

文章编号: 1000-5013(2008)01-0034-04

黑曲霉菌丝球对直接耐晒翠蓝 FBL 的脱色特性

曹晓婷¹, 熊小京¹, 郑天凌², 孟雪娇¹

(1. 厦门大学 环境科学研究中心; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 探讨黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌丝球的生长特性, 以及染料种类对其脱色特性的影响. 以直接耐晒翠蓝 FBL 为处理对象, 考察染料初始质量浓度、曲霉孢子投加量、pH 值、无机盐质量分数、温度、C 源和 N 源对黑曲霉的脱色性能的影响. 结果表明, 黑曲霉对多种染料有很好的去除效果. 对直接耐晒翠蓝 FBL 的最佳脱色条件是: 染料初始质量浓度低于 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、黑曲霉孢子投加量为 2.5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、染料培养基 pH 值为 6、NaCl 质量分数低于 5%, 培养温度在 $30 \sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间, 并需适量补充 C 源、N 源.

关键词: 黑曲霉; 直接耐晒翠蓝 FBL; 脱色; 菌丝球

中图分类号: X 172; Q 949.327.1; X 791.031

文献标识码: A

近年来, 国内外的一些学者发现黑曲霉(*Aspergillus niger*)对重金属离子、染料色素分子具有吸附作用. 在考察黑曲霉对染料的脱色性能方面, 主要针对活菌的脱色特性和死菌对色素的吸附性能. 刘效梅等^[1]将黑曲霉活菌用于去除水溶性染料, 发现菌体对活性艳红 X-3B 等 6 种水溶性染料的去除率均可达到 88% 以上, 脱色作用主要是吸附. Fu 等^[2]发现, 黑曲霉对染料的吸附性能取决于染料的分子结构及其官能团类型, 黑曲霉的不同官能团在其吸附不同染料时起不同作用. 陈桂淋等^[3]研究了黑曲霉干粉菌体对弱酸性艳蓝 RAWL 的吸附特性, 发现酸性条件下氨基质子化使菌体带正电, 有利于吸附带负电的染料. 本研究以直接耐晒翠蓝 FBL(简称蓝 FBL)为处理对象, 考察脱色的影响因素, 确立适宜的脱色条件.

1 材料与方法

1.1 菌种与染料

(1) 菌种. 黑曲霉(*Aspergillus niger*), 取自厦门大学生命科学院环境与应用微生物研究所. (2) 染料. 蒽醌染料: 分散紫 HFRL (C. I. Disperse Violet 31, $\lambda_{\text{max}} = 614\text{ nm}$), 活性艳蓝 KNR (C. I. Reactive Blue 19, $\lambda_{\text{max}} = 592\text{ nm}$); 偶氮染料: 活性黑 KNB (C. I. Reactive Black 5, $\lambda_{\text{max}} = 599\text{ nm}$), 分散橙 S-4RL (C. I. Disperse Orange 30, $\lambda_{\text{max}} = 465\text{ nm}$); 酞菁类染料: 直接耐晒翠蓝 FBL (C. I. Direct Blue 199, $\lambda_{\text{max}} = 608\text{ nm}$), 活性翠蓝 KNG (C. I. Reactive Blue 21, $\lambda_{\text{max}} = 661\text{ nm}$).

1.2 培养基组成

(1) 固体培养基. 马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA): $5.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 马铃薯浸粉, $20.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $13.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂, $0.1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯霉素. 于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌后摆斜面备用. (2) 液体培养基. $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 , $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl , $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.01\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 , 自然 pH 值. (3) 染料液体培养基. 于液体培养基中配制 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染料. (4) 种子培养基. 与(2)同. 各类液体培养基按照上述配方配制, 分装于若干 300 mL 锥形瓶中, 每瓶 50 mL, 于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 20 min 后备用.

