

文章编号:1008-7826(2010)01-0083-05

黑曲霉降解甲基橙的探讨

张明强¹, 卢昌义^{2,3}, 郑逢中^{2,3}(1.漳州师范学院 化学与环境科学系, 福建 漳州 363000; 2.厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005;
3.厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 考察不同培养时间、pH 值、温度、转速、碳源、氮源等条件对黑曲霉 AN-1(*Aspergillus niger*) 菌丝球降解甲基橙的影响。结果表明, 在培养时间为 24 h、pH 值为 5.0、温度为 30 ℃、转速为 150 r/min、以葡萄糖为碳源、以硫酸铵为氮源等最佳条件下, AN-1 的降解率接近 100 %。

关键词: 黑曲霉; 菌丝球; 甲基橙; 降解

中图分类号: X172 **文献标识码:** A

Degradation of Methyl Orange by *Aspergillus niger*

ZHANG Ming-qiang¹, LU Chang-yi^{2,3}, ZHENG Feng-zhong^{2,3}(1.Department of Chemistry and Environment Science, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;
2.College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 3.State Key
Laboratory of Marine Environment, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: Effects of *Aspergillus niger* AN-1 on degradation of Methyl Orange were studied under different conditions of culture time, pH, temperature, rotational speed, carbon sources and nitrogen sources. The results showed that the degradation rate was nearly 100 % to Methyl Orange when optimal culture time was 24 hours, pH value 5.0, temperature 30 ℃, rotational speed 150 r/min, glucose as carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source.

Key words: *Aspergillus niger*; Pellets; Methyl Orange; degradation

1 前言

随着染料废水的大量排放, 染料在环境中日渐积累, 造成严重的环境污染, 因此染料废水的处理越来越被人们重视。染料废水是最难处理的工业废水之一^[1,2], 其脱色和降解已成为世界性的研究难点和热点。染料从结构上分为偶氮、蒽醌、杂环、三苯甲烷等, 多是难降解的芳香族化合物^[3]。偶氮染料是合成染料中最多的品种, 占排放到环境中染料总量的 80%, 其化学性质稳定, 废水成分复杂。因此, 解决好偶氮染料的净化问题, 对于解决整个染料工业废水的净化具有重要意义。甲基橙是一种互变异构体, 在酸性和碱性条件下的偶氮和醌式结构是染料化合物的主体结构, 以其作为染料模型化合物具有一定的代表性^[4]。

对染料废水的处理大多采用生化法^[5,6], 高效脱色降解菌的选育是用生化法的关键。近年来, 能有效脱色降解染料的细菌和真菌不断被发现^[7-10]。目前已经发现的脱色细菌^[11]有克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、细螺菌属(*Rhodospirillum*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、欧文氏菌属(*Enwinia*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、埃希氏菌属(*Escherchia*)、邻单胞菌属(*Plesiamonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、动胶菌属(*Zoogloea*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)

收稿日期: 2008-12-23

基金项目: 漳州师范学院科学研究资助项目(SK09011)

作者简介: 张明强(1977-), 男, 福建省漳州市人, 讲师。

和脱色真菌^[11]黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、采绒革盖菌(*Trametes versicolor*)、朱红密孔菌(*Pycnoporus cinnabarinus*)、青霉菌(*Penicillium* sp.)以及酵母菌属的多种酵母菌。由于真菌的降解能力比较稳定,所以选育具有较强降解能力的真菌,对于染料废水的微生物处理具有较大的应用价值。

本文从九龙江红树林保护区的底泥中筛选出一株对偶氮染料甲基橙有较强降解能力的曲霉,对其降解条件进行了研究,为进一步利用真菌对甲基橙废水的降解提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

增殖培养基(用于真菌初筛): 2g/L KH_2PO_4 , 1.4g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7mg/L ZnCl_2 , 0.3g/L CaCl_2 , 1.7mg/L CoCl_2 , 1.6mg/L MnSO_4 , pH 5.5.

分离筛选培养基(用于真菌复筛): 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L MgSO_4 , 1.0 g/L KH_2PO_4 , 50 mg/L 甲基橙, pH 自然.

查氏培养基(用于斜面培养孢子): 2.0 g/L NaNO_3 , 1.0 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 0.5 g/L KCl , 0.01 g/L FeSO_4 , 琼脂 15~20 g/L, pH 自然.

改进的马丁氏培养基(用于菌丝球的培养): 10.0 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L MgSO_4 , 1.0 g/L KH_2PO_4 , pH 自然.

改进的含甲基橙的马丁氏培养基(用作甲基橙降解的培养液): 10.0 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L MgSO_4 , 1.0 g/L KH_2PO_4 , 50 mg/L 甲基橙, pH 自然.

使用的染料为甲基橙(Methyl Orange), 为上海试剂三厂生产. 所用试剂均为分析纯.

