

一株脱色真菌的鉴定及脱色特性的初步探讨

梁红昌 千英花 张庆华 陈和淼 吴晓玉*

(江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

摘要: 从废水环境中分离筛选到一株高效染料脱色真菌, 根据形态学及显微特征初步鉴定为泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*), 命名为 Asaw117; 从偶氮类、蒽醌类和氧醌类中选取 8 种不同染料进行脱色分析表明, 该菌株对 0.1 g/L 蒽醌类染料还原蓝 RSN 的脱色率可达 100%; 采用不同培养基及不同种类碳氮源进行试验比较, 菌株在查氏培养基中生长慢, 但脱色效果最好, 在马铃薯培养基中生长旺盛, 脱色效果次之。此外, 菌株 Asaw117 能利用还原蓝 RSN 作为氮源, 但不能利用其为碳源; 几种碳氮源组合实验中, 菌株在蔗糖、硝酸铵组合的查氏培养基脱色效果为好。因此对处理印染废水具有较好的应用潜力。

关键词: 泡盛曲霉, 鉴定, 脱色, 染料

Preliminary Discuss on Identification and Characterization of One Decolorizing Fungus

LIANG Hong-Chang QIAN Ying-Hua ZHANG Qing-Hua
CHEN He-Miao WU Xiao-Yu*

(College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agriculture University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: According to morphological and microscopic characteristics, a high-efficient decolorizing fungus, the strain Asaw117, was identified as *Aspergillus awamori*. Selecting eight different dyes from Azo dyes, anthraquinones dyes and oxygen Quinones dyes, the decolorizing assays of various dyes showed that the strain Asaw 117 was the highest decolorizing potential to 0.1 g/L Vat Blue RSN, the discoloration rate up to 100 percent. Comparing to different kinds of medium and several of carbon and nitrogen sources, the strain had the best decolorizing efficient although grew slower in the Czapek medium, otherwise, grew quicker and decolorizing efficient lower in the PDF medium. It could use Vat Blue RSN as a nitrogen source, but not as a carbon source. The medium composing of saccharose and ammonium nitrate as carbon and nitrogen sources was decolorizing potential markedly during different combinations of carbon and nitrogen sources. So the strain has good potential for the dyeing wastewater treatment

Keywords: *Aspergillus awamori*, Identification, Decolorization, Dye

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30360050); 江西省教育厅科技项目(No. 赣教技字〔2005〕100号); 江西农业大学研究生创新专项资金项目

* 通讯作者: Tel: 86-791-3828080; 信箱: wuxiaoyu58@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-14; 接受日期: 2009-02-10

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

蒽醌类染料是一类分子结构中含蒽醌基的染料通称,具有色泽鲜艳、固色率高、染色牢度好等众多突出的优点^[1,2]。而还原蓝RSN(分子式: C₃₈H₁₄O₄N₂)是出现最早的蒽醌系还原染料,它是棉用高级染料品种之一,广泛应用于纤维素纤维和涤/棉混纺织物内棉组分的套染。

印染废水水量大、色度高、毒性大、成份复杂,对环境污染严重;印染废水可生化性差,是难处理的工业废水之一^[3]。而蒽醌类染料大多数是芳香族化合物,有稳定的共轭结构,结构复杂而难降解,其生产废水也是废水处理的难点。许多环境工作者正通过各种试验与研究,寻求蒽醌染料废水的处理工艺^[4,5]。传统的蒽醌染料废水处理方法较多,物化法有中和、混凝沉淀、气浮、砂滤等;化学法有沉淀法、臭氧氧化法、过氧化氢及过氧化物氧化法、氯系氧化法、电解氧化、还原法、碳化法等;生化法有厌氧降解和好氧降解等^[1]。近年来,生化法在废水处理中已受到越来越多的关注,特别是利用高效脱色微生物进行染料脱色处理,此法不仅成本低、且可减少二次污染的产生,因此被认为是染料脱色和降解最经济有效的方法^[6-8]。关于具有降解染料能力的真菌种类报道并不多,特别是利用蒽醌类染料作为营养物质的真菌报道更少。林晓华、董新姣等曾分别于2002年、2003年分离得到对蒽醌染料具有较强脱色能力的青霉菌X5和酵母菌T-2^[9,10]。

