

### 3 株真菌对活性艳蓝 KN-R 的脱色条件

金朝晖, 柴英涛, 李铁龙, 曹骥赞, 庄源益

(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071, E-mail: jinzh@tianjin.cngb.com)

摘要: 从受污染土壤中筛选出具有广谱脱色的优势菌 17 株, 并进一步扩大染料范围, 筛选出 3 株对偶氮、蒽醌、三苯甲烷染料均有较好脱色效果的优势菌株。3 株菌分别为青霉属(菌 I、菌 II)和头孢霉属(菌 III)的真菌; 以染料配水为例, 探讨了 pH 值、温度、碳源、氮源因素对菌株脱色的影响; 并进行了实际废水的脱色实验, 结果表明该菌在 pH 值 5~9, 温度 18~37℃的区间内, 且外加葡萄糖提供 0.5% 碳源时对染料废水的脱色率可达 70%。因此对处理染料污染废水具有较好的应用前景。

关键词: 优势脱色菌; 选育; 脱色; 染料废水处理

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)02-0081-04

### Decolorization Conditions for Reactive Brilliant Blue KN-R by Three Fungi

JIN Zhao-hui, CHAI Ying-tao, LI Tie-long, CAO Ji-yun, ZHUANG Yuan-yi

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China E-mail: jinzh@tianjin.cngb.com)

**Abstract:** Seventeen strains with wideranging decolorization ability were screened from contaminated soil and were applied on the decoloring of dye wastewater. Three strains were selected due to their high decolorization capacity on azo dyes, anthraquinone dyes and triphenylmethane dyes. The three strains were named as Strain I, Strain II, Strain III. This three superior strains were identified as *penicillium link* (Strain I & strain II) and *Cephalosporium corda* (strain III). Using aqueous samples, the influences of several factors on decolorization were reported, such as pH, carbon source, temperature and so on. And then applying of these strains for treatment of actual wastewater have also been done. The results showed that the optimal pH, temperature and carbon source were 5~9, 18~37℃ and 0.5% respectively, under those conditions the decolorization removal rate was 70%. And these fungi have a good prospect for the treatment of dye wastewater.

**Key words:** superior strains with high decolorization capacity; screening; decolorization; treatment of dye wastewater

全世界以废物形式排放到环境中的染料约 6 万吨, 其中 80% 为偶氮染料<sup>[1,2]</sup>。由于染料是人工合成的大分子化合物, 品种繁多、结构复杂, 生物难以降解<sup>[3-5]</sup>。尤其是含磺酸基的偶氮染料及其降解产物具有强烈的致癌、致畸、致变效应, 因而印染废水的净化已成为有待于解决的难题之一<sup>[6,7]</sup>。本实验从印染废水污染的土壤中分离<sup>[8]</sup>得到 3 株对染料生物吸附效率较高的菌株, 并以菌株对多种染料的快速高效脱色为条件进行复筛, 得到对多种不同结构的染料产生较好脱色效果的优势菌株<sup>[9,10]</sup>, 研究了优势菌的生长和生理特性及 pH 值、温度、碳源、氮源等因素对菌株脱色能力的影响, 并进行了实际废水实验, 获得了满意效果。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料

样品采自受染料废水污染的土壤。

培养基<sup>[11]</sup>: 葡萄糖 5.0g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, NaCl 0.2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, 10% FeSO<sub>4</sub> 1 滴,

染料 0.01g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.0~7.5。

琼脂培养基<sup>[11]</sup>: 在液体培养基中加入琼脂粉 15g。

##### 1.2 实验方法

(1) 液体培养驯化 在无菌操作条件下, 取 2g 混匀的土样放入已灭菌的 250 mL 液体培养基中, 摇匀分别放入 30℃ 摇床及培养箱中培养 7d, 观察生长状况及颜色变化。7d 后, 其他组分不变, 增加染料在培养基中的含量, 配制新的液体培养基, 取 5 mL 培养液至新培养基中继续培养, 逐渐增加染料浓度至 200 mg/L, 对仍存活的菌株进行平板划线分离<sup>[11]</sup>。

