

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

韩国民^{1,2} 何兴兵³ 张鹏¹ 陈展慧¹ 王从彦¹ 田兴军^{1*}

(1. 南京大学生命科学学院 江苏 南京 210093)

(2. 南京大学地球科学与工程学院 江苏 南京 210093)

(3. 吉首大学生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000)

摘要: 选用杭州竹林土壤分离并筛选能够降解多种类型染料的真菌。经大量筛选发现一株编号为 1302BG 的真菌能够在固体培养基上分解所测试的全部 9 种染料(苯胺蓝、刚果红、橙黄 G、甲基红、甲基橙、结晶紫、酸性品红、番红花红、碱性品红、甲基紫)。经形态学和分子生物学方法鉴定, 该菌 1302BG 为冷杉附毛孔菌(*Trichaptum abietinum*)。在液体培养基中研究了 pH、温度、碳源、氮源、碳氮源组合、碳氮源浓度等参数对该菌脱色效果的影响, 以寻找最适最经济的脱色条件。在液体培养基中研究表明, 冷杉附毛孔菌 1302BG 既能在酸性又能在碱性条件下有效分解 2 种测试染料(酸性品红和刚果红)。该真菌能以仅含有 0.5 g/L 淀粉和 0.05 g/L 硫酸铵的经济、环境友好的培养基为底物, 能在灭菌和非灭菌(自然)的条件下高效脱色, 在 24 h 内对 2 种染料的脱色率均在 90% 以上。紫外/可见光谱及微核试验分析显示, 该菌脱色主要是以生物降解为主, 2 种染料经该菌分解后的毒性也同时大大降低。这些优异特点显示了该菌具有非常广阔的工业染料废水处理应用潜力。

关键词: 冷杉附毛孔菌, 非灭菌, 脱色, 刚果红, 酸性品红

Efficient degradation of polyporus fungus *Trichaptum abietinum* 1302BG on the synthetic dyes congo red and fuchsin acid under non-sterile condition

HAN Guo-Min^{1,2} HE Xing-Bing³ ZHANG Peng¹ CHEN Zhan-Hui¹
WANG Cong-Yan¹ TIAN Xing-Jun^{1*}

(1. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

(2. School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30870419, 40971151); 南京大学博士后启动基金项目(No. 0208003100)

* 通讯作者: Tel: 86-25-83686787; E-mail: tianxj@nju.edu.cn

收稿日期: 2010-11-10; 接受日期: 2010-12-27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(3. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

Abstract: Soil samples collected from bamboo agroforestry fields in Hangzhou, China, were studied for screening and isolation of fungal strains capable of degradation of structurally different dyes. Among all isolates, an isolate (1302BG) could decolorize all of the 9 tested dyes (Aniline blue, Congo red, Orange G, Methyl red, Methyl orange, Crystal violet, Fuchsin acid, Safranin T, Fuchsin basic, and Methyl violet) on the solid agar plates. The isolate was identified as *Trichaptum abietinum* by morphological and molecular methods. Different parameters such as pH, temperature, carbon source, nitrogen source, co-effect of carbon and nitrogen source, and carbon/nitrogen regimes were used to find an inexpensive medium for *Trichaptum abietinum* 1302BG to decolorize. The results showed that the strain was very efficient at decolorizing the two tested dyes (Congo red and Fuchsin acid) in both acid and basic conditions. The inexpensive and environment-friendly medium contained 0.5 g/L starch and 0.05 g/L ammonium sulfate and could decolorize the two dyes over 90% after 24 hours incubation under both sterile and non-sterile (nature) conditions. The UV-vis absorption spectrum indicated that the decolorization by this fungus should be attributed to biodegradation. A great decrease in toxicity after the decolorization of Congo red and Fuchsin acid was observed by micronucleus tests. The results suggest that *Trichaptum abietinum* 1302BG is a highly promising fungus for the treatment of industrial dye effluents.

Keywords: *Trichaptum abietinum*, Non-sterile, Decolorization, Congo red, Fuchsin acid

人工合成的染料都能够抵抗光、水、许多化合物和生物攻击,很难被常规污水处理系统中的微生物所分解。如果印染废水不加以处理就直接排放到河流,势必造成严重的环境污染。许多物理和化学方法虽然可以从废水中去除染料,效果较好,但是,这些方法价格昂贵、需要耗费大量的能源、并且常常产生一些有毒的分解产物等,从而大大限制了这些方法在工业印染废水处理中的实际应用。生物学方法去除染料颜色跟物理化学方法相比,有许多优势,比如:成本低、生态友好等^[1]。近年来,陆续报道了一些细菌、真菌能够去除不同种类染料的颜色^[2-5]。细菌在无氧的条件下脱色通常只能去除一种类型的偶氮染料,同时又常常产生有害的一些分解产物。这些不利因素限制了细菌在处理混合种类染料工业废水中的应用。因此,越来越多的研究人员把注意力投向了真菌脱色研究^[6-8]。

近几十年,许多研究报道了一些真菌具有良好的脱色能力,比如:黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium*、云芝 *Trametes versicolor* 等^[9-10]。但这些真菌的良好脱色能力是在培养基营养丰富且经灭菌预处理的条件下取得的。如果对染料废水进行

灭菌预处理,就需要购置一些贵重的设备,同时消耗大量的能源,这些不利因素就限制了目前生物学方法在染料工业废水脱色中的应用^[11]。现已有报道对非灭菌条件下的真菌脱色进行了一些探索性的研究,认为污染微生物主要以细菌、酵母为主,这些主要污染微生物的存在极大地影响了染料分解真菌的脱色能力^[12],并提出了抑制污染微生物生长的方法,如:将 pH 值调整到 3 以下、将真菌固定化、调节 C/N 比等^[12-16]。已有的解决方法虽然能部分克服其它微生物污染造成的真菌脱色能力下降问题,但是,离实际应用仍然相差甚远。如果某种真菌能够高效降解多种类型的染料,而且能在非灭菌的、价格低廉的培养条件下生长脱色,具有这些优良特性的真菌如果用于工业印染废水的处理,无疑会大大降低处理成本。本研究以覆盖管理多年的竹林土壤中分离的冷杉附毛孔菌为研究对象,研究其对染料降解的特性及其应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:染料及其它试剂均为国产分析纯,配

制 1 g/L 的刚果红与酸性品红溶液置于 4 °C 冰箱中储存备用。

1.1.2 真菌分离材料: 利用自封袋收集杭州临安经覆盖方法管理二十余年的雷竹表层土壤(0–20 cm), 带回实验室于 4 °C 保藏待用。

1.1.3 脱色液体培养基: 培养基 I (Kirk 基础培养基)^[17](g/L): 葡萄糖 5, 酒石酸铵 0.2, KH₂PO₄ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCl₂ 0.01, 硫胺素 0.001, 10% 吐温-80 10 mL, 黎芦醇 0.23 mL, 10 mL 微量元素溶液。微量元素溶液组成如下(g/L): CuSO₄·7H₂O 0.08, H₂MoO₄ 0.05, MnSO₄·4H₂O 0.07, ZnSO₄·7H₂O 0.43, Fe₂(SO₄)₃ 0.05。