收稿日期: 2007-12-03

作者简介: 曹晓婷(1983-), 女; 通讯作者: 熊小京(1963-), 男, 副教授, 工学博士, 主要从事水污染控制工程方面的研究. E-mail: xiongxiang@xmu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目(D0610021); 福建省重大专项研究项目(2005YZ1023)

1.3 孢子的获得及种子培养液的制备

将在 4 ℃冻存的菌种转接于新鲜的 PDA 斜面培养基上, 30 ℃恒温培养箱中静置培养 4~ 7 d. 取此斜面, 加入无菌水, 用接种环刮下孢子, 经 4 层纱布滤得菌液, 再倒入装有玻璃珠和无菌水的已灭菌三角瓶中, 于 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡至镜检为分散单孢子, 即得到单孢子悬液^[4]. 血球计数板计数后, 用无菌水调节孢子悬液的孢子量为 10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$. 取单孢子悬液加入到种子培养基中, 使种子培养基中孢子的量为 10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 于 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 ℃下培养 16 h, 即得到种子培养液.

1.4 脱色率的测定

按 2% 的接种量将种子培养液接种于染料液体培养基中, 每个考察指标设两个重复和 1 个空白, 于 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 ℃下培养 48 h. 将培养液于 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心机中离心 15 min, 取上清夜在相应的染料最大吸收波长处测定吸光度值. 对照吸光度(A)-染料质量浓度(ρ)的标准曲线, 可得出溶液中染料质量浓度, 并计算出脱色率(φ).

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉的生长曲线

将种子培养液接种于液体培养基中, 每隔 12 h 测定培养液中菌体的干质量(m_d)与湿质量(m_o), 如图 1 所示. 由图 1 可知, 黑曲霉培养物的湿质量和干质量分别于 84, 72 h 达到最大. 黑曲霉的生长曲线与单细胞生物类似^[5], 其生长过程包括延迟期 40 h, 指数期 40~ 72 h, 之后进入稳定期, 84 h 后进入衰亡期. 实验发现, 经 12 h 后, 溶液中形成具有黑色中心点、白色菌丝外圈的微小而松散的菌丝球. 在振荡的水力剪切作用下, 随着培养时间的推移, 其直径逐渐增加并且形成边缘光滑、结构紧凑的小球. 经 72 h 后, 菌丝球的直径约为 5~ 6 mm, 且大小较为均一, 成长情况最好. 随后, 球状结构逐渐变松散, 部分瓶内的球体出现自溶现象. 到了 91 h 后, 大部分锥形瓶内菌丝球(黑曲霉菌丝球)均出现自溶. 由此可见, 采用的黑曲霉液体培养时间均不宜超过 3 d.

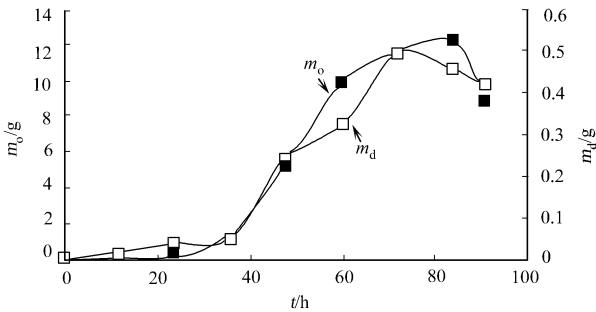


图 1 黑曲霉的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of the *Aspergillus niger*

2.2 脱色条件对黑曲霉脱色效果的影响

2.2.1 染料种类 将黑曲霉的种子培养液接种于染料液体培养基后, 每 24 h 测上清液吸光度值(A), 并计算染料去除率(φ). 随着时间的推移, 各类染料培养基颜色逐渐变浅, 置于染料培养基的菌丝球具有与所接触染料相同的颜色, 因染料结构的不同, 黑曲霉表现出不同程度的脱色能力, 如表 1 所示. 表 1 表明, 活性黑 KNB 的 63% 去除率较低, 其他 5 种染料 3 d 内均可达到 85% 以上. 其中, 分散橙 S-4RL、直接耐晒翠蓝 FBL、分散紫 HFRL、活性翠蓝 KNG 可达 94% 以上, 证明黑曲霉对多种染料具有广谱高效的去除效果. 因此, 利用黑曲霉来脱除染料废水中的多种色素, 具有较高的可行性. 考虑到蓝 FBL 结构复杂, 且尚未见黑曲霉对其进行处理的研究报道, 故后续实验采用蓝 FBL 进行单因素实验研究, 摸索黑曲霉脱色的条件和规律.