756PG 紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); SHA-B 恒温振荡器(国华企业); BS 124S 电子天平(Sartorius); Ba Xun 超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); YXQ-LS-50SLL 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); SPX-250C 生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); PB-10 酸度计(Sartorius); XSP-2C 电子显微镜(上海光学仪器厂).

2.2 实验方法

2.2.1 菌种筛选

将九龙江红树林保护区的底泥 2 g, 加入到含 50 mL 增殖培养基的 250 mL 的锥形瓶中, 30℃、120 r/min 下培养 3 d, 然后采用 10 倍稀释法涂布于分离筛选培养基上, 观察菌落特征和透明圈大小, 将单个纯菌落(选取透明圈/菌落直径比值较大菌落)反复用分离筛选培养基纯化, 最终筛选到一株甲基橙降解菌 AN-1, 初步鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*). 将 AN-1 接种在查氏固体培养基斜面上, 30℃培养 3 d 后, 于 4℃保存备用.

2.2.2 菌丝球的培养

取 4℃保存的 AN-1 孢子, 活化, 加入适量的无菌水用接种环将斜面上的孢子刮下, 制成浓度为 $10^6 \sim 10^9$ 个/mL 的孢子菌悬液后, 以 5% 的接种量接入预先配制的含 500 mL 改进的马丁氏培养基的 1000 mL 锥形瓶中, 于摇床转速 120 r/min, 30℃下培养 3 d, 过滤收集菌丝球, 将菌丝球浸泡于生理盐水中, 于 4℃冰箱中保存备用.

2.2.3 降解率的测定

往 250 mL 锥形瓶中, 加 2.0 g 菌丝球, 50 mL 甲基橙(50 mg/L)培养液, 以葡萄糖为碳源、硫酸铵为

氮源, 调节 pH 为 5.0, 控制 30 °C, 转速 150 r/min, 培养 24 h. 同时作空白试验, 于 468 nm 处测定反应前体系的吸光度(A_0)和反应后体系的吸光度(A), 计算降解率 $[(A_0-A)/A_0 \times 100\%]$ ^[12-13].

3 结果与讨论

3.1 菌株初步鉴定

采用常规真菌鉴定方法^[14]对菌株进行鉴定. 将 AN-1 点植于查氏培养基平板, 30 °C 培养观察. 第 1 d 呈白色绒状; 第 2 d 慢慢转为灰色; 第 3 d 孢子逐渐成熟, 菌落颜色渐黑, 菌落直径可达 3~4 cm. 菌落中央部分凸起, 边缘呈纤毛状, 反面中央部分略带黄褐色, 且产生皱褶. 经镜检, 菌株有足细胞, 分生孢子头幼时呈球形, 然后裂变成几个放射的柱状物. 顶囊球形, 小梗双层. 根据以上特征^[14,15], 初步鉴定菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*).

3.2 甲基橙降解最佳条件

3.2.1 培养时间

考察培养时间对甲基橙降解的影响. 由图 1 可见, 随着时间的延长, 降解率不断提高. 在 18 h~27 h 范围内, 降解率都在 90.0% 以上, 24 h 和 27 h 降解率分别为 95.4% 和 96.0%. 在降解过程中, 培养液的 pH 值逐渐下降, 15 h 时培养液的 pH 值为 2.6, 15 h 后培养液的 pH 值趋向稳定.