本研究室从污水中分离筛选出一株新脱色真菌,选取8种不同种类的染料进行脱色实验,其对蒽醌类染料还原蓝RSN不仅具有较强吸附作用,同时发现,其发酵液在适宜的温度、PH等条件下可以促使还原蓝RSN溶液快速凝聚并逐步脱色,从而推测该菌株的代谢产物中可能含有某种染料降解酶。因此,通过工业污水驯化筛选高适用菌株并分离纯化其代谢酶,开发高活性、强稳定性的酶产品进一步应用于废水工业化处理具有重大的意义。本文从形态及显微特征对其进行了初步鉴定并探讨不同碳氮源对菌株脱色的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌种:由本实验室从江西农业大学附近污水中分离得到,简称菌株Asaw117。

1.1.2 染料与试剂:还原蓝RSN、活性艳蓝X-BR、

直接大红4BE、直接耐酸枣红、孟加拉玫瑰红、曙红、活性艳红X-3B、酸性大红GR,由南昌某染料化工有限公司提供,其它试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基:采用马铃薯培养基、马丁氏培养基、查氏培养基、查氏琼脂培养基、查氏酵母膏培养基、麦芽汁琼脂培养基^[11]。

1.1.4 主要仪器与设备:XSP-30生物显微镜,扫描电子显微镜,UV2802PC/PCS型分光光度计,LXJ-IIB型低速大容量多管离心机,HQL150B大振幅恒温摇床等仪器设备。

1.2 方法

1.2.1 菌种纯化:将分离的菌株接种到查氏斜面培养基上,于28°C~30°C下活化3d~5d,加入无菌水洗下孢子,过滤,滤液在装有玻璃珠的三角瓶中充分摇荡约1h,制得孢子悬液。取适量孢子悬液在培养基平板上划线分离、培养,挑取单菌落于查氏斜面培养基,重复上述步骤3次,获得纯培养菌株。

1.2.2 菌种鉴定:1)菌落形态观察:采用点植培养法。2)显微特征观察:采用载片培养观察法^[12,13]。

1.2.3 菌体对染料的脱色实验:菌种活化后,用无菌水制成浓度为 2.0×10^6 个/mL~ 3.0×10^6 个/mL的孢子悬液,充分振荡,以0.2%的接种量加入含50mL染料培养基(染料浓度为0.1g/L)的250mL三角瓶中,置摇床,150r/min、28°C下培养。

1.2.4 菌体干重的测定:50mL培养液经过滤,收集菌体,置干燥箱,80°C烘干至恒重,所得干重减去吸附在菌体上的染料质量即为菌体干重。

1.2.5 脱色能力的测定:菌株对染料的脱色能力采用比色法测定。取培养一定时间的培养液,于20000r/min下离心10min,所得上清液于染料的最大吸收波长下测定其吸光度 A_1 ,以不接种菌悬液的染料培养基的吸光度 A_2 为对照。

其脱色率用下列公式计算:

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

2 结果

2.1 菌种的鉴定

2.1.1 形态培养特征:本研究室筛选的脱色菌株Asaw117采用点植法,分别在查氏培养基25°C培养7d,查氏酵母琼脂和麦芽汁琼脂培养基25°C培养5d后,观察其形态特征,结果见表1。试验显示:在3

表 1 菌株在不同培养基上的形态特征
Table 1 Morphology of the strain Asaw117 in different culture medium

