

开放条件下烟管菌 XX-2 对孔雀石绿染料的高效降解

何兴兵^{1*} 林永慧¹ 韩国民² 王成¹ 周小成¹ 叶佳¹ 何再华¹ 田启建¹

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院 湖南 吉首 416000)

(2. 安徽农业大学 生命科学学院 安徽 合肥 230036)

摘要: 【目的】评价白腐真菌 *Bjerkandera adusta* XX-2 处理孔雀石绿染料废水的能力, 为其在染料废水中的应用提供参考依据。【方法】采用批次实验在开放条件下研究通气、pH、温度、染料初始浓度、培养时间、碳源、氮源、金属离子、盐度等因子对该菌降解孔雀石绿的影响。同时利用植物萌发、微生物抑菌和水生动物致死实验对降解产物进行毒性测试。【结果】*B. adusta* XX-2 菌株在开放的非灭菌条件下也能高效降解孔雀石绿。例如, 在初始浓度为 120 mg/L 且以孔雀石绿为唯一营养源的条件下降解率也能达到 60%。静置培养和摇动培养呈现出几乎相同的降解率, 这可以为技术应用节约动力成本。最适降解 pH 与温度分别为 7.0 和 25 °C。在上述参数体系的优化基础上, 分别进行了碳源、氮源与金属离子的添加优化实验, 结果显示低浓度的碳源(如柠檬酸钠)、氮源(如氯化铵)和金属离子(如 Zn^{2+})均可大大提高 *B. adusta* XX-2 对孔雀石绿的脱色效率。同时 *B. adusta* XX-2 的降解也能在很高的盐浓度下进行。毒性测试表明降解后的染料对植物、微生物、水生生物的毒性大大减少。【结论】*B. adusta* XX-2 菌株在处理染料废水方面具有很大的应用潜力。

关键词: 烟管菌, 孔雀石绿, 降解, 染料废水, 毒性测试

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31100370); 湖南省自然科学基金项目(No. 13JJ3092); 吉首大学科研基金项目(No. jsdxkyzz200901, 10JD028); 喀斯特草地生态系统研究生培养创新基地项目(No. 201101A); 湖南省生态学重点学科建设项目(No. JSU0713Z02); 安徽省自然科学基金项目(No. 1208085QC70)

*通讯作者: Tel: 86-743-8564416; 邮箱: hexb@jsu.edu.cn

收稿日期: 2012-09-25; 接受日期: 2013-01-29

Efficient degradation of Malachite Green dye by *Bjerkandera adusta* XX-2 strain in an air-opening system

HE Xing-Bing^{1*} LIN Yong-Hui¹ HAN Guo-Min² WANG Cheng¹
ZHOU Xiao-Cheng¹ YE Jia¹ HE Zai-Hua¹ TIAN Qi-Jian¹

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

(2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] Our aim was to evaluate the ability of *Bjerkandera adusta* XX-2 strain in degrading Malachite Green (MG) dye in order to provide reference for its application in treating dye wastewater. **[Methods]** Batch experiment was carried out to decolorize MG dye in an air-opening system in this study. Experimental parameters, such as oxygen demand, initial pH value, temperature, initial dye concentration, incubation time, carbon source, nitrogen source, metal ion and salinity, was investigated to analyze their effect on the decolorization of MG. The toxicity test of decolorized products on plant, aquatic animal and microorganism was also carried out in this study. **[Results]** *B. adusta* XX-2 strain showed efficient decolorization of MG dye without supplying basic salt medium in non-sterile culture, for example, decolorization rate still reached above 60% at the initial dye concentration of 120 mg/L, using MG as sole nutrient source. Static culture presented the similar MG decolorization rate as shaken culture, indicative of low-cost application potential for *B. adusta* XX-2 strain. The optimal pH and temperature for decolorization were 7.0 and 25 °C, respectively. Based on the system with optimal parameters, carbon source, nitrogen source and metal ion were separately added for choosing appropriate dosage. The results indicated that carbon source (e.g. sodium citrate), nitrogen source (e.g. ammonium chloride) and metal ion (e.g. Zn²⁺), even at a low concentration, all could greatly improve the efficiency of decolorization. Moreover, *B. adusta* XX-2 could decolorize MG in dye solution with high salinity. Toxicity test showed toxicity of decolorized products on plant, aquatic animal and microorganism greatly declined, in comparison with non-decolorized MG dye. **[Conclusion]** *B. adusta* XX-2 strain had a good application potential for treating dye wastewater.

Keywords: *Bjerkandera adusta*, Malachite Green, Degradation, Dye wastewater, Toxicity test

印染工业是世界上最大的工业之一, 它包括纺织业、皮革、化妆品、纸业、印刷业、塑料制造、制药和快餐业等, 同时它也是世界上最大的污染源之一^[1]。如果染料废水被排到河水中会对水生生物的肝脏、鳃、肾脏、肠、生殖腺、腺垂

体细胞产生有害的影响^[2-3]。因此, 染料的降解已经被认为是纺织业废水处理的一个非常重要的问题^[4]。各种各样的物理或化学方法已经被用于染料废水的处理, 如吸附、离子交换、凝聚、膜过滤、臭氧法等^[5]。用物理化学方法除去孔雀石

绿相对来说过程复杂、耗时且效率不高^[6]。而生物方法因其是一种环境友好型的处理方式, 日益受到人们的关注。现在, 越来越多的实验研究报道了微生物对染料的降解, 特别是白腐真菌对染料的降解^[7]。白腐真菌是一种对环境中的毒性物质具有很高耐受性的生物体, 这也使它们成为生物降解最理想的菌种。它的木质素降解酶系主要由木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶组成, 故能降解很多难降解复合物^[8-9]。