(2) 琼脂平板分离 取新鲜土样 10g<sup>[12]</sup>, 盛于含有 90 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, 充分摇匀 15 min, 此为质量分数 10<sup>-1</sup> 的稀释液。用无菌吸管取该稀释液 1 mL 加至含 9 mL 无菌水的试管中, 充分摇匀, 此即为 10<sup>-2</sup> 浓度稀释液。同样依次制成 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 等一系列土壤稀释液。

收稿日期: 2003-04-08; 修订日期: 2003-06-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29877014)

作者简介: 金朝晖, (1946~), 男, 河北省人, 教授, 博士生导师, 主要从事环境污染与控制研究。

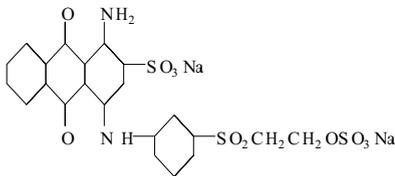
用 3 支 1 mL 无菌吸管分别由  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  的土壤稀释液中吸取 1 mL 吹入不同培养皿中, 然后再倒入溶化后冷却至  $45^{\circ}\text{C}$  左右的培养基, 边倒入边摇匀, 使样品中的微生物与培养基混合均匀, 待冷却凝成平板后, 放置于  $30^{\circ}\text{C}$  的培养箱中培养 3 ~ 5 d. 挑取在平板上菌落周围颜色变浅的菌株, 进行平板划线分离, 直至获得纯培养.

(3) 优势菌的筛选与分离 富集培养 4 次后在牛肉汁琼脂平板上划线分离单菌落, 分离得到 17 株具脱色能力的菌株, 从中筛选 3 株脱色能力较强的菌株, 命名为菌 I、菌 II 和菌 III. 3 株菌的菌落均为典型真菌菌落特征, 用常规真菌分类法<sup>[11]</sup>按照平板点接、小室培养和低高倍镜下观察的程序对这 3 株真菌分类鉴定.

## 2 染料废水的脱色实验

### 2.1 优势菌株对染料配水的脱色实验

配制 50 mg/L 或 100 mg/L 的活性艳蓝 KN-R 溶液, KN-R 的最大吸收波长在 600 nm, 其结构式为:



加入一定量的碳源及营养盐, 向水样中加入一定量 3 株菌的菌悬液, 置于  $30^{\circ}\text{C}$  恒温摇床中振荡培养. 于 0h、12h、24h、48h、72h 分别取样, 离心取上清液, 以 722 型可见分光光度计测定反应前后的吸光度, 根据吸光度值计算脱色率.

### 2.2 对实际废水的脱色实验

实验中的废水为 2 种印染厂活性艳蓝生产线末端废水, 1 号水质 pH 值 7.12, 全盐量 4342 mg/L,  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  1074.3 mg/L, 色度 5000 倍; 2 号水质 pH 值 3.18, 全盐量 7536 mg/L,  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  1631 mg/L, 色度 15000 倍; 根据需要调 pH 近中性, 将废水分成不加营养和外加营养 (0.5% 碳源, 0.5% N) 2 组对照. 接种 2% 菌悬液,  $30^{\circ}\text{C}$  振荡培养, 测定优势菌对废水的脱色率 (用稀释倍数法测色度).

## 3 结果与分析

### 3.1 脱色菌的分离与鉴定

从筛选出的 17 株脱色菌株中, 通过进一步的染料培养基富集培养, 从中选出 3 株对某些染料都有

显著脱色效果的菌株. 通过分类鉴定, 菌 I 的菌苔为黄色, 镜下菌丝较细, 有隔膜, 生殖菌丝为帚状枝; 分生小梗为单轮分枝, 孢子为椭圆形; 菌 II 的菌苔为绿色, 镜下菌丝较细, 有隔膜, 生殖菌丝为帚状枝; 分生小梗为二轮分枝, 分生呈椭圆形; 菌 III 气生菌丝发达, 茸毛状粉红色菌落, 镜下菌丝有隔膜、分枝, 有明显的绳状菌索; 分生孢子梗较短、直, 从气生菌丝上生出, 基部膨大, 呈瓶状, 分生孢子从瓶状子梗顶端溢出后推至侧边靠粘液粘成假头状, 孢子为长卵形; 据此可以鉴定菌 I、菌 II 都同于青霉菌属 (*Penicillium link*), 菌 III 为头孢霉菌 (*Cephalosporium corda*).