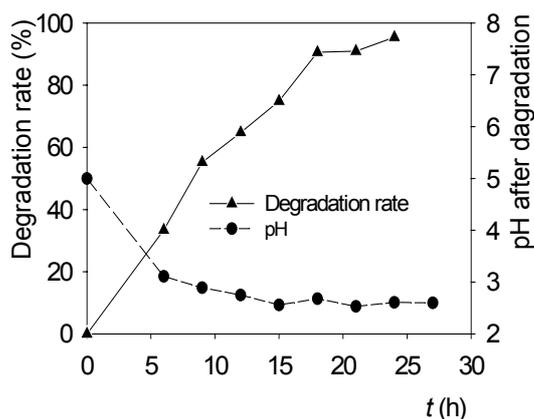


图 1 培养时间对甲基橙降解的影响

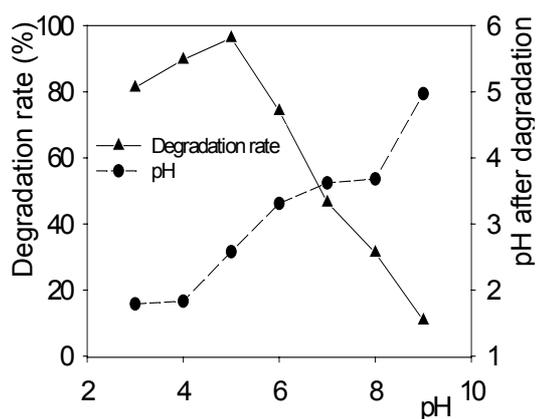


图 2 pH 值对甲基橙降解的影响

3.2.2 pH

考察培养液的 pH 值对甲基橙降解的影响. 由图 2 可见, 当初始 pH 值低于 5.0, AN-1 对甲基橙的降解率随 pH 值的升高而升高, 降解率都在 80.0% 以上. 初始 pH 值为 5.0 时, 降解率达 96.2%. 当初始 pH 值大于 5.0, 降解率开始下降. 降解 24 h 后, 培养液的 pH 值发生了变化. 初始 pH 值为 5.0 时, 降解后的 pH 值下降为 2.6. 由此可见, AN-1 适合在偏酸的环境中生长和降解甲基橙, AN-1 降解甲基橙的最佳 pH 值为 5.0.

3.2.3 温度

考察培养温度对甲基橙降解的影响. 由图 3 可见, 当温度在 25~30 °C 范围内, 降解率随温度升高而升高, 其降解率都大于 89.0%; 当温度为 30 °C 时, 降解率达 96.1%; 当温度在 30~45 °C 范围内, 降解率随温度升高而降低; 当温度为 45 °C, 降解率仅为 39.9%. 这可能是由于温度升高对菌丝球的酶活性有抑制作用, 从而使降解能力下降. AN-1 降解甲基橙的最佳温度是 30 °C.

3.2.4 转速

考察转速对甲基橙降解的影响. 由图4可见, 当转速为0, 降解率很低. 当转速在0~150 r/min范围内, 降解率随转速升高而升高, 说明黑曲霉是需氧型真菌, 无氧会对其降解效果起抑制作用; 当转速120~210 r/min范围内, 降解率变化不大, 且都大于90.0%, 这说明在该变化范围内, 菌丝球的供氧变化不是很明显. 当转速为150 r/min时, 降解率达95.9%, 说明在该转速下, 菌丝球供养充足, 生长快, 最有利于降解甲基橙. 实验结果表明, 振荡培养条件下有利于菌丝球对甲基橙的降解, 其降解率高于静止培养. 静止培养时, 菌丝球生长近乎停止, 对甲基橙的降解率也很低.

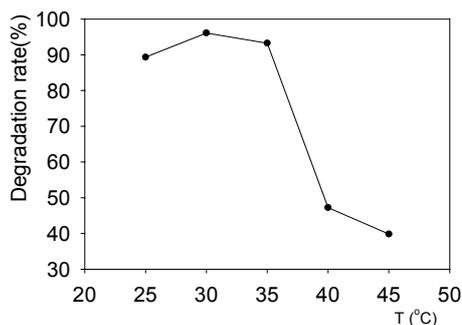


图3 温度对甲基橙降解的影响

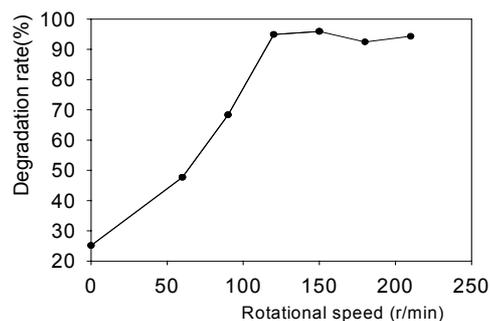


图4 转速对甲基橙降解率的影响

3.2.5 碳源

考察碳源对甲基橙降解的影响. 由图5可见, 淀粉、葡萄糖、蔗糖均能被AN-1利用. 以蔗糖作为碳源的降解率略高于以葡萄糖作为碳源的降解率, 但差别不大. 以淀粉作为碳源, 其降解率只有24.6%. 培养液中不加其他碳源, AN-1菌因缺乏碳源不能很好生长, 降解率低. 考虑到费用问题, 本实验使用葡萄糖作为碳源.