孔雀石绿(Malachite Green, MG)是一种已经被广泛应用于工业的三苯甲烷类染料, 它影响人类的免疫系统、生殖系统, 是一种具有致癌性的有毒物质^[10]。另外, 直接接触孔雀石绿会刺激皮肤、损伤眼睛^[11]。孔雀石绿已经被美国食品与药物管理局提名为首要的致癌化学物质^[12], 并且已经被一些国家和美国食品与药物管理局禁止使用^[13]。但是由于低成本、易得和高效性等特点, 孔雀石绿仍然被世界上的某些地区所使用, 而且据报道孔雀石绿很难从水溶液中清除^[14]。我们从野外采集的大型真菌中通过筛选获得了一株白腐真菌 *Bjerkandera adusta* XX-2 能够高效降解高浓度孔雀石绿水溶液, 且该菌株能够在低成本的培养基中短时间内(6 d 以内)形成较为致密的菌膜, 具有较强的应用潜力^[15]。此菌种经常被用于降解偶氮染料和酞青染料等^[16-17]。据我们所知, *B. adusta* XX-2 对孔雀石绿降解的报道很少。而且相对于需要添加 KirK 培养基、土豆培养基、MSN 培养基的降解来说, *B. adusta* XX-2 能在开放条件下仅利用孔雀石绿作为唯一碳源就可高效降解孔雀石绿。此实验的主要目的在于研究 pH、温度、染料初始浓度、碳源、氮源、金属离子和盐度等实验参数对 *B. adusta* XX-2 降解孔雀石绿的影响, 同时也进行了毒性测试以分析降解后产物的毒性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种采集、筛选和鉴定: 菌种 *B. adusta* XX-2 为大型真菌, 采自湖南省湘西自治州小溪国家自然保护区, 实验室内所用接种体为其孢子萌发后的丝状菌丝体。染料脱色筛选采用染料固体培养基(染料-PDA: 100 mg/L 孔雀石绿+20%土豆浸出液+2%葡萄糖+2%琼脂)筛选法, 具体参见田启建等研究^[18]。菌种 *B. adusta* XX-2 采用 ITS 序列测序方法进行鉴定, 具体参见 He 等研究^[19]。

1.1.2 染料和试剂: 孔雀石绿($C_{23}H_{25}ClN_2$, 分子量 364.92, $\lambda_{\max}=680$), 实验中所用试剂为国产分析纯(天津石英钟厂霸州市化工分厂, Q/12YQ 4031-2004)。染料溶液母液浓度为 1 g/L (按 1 g 孔雀石绿染料溶于 1 L 去离子水的比例制备), 目标浓度的染料由去离子水连续稀释获得。

1.1.3 主要仪器设备: T6 新世纪紫外可见分光光度计, 北京普析通用; BSC-250 恒温培养箱, 上海博迅; HZQ-F160 全温振荡培养箱, 哈尔滨东联; AU120 电子分析天平, SHIMADZU。

1.2 方法

1.2.1 接种体的制备: 将培养于 PDA (Potato dextrose agar)培养基上的菌种接种于装有 50 mL PDB (Potato dextrose broth) 培养基(g/L; 土豆浸出液 200, 葡萄糖 20)的 150 mL 锥形瓶中, 28 °C 恒温摇瓶培养 5 d, 形成菌丝球, 用无菌玻璃棒将摇瓶中的菌丝球充分打碎, 用移液枪吸取 1 mL 接种于装有 20 mL PDB 培养基的直径为 9 cm 的无菌培养皿中, 28 °C 恒温静置培养 6-7 d, 得到实验所需菌膜, 作为染料降解过程中的接种体。

1.2.2 降解实验: 采用不同批次实验在开放系统(即非灭菌情况下, 降解体系直接与外界微生物接触, 也即是考虑了外源微生物的竞争)中分析不同参数对孔雀石绿降解的影响。首先静置与摇

瓶(125 r/min)两种培养条件用于分析通气状况对降解过程的影响。在此基础上分别研究不同初始 pH (1.0–7.0)、不同温度(20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C)、不同染料初始浓度以及培养时间对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响。上述各参数对降解的影响实验研究均以前一参数的优化(或选择)结果为前提进行。通过这些参数的选择建立起相应的降解参数体系,加入不同的碳源(酒石酸钠、果糖、蔗糖、草酸、葡萄糖、柠檬酸钠、乙酸钠、木糖、乳糖、丙二酸、肌醇、间苯三酚、草酸)、氮源(氯化氨、硝酸铵、尿素、蛋白胨、硝酸钠、牛肉膏、酒石酸氨、丙烯酰胺、乙二胺四乙酸二钠、氨基乙酸)或金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{+}),从中选出降解最佳的碳源、氮源和金属离子,并选取不同浓度的最佳碳源、氮源和金属离子。利用 NaCl 来确定菌株对盐度的耐受能力,同时对该菌株的连续脱色能力进行测试。降解实验发生在 150 mL 的锥形瓶中,包含一个菌膜与 50 mL 的孔雀石绿溶液。所有处理均设置 3 个重复,以加入菌膜的時刻为起点,每 24 h 对锥形瓶中的染料降解液进行离心,以测定其吸光值,对照为不加菌膜的染料溶液。

1.2.3 毒性测试: 毒性测试以去离子水为对照,研究 120 mg/L 的孔雀石绿染料与其降解 5 d 后的降解产物对植物、水生动物及微生物的毒性,所有的溶液测试前均用 0.22 μm 微孔滤膜除菌。