### 3.2 pH 值对脱色效果的影响

在活性艳蓝 KN-R 浓度为 50 mg/L 条件下, 含 0.5% 碳源的液体培养基, 2% 接种量,  $30^{\circ}\text{C}$ , 100 r/min 摇床培养. 以 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 不同范围的培养液对 3 株菌进行 3 d 脱色试验, 结果见图 1. 菌 I 对染料脱色的 pH 适合范围为 7.0 ~ 9.0 (最适为 8.0); 菌 II 在 5.0 ~ 9.0 的 pH 值范围内, 对染料有较好的脱色效果, 脱色率在 80% 以上; 菌 III 在 pH 值 6.0 ~ 9.0 时也有较好的脱色能力. 总之在 pH 5.0 ~ 9.0 范围内 3 株菌都能保持较高的脱色效果.

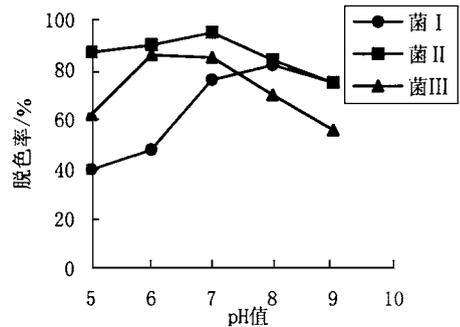


图 1 pH 对脱色率的影响

Fig. 1 Effects of pH on decolorization rate

### 3.3 温度对脱色效果的影响

将菌 I、菌 II 与菌 III 分别接种到含有活性艳蓝 KN-R 的培养液中, 分别置于  $18^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  的摇床上进行培养, 染料浓度为 100 mg/L, 结果见图 2. 从图 2 中可以看出, 菌 I 和菌 III 在  $18^{\circ}\text{C}$  下的脱色能力下降, 只有  $30^{\circ}\text{C}$  时的一半左右, 而菌 II 的降幅要小于其他 2 种菌. 在  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  下, 3 株菌对染料的脱色能力无大差别, 菌 I、菌 II 的最佳脱色温度为  $30^{\circ}\text{C}$ , 而菌 III 在  $37^{\circ}\text{C}$  脱色效果最好. 一般印染废水的温度为  $25 \sim 40^{\circ}\text{C}$ , 正适宜 3 种

菌的生长发育.

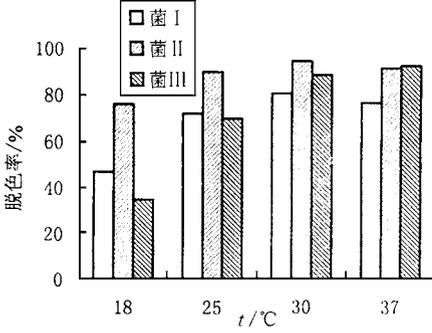


图 2 温度对脱色的影响

Fig.2 Effects of temperature on decolorization rate

3.4 碳源营养水平对脱色的影响

碳源是微生物生长必需的因素,制约着微生物的生长,为了研究碳源种类及加入量的影响,以葡萄糖、蔗糖、牛肉膏为碳源(0.5%),染料浓度为100 mg/L,接种2%菌悬液,30 °C振荡培养1~3d,对比实验结果见图3,图4.可以看出菌 I、菌 II 对葡萄