培养基 II: 不含黎芦醇, 其它成分同培养基 I。

培养基 III: 仅含有培养基 I 成分中的碳源和氮源, 即葡萄糖 5 g/L, 酒石酸铵 0.2 g/L。

1.2 方法

1.2.1 真菌分离方法: 采用稀释平皿法^[18]在虎红培养基上分离纯化真菌。纯化后的真菌定期转接于 PDA 固体培养基上, 4 °C 保藏备用。

1.2.2 真菌脱色能力测试及鉴定: 使用打孔器(直径 6 mm)沿真菌菌丝(菌落)边缘打孔, 取直径 6 mm 的菌片接种到含有 100 mg/L 苯胺蓝的 PDA 固体培养基上, 28 °C 避光培养观察各分离菌的脱色能力。脱色能力较强的真菌接种于含有 100 mg/L 其它染料(刚果红、橙黄 G、甲基橙、结晶紫、酸性品红、番红花红、碱性品红、甲基紫)的 PDA 固体培养基上, 进一步观察对其它染料的脱色能力。脱色染料的种类最多、能力最强的真菌利用形态学手段及分子生物学 18S rDNA 进行鉴定, 并用于后续的脱色条件优化研究。

1.2.3 染料降解优化: 以刚果红(偶氮类)及酸性品红(三苯甲烷类) 2 种染料为代表, 进行液体培养基的脱色条件优化研究。将 50 mL 染料-培养基 I、II、III (染料终浓度为 200 mg/L)分别装入 150 mL 的三角瓶中, 先进行 1×10⁵ Pa 灭菌, 冷却后接入上述在单个平皿培养的真菌菌膜, 28 °C 下置于摇床(125 r/min)进行脱色培养。所有试验均重复 3 次。

上述 3 种染料培养基采用一次一个因子法(One-factor-at-a-time approach)进行脱色条件的优

化。首先测试不同的 pH 值(2、3、4、5、6、7、8、9、10)对脱色的影响, 在最适 pH 值下研究温度对脱色的影响。然后在最适 pH 值和温度条件下, 测试不同的碳源(蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖和淀粉)和氮源(硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨和尿素), 及碳源与氮源的组合对脱色的影响。最后, 测试最适的氮源和碳源的浓度对脱色效果的影响。

1.2.4 非灭菌条件下的脱色能力测试: 优化后的培养基不经高压灭菌处理, 测试在非灭菌敞开式摇动培养条件下及外加微生物污染条件下真菌的脱色能力, 培养条件同 1.2.3。

1.2.5 脱色效果分析: 取 200 μL 含染料的培养基, 稀释 10 倍用于测定降解后染料最大吸光度(刚果红 506 nm, 酸性品红 545 nm)的变化, 脱色率按如下公式计算:

$$\text{脱色率} = (A_2 - A_1) / A_2 \times 100\%。$$

A_1 为不同降解时期染料的吸光值, A_2 为未降解染料培养基的初始吸光值。

染料分解前后的残基变化使用分光光度计 DU 800 Spectrophotometer (Beckman coulter)进行分析。

1.2.6 毒性测试: 真菌降解染料前后, 使用蚕豆根尖微核法测定其毒性变化^[19–20]。

2 结果与分析

2.1 菌株分离及降解染料种类

根据真菌菌落的颜色、生长速度、孢子形态等特征, 将从竹林土壤中分离的各真菌进行初步鉴定。一共获得 96 个不同形态的分离菌, 其中 15 株能够分解染料苯胺蓝。通过进一步测试这 15 株真菌对其他染料的分解能力, 发现一株编号为 1302BG 的真菌对所有测试的染料都具有较强的脱色能力(图 1)。在固体培养基上, 该真菌对苯胺蓝、橙黄 G、刚果红、甲基橙、酸性品红脱色能力最强, 10 d 内可以去除几乎全部的颜色。对甲基紫、结晶紫、碱性品红、番红花红的分解速度稍慢, 10 d 内可以脱去大部分染料的颜色。经形态学和分子生物学鉴定, 该菌(1302BG)为冷杉附毛孔菌 *Trichaptum abietinum* (简称 TA, NCBI accession number: FJ768676)。

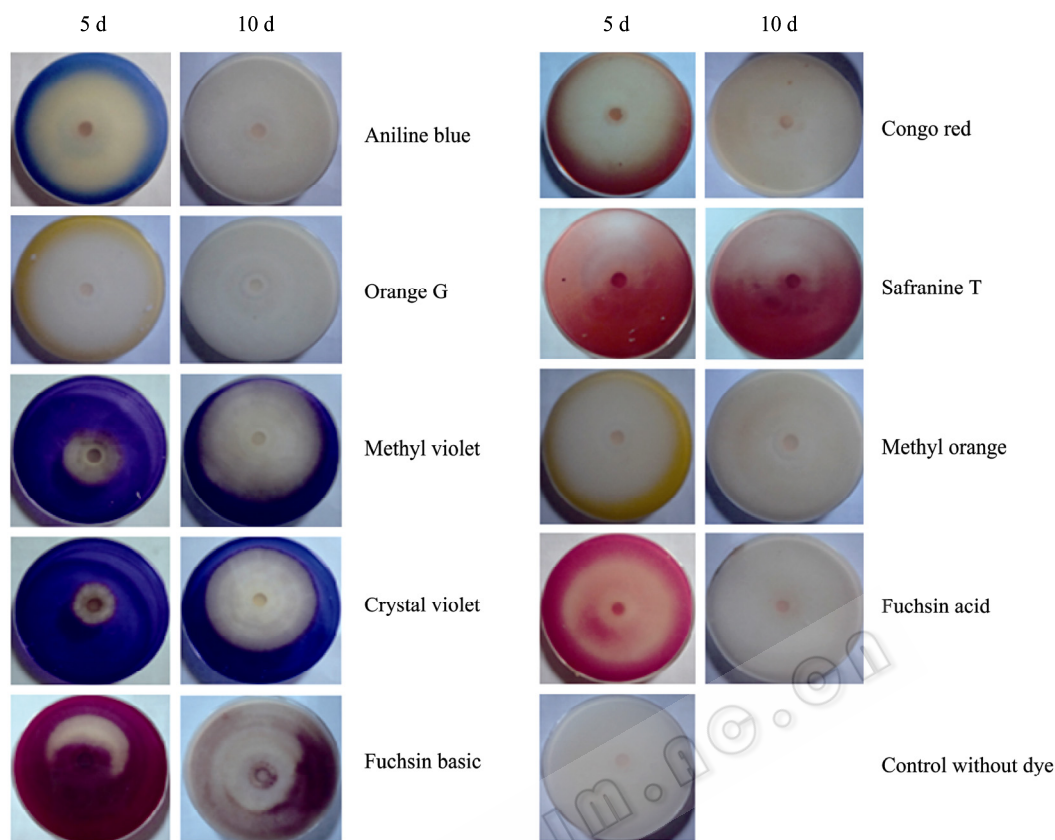


图 1 真菌 TA 在固体培养基上对几种染料(100 mg/L)的脱色能力

Fig. 1 The decolorization abilities of *Trichaptum abietinum* 1302BG on the solid plates containing 100 mg/L each single dye
注: 染料左侧为 5 d 时的脱色图片, 右侧为 10 d 时的脱色图片.