植物毒性测试以豌豆(*Pisum sativum*)和豇豆(*Vigna unguiculata*)为材料,种子使用前于 25 °C 温水中浸泡 12 h,选取膨胀的种子用于测试。3 层滤纸铺在培养皿的底部,1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 30 min,冷却后将 10 粒种子均匀置于培养皿中的滤纸上面。种子每天用 2 mL 相应溶液喷洒 2 次,以保持种子萌发所需要的湿度。种子置于 28 °C 培养箱中萌发,5 d 后测定每个培养皿中种子的发芽率、

胚芽、胚轴、胚根的长度以及三者的干重(75 °C 烘 48 h)。每一个含有 10 粒种子的培养皿是一个重复,实验共 5 个重复。

微生物毒性测试以 2 种细菌[枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)]和 2 种真菌[黑曲霉(*Aspergillus niger*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)]为受试菌种,采用圆纸片法^[20]。所用细菌和真菌分别在 37 °C 和 28 °C 培养 24 h 后测定抑菌圈的大小(直径),实验共设 10 个重复。

水生动物毒性测试以青鳉(*Oryzias latipes*)和田螺(*Bellamya aeruginosa*)为受试水生动物。分别将 10 条小青鳉和田螺分别放入装有 500 mL 120 mg/L 的孔雀石绿染料溶液、500 mL 其 5 d 降解产物和 10 d 降解产物的开敞容器里,置于室温中,分别记录青鳉和田螺的致死和半致死时间。

1.2.4 分析方法: 菌株对孔雀石绿的降解能力采用比色法测定。每 24 h 取一次培养液,于 5 000 r/min 离心 5 min,所得上清液于孔雀石绿的最大吸收波长(680 nm)下测定其吸光度 A_1 ,以不接种菌膜的初始染料培养基的吸光度 A_2 为对照,其降解率用下列公式计算:

$$\text{降解率}(\%) = (A_1 - A_2) / A_1 \times 100.$$

1.2.5 数据分析: 不同处理间数据差异比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行 *t*-test (2 个处理)与单因素方差分析(3 个或 3 个以上处理)。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选鉴定以及静置与摇瓶培养对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

菌株 XX-2 菌丝体经接种于染料-PDA 培养基上显示出明显的脱色圈,显示出一定的降解孔雀石绿的能力,经 ITS 序列测序(GenBank 登录号 KC484654)并与 NCBI 数据库已知基因序列进行比对鉴定为 *Bjerkandera adusta*。

B. adusta XX-2 在静置与摇瓶培养条件下(温度 28 °C, pH 7.0)对孔雀石绿(染料初始浓度为 100 mg/L)的降解情况如图 1 所示。结果显示, 降解前期(前 2 天)静置培养引起的降解率明显低于摇瓶培养, 但是这种差别在第 3 天后逐渐减小, 第 5 天时摇动和静置培养的降解率相差不大, 均达到了 90% 以上。三苯甲烷类染料的降解需要 NADH/NADPH 依赖的加氧酶, 摇动可能增加了染料溶液的溶氧量使该酶的活性加强, 从而促进了染料的降解^[21]; 同时摇动也为菌体生长提供了更多的氧气, 使菌体生长加快^[22]。后期由于底物数量减小, 持续的溶氧供应已不能持续快速增加降解量。因此只需通过延长降解时间至 3 d, 就可以实现动力成本的节约, 显示出该菌株具有较好的应用前景, 静置培养用于本研究后续其它参数或影响因素的分析。

在该试验中, 孔雀石绿是染料降解体系中唯一的碳源, 与其它加入营养肉汤^[22]、基础盐培养基^[10,23-26]的脱色研究相比, 仍然具有高效的降解能力。Ali 等^[10]利用 2 种真菌对 50 $\mu\text{mol/L}$ 的孔雀石绿在添加基础盐培养基的条件下实现了 97.43% (*Aspergillus flavus*)和 96.91% (*Alternaria solani*)的脱色率, 降解效率明显低于本研究中所使用的 *B. adusta* XX-2 菌株。同时, 本研究采用开放式的降解体系, 允许空气中的微生物

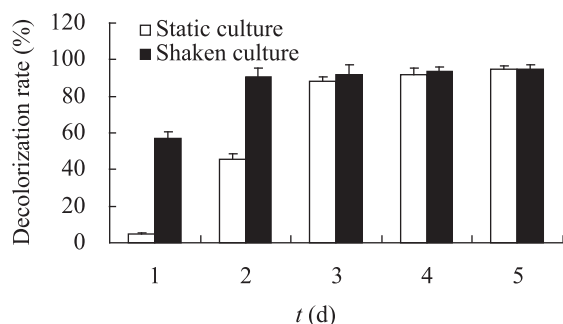


图 1 静置与摇瓶培养对孔雀石绿脱色的影响

Fig. 1 Effect of static and shaken culture on decolorization of MG by *B. adusta* XX-2 strain