培养基种类 Variety	菌落直径 Colony diameter (mm)	质地特征 Colony characteristic	菌落颜色 Colony color
查氏培养基 Culture media	50~55	具辐射状沟纹, 质地丝绒状	表面呈橄榄褐色至暗巧克力褐色, 中部带灰褐色, 菌落反面呈不同程度黄褐色
查氏酵母培养基 Yeasty culture media	60~65	多具辐射状沟纹, 质地丝绒状	暗褐黑色到黑色, 菌落反面带灰黄色
麦芽汁培养基 Maltextract agar	70~75	具辐射状沟纹, 质地丝绒状	暗褐色至黑色, 菌落反面呈不同程度的黄褐色

种不同培养基中, 菌株的菌落特征差异不明显, 与《中国真菌志》第五卷“曲霉属及其相关有性型”中的泡盛曲霉培养特征相近^[12,13]。

2.1.2 显微特征: 采用光学与电子显微镜观察显示: 菌株 Asaw117 分生孢子梗较长, 具有足细胞; 孢梗茎近顶囊部分稍收缩, 梗壁平滑; 顶囊球形, 直径 20 μm ~60 μm , 整个顶囊着生梗基(图 1); 产孢结构为双层: 梗基(10 μm ~40 μm) \times (3.5 μm ~6 μm), 瓶梗(8 μm ~10 μm) \times (2 μm ~4 μm); 分生孢子头幼时多呈辐射形, 直径 70 μm ~150 μm , 老时疏松或呈疏松的圆柱状结构, 直径约 300 μm ~500 μm ; 分生孢子球形, 直径 3.5 μm ~5.0 μm , 孢子壁稍粗糙, 具有不规则的低脊。

由上述结果, 参考魏景超著《真菌鉴定手册》和齐祖同著《中国真菌志》第五卷“曲霉属及其相关有性型”及模式菌株泡盛曲霉 As3.44(图 2), 初步鉴定该菌株为曲霉属的泡盛曲霉 *Aspergillus awamori*^[12,13]。



图 1 菌株 Asaw117 分生孢子及孢梗茎的形态特征($\times 640$)
Fig. 1 Morphology of conidiophore and conidiophore stipe of the strain Asaw117 ($\times 640$)

2.2 不同因子对菌株脱色的影响

2.2.1 菌株对不同染料的脱色效果: 试验选取偶氮类、蒽醌类、氧醌类 3 大类 8 种染料, 分别添加浓度为 0.1 g/L 的染料于查氏培养基中, 检测菌株 Asaw117 对其脱色性能。

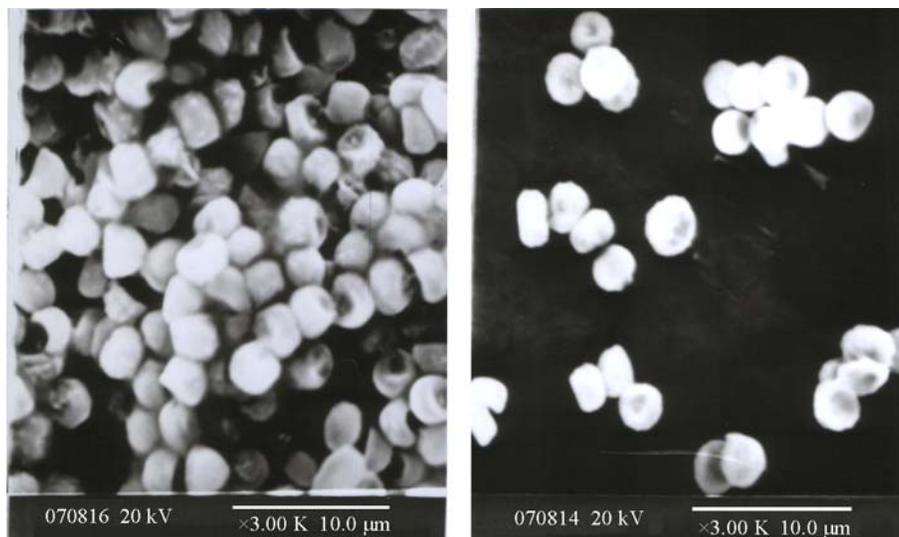


图 2 菌株 Asaw117 与模式菌株 As3.44 分生孢子形态比较($\times 3000$)