表 1 染料种类对脱色效果的影响 (%)

Tab. 1 The influence of the dye species on decolourization efficiency (%)

| t/d | 1 | 2 | 3 |
|------------|--------|--------|--------|
| 活性黑 KNB | 24. 20 | 46. 83 | 63. 00 |
| 分散橙 S-4RL | 65. 91 | 82. 37 | 94. 92 |
| 直接耐晒翠蓝 FBL | 58. 54 | 92. 37 | 98. 92 |
| 分散紫 HFRL | 91. 76 | 99. 74 | 98. 98 |
| 活性翠蓝 KNG | 71. 65 | 97. 88 | 99. 30 |
| 活性艳蓝 KNR | 47. 98 | 63. 38 | 87. 61 |

2.2.2 染料初始质量浓度 改变蓝 FBL 在染料液体培养基中的质量浓度, 考察初始质量浓度(ρ)对黑曲霉的脱色率的影响, 如图 2 所示. 从图 2 可知, 在 20~ 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低质量浓度范围内, 黑曲霉对蓝 FBL 显示出 95% 以上的去除效果; 在 100~ 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 高质量浓度范围内, 随着初始质量浓度的增加, 脱色率下降明显; 在 400~ 600 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 脱色率降至 70% 左右. 究其原因可能是, 在高质量浓

度范围,随着蓝 FBL 初始质量浓度的上升,一方面会导致生物毒性作用增强,曲霉增殖速度逐渐减小,从而脱色效果下降;另一方面,菌体的吸附容量容易接近饱和,表现为黑曲霉对蓝 FBL 去除率的迅速下降.在染料初始质量浓度达到 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,黑曲霉的脱色率仍能达到 67%.表明,黑曲霉对染料质量浓度的适应范围宽、脱色效果好,适合水质波动大的染料废水处理,具有较好的实用性.

2.2.3 黑曲霉投加量 孢子投加量(M)对黑曲霉的脱色性能的影响,如图 3 所示.孢子投加量直接影响到黑曲霉的成球性能,小而致密的黑曲霉球体具有较大的表面积,不仅能够充分利用营养,易于分离,且脱色效果好.由图 3 可知,孢子投加量为 2.5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,菌丝球生长密度大,结构紧凑,对蓝

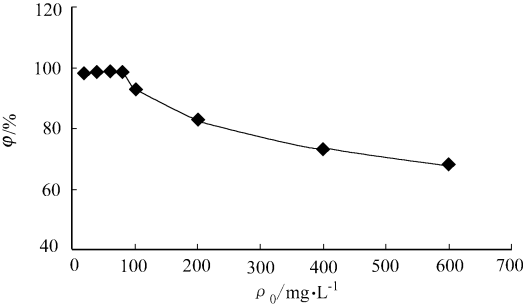


图 2 蓝 FBL 初始质量浓度对脱色率的影响

Fig. 2 Effect of the initial concentration of FBL on its decolourization efficiency

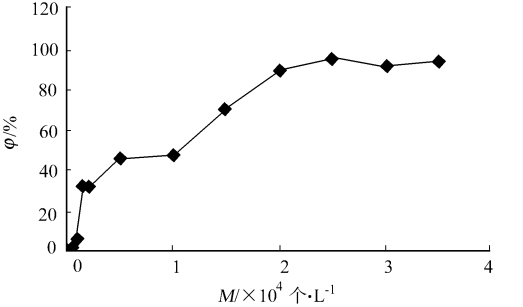


图 3 黑曲霉孢子投加量对蓝 FBL 脱色率影响

Fig. 3 Effect of dose rate of *Aspergillus niger* on decolourization efficiency of FBL