进入该体系, 显示了 *B. adusta* XX-2 菌株在与外源微生物共存竞争的情况下仍然能够发挥自身的降解能力。

2.2 pH 对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

pH 是影响微生物降解染料的重要环境影响因素之一, 本研究中孔雀石绿的降解实验控制在 pH 为 1.0–7.0 的范围内进行(由于所用孔雀石绿在 pH 超过 7.0 时会出现浑浊, 所以暂未进行较高的 pH 影响实验)。实验(静置培养, 28 °C, 染料初始浓度 120 mg/L)结果显示孔雀石绿在 pH 值为 5.0 及以下的条件时降解率极低, 最高仅有 1.11%, 甚至在 pH 为 1.0–3.0 时不发生降解, 这说明酸性环境不适合于 *B. adusta* XX-2 菌种的降解。一种可能是酸性环境抑制了菌种本身的生长, 另一种可能是酸性环境抑制了染料降解酶的表达。许多白腐真菌显现出低 pH 降解的特性^[27-29], 但与之相反, 在本实验中随着 pH 的上升, *B. adusta* XX-2 的降解率也在 pH 7.0 时达到 70.09%, 这与 Aayed 等^[25]研究 *Sphingomonas paucimobilis* 菌株降解孔雀石绿时对 pH 适应性的结果相似。Daneshvar 等^[30]利用藻类对孔雀石绿进行降解时也发现碱性状态有利于染料的降解, 认为染料溶液的初始 pH 是各类影响参数中最为有效的影响因素。Chen 等^[6]也发现了 *Pandora pulmonicola* YC32 在略偏碱的溶液中对孔雀石绿降解效果更好。由于染料废水通常呈碱性状态, 所以降解菌对碱的耐受性是进行工业应用时所要考虑的重要因素之一^[31]。因此, *B. adusta* XX-2 菌株更有可能应用于碱性环境的染料废水处理。后续实验的染料溶液初始 pH 设定为 7.0。

2.3 培养温度对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

降解系统在不同的温度下培养 120 h, 研究温度对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响。研究(静置培养, pH 7.0, 染料初始浓度为 120 mg/L)结果

表明,在25 °C 时降解率最大,达到66%,这与 Daneshvar 等^[30]利用藻类 *Chlorella* sp.降解孔雀石绿时的最适温度一致。在 25 °C–40 °C 的范围内,降解率随温度的升高而降低,最低达2.93% (35 °C)。最适降解温度(25 °C)与真菌活跃季节的温度非常接近,有利于菌种的快速生长,也是菌种应用于染料废水降解的有利条件之一。后续实验均在最佳温度 25 °C 下进行。曹海鹏、梅嫒、林少芳等^[22,26,32]研究了细菌对孔雀石绿的降解,发现最适温度在 30 °C; Daneshvar 等^[33]利用藻类 *Cosmarium* sp.对孔雀石绿进行降解,最适温度高达 45 °C, Ayed 等^[25]利用 *Sphingomonas paucimobilis* 降解孔雀石绿时的最适温度也与之相似。

2.4 初始染料浓度对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

从图 2 (静置培养, pH 7.0, 温度 25 °C)可以看出, *B. adusta* XX-2 对孔雀石绿的降解率随着初始染料浓度的升高而降低,这与绝大多数的研究结果相似^[23,25],是因为随着染料浓度的升高,染料对微生物的毒害加大^[34],同时因为微生物酶分泌能力有限,这种降解效率也会下降。当孔雀石绿的浓度由 10 mg/L 上升到 120 mg/L,降解百分率从 93.72% 下降到 61.29%。当染料浓度达到 200 mg/L 时, *B. adusta* XX-2 菌株仍然具有一定

降解能力,降解率大约为 24%,说明 *B. adusta* XX-2 菌株能够忍耐较高浓度孔雀石绿的毒性。Parshetti 等^[23]的研究报道了 *Kocuria rosea* MTCC 1532 能够 100%的降解 50 mg/L 的孔雀石绿溶液,但是当孔雀石绿浓度达到 100 mg/L 时只有 6%的降解率; Youssef 等^[35]也报道 *Acremonium kiliense* 降解 10 mg/L 孔雀石绿溶液的降解率也只有 35.48%; 梅嫒等^[26]研究 K4-W 降解孔雀石绿时发现当染料浓度超过 20 mg/L 时,降解效率明显降低,不到 50%。与之相比,本研究中的 *B. adusta* XX-2 菌株表现出更加高效地对孔雀石绿染料的降解。

2.5 培养时间对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

降解百分率随降解时间的变化如图 3 (温度 25 °C, 静置培养, pH 7.0, 初始染料浓度 120 mg/L)所示, 5–6 d 时的降解率达到了 80%–90%, 6 d 后随着时间的增加,降解百分率增加不显著,降解系统基本达到平衡,所以我们选择 5 d 作为实验时间。在染料降解初期即前 3 天的时间内,降解非常缓慢,这可能是由于 *B. adusta* XX-2 菌株对染料溶液有一个适应驯化期,同时也可能是由于初期分解酶的分泌量较小导致的。Asgher 等^[7]也从 *Schizophyllum commune* 降

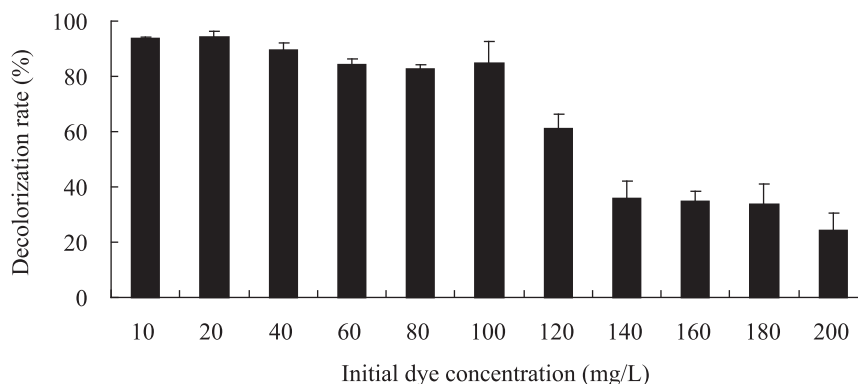


图 2 初始染料浓度对孔雀石绿降解的影响

Fig. 2 Effect of initial dye concentration on decolorization of MG by *B. adusta* XX-2 strain