Fig. 2 Comparison of morphology of conidiophore between the strain Asaw 117 and the type strain As3.44 ($\times 3000$)

结果表明: 28°C 培养 48 h 后, 菌株 Asaw117 对不同染料的脱色率存在很大差异。菌株对还原蓝 RSN 的脱色能力最强, 脱色率达到 100%; 对其它染料的脱色率相对较低, 其中对活性艳红 X-3B 和酸性大红 GR 脱色率最低, 几乎为 0。以不加染料的培养基作为对照(CK), 测得各染料培养基(50 mL)中菌株 Asaw117 培养 48 h 后的干重。结果表明: 直接大红 4BE 和活性艳红 X-3B 对菌体生长存在抑制作用, 其干重都小于对照菌体干重 0.04 g; 而其它种类染料菌体干重均高于比对照组, 尤以直接耐酸枣红明显, 为 0.13 g。(见图 3)。

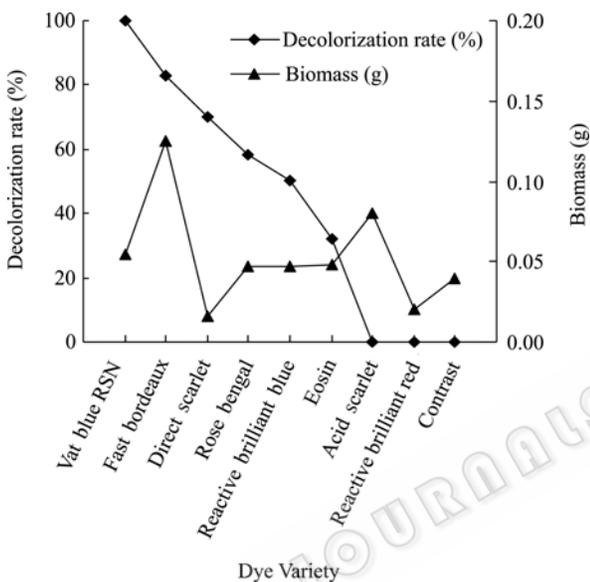


图 3 菌株 Asaw117 对不同染料的脱色效果及染料对菌株生长的影响

Fig. 3 Decolor ratio of various dyes by the strain Asaw117 and effect of the dyes on the strain growth

在以上 8 种染料中, 还原蓝 RSN 是一种应用最早且产量较高的蒽醌类染料, 由于其分子中含有多个芳香环, 其废水难以处理。本试验显示菌株 Asaw117 对还原蓝 RSN 的脱色率为 100%, 且该染料对菌株生长有促进作用, 故以下试验均以还原蓝 RSN 为代表, 研究菌株 Asaw117 对蒽醌类染料的脱色影响因子。

2.2.2 不同培养基对脱色效果的影响: 采用在查氏、马丁、马铃薯(PDA)培养基添加浓度为 0.1 g/L 还原蓝 RSN, 配制成含染料培养基, 考察菌株生长状况及脱色率, 结果表明(见图 4): 28°C 培养 48 h 后, 菌株在查氏培养基和 PDA 培养基的脱色率差异不

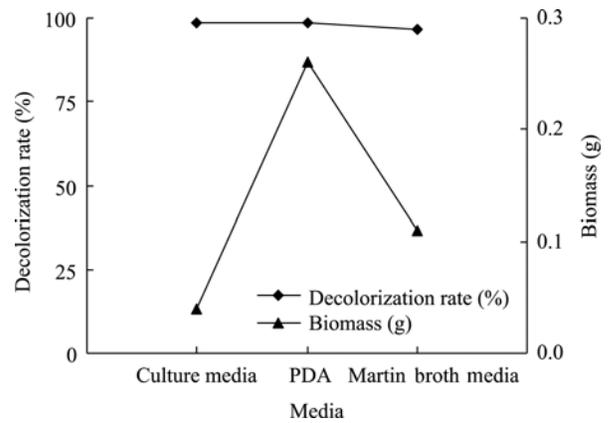


图 4 不同培养基对菌株 Asaw117 生长及脱色的影响

Fig. 4 Effect of different culture media on cell growth and decoloration of the strain Asaw117