FBL 的去除率为最佳的 95.6%;投加量大于 2.5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,去除率基本稳定在 91% 以上.观测结果表明,投加量小于 2.0×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,形成的黑曲霉球体过大,大小不一,结构松散且数量稀少.考虑到经济性,实验如无特别说明均采用 2.0×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的孢子投加量.

2.2.4 pH 值 生长环境的 pH 值能够影响黑曲霉细胞内的 pH 值,从而影响酶的活性、摄取营养和生长能力.用 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 和 HCl 调节染料培养基的初始 pH 值,考察 pH 值对脱色效果的影响,如图 4 所示.由图 4 可知,在 pH 值为 6 时,染料去除率达到 87% 的最大值;而在 pH 值为 4~ 10 时,均能够保持在 60% 以上.说明黑曲霉生长的环境 pH 值范围较宽.观测还发现,当 pH 值低于 5 时,菌丝球直径大,约为 5~ 7 mm 不等,边缘不平滑;当 pH 值为 6~ 10 时,菌丝球直径约为 3~ 5 mm;当 pH 值为 11 时,菌丝球的直径相当小,约为 0.5~ 1.0 mm.

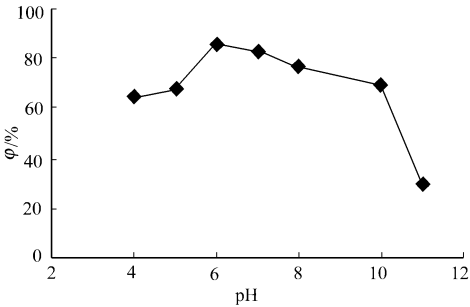


图 4 pH 值对蓝 FBL 脱色率的影响

Fig. 4 Effect of pH value on decolourization efficiency of FBL

2.2.5 无机盐质量分数 由于染料废水中含有一定的无机盐^[6],考察无机盐质量分数(w)对黑曲霉

的脱色性能影响,如表 2 所示.表 2 中, d 为菌丝球直径,实验选用 NaCl 作为代表性无机盐.从表 2 可知,随着 NaCl 质量分数的增加,菌丝球的数量依次递减,直径逐渐减小,黑曲霉对染料的脱色效果逐渐降低.当 NaCl 质量分数为 8% 时,脱色率可保持在 50% 左右,而当 NaCl 质量分数为 20% 时,脱色率仅为 26.9%,高盐质量分数环境对黑曲霉的生长具有明显的抑制作用.因此,为了保证黑曲霉的脱色效果,应避免在高盐质量分数条件下运行.

表 2 无机盐质量分数对脱色效果的影响

Tab.2 Effect of salt concentration on decolourization efficiency of FBL

| <i>w</i> / % | <i>d</i> / mm | ϕ / % | 菌丝球外层生长形态 |
|--------------|---------------|------------|-----------|
| 0 | 4.0~ 5.0 | 82.8 | 光滑 |
| 4 | 3.0~ 4.0 | 71.5 | 光滑 |
| 8 | 2.0~ 3.0 | 54.0 | 光滑 |
| 12 | 2.0 | 41.0 | 放射状 |
| 16 | 1.0~ 1.5 | 31.9 | 放射状 |
| 20 | 1.0 以下 | 26.9 | 放射状 |

2.2.6 温度 由图 5 可知,在 30~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,黑曲霉的脱色率较高,为 80% 左右,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大值的 83%,生长情况最好.观察发现,在 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 时生长的菌丝球直径小于 1 mm,且大小不均匀;25 $^{\circ}\text{C}$ 时球径为 3 mm 左右,30 $^{\circ}\text{C}$ 时球径为 3~ 4 mm,而

35 ℃时球径为 4 mm 左右, 40 ℃时球径为 1~ 2 mm, 与其各温度下的染料脱色能力成正相关.