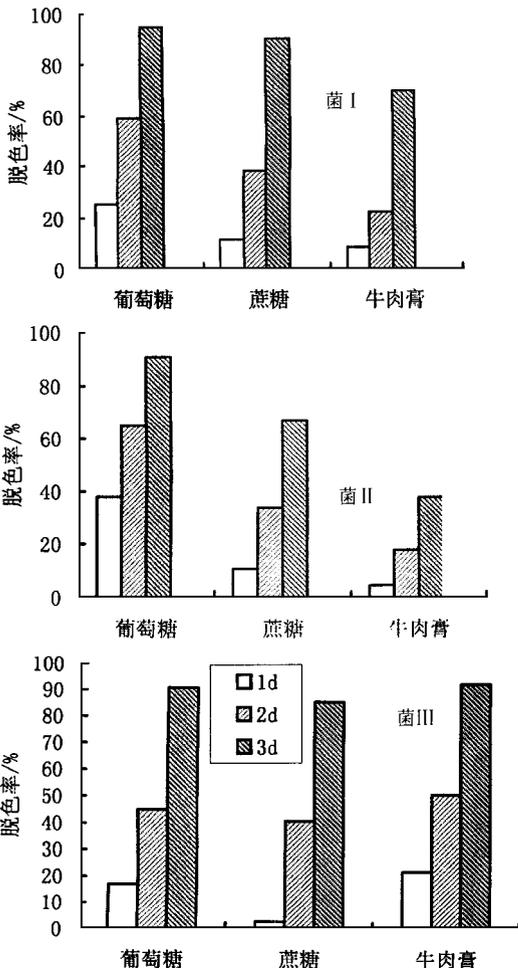


图 3 碳源种类对菌 I、菌 II 和菌 III 脱色的影响

Fig.3 Effects of carbon source on decolorization rate of strain I ,strain II and strain III

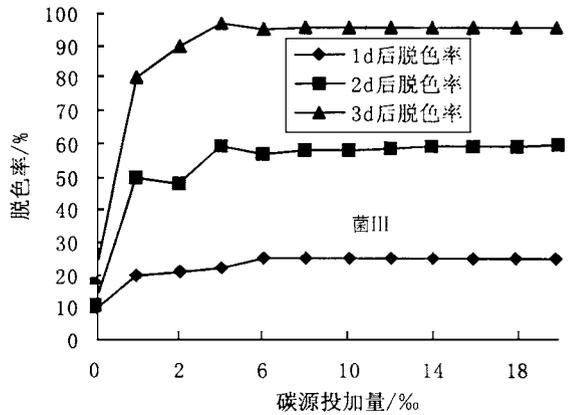
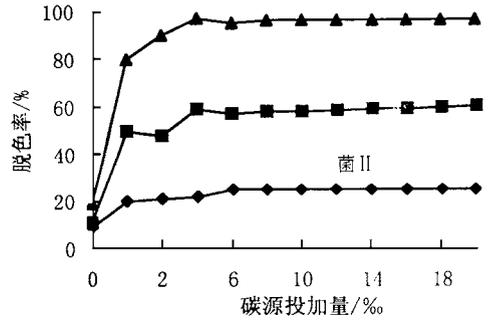
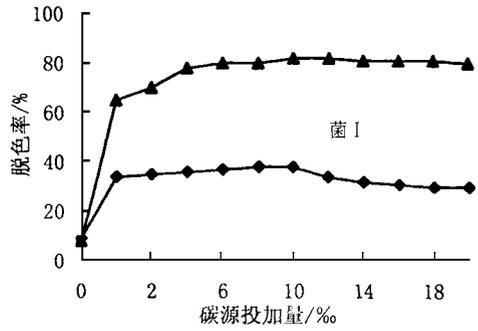


图 4 碳源投加量对菌 I、菌 II 和菌 III 脱色的影响

Fig.4 Effects of quantity of carbon source on decolorization rate of strain I ,strain II and strain III

糖的利用最好,脱色启动时间短,1d 以内即有 30% 的脱色率,并且在 0.5% 碳源水平下即可达到最佳脱色率(图 4). 菌 III 则对牛肉膏的利用率最高,以牛肉膏为外加碳源 0.5% 水平下,菌 III 在 3d 内对染料的脱色率即可达到 90% 以上(图 4). 表明菌 I、菌 II 和菌 III 在 0.5% 碳源水平下即可达最佳脱色率,再增加碳源量,脱色率几乎没有提高.