Note: The photos of left sides were decolorized for 5 d, and the photos of right sides were decolorized for 10 d.

2.2 培养基组分对真菌 TA 脱色能力的影响

真菌 TA 在 3 种培养基中对 2 种染料的脱色能力非常接近(图 2)。培养基 III 仅含有葡萄糖 5 g, 酒石酸铵 0.2 g, 要比前 2 种培养基简单、经济且环境友好, 因此, 选择培养基 III 用于随后的条件优化研究。Kirk 培养基是一种最常用的脱色培养基, 含有黎芦醇和一些金属离子。这些成分是诱导真菌产生与染料降解有关的木质素分解酶, 或者是分解酶具有活性所必需的辅基^[21-22]。而本研究所分离到的冷杉附毛孔菌 1302BG 不需要添加这些诱导成分, 却仍然具有很强的脱色能力。

2.3 pH 值对脱色影响

从图 3 看出真菌 TA 受 pH 值影响较小, 在 pH 值 3-10 的范围内都能较好地脱色, 48 h 内的脱色率均超过 90%(刚果红超过 91%, 酸性品红超过 95%), 甚

至接近 100%。大多数白腐菌快速生长及染料分解最适环境是在酸性条件下, 然而实际染料废水大多数是碱性的, 不利于一般真菌脱色^[1]。也有研究报道了一些在碱性条件下有较好的染料分解能力的真菌, 比如: *Aspergillus fumigatus*、*Funalia trogii*、*Ceriporia lacerate*^[23-25]。本研究分离到的真菌 TA 不但在酸性条件下, 脱色能力优良, 而且在碱性条件下仍然可以高效脱色^[1], 这些优良特性有利于实际的工业应用。

2.4 温度对脱色影响

图 4 表明真菌 TA 在 28 °C-30 °C 对 2 种染料分解的速度最快。接种菌膜 48 h 后, 在 25 °C-37 °C 范围内, 该真菌几乎分解培养基中的全部染料。该菌的最适脱色温度范围是 28 °C-30 °C, 直接选用 28 °C 培养进行脱色研究恰好是该菌的最适脱色温度。这与许多报道是一致的^[1]。

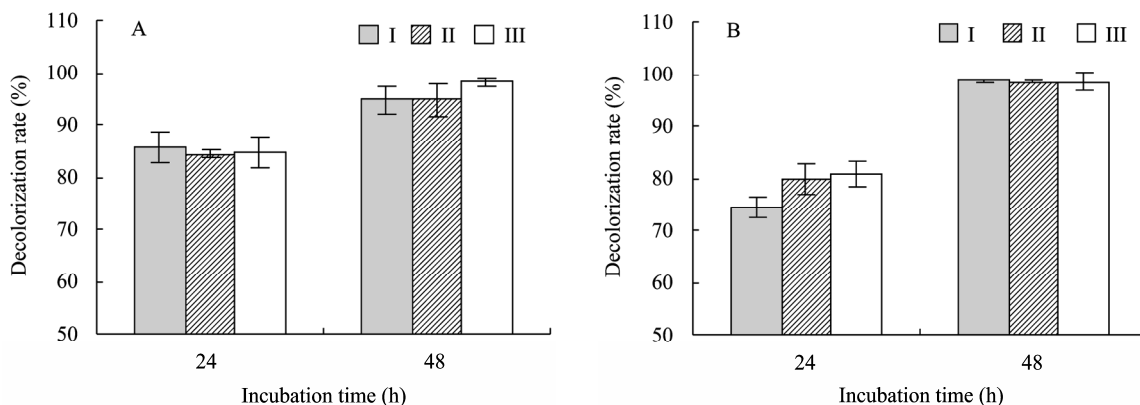


图 2 培养基组成对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 2 The effects of media composition on the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

注: I: 培养基 I; II: 培养基 II; III: 培养基 III.

Note: I: Medium I; II: Medium II; III: Medium III.

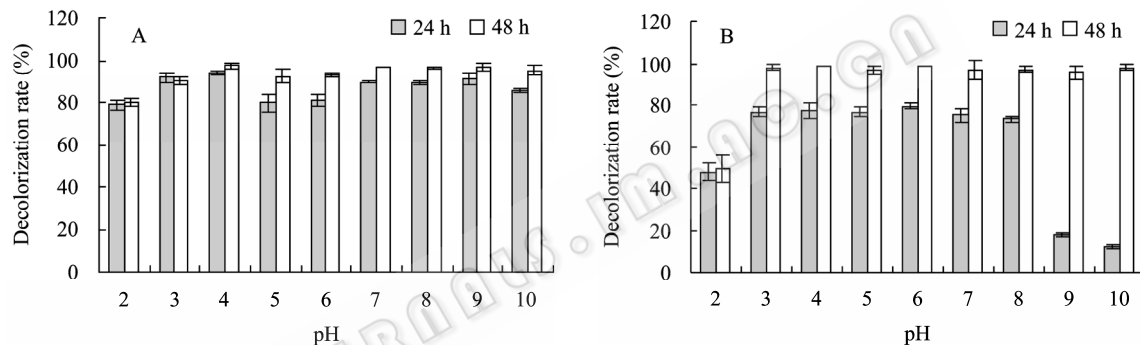


图 3 pH 值对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 3 The effects of pH values on decolorization efficiency of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