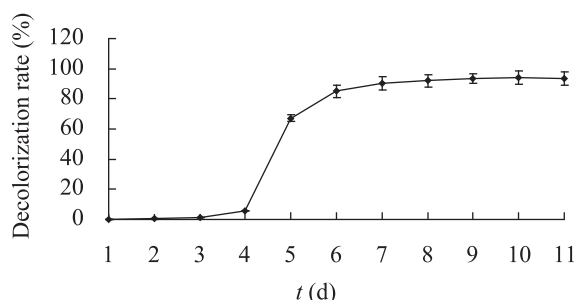


图3 培养时间对孔雀石绿降解的影响

Fig. 3 Effect of incubation time on decolorization of MG by *B. adusta* XX-2 strain

解孔雀石绿的过程中观察到了相似的结果。本实验同时将脱色率随时间的变化数据进行了动力学模拟,发现 *B. adusta* XX-2 菌株对孔雀石绿的降解行为符合一阶动力曲线,即 $\ln C = -2.5069t + 14.295$ ($R^2 = 0.8971$, C 代表降解后的染料浓度, t 代表降解的天数)。

2.6 碳源对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

碳源是微生物获取能量的重要营养元素之一,染料降解菌对不同的碳源具有不同的利用能力,分别向染料溶液中添加酒石酸钠(ST)、果糖(FR)、蔗糖(CS)、葡萄糖(G)、柠檬酸钠(SC)、乙酸钠(SA)、木糖(XY)、乳糖(LA)、丙二酸(MC)、肌醇(IN)、间苯三酚(PH)和草酸(AC),使最终浓度达到 5 g/L。由图 4 (静置培养, 25 °C, pH 7.0, 染料初始浓度 120 mg/L)可知,最佳碳源是柠檬酸钠(SC),在没有其它基础盐培养基的情况下其降

解百分率可达 97.86%。然而在许多其它染料降解的研究中葡萄糖是使染料降解效果最好的添加碳源之一,这归因于葡萄糖是多数微生物最容易利用的营养物质,如 Raghukumar 和 Rivonkar^[36] 研究表明白腐真菌 *Flavodon flavus* 可以高效利用葡萄糖降解染料废水;梁红昌等^[37]报道泡盛曲霉以葡萄糖为碳源的查氏培养基脱色效果最好;林永慧等^[38]研究显示 *Mucoromycotina* sp.在添加葡萄糖为碳源的 Kirk 培养基中脱色最好;田启建等^[39]发现撕裂蜡孔菌 P2 对添加葡萄糖的橙黄 G 染料废水的降解效果最佳。为了研究最佳碳源浓度对降解的影响,不同浓度的柠檬酸钠添加到染料溶液中,显示柠檬酸钠浓度的改变对 *B. adusta* XX-2 降解的影响不是很大,降解率大约在 86%–93%之间,所以从节约成本的角度来讲,1 g/L 的柠檬酸钠浓度更适合实际的孔雀石绿降解。

2.7 氮源对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

分别向染料溶液中添加氯化氨、硝酸铵、硫酸铵、尿素、蛋白胨、硝酸钠、牛肉膏、酒石酸氨、丙烯酰胺、乙二胺四乙酸二钠和氨基乙酸,使最终浓度达到 0.2 g/L。不同氮源条件下的染料降解研究(静置培养, 25 °C, pH 7.0, 染料初始浓度 120 mg/L)表明所有选择的氮源都能很大程度上促进 *B. adusta* XX-2 菌株对孔雀石绿的降解,染料降解率在 95%–98%之间(高出无氮源添加的处

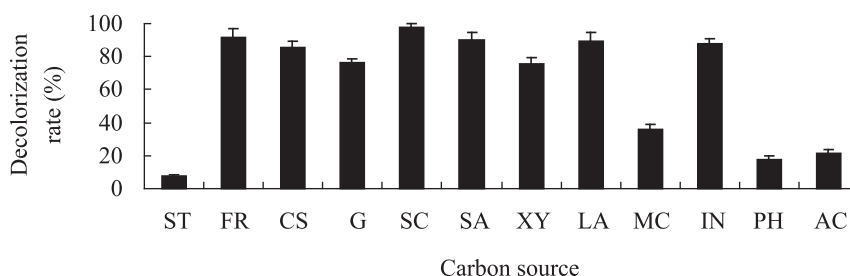


图4 不同碳源对孔雀石绿降解的影响

Fig. 4 Effect of carbon source on decolorization of MG by *B. adusta* XX-2 strain

理近 25%), 其中以氯化氨略为显著。氮素的添加可能促进了菌丝量的生长, 进一步提高了染料降解酶的分泌, 从而提高了降解效率。不同的研究结果显示了不同微生物对氮源的利用程度不同, 如梅嫒等^[26]报道 *Raoultella* sp. 降解孔雀石绿时对有机氮源的利用明显好于无机氮源; 田启建等^[39]研究发现撕裂蜡孔菌 P2 降解橙黄 G 染料时对硝酸铵的利用最为有效; 而林永慧等^[38]的研究却表明硫酸铵是利用最为有效的氮源。同时, 本研究也分析了不同浓度的氯化氨对降解的影响, 结果表明氯化氨浓度的改变对降解效果的影响也不是很大, 同碳源一样, 降解率基本在 90%–95% 之间, 从节约成本以及避免水体富营养化的角度考虑, 0.1 g/L 的氯化氨更符合实际染料废水降解的要求。