大, 分别为 98.6%和 98.5%, 马丁培养基脱色效果略低, 为 96.8%; 进一步研究菌株在 3 种培养基中的生长状况发现, 菌株干重值最大为采用 PDA 培养基(0.27 g), 其次马丁培养基(0.11 g), 最小为查氏培养基(0.045 g); 查氏培养基中菌株的生长量比 PDA 培养基的少 6 倍, 而脱色效果相似, 甚至稍高于后者, 说明利用查氏培养基可提高菌株单位细胞的脱色能力。由此我们以查氏培养基作为研究菌株脱色性能的初始培养基。

接着, 将菌株分别接种于去除蔗糖或硝酸钠的含还原蓝 RSN 的查氏培养基中, 28°C 培养 48 h, 考察菌株的脱色及生长状况。结果表明: 菌株在缺乏蔗糖的含染料查氏培养基中生长量为 0, 脱色率为 0; 缺乏硝酸钠的查氏培养基中生长量为 0.03 g, 脱色率为 66.3%。说明菌株不能利用还原蓝 RSN 作为碳源进行生长, 而没有脱色效果, 但具有利用其为氮源进行生长的潜在可能性, 尽管菌株在此种条件下生长与脱色相对较弱些。

2.2.3 不同碳源对菌株脱色效果的影响: 分别用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、淀粉、甘油和乙醇替代查氏培养基中的碳源(蔗糖), 浓度均为 3%, 保持碳源含量和培养基其它成分不变, 研究 28°C、150 r/min 培养条件下菌株对染料还原蓝 RSN 的脱色效果。结果表明: 菌株在以葡萄糖为碳源的查氏培养基中生长量最大, 且脱色效果最好, 培养 48 h 时脱色率达到 99.6%; 而在蔗糖和麦芽糖培养基中生长与脱色次之, 脱色率分别为 98.8%、98.5%; 淀粉和乳糖培养基中菌株的生长与脱色效果偏低, 乙醇培养基中菌体生长量和脱色率均为 0(见图 5)。说明菌株对单糖

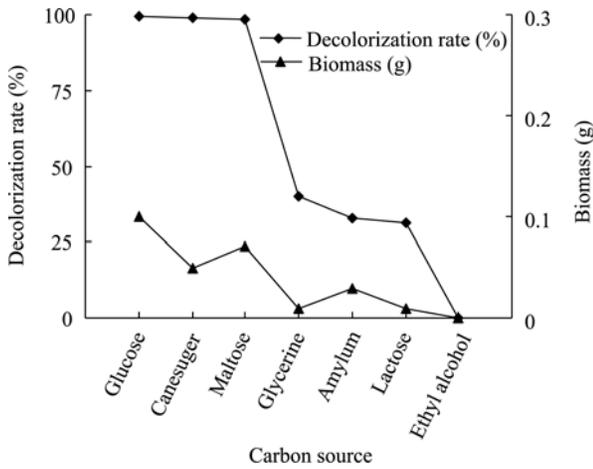


图 5 不同种类碳源对菌株 Asaw117 生长及脱色的影响
 Fig. 5 Effect of different carbon sources on cell growth and decolorization of the strain Asaw117

类的葡萄糖及双糖类的麦芽糖、蔗糖具有较高的利用能力。

2.2.4 不同氮源对菌株脱色效果的影响: 分别用蛋白胨、牛肉膏、黄豆饼粉、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵替代查氏培养基的氮源(硝酸钠), 浓度均为 0.2%, 保持氮源含量和培养基其它成份不变, 研究 28°C、150 r/min 培养条件下菌株对染料还原蓝 RSN 的脱色效果, 实验结果(图 6)表明: 菌株对无机氮源和有机氮源都具有较高的利用能力。菌株在含有无机氮源的培养基中脱色率普遍较高。培养 48 h 时, 菌株在含有硫酸铵、氯化铵、硝酸钠或硝酸铵的查氏培养基中脱色率都达到 100%; 在含有蛋白胨、牛肉膏