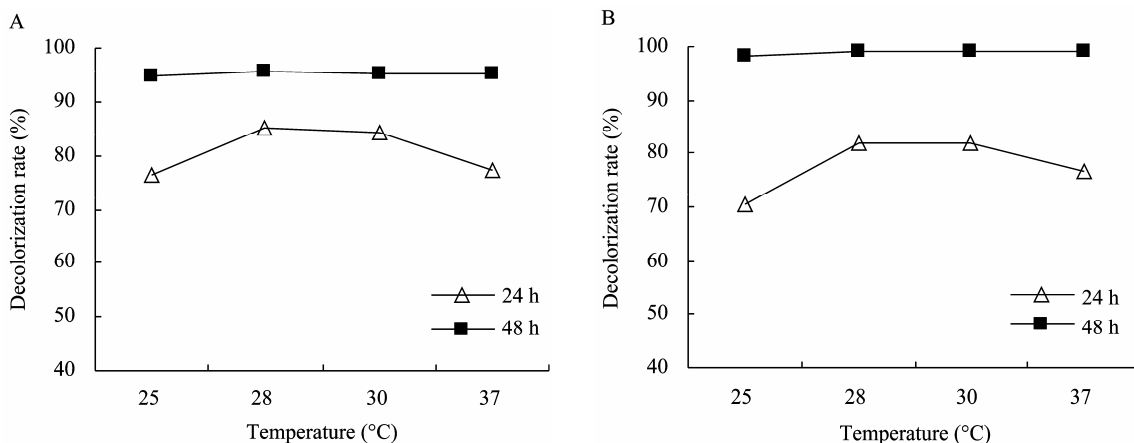


图 4 温度对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 4 The effects of temperatures on the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

2.5 碳氮源种类对脱色影响

不同种类的碳源对真菌 TA 脱色能力的影响较小(图 5A、5B)。接种该真菌菌膜 48 h 后, 使用所有种类的碳源对 2 种染料均达到了较高的脱色率(刚果红超过 92.8%, 酸性品红超过 98%)。不同种类的碳源对该菌分解刚果红的速度几乎相同, 而分解酸性品红的速度稍有不同。使用淀粉作为碳源, 在前 36 h 内对酸性品红的分解速度一直较高, 呈线性匀速。而使用蔗糖、果糖、麦芽糖、乳糖及葡萄糖在前 12 h 内分解较慢, 12 h 后分解速度快速增加。接种 36 h 后, 使用所有种类的碳源均达到了较高的脱色率。不同种类的氮源对于真菌 TA 脱色速度的影响较大(图 5C、5D)。使用 4 种其它氮源替换酒石酸铵后, 虽然接种菌膜 48 h 后都能达到较高的脱色率(刚果红超过 94.8%, 酸性品红超过 97.8%), 但是脱色

速度有所不同。尿素较其它几种氮源的效果差, 而硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨效果跟对照酒石酸铵相当或更好。表明该菌对于可利用碳氮源种类的要求是比较宽泛的。

多数真菌偏爱某一种碳源或氮源作为脱色培养基底物。Park 等报道了真菌 *Funalia trogii* 分解染料活性黑 5 的时候, 最适碳源是果糖和淀粉, 而不是乳糖和蔗糖^[26]。黄孢原毛平革菌的培养基中添加葡萄糖可以显著提高其分解刚果红的能力(达 87%)^[27]。然而葡萄糖市场价格一般比其它碳源高, 印染废水处理不常使用^[22]。染料分解研究时常用的氮源是酒石酸铵, 然而, 酒石酸铵在废水处理中也不经济。硫酸铵、硝酸铵、尿素的市价通常比酒石酸铵及蛋白胨的价格低许多, 这 3 种氮源都可以作为真菌 TA 分解染料时的候选底物。

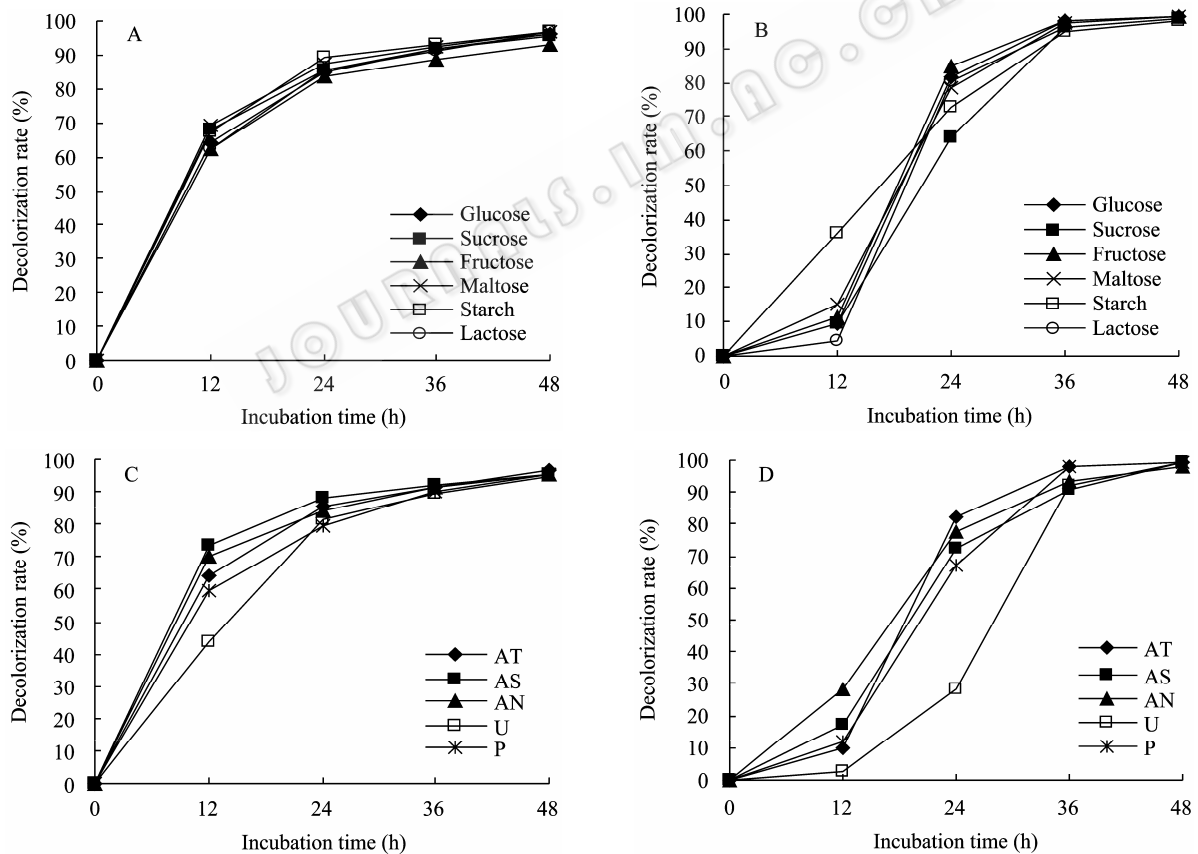


图 5 不同的碳源和氮源种类对真菌 TA 降解刚果红和酸性品红的影响

Fig. 5 The effects of different carbon and nitrogen sources on the decolorization of Congo red and Fuchsin acid by *Trichaptum abietinum* 1302BG

注: A、C: 刚果红; B、D: 酸性品红。AT: 酒石酸铵; AS: 硫酸铵; AN: 硝酸铵; U: 尿素; P: 蛋白胨。

Note: A,C: Congo red; B,D: Fuchsin acid. AT: Ammonium tartrate; AS: Ammonium sulfate; AN: Ammonium nitrate; U: Urea; P: Peptone.