2.8 金属离子对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

由于染料废水中一般含有各种各样的金属离子, 我们研究了不同金属离子对染料降解的影响, 分别向染料溶液中添加 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ba^{2+} 和 Ni^{+} , 使其最终浓度为 0.1 mmol/L。图 5 (静置培养, 25 °C, pH 7.0, 染料初始浓度 120 mg/L) 显示最佳金属离子为 Zn^{2+} , 其次为 Cu^{2+} , 金剑等^[40]报道称 Zn^{2+} 能够促进染料的降解, 这可能是

由于 Zn^{2+} 能够提高木质素过氧化物酶的活性; 田启建等的研究也表明 Zn^{2+} 能促进橙黄 G 染料的脱色^[39]。 Cu^{2+} 是漆酶的组成成分, Cu^{2+} 对孔雀石绿降解的促进作用可能是由于 Cu^{2+} 激发了漆酶的活性^[40]。同时由图 5 可知 Hg^{2+} 大大的抑制了 *B. adusta* XX-2 对孔雀石绿的降解, 可能是由于菌种承受不了 Hg^{2+} 的剧毒所致。进一步研究了不同浓度 Zn^{2+} 对孔雀石绿降解的影响, 结果显示在 0.01–0.50 mmol/L 的 Zn^{2+} 浓度范围内, 孔雀石绿的降解百分率变化不大, 基本在 89%–95% 之间。

2.9 盐度对 *B. adusta* XX-2 降解能力的影响

印染工业废水中含有大量的无机盐, 盐度有时高达 15%–17%, 染料降解微生物对高盐度的耐受性是影响其能否正常应用的重要因素之一^[41]。研究(静置培养, 25 °C, pH 7.0, 染料初始浓度 120 mg/L)结果表明, 当盐度低于 16 g/L 时, 对降解率的影响不大(降解率大约 88% 左右), 当盐度高于 32 g/L 后, 孔雀石绿的降解率随着盐度的上升而下降, 但当盐度达到 64 g/L 时, 降解率仍能保持在 60% 以上, 甚至在盐度为 128 g/L 时菌株仍然有一定的降解活性(降解率为 8.59%), 可以表明 *B. adusta* XX-2 是一株耐高盐的真菌, 显示出较强的应用潜能。其它有关染料脱色的研究也报道了许多相似的耐盐菌株^[38–39, 41–42]。

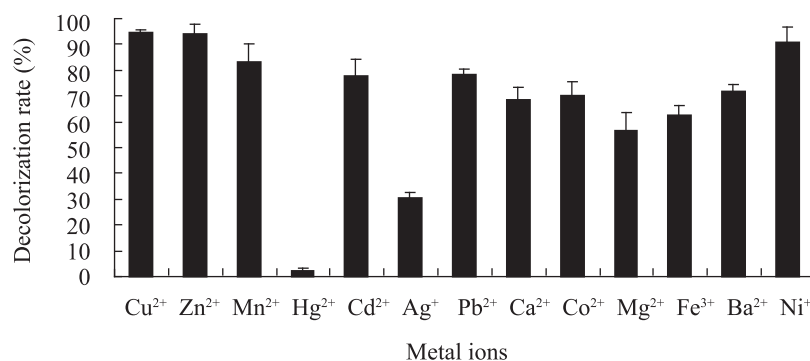


图 5 不同金属离子对孔雀石绿降解的影响

Fig. 5 Effect of metal ion on decolorization of MG by *B. adusta* XX-2 strain

2.10 连续脱色能力测试

菌株的连续脱色能力是检验菌株应用能力的一个重要指标，连续脱色能力测试(静置培养，25℃，pH 7，染料初始浓度 120 mg/L)结果表明，*B. adusta* XX-2 菌株显示了对孔雀石绿(浓度 120 mg/L)较强的连续脱色能力，第 1、2 个周期(每个周期 5 d)后染料降解率基本相同，约 67%左右，之后降解率显著下降，经过 5 个周期的降解后，仍显示较强的脱色能力，脱色率达 42%，显示出该菌株较强的应用潜力。Daneshvar 等^[30]利用藻类 *Chlorella* sp.对孔雀石绿进行连续脱色，显示在 5 个循环内脱色率不变；Chang 和 Kuo 等^[43]报道 *E. coli* NO3 对 C.I. Reactive Red 22 进行连续脱色时在第 2–5 个循环表现出脱色效率的增加。不同研究中连续脱色的表现不一致，这可能归因于不同菌株对染料溶液的适应性不同。

2.11 毒性分析

最常用的植物毒性测试方法是监测种子的发芽率和植株的生长情况^[44]。植物毒性测试结果如表 1 所示，去离子水(对照)、120 mg/L 孔雀

石绿溶液与其降解产物对豇豆和豌豆种子进行培养后种子萌发率均为 100%，表明孔雀石绿及其降解产物对豇豆和豌豆种子的萌发率均没有产生明显的影响。大部分用孔雀石绿降解产物浇灌的种子胚芽、胚轴、胚根的长度都大于直接用孔雀石绿浇灌的种子，与对照组相近，甚至超过对照组，说明降解后的溶液毒性极大下降。Parshetti 等^[23]的研究也显示 MG 降解后的产物引起 *Triticum aestivum* 的种子萌发要高于 MG；Ayed 等^[25]研究发现 MG 降解后的产物对 *T. aestivum* 和 *Sorghum bicolor* 萌发与根茎生长的毒性大大降低。