2.2.7 碳氮源 设添加碳氮源的组为对照组, 考察染料液体培养基中蔗糖或 NaNO_3 添加对脱色能力的影响. 结果可知, 对照组的菌丝球呈蓝色直径为 3~ 4 mm, 脱色率为 81.9%. 在无碳源条件下, 菌丝球呈蓝色, 直径为 1.0~ 1.5 mm, 脱色率仍能达到 79.5%; 而在无氮源条件下, 菌丝球呈绿色, 直径为 2.0~ 2.5 mm, 且表面光滑, 脱色率仅为 69.7%. 尽管黑曲霉在限碳和限氮培养基上均可以不同程度生长, 但生长情况和脱色效果均不如对照组. 由此可以推知, 黑曲霉能够利用蓝 FBL 作为碳氮源维持生长.

3 结束语

实验考察了黑曲霉的生长特性, 选用印染业常用的 6 种典型染料, 研究染料种类对黑曲霉脱色效果影响, 并确立直接耐晒翠蓝 FBL 为处理对象. 通过考察脱色条件的影响因素, 确立适宜的脱色条件, 为黑曲霉治理实际染料废水提供依据.

参考文献:

[1] 刘效梅, 辛宝平, 徐文国, 等. 黑曲霉对水溶性染料的吸附研究[J]. 化工环保, 2005, 5(25) : 341-345.
[2] FU Yu-zhu, VIRARAGHAVAN T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2002, 82: 139-145.
[3] 陈桂林, 辛宝平, 郑文钊. 黑曲霉吸附弱酸性艳蓝 RAWL 的机理[J]. 化工环保, 2006, 26(6) : 447-450.
[4] 日本微生物研究法讨论会. 微生物学实验法[M]. 程光胜, 等译. 北京: 科学出版社, 1981.
[5] 吴松刚. 微生物工程[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
[6] 李家珍. 染料、染色工业废水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 1997.

Decolorization Behavior of C. I. Direct Blue 199 by *Aspergillus niger* Mycelium Pellet

CAO Xiao-ting¹, XIONG Xiao-jing¹,
ZHENG Tian-ling², MENG Xue-jiao¹

(1. Environmental Science Research Center, Xiamen University;
2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The growth behavior of *Aspergillus niger* mycelium pellet was characterized and the relationships between the species of dye and their decolourization efficiencies were obtained. The decolourization behavior of C. I. Direct Blue 199 dye by this mycelium pellet were investigated at various initial concentrations of dye, dose rates of the spore, pH values salt concentrations, temperature, carbon and nitrogen source concentrations. The results showed that *Aspergillus niger* could effectively decolourize the several species of dye. The optimum decolourization condition for C. I. Direct Blue 199 was described as follows: initial concentration of dye was below $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, dose rate of the spore was $2.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, pH = 6, NaCl concentration was below 5%, temperature was in the range of 30~ 40 ℃, the amounts of both carbon and nitrogen sources were enough.

Keywords: *Aspergillus niger*; C.I. Direct Blue 199; decolorization; mycelium pellet

(责任编辑: 黄仲一)

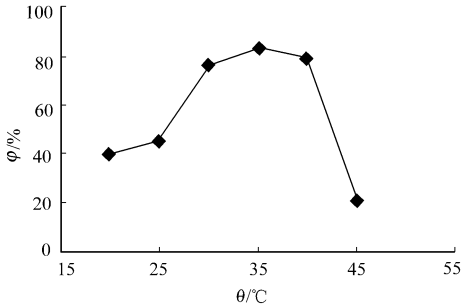


图 5 培养温度对蓝 FBL 脱色率的影响
Fig. 5 Effect of temperature on decolourization efficiency of FBL