2.6 碳氮源组合及浓度对真菌 TA 脱色的影响

几种比较经济的碳源(蔗糖、淀粉)与氮源(硫酸铵、硝酸铵、尿素)组合接种菌膜 48 h 后,大多达到了较高的脱色率(图 6)。其中,蔗糖&硫酸铵、淀粉&硫酸铵、淀粉&硝酸铵及蔗糖&硝酸铵 4 种组合效果均比对照葡萄糖&酒石酸铵组合的脱色效果好。尿素作为氮源与其它 2 种碳源组成的 2 种组合的脱色效率都较差,尤其是对于该菌分解酸性品红时。综合考虑价格的因素,淀粉&硫酸铵组合对于真菌 TA 脱色是最经济最合适的选择。

根据限氮培养基和富氮培养基氮源含量不同(一般限氮培养基氮源含量为 0.2 g/L,而富氮培养基氮源含量为 2 g/L),设置 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 g/L 等 8 种氮源(硫酸铵)浓度进行测试。从图 7 可知,最适硫酸铵浓度为 0.05 g/L。在最适氮源浓度的基础上,进一步设置 8 种碳源(淀粉)浓度(0.25、0.5、1、3、5、7、9、20 g/L)用于选择最适碳源浓度。图 8 表明,0.5 g/L 淀粉浓度的脱色效果跟 20 g/L 的效果几乎相同。因此,选择 0.5 g/L 淀粉和 0.05 g/L 硫酸铵作为真菌 TA 的最适脱色培养基,24 h 内的脱色能力对刚果红超过 90%,对酸性品红超过 96%。培养基的成分比没有优化前更加简单经

济,同时脱色速度也大幅提高。

许多研究直接认为最佳碳源与最佳氮源就是最佳的脱色条件,但最优碳源与最优氮源组合在一起不一定是最佳的碳氮源组合。本研究中效果稍差的碳源与其它氮源的组合,也几乎达到了最优的效果。使用很少的用量就可以达到较高的脱色率,且比较经济。一般脱色研究中所用的碳源使用量在 5 g/L 以上,氮源一般需要 0.2 g/L^[28],而真菌 TA 只需要利用 0.5 g/L 淀粉和 0.05 g/L 硫酸铵为底物即可高效脱色。

2.7 在非灭菌条件下真菌 TA 的染料降解能力

如图 9 所示,真菌 TA 在非灭菌甚至含有少许污染的情况下,对 2 种染料的脱色效率与灭菌条件下相同或更好。24 h 内的脱色能力对刚果红超过 90%,对酸性品红超过 96%。48 h 内对 2 种染料的脱色率均接近 100%。这种优良特性有利于实际工业应用,可以节省大量的能源和相关的昂贵设备,可以降低微生物在脱色实际应用时的成本。细菌污染是非灭菌条件下导致白腐真菌脱色能力丧失的主要元凶^[15]。细菌污染是真菌用于染料废水处理应用时的主要瓶颈问题,已有报道研究了微生物污染的组成并提出一些克服的方法^[12-15,29]。真菌与细菌相比,

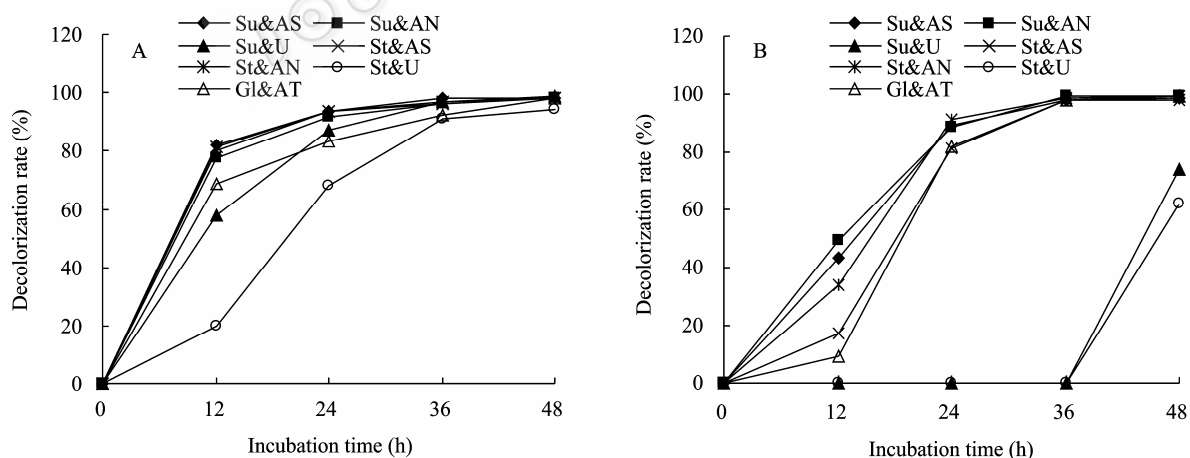


图 6 一些经济的碳氮源组合对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 6 The co-effects of some cheaper carbon sources and nitrogen sources on the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

注: Su&AS: 蔗糖 & 硫酸铵; Su&AN: 蔗糖 & 硝酸铵; Su&U: 蔗糖 & 尿素; St&AS: 淀粉 & 硫酸铵; St&AN: 淀粉 & 硝酸铵; St&U: 淀粉 & 尿素; Gl&AT: 葡萄糖 & 酒石酸铵。

Note: Su&AS: Sucrose & Ammonium sulfate; Su&AN: Sucrose & Ammonium nitrate; Su&U: Sucrose & Urea; St&AS: Starch & Ammonium sulfate; St&AN: Starch & Ammonium nitrate; St&U: Starch & Urea; Gl&AT: Glucose & Ammonium tartrate.

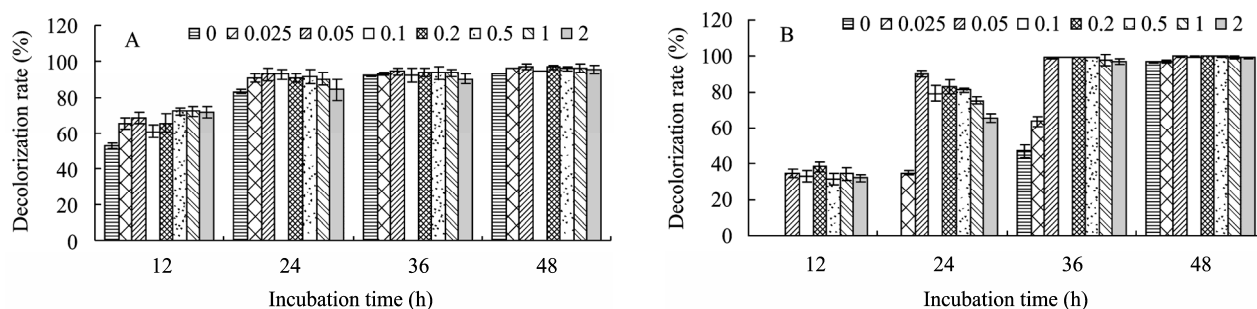


图 7 氮源含量对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 7 The effects of different nitrogen regimes on the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

注: 设置 0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 g/L 等 8 种浓度梯度。

Note: Eight regimes of ammonium sulfate (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 g/L) for the decolorization of Congo red and Fuchsin acid were tested.