微生物毒性测试的数据结果如表 2 所示，120 mg/L孔雀石绿溶液的抑菌圈明显大于降解后产物的抑菌圈，表明了孔雀石绿溶液降解产物的毒性较降解前有所降低。Ayed 等^[25]研究微生物毒性测试时也发现在 MG 降解后对 *Sphingomonas paucimobilis* 产生的毒性极大减小，而有的研究发现 MG 降解后生成的隐性孔雀石绿的毒性与 MG 相同^[25]。

表 1 孔雀石绿染料溶液(120 mg/L)与其降解产物(5 d 后)对豇豆和豌豆种子萌发的影响 Table 1 Effect of 120 mg/L MG solution and its decolorized product on germination of <i>V. unguiculata</i> and <i>P. sativum</i> seeds						
参数 Parameters	豇豆 <i>V. unguiculata</i>			豌豆 <i>P. sativum</i>		
	对照组 Control	孔雀石绿 溶液 MG solution	降解产物 Decolorized product	对照组 Control	孔雀石绿 溶液 MG solution	降解产物 Decolorized product
发芽率 Germination percentage (%)	100	100	100	100	100	100
胚芽长度 Length of plumule (cm)	1.08±0.06	0.77±0.03	0.98±0.05	0.81±0.03	0.51±0.01	0.68±0.02
胚轴长度 Length of plumule (cm)	1.05±0.33	0.39±0.03	0.51±0.05	1.78±0.14	1.29±0.08	2.30±0.16
胚根长度 Length of plumule (cm)	9.98±0.81	4.32±0.23	11.41±0.72	10.47±0.31	5.11±0.14	11.27±0.32
胚芽干重 Dry weight of plumule (g)	0.18±0.04	0.12±0.05	0.14±0.03	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
胚轴干重 Dry weight of plumule (g)	0.06±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.22±0.04	0.18±0.03	0.26±0.05
胚根干重 Dry weight of plumule (g)	1.09±0.09	0.86±0.07	0.92±0.07	0.69±0.06	0.55±0.03	0.74±0.04

表 2 孔雀石绿染料溶液(120 mg/L)与其降解产物(5 d 后)对测试菌的影响
Table 2 Effect of 120 mg/L MG solution and its decolorized products on tested bacteria and fungi

菌种 Strain	抑菌圈直径大小 The diameter size of circle of inhibition (cm)	
	孔雀石绿溶液 MG solution	降解产物 Decolorized product
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	2.57±0.03	1.46±0.02
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	3.45±0.05	2.29±0.07
黄曲霉 <i>A. flavus</i>	1.92±0.04	1.09±0.03
黑曲霉 <i>A. niger</i>	1.76±0.04	0.93±0.03

表 3 孔雀石绿染料溶液(120 mg/L)与其降解产物对小青鳞和田螺的影响
Table 3 Effect of 120 mg/L MG solution and its decolorized products on *O. latipes* and *B. aeruginosa*

染料处理 Dye treatment	小青鳞 <i>O. latipes</i>		田螺 <i>B. aeruginosa</i>	
	半致死时 Semilethal time (min)	全死时间 Total lethal time (min)	半致死时间 Semilethal time (min)	全死时间 Total lethal time (min)
孔雀石绿溶液 MG solution	30.0±2.5	120.0±6.1	810.0±46.8	900.0±67.2
降解产物 Decolorized products (5 d)	186.0±15.4	407.0±28.4	1 635.0±103.6	2 070.0±201.7
降解产物 Decolorized products (10 d)	533.0±43.8	>800	1 875.0±133.4	>2 600

从表3可以看出水生生物的半致死时间和致死时间在染料被降解后明显的延长,而且降解时间越长水生生物存活的时间越长.降解后的溶液仍有小青鳞、田螺死亡,显示降解后的溶液仍具有一定程度的毒性,但有些小青鳞与田螺经过一段时间的适应后,已经能够在降解后的染料溶液中长期生存,降解后的染料溶液毒性已大大下降。

从所有的毒性测试结果可以看出,对植物、微生物、水生动物而言,降解后的产物毒性较降解前的孔雀石绿溶液的毒性明显减弱,说明利用 *B. adusta* XX-2 菌株降解孔雀石绿会使染料溶液的毒性大大降低,因此在实际应用中符合环境友好型的环保需求。

3 结论

本研究表明 *B. adusta* XX-2 菌株能够在静置和系统开放条件下高效降解孔雀石绿,静置培养与摇动培养相比更能够节约成本,*B. adusta* XX-2

能够以孔雀石绿为唯一营养源进行染料降解,且添加低浓度的碳源、氮源、金属离子能够在很大程度上提高降解效率。*B. adusta* XX-2 有很高的耐盐性,毒性测试也表明降解后产物的生物毒性明显减弱。综上所述,*B. adusta* XX-2 菌株在处理以孔雀石绿为主的染料废水时具有很强的应用潜力。

参 考 文 献

[1] Babu PEJ, Kumar V, Visvanathan R. Equilibrium and kinetic study for the removal of malachite green using activated carbon prepared from *Borassus flabellifer* male flower[J]. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2010, 5(3): 465-472.

[2] Hameed BH, El-Khaiary MI. Batch removal of malachite green from aqueous solutions by adsorption on oil palm trunk fibre: equilibrium isotherms and kinetic studies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154(1/3): 237-244.