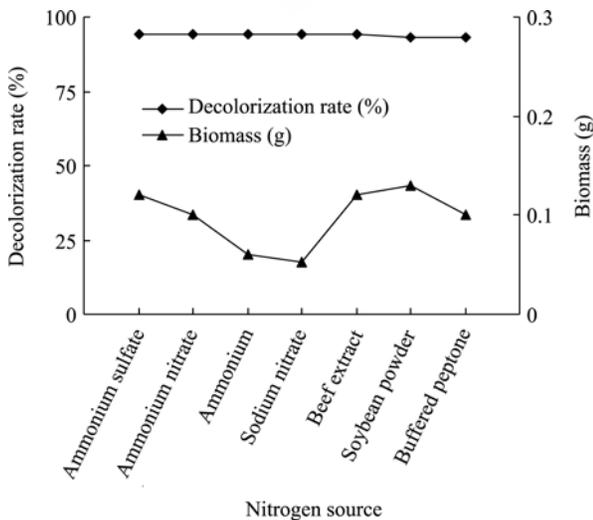


图 6 不同种类氮源对菌株 Asaw117 脱色率及生长量的影响
 Fig. 6 Effect of different nitrogen sources on cell growth and decolorization of the strain Asaw117

或黄豆饼粉的培养基中脱色率分别为 98.8%、100%、99.2%。有机氮源(牛肉膏、黄豆饼粉)更有利于菌株生长, 而菌株在无机氮源的培养基中生长相对比较缓慢(除硫酸铵外)。

2.2.5 不同碳、氮源组合对菌株脱色效果的影响: 根据上述实验结果, 选择脱色效果明显、菌株生长适宜以及原料价格低、有机氮源可能造成水质污染等因素, 选用葡萄糖、蔗糖分别为碳源, 硝酸钠、硫酸铵分别为氮源, 其他培养基营养成分不变, 组成 4 种培养基配方, 即: 葡萄糖+硝酸钠(A), 葡萄糖+硫酸铵(B), 蔗糖+硫酸铵(C), 蔗糖+硝酸钠(D), 各种碳氮源浓度、菌体的接种量、培养条件均同 2.2.3 和 2.2.4。每种培养基分别添加浓度为 0.1 g/L、0.5 g/L、1.0 g/L 的染料, 实验结果(图 7)表明, 在染料浓度为 0.1 g/L 的 4 种培养基中, A 培养基的脱色率最大, C 和 D 组合脱色率次之, B 培养基中的脱色率最小; 随着染料浓度的升高, D 培养基的脱色率逐渐高于其它组合的培养基。说明 D 组合培养基更具有脱色潜力。由此可知, 蔗糖和硝酸钠组成的碳、氮源培养基最有利于菌株的脱色作用。

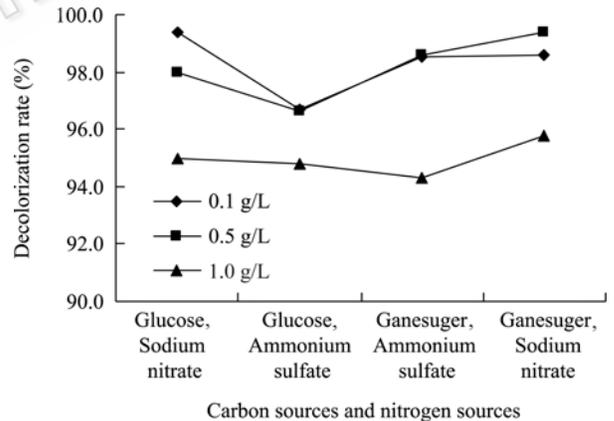


图 7 不同碳、氮源组合对菌株 Asaw117 脱色率的影响
 Fig. 7 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on decolorization of the strain Asaw117