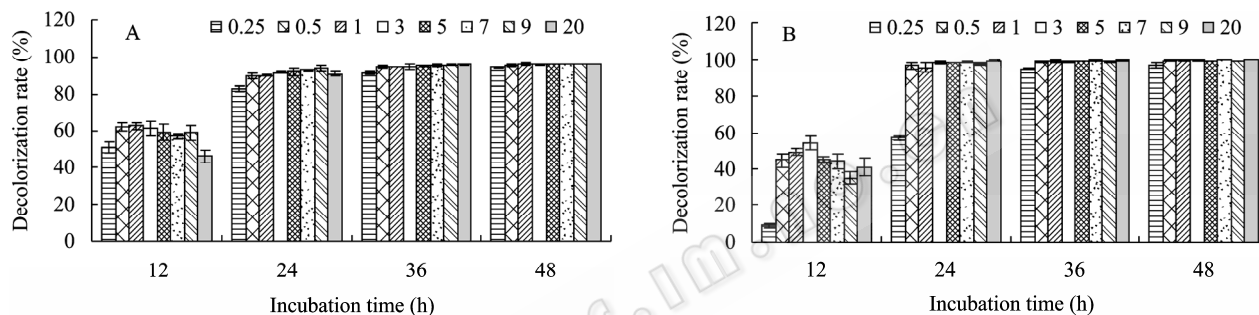


图 8 碳源含量对真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)的影响

Fig. 8 The effects of different carbon regimes on the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG

注: 设置 0.25、0.5、1、3、5、7、9、20 g/L 等 8 种浓度梯度。

Note: Eight different starch regimes (0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 20 g/L) for the decolorization of both Congo red and Fuchsin acid were tested.

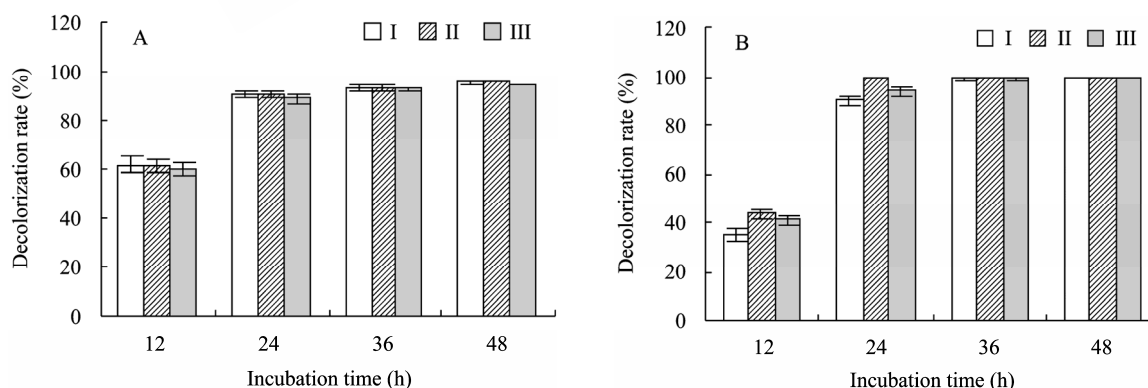


图 9 真菌 TA 抗污染能力测试

Fig. 9 Decolorization abilities of *Trichaptum abietinum* 1302BG under non-sterile conditions

注: A: 刚果红; B: 酸性品红。I: 含有染料的液体培养基经 1×10^5 Pa 20 min 灭菌; II: 含有染料的液体培养基不进行灭菌处理; III: 未经过灭菌的含染料的液体培养基中再加入 1% 的土壤污水。

Note: A: Congo red; B: Fuchsin acid. I: The decolorization media were autoclaved in 1×10^5 Pa for 20 min; II: The decolorization media were not autoclaved; III: Newly collected soil water (1%) was added to the non-autoclaved media.

生长缓慢些,一旦细菌在处理器中生长繁殖,就会迅速变成优势菌种,进而抑制乃至使脱色真菌的脱色能力丧失^[15]。Libra 等和 Gao 等认为限氮培养基可以有效抑制真菌脱色体系中细菌的生长。Libra 等将云芝 *T. versicolor* 菌丝包裹于聚乙烯醇中用于非灭菌条件下的脱色,5–10 d 的脱色率可达 80%–95%,但他们同时发现真菌容易破坏聚乙烯醇水凝胶珠。Gao 等将黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)菌丝固定在 4 种不同的惰性载体上,并认为在非灭菌条件下选择合适的载体就可能得到满意的脱色结果,3 d 内的脱色率达 93.5%。然而,该研究选用的载体在使用之前仍然需要高温灭菌,同时真菌预培养的培养基成本也很高。

2.8 脱色前后染料组成变化

脱色前后染料光谱扫描可以看出,两种染料的最大吸收峰(刚果红 506 nm, 酸性品红 545 nm)在接种菌膜 12 h 后降低了一部分,24 h 后 2 种染料的最大吸收峰完全消失(图 10)。对于降解后的刚果红,在约 270 nm 及 360 nm 处出现 2 个新峰。而对于降解后的酸性品红,在约 275 nm 出现一个新峰。波谱变化表明,2 种染料均被真菌 TA 降解为其它物质^[30]。

2.9 脱色前后染料毒性变化

通过蚕豆根尖微核试验可以很灵敏地测试出水溶液的相对毒性。根据表 1 测试可以看出,2‰的刚

果红溶液经真菌 TA 脱色 48 h 后,溶液的蚕豆根尖微核率跟对照蒸馏水基本相当,说明已经没有毒性。而 2‰的酸性品红溶液经该真菌脱色 48 h 后,脱色后溶液的微核率为脱色前的 1/2,但是仍然比对照蒸馏水的微核率高,说明脱色后的酸性品红溶液仍然有一定的毒性,但毒性相对于脱色之前已经大大降低。染料多数是有一定毒性的,经微生物分解后并不一定能降低其毒性。不完全降解或者形成其它中间体可能导致染料微生物分解产物的毒性更强^[24]。