3.5 氮源种类对脱色的影响

实验选取 2 种常用的无机氮源和一种有机氮源,进行对比实验(操作条件与碳源实验相同,含 N 0.5%),结果表明,在 3 种不同的氮源条件下,3 株菌均能在 3d 内达到最佳脱色效果(见表 1),由此可见氮源种类对真菌脱色影响不大.

表 1 氮源种类对脱色的影响

Table 1 Effects of Nitrogen source on decolorization rate

氮源	脱色率/ %		
	菌 I	菌 II	菌 III
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	80.7	96.4	90.4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	83.1	93.7	88.9
蛋白胨	82.5	87.4	93.3

### 3.6 实际印染废水脱色结果

由表 2 可以看出,优势菌对不同染料废水均有一定的脱色效果,菌 II 的脱色效果好于菌 I 和菌 III;加入营养有利于菌株脱色,同时也可以看出废水水质的差异会使脱色效果有很大不同。

表 2 菌株对染料废水的处理效果

Table 2 Decolorization rate of dye wastewater by strains

废水	未加营养的脱色率/ %			加营养时脱色率/ %		
	菌 I	菌 II	菌 III	菌 I	菌 II	菌 III
1 号	19.76	38.67	38.91	49.47	63.87	70.76
2 号	39.50	27.76	51.35	45.74	51.56	65.05

## 4 结论

(1) 筛选出 3 株具有广谱高效脱色能力的优势脱色菌.鉴定结果表明,菌 I,菌 II 属于真菌中的青霉菌属 (*Penicillium link*),菌 III 属于头孢霉菌属 (*Cephalosporium corda*).

(2) 使用染料配水研究了 3 株优势菌的脱色条件及影响脱色的因素.实验证明 3 株菌对环境条件和 pH 值的适应范围较广,其中,菌 II 在 pH 值 5 ~ 9,18 ~ 37 °C 对染料配水均有较高的脱色率;3 株菌在外加葡萄糖提供 0.5 % 碳源时可获得最佳脱色

效果.

(3) 进行了优势菌对实际废水的处理实验,结果表明,优势菌株对实际废水有一定的脱色效果,菌 III 的脱色效果优于菌 I、菌 II,加入碳、氮源可显著增加脱色率.

参考文献:

- [1] 刘金齐,刘厚田.藻对偶氮染料降解作用的研究[J].水生生物学报,1992,16(2):133~143.
- [2] 刘厚田,等.藻菌系统降解偶氮染料的机理研究[J].环境科学学报,1993,13(3):332~338.
- [3] Brown D. Effects of Colorants in the Aquatic Environment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1987, 13: 139~147.
- [4] Hitz H R. Publication Sponsored by ETAD, The adsorption of Dyes on Activated Sludge[J]. JSPC,1978, 71~76.
- [5] 付莉燕,等.活性翠蓝生物降解性能的试验研究[J].环境科学,2001,22(4):100~103.
- [6] 沈东升,冯孝善.我国印染废水处理技术的现状和发展趋势[J].环境污染与防治,1996,18(1):26~28.
- [7] 曾秀琼,等.羟基铝蒙脱石去除染料弱酸性深蓝 GR 的研究[J].环境科学,2001,22(5):65~69.
- [8] 周与良,邢来君.真菌学[M].北京:高等教育出版社,1986.40~50.
- [9] Pagga U, Brown D. The Degradation of Dyestuffs: Part II Behaviors of Dyestuffs in Biodegradation Tests[J]. Chemosphere, 1986, 15(4): 479~490.
- [10] Wang P K, Yuen P Y. Decolorization and Biodegradation of Methyl Red by Klebsiella Pneumoniae RS-13[J]. Water Research, 1996, 30(7):1736~1744.
- [11] 王家玲.环境微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1998.1~62.
- [12] 庄源益,等.生物絮凝剂对水中染料絮凝效果探讨[J].水处理技术,1997,23(6):349~353.