[3] Li L, Hong Q, Yan X, et al. Isolation of a malachite green-degrading *Pseudomonas* sp. MDB-1 strain

- and cloning of the *tmr2* gene[J]. *Biodegradation*, 2009, 20(6): 769–776.
- [4] Wang XS. Invasive freshwater macrophyte alligator weed: novel adsorbent for removal of malachite green from aqueous solution[J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2010, 206(1/4): 215–223.
- [5] 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.
- [6] Chen CY, Kuo JT, Cheng CY, et al. Biological decolorization of dye solution containing malachite green by *Pandoraea pulmonicola* YC32 using a batch and continuous system[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(2/3): 1439–1445.
- [7] Asgher M, Kausar S, Bhatti HN, et al. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2008, 61(2): 189–193.
- [8] Reddy CA. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(3): 320–328.
- [9] Sugano Y, Matsushima Y, Shoda M. Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(4): 862–871.
- [10] Ali H, Ahmad W, Haq T. Decolorization and degradation of malachite green by *Aspergillus flavus* and *Alternaria solani*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8(8): 1574–1576.
- [11] Cheriaa J, Bakhrouf A. Triphenylmethanes, malachite green and crystal violet dyes decolourisation by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. *Annals of Microbiology*, 2009, 59(1): 57–61.
- [12] Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66(3): 319–329.
- [13] Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4358–4360.
- [14] Papinutti VL, Forchiassin F. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 231(2): 205–209.
- [15] 陈亮, 林永慧, 何兴兵, 等. 烟管菌降解孔雀石绿染料的多因素优化分析[J]. *湖南农业科学*, 2011, 8(16): 36–37.
- [16] Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(2): 261–266.
- [17] 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.
- [18] 田启建, 林永慧, 何兴兵, 等. 小溪自然保护区甲基橙降解真菌的筛选及其脱色能力分析[J]. *贵州农业科学*, 2011, 39(11): 4178–4184.
- [19] He X, Han G, Lin Y, et al. Diversity and decomposition potential of endophytes in leaves of a *Cinnamomum camphora* plantation in China[J]. *Ecological Research*, 2012, 27(2): 273–284.
- [20] Li A, Zhu Y, He XB, et al. Evaluation of antimicrobial activity of certain Chinese plants used in folkloric medicine[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(4): 569–572.
- [21] Ren S, Guo J, Zeng G, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1316–1321.
- [22] 曹海鹏, 葛秀卿, 何珊, 等. 孔雀石绿脱色菌 M6 的脱色特性与系统发育分析[J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(12): 39–42.
- [23] Parshetti G, Kalme S, Saratale G, et al. Biodegradation of malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532[J]. *Acta Chimica Slovenica*, 2006, 53(4): 492–498.

- [24] 王国惠. 霉菌菌丝球 WL 对孔雀绿染料脱色性能研究[J]. 微生物学杂志, 2008, 28(6): 19-23.
- [25] Ayed L, Chaieb K, Cheref A, et al. Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(4): 705-711.
- [26] 梅嫒, 洪青, 李顺鹏. 一株孔雀石绿降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 390-393.
- [27] Ali N, Ikramullah, Lutfullah G, et al. Decolorization of Acid Red 151 by *Aspergillus Niger* SA1 under different physicochemical conditions[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 1099-1105.
- [28] Rismayani S, Fukushima M, Ichikawa H, et al. Decolorization of orange II by catalytic oxidation using iron (III) phthalocyanine-tetrasulfonic acid[J]. Journal of Hazardous Materials, 2004, 114(1/3): 175-181.
- [29] Mazmanci MA, Unyayar A. Decolorization efficiency of *Funalia trogii* under static condition: Effect of C:N ratios[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(39): 6539-6544.
- [30] Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard MH, et al. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: optimization of effective parameters using Taguchi method[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 143(1/2): 214-219.
- [31] Joe M, Lim S, Kim D, et al. Decolorization of reactive dyes by *Clostridium bifermentans* SL186 isolated from contaminated soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2221-2226.
- [32] 林少芳, 余萍, 林玉满. 一株绿脓假单胞菌对碱性孔雀绿脱色的初步研究[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2004, 20(4): 72-75.
- [33] Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee AR, et al. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp.[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(6): 1176-1182.
- [34] Khehra MS, Harvinder SS, Sharma DK. Biodegradation of Azo dye C.I. acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor[J]. Dyes and Pigments, 2005, 70(1): 1-6.
- [35] Youssef AS, El-Sherif MF, El-Assar S. Studies on the decolorization of malachite green by the local isolate *Acremonium kiliense*[J]. Biotechnology, 2008, 7(2): 213-223.
- [36] Raghukumar C, Rivonkar G. Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a Marine habitat[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 55(4): 510-514.
- [37] 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.
- [38] 林永慧, 陈亮, 何兴兵, 等. *Mucoromycotina* sp. HS-3对苯胺蓝染料的降解[J]. 微生物学通报, 2010, 37(12): 1727-1733.
- [39] 田启建, 林永慧, 何兴兵, 等. 耐高盐撕裂蜡孔菌 P2对模拟橙黄 G 染料废水的脱色及废水脱色前后的毒性测试[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 876-882.
- [40] 金剑, 康文丽, 生吉萍, 等. 云芝(*Coriolus versicolor*)木质素过氧化物酶(LiP)酶学性质分析[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 224-227.
- [41] 田存萍, 周集体, 郭建博, 等. 耐盐菌在复合高盐条件下对偶氮染料 K-2BP 的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(6): 82-83, 120.
- [42] 郭建博, 周集体, 王栋, 等. 降解偶氮染料耐盐菌 GTY 的分离鉴定及特性研究[J]. 环境科学学报, 2007, 27(2): 201-205.
- [43] Jo-Shu C, Tai-Shin K. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3[J]. Bioresource Technology, 2000, 75(2): 107-111.
- [44] Jadhav JP, Phugare SS, Dhanve RS, et al. Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH[J]. Biodegradation, 2010, 21(3): 453-463.