表 1 接种真菌 TA 菌膜 48 h 前后刚果红和酸性品红对蚕豆微核率的影响

Table 1 Evaluation of Congo red and Fuchsin acid toxicity by *Vicia faba* micronucleus tests before and after the degradation for 48 h

处理 Treatment	微核/1 000 细胞±s (n=3) MCN/1 000 cells±s (n=3)
CK	1.93±0.78
I	28.62±4.21*
II	2.02±0.65
III	20.11±1.37*
IV	10.31±1.79*

注: CK: 阴性对照,去离子水; I: 2‰ 刚果红; II: 经真菌 TA 脱色 48 h 后的刚果红溶液(2‰); III: 2‰酸性品红; IV: 经真菌 TA 脱色 48 h 后的酸性品红溶液(2‰)。*显著水平选用 0.01。

Note: CK: Negative control, deionized water; I: Congo red (2‰); II: Effluents after 48 h decolorization of Congo red (2‰); III: Fuchsin acid (2‰); IV: Effluents after 48 h decolorization of Fuchsin acid (2‰)。*: Statistically significant at the 0.01 level.

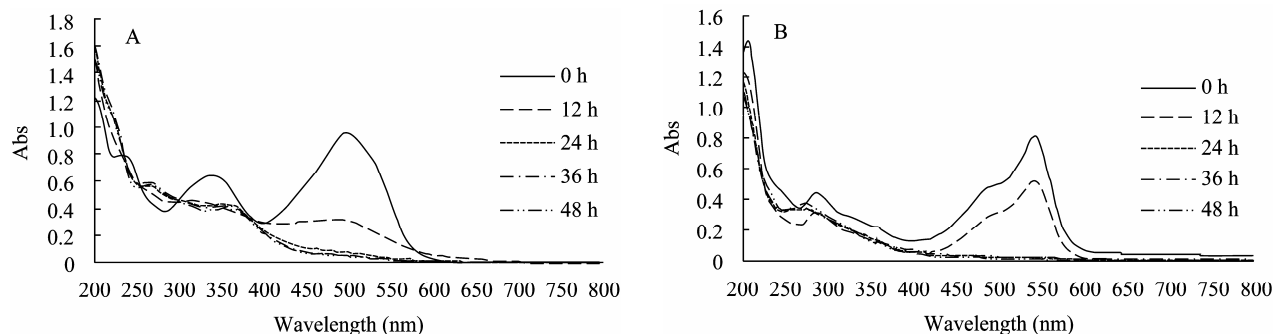


图 10 真菌 TA 降解刚果红(A)和酸性品红(B)过程中 UV-vis 吸收光谱的变化

Fig. 10 UV-vis absorption spectrum during the decolorization of Congo red (A) and Fuchsin acid (B) by *Trichaptum abietinum* 1302BG within 48 h

3 讨论

竹林土壤相对于其它生境,其微生物,尤其是功能微生物研究得很少^[31-32]。本研究分离真菌所用的雷竹土壤已采用覆盖法耕作管理二十余年,经过多年的这种覆盖翻耕方法处理的土壤,有利于分解木质素纤维素能力强的微生物富集。由于染料的结构与木质素组分的结构相似,具有分解木质素能力的微生物同样具有分解染料的能力^[1]。从研究较少的,以稻草覆盖方法连续处理多年的土壤为材料,可能更易分离到效果较好的多能脱色真菌。本研究从退化严重的雷竹土壤中共分离获得 96 种不同分离菌,其中 15 种具有分解染料苯胺蓝的能力。这 15 种分离菌中,多数具有分解一种以上染料的能力。冷杉附毛孔菌 1302BG 能够分解全部所测试的 9 种染料,这些染料属于 4 大类型的染料。由于合成染料的结构复杂,它们很难被降解^[10,33]。尽管已经报道了一些真菌可以降解偶氮类^[24,34]、三苯甲烷类^[35]、三芳基甲烷类^[36-38],或分解偶氮及三苯甲烷类^[37-38]、偶氮及三芳基甲烷染料^[39],但是还未见有分解醌亚胺类染料的报道。尽管有些染料结构类似,但修饰基团稍微不同的染料的分解速度却大不一样。真菌分解染料的难度与染料结构本身的复杂度没有相关性。甲基紫与酸性品红,以及碱性品红与甲基紫有类似的结构,仅有细微的结构差异,但是该真菌分解他们的速度明显不同。这种微小的差异极大地影响了冷杉附毛孔菌 1302BG 的脱色能力,这与 Eichlerová 等的发现是一致的^[40]。

冷杉附毛孔菌 1302BG 不但能够适应宽泛的 pH 值范围,而且能以多种碳源、氮源为培养基组分进行高效的染料脱色。以本研究优化后的简易培养基,即只需要 0.5 g/L 淀粉和 0.05 g/L 硫酸铵而不需要黎芦醇及其它金属离子的诱导,冷杉附毛孔菌 1302BG 在非灭菌乃至外加一些微生物污染的情况下,48 h 内的脱色率仍然接近 100%。该真菌在非灭菌条件下能高效脱色,可能有 3 个原因:(1) 该真菌生长较快,本身与其它微生物竞争时有一定优势。(2) 本研究所用的培养方法是先将真菌预培养成为

一定大小的菌膜,然后转接到液体脱色培养基中进行脱色实验。即使有少量的污染存在,但是与真菌的起始接种量相比,也只是很少量的,对真菌整体的脱色效果没有多大影响。(3) 脱色培养基成分简单,营养不丰富,也就不利于其它污染微生物的生长。故而,该真菌在非灭菌(自然)条件下脱色时抗污染的能力很强。真菌脱色机理一般分为 2 种:吸附脱色和降解脱色^[1,41]。脱色过程光谱变化表明,冷杉附毛孔菌 1302BG 脱色以降解脱色为主。然而,本研究所分离到的冷杉附毛孔菌 1302BG 不需要添加这些诱导成分,却仍然具有很强的脱色能力^[21-22]。对该真菌的几种主要木质素分解酶检测,没有检测到常见的 LiP、MnP 及 Lac 酶活性(数据未显示),说明该真菌的主要染料脱色酶类可能与已知的主要脱色酶类不同。冷杉附毛孔菌 1302BG 产生的主要脱色酶可能既不需要黎芦醇及一些金属离子诱导,也不需要金属离子如 Mn^{2+} 作为辅基,相关新功能酶分离纯化研究尚在进一步的进行当中。

脱色后毒性测定是微生物降解染料后所必须进行的研究,本研究使用对水体毒性非常敏感的蚕豆根尖细胞微核试验进行测定,以提高毒性试验的灵敏性。微核试验结果表明,刚果红经冷杉附毛孔菌 1302BG 分解后染料的毒性基本消失,而酸性品红经该菌分解后毒性降低了 1/2,但仍然有一定的毒性。该菌在分解染料的同时,可以极大地降低染料的毒性。

