ghodake G, Govindwar S. Red HE7B degradation using desulfonation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 60: 327-333.
- [23] Chiou MS, Chuang GS. Competitive adsorption of dye metanil yellow and RB15 in acid solutions on chemically cross-linked chitosan beads[J]. Chemosphere, 2006, 62: 731-740.
- [24] Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, et al. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*[J]. Water Research, 2002, 36: 1449-1456.
- [25] Masud Hossain SK, Anantharaman N. Activity enhancement of ligninolytic enzymes of *Trametes versicolor* with bagasse powder[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(2): 189-194.
- [26] Kousha M, Daneshvar E, Sohrabi MS, et al. Adsorption of acid orange II dye by raw and chemically modified brown macroalga *Stoechospermum marginatum*[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 192: 67-76.
- [27] Gopinath KP, Kathiravan MN, Srinivasan R, et al. Evaluation and elimination of inhibitory effects of salts and heavy metal ions on biodegradation of Congo red by *Pseudomonas* sp. mutant[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 3687-3693.
- [28] Enaud E, Trovaslet M, Naveau F, et al. Laccase chloride inhibition reduction by an anthraquinonic substrate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 49: 517-525.
- [29] Goszczynski S, Paszczynski A, Pasti-Grigsby MB, et al. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176: 1339-1347.
- [30] Dawkar VV, Jadhav UU, Jadhav SU, et al. Biodegradation of disperse textile dye Brown 3REL by newly isolated *Bacillus* sp. VUS[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105: 14-24.
- [31] Sulaymon AH, Abbood DW, Ali AH. Competitive biosorption of phenol and lead from synthetic wastewater onto live and dead microorganisms[J]. Desalination and Water Treatment, 2012, 45: 331-342.
- [32] Anastasi A, Prigione V, Varese GC. Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 177: 260-267.
- [33] Pathak H, Patel S, Rathod M, et al. *In vitro* studies on degradation of synthetic dye mixture by *Comamonas* sp. VS-MH2 and evaluation of its efficacy using simulated microcosm[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 10391-10400.
- [34] Rojek K, Roddick FA, Parkinson A. Decolorization of natural organic matter by *Phanerochaete chrysosporium*: the effect of environmental conditions[J]. Water Science and Technology: Water Supply, 2004, 4: 175-182.
- [35] Ly J, Lawen A. Transplasma membrane electron transport: enzymes involved and biological function[J]. Redox Reports, 2003, 8(1): 3-21.
- [36] Aksu Z, Tezer S. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature[J]. Process Biochemistry, 2000, 36: 431-439.
- [37] Arora DS, Chander M. Decolorization of diverse industrial dyes by some *Phlebia* spp. and their comparison with *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44: 331-338.
- [38] Wu J, Li L, Du H, et al. Biodegradation of leuco derivatives of triphenylmethane dyes by *Sphingomonas* sp. CM9[J]. Biodegradation, 2011, 22: 897-904.
- [39] Mansur M, Arias ME, Copa-Patiño JL, et al. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities[J]. Mycologia, 2003, 95(6): 1013-1020.
- [40] Fang ZM, Li TL, Chang F, et al. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability[J]. Bioresource Technology, 2012, 111: 36-41.
- [41] Fang ZM, Li TL, Wang Q, et al. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 1103-1110.
- [42] Jadhav JP, Kalyani DC, Telke AA, et al. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 165-173.