3 结论

1) 经形态特征观察以及在扫描电镜下与模式菌株分生孢子结构比较, 菌株初步鉴定为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*); 该菌株对部分种类染料具有较强的脱色能力, 其中对还原蓝 RSN 的脱色能力最强, 培养 48 h 时脱色率达到 100%, 但对活性艳红 X-3B 和酸性大红 GR 脱色率最低, 几乎为 0。

2) 菌株在不同培养基中脱色率及生长量存在差异,在查氏培养基中生长最慢,但脱色率达到98.8%,在马丁氏培养基中脱色率为96.8%,在马铃薯培养基中菌株生长最好,但脱色率为98.5%。由此可见,该菌株最佳的生长培养基是马铃薯培养基,最佳的脱色培养基是查氏培养基。

3) 菌株对葡萄糖等单糖具有较好的利用效果,对氮源的选择性较大,甚至具有利用还原蓝 RSN 作为氮源的潜能;而以蔗糖和硝酸钠组成的碳、氮源组合培养基更有利于菌株脱色作用。

4) 自发现白腐真菌对含木质素的纸浆和造纸废水生物脱色以来,不断有关于真菌对染料废水等复杂有机物生物脱色降解的报道。泡盛曲霉属于半知菌类曲霉属,是黑曲霉组的一个变种,它具有合成细胞毒活性及新的多羟基甾醇脂肪酸酯结构化合物的能力^[14],但在作者所查阅的文献中还没有发现泡盛曲霉具有对染料进行降解除色的相关报道。关于该菌株的脱色研究我们将给予继续报道。

参 考 文 献

- [1] 洪颖,陈国松,张红漫,等. 蒽醌类染料废水处理的研究进展. 工业水处理, 2004, 24(10): 5-8.
- [2] 庄源益,辛宝平,宋文华,等. 蒽醌染料中间体溴氨酸降解酶的特性. 城市环境与城市生态, 2001, 14(2): 1-3.
- [3] Donlagic J, Level J. Comparison of catalyzed and non-catalyzed oxidation of azo dye and effect on biodegradability. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(9): 1294-1302.
- [4] 鲜海军,贾省芬,杨惠芳,等. 用高效染料脱色苗和 PVA 降解苗混合培养处理印染废水. 环境科学学报, 1993, 13(4): 420-427.
- [5] 许玫英,郭俊,岑英华,等. 染料的生物降解研究. 微生物学通报, 2006, 33(1): 138-143.
- [6] Dong Xiaoli, Zhou Jiti, Wang Jing. Decolorization of anthraquinone dye by *Rhodopseudomonas* XL-1. *High Technology Letters*, 2002, 8(2): 11-14.
- [7] Suizhou Ren, Jun Guo, Guoqu Zen, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Applied Micro-biology and Biotechnology*, 2006, 72(6): 1316-1321.
- [8] Walker GM, Weatherley LR. Biodegradation and biosorption of acid anthraquinone dye. *Environmental Pollution*, 2000, 108(2): 219-223.
- [9] 林晓华,董新姣. 青霉菌 X5 对活性艳蓝 KN-R 脱色研究. 四川环境, 2002, 21(4): 5-12.
- [10] 董新姣,林晓华,李晓云,等. 酵母菌 T-2 对蒽醌染料的脱色研究. 2003, 26(5): 30-32.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999, pp.214-216.
- [12] 齐祖同. 中国真菌志——曲霉属及其相关有性型. 北京: 科学出版社, 1997, pp.94-101.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979, pp.495-500.
- [14] 张志华,洪葵,高昊,等. 具有细胞毒活性红树林真菌 094811 的鉴定. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 6-11.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写,其余小写,属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体,首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体,后面的字母和编码正体平排,例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时,仅第一个字母大写,其余小写,正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体,蛋白质符号首字母大写,用正体。