4 结论

本研究从退化严重的雷竹竹林中一共分离获得 96 种不同形态的真菌,其中冷杉附毛孔菌 1302BG 具有一定的染料降解广谱性。通过液体培养基的条件优化表明,该真菌的适应力很强,既能在酸性又能在碱性条件下,即能在灭菌和非灭菌的条件下,仅利用含有 0.5 g/L 淀粉和 0.05 g/L 硫酸铵的经济、环境友好的培养基就能高效脱色。同时,染料经该菌分解后的毒性大大降低。所有这些均显示了这株真菌有非常优良的脱色能力,是一株很有潜力的工业印染废水处理真菌。

参 考 文 献

- [1] Fu YZ, Viraraghavan T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79(3): 251–262.
- [2] 袁海生, 戴玉成, 曹云, 等. 白腐真菌染料脱色菌株的筛选及一色齿毛菌脱色条件的研究[J]. *菌物学报*, 2010, 29(3): 429–436.
- [3] 靳奇峰, 时胜男, 焦庆祝, 等. 真菌在染料脱色中的应用及其酶学研究进展[J]. *辽宁师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 32(4): 480–483.
- [4] 余燧, 郑平, 金仁村, 等. 印染废水生物处理技术进展[J]. *化工进展*, 2008, 27(11): 1724–1727.
- [5] 尹亮, 陈章和, 赵树进. 微生物对偶氮染料的脱色及其基因工程研究进展[J]. *生物技术*, 2007, 17(6): 86–89.
- [6] 朱林, 洪宇植, 方泽民, 等. 真菌漆酶对蒽醌和偶氮类活性染料的脱色[J]. *中国科技论文在线*, 2010, 5(3): 224–227.
- [7] 梁红昌, 千英花, 张庆华, 等. 一株脱色真菌的鉴定及脱色特性的初步探讨[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7): 956–961.
- [8] 张培培, 任随周, 许玫英, 等. 微生物对三苯基甲烷类染料脱色的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9): 1410–1417.
- [9] Ghasemi F, Tabandeh F, Bambai B, et al. Decolorization of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* RP78 under optimal condition[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2010, 7(3): 457–464.
- [10] Swamy J, Ramsay JA. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24(3/4): 130–137.
- [11] 高大文, 文湘华, 钱易. 应用白腐真菌降解染料的研究现状及发展趋势[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2005, 37(9): 1200–1204, 1306.
- [12] 高大文, 文湘华, 周晓燕, 等. pH 值对白腐真菌液体培养基抑制杂菌效果的影响研究[J]. *环境科学*, 2005, 26(6): 173–179.
- [13] Leidig E, Prüsse U, Vorlop KD, et al. Biotransformation of poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions[J]. *Bioprocess Engineering*, 1999, 21(1): 5–12.
- [14] Libra JA, Borchert M, Banit S. Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, 82(6): 736–744.
- [15] Gao DW, Zeng YG, Wen XH, et al. Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(9): 937–944.
- [16] 高大文, 文湘华, 周晓燕, 等. 微量元素对白腐真菌的生长影响和抑制酵母菌效果的研究[J]. *环境科学*, 2006, 27(8): 1623–1626.
- [17] Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238–249.
- [18] Pankhurst CE, Pierret A, Hawke BG, et al. Microbiological and chemical properties of soil associated with macropores at different depths in a red-duplex soil in NSW Australia[J]. *Plant and Soil*, 2002, 238(1): 11–20.
- [19] Ma TH, Xu ZD, Xu CG, et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants[J]. *Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1995, 334(2): 185–195.
- [20] Ji Q, Chen YF. *Vicia faba* root tip micronucleus test on the mutagenicity of water-soluble contents of cigarette smoke[J]. *Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1996, 359(1): 1–6.
- [21] Bakshi DK, Gupta KG, Sharma P. Enhanced biodecolorization of synthetic textile dye effluent by *Phanerochaete chrysosporium* under improved culture conditions[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1999, 15(4): 507–509.
- [22] Kapdan IK, Kargia F, McMullan G, et al. Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(5/6): 381–387.
- [23] Sahoo DK, Gupta R. Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1573–1578.
- [24] Xu L, Zhu Y, He XB, et al. Evaluation of a new fungus *Ceriporia lacerate* strain P2-its ability to decolorize alizarin red and methyl orange[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(12): 3097–3104.
- [25] Yesilada O, Asma D, Cing S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(6): 933–938.
- [26] Park C, Lim JS, Lee Y, et al. Optimization and morphology for decolorization of reactive black 5 by *Funalia*

- trogii*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(7): 1758–1764.
- [27] Pant D, Singh A, Satyawali Y, et al. Effect of carbon and nitrogen source amendment on synthetic dyes decolorizing efficiency of white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Environmental Biology, 2008, 29(1): 79–84.
- [28] Niebisch CH, Malinowski AK, Schadeck R, et al. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 180(1/3): 316–322.
- [29] 高大文, 文湘华, 钱易. 自然(非灭菌)环境白腐真菌降解活性艳红染料[J]. 中国科学(B辑: 化学), 2007, 37(4): 402–407.
- [30] Chen KC, Wu JY, Liou DJ, et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 101(1): 57–68.
- [31] 董林根, 姜小娟. 雷竹覆盖栽培林地土壤微生物的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 1998, 15(3): 236–239.
- [32] 秦华, 徐秋芳, 曹志洪. 长期集约经营条件下雷竹林土壤微生物量的变化[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(1): 1–7.
- [33] Maas R, Chaudhari S. Adsorption and biological decolorization of azo dye reactive red 2 in semicontinuous anaerobic reactors[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 699–705.
- [34] Ali N, Hameed A, Ahmed S, et al. Decolorization of structurally different textile dyes by *Aspergillus niger* SA1[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1067–1072.
- [35] Shedbalkar U, Dhanve R, Jadhav J. Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 157(2/3): 472–479.
- [36] Jadhav SU, Jadhav UU, Dawkar VV, et al. Biodegradation of disperse dye brown 3REL by microbial consortium of *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 and *Bacillus* sp. VUS[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2008, 13(2): 232–239.
- [37] Pointing SB, Vrijmoed LLP. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2000, 16(3): 317–318.
- [38] Vijaykumar MH, Veeranagouda Y, Neelakanteshwar K, et al. Decolorization of 1:2 metal complex dye Acid blue 193 by a newly isolated fungus, *Cladosporium cladosporioides*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(2): 157–162.
- [39] Šušla M, Svobodová K. Effect of various synthetic dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(2): 225–230.
- [40] Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232[J]. Dyes and Pigments, 2007, 75(1): 38–44.
- [41] Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review[J]. Journal of Environmental Management, 2010, 91(10): 1915–1929.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 $S E$ 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。