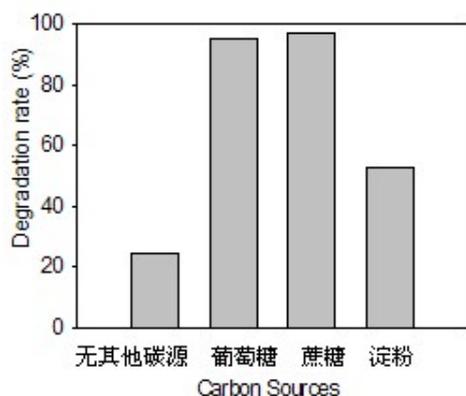


图5 碳源对甲基橙降解的影响

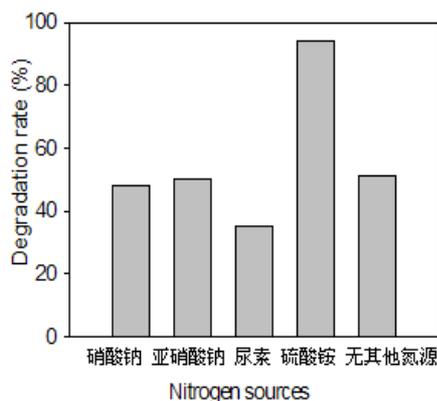


图6 氮源对甲基橙降解的影响

3.2.6 氮源

探讨氮源对甲基橙降解的影响. 由图6表明, 硝酸钠、亚硝酸钠、尿素、硫酸铵均能被AN-1利用. 以亚硝酸钠、硝酸钠和尿素作为氮源, 降解率都低于50.0%. 以硫酸铵作为氮源, 降解率达94.4%. 培养液中不加其他氮源, 降解率为51.3%, 说明AN-1可以甲基橙作为唯一氮源. 因此, 本实验使用硫酸铵作为氮源.

3.3 降解产物光谱

扫描甲基橙降解前后的紫外-可见光谱于图7. 由图7可见, 经AN-1降解后, 甲基橙在468 nm处的吸收峰明显消失, 而在紫外区的吸收峰蓝移, 且吸光度显著增强, 表明甲基橙被AN-1降解.

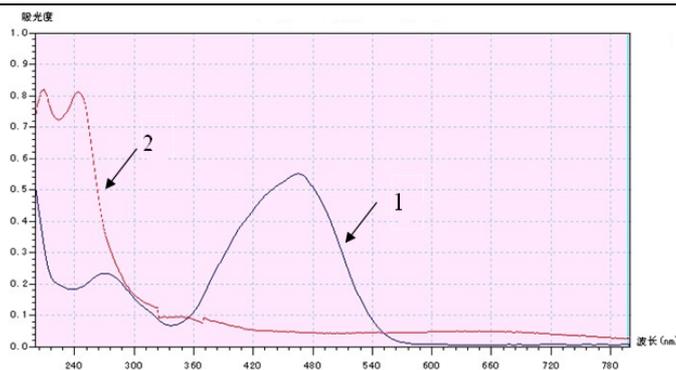


图 7 甲基橙被 AN-1 降解前后的紫外-可见光光谱
1:降解前 before degradation; 2:降解后 after degradation

4 结束语

从九龙江红树林保护区的底泥中筛选出一株对偶氮染料甲基橙有较强降解能力的黑曲霉 AN-1, 探讨了该真菌降解的最佳条件. 实验结果表明, AN-1 是一种较易培养的真菌, 对甲基橙表现出较好的降解效果, 在废水处理中具有较高的潜在应用价值.

参考文献:

- [1] 陈 勇, 沈日华. 染料废水的微生物处理[J]. 应用基础与工程科学报, 1998, 6(4): 325-358.
- [2] Knapp JS, Newby PS. The decolorization of a chemical industry effluent by white rot fungi[J]. Wat Res, 1999, 33(4): 979-988.
- [3] Kulla HG. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds[M]. London: Academic Press, 1981.
- [4] 王怡中. 甲基橙溶液多相光催化降解研究[J]. 环境科学, 1998, 19(1): 1-4.
- [5] 彭跃莲, 韩燕肋, 李建中. 生物技术在印染和染料废水处理中的应用[J]. 环境科学进展, 1997, 5(3): 56-64.
- [6] 张书军, 杨 敏, 辛宝平, 等. 应用青霉菌 BX1 活体吸附水中活性艳蓝 KN-R[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 87-90.
- [7] 徐文东, 文湘华. 微生物在含染料废水处理中的应用[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(2): 81-87.
- [8] 董新姣, 黄吉祥. 无花果曲霉菌丝球对活性艳蓝 KN-R 的脱色研究[J]. 四川环境, 2006, 25(4): 13-17.
- [9] 程永前, 黄民生, 张国莹. 白腐真菌对染料脱色及降解过程机理和影响因素[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(6): 25-34.
- [10] 刘生浩, 史玉英. 青霉菌 P-93 对偶氮染料的降解特性研究[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 1(2): 168-172.
- [11] 魏剑斌, 付永胜, 朱 杰, 等. 印染废水生物脱色研究现状与展望[J]. 污染防治技术, 2003, 4(16): 87-91.
- [12] 刘勇弟, 徐寿昌. 紫外-Fenton 试剂作用机理及在废水处理中的应用[J]. 环境化学, 1994, 13(4): 302-306.
- [13] 季 民, 张宏伟, 杨秀文. 染料废水混凝脱色与氧化脱色的最佳条件[J]. 环境工程, 1994, 12(1): 3-6.
- [14] 周与良. 真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [15] 石成春, 郭养浩, 王大奈, 等. 草甘膦曲霉生物降解的动力学研究[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 361-365.

[责任编辑: 陈 丽]