

白腐真菌岛生异担子菌对染料的降解作用研究

岳丽红¹, 吴微¹, 王玉俊¹, 刘德财¹, 李文龙¹, 王媛媛¹, 马现成², 张跃华^{2*}

(1. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学理学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的] 研究白腐真菌岛生异担子菌对染料的降解作用。[方法] 对野外采集到的岛生异担子菌进行纯培养, 优化菌丝体培养条件, 并对岛生异担子菌降解脱色作用的影响因素进行研究。[结果] 岛生异担子菌最适培养基配方为: 葡萄糖 10.0 g/L, 酒石酸铵 0.5 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.075 g/L, Tween-80 0.4 g/L, $V_{\text{BI}} 1 \times 10^{-4}$ g/L, pH 3.0。岛生异担子菌降解染料的最适氮源为酒石酸铵, 浓度范围为 0.5 ~ 1.0 g/L; 最适碳源为葡萄糖, 浓度范围为 10.0 ~ 15.0 g/L; 最适 pH 为 3.0 ~ 3.5。[结论] 岛生异担子菌对染料脱色降解效果与培养基中碳源、氮源的浓度在一定范围内呈正相关。

关键词 岛生异担子菌; 培养条件; 染料; 脱色降解

中图分类号 S181.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)22-07592-03

Study on the Degradation Effects of White-rot Fungus *Heterobasidion insulare* on Dye

YUE Li-hong, ZHANG Yue-hua et al (College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] The research aimed to study on the degradation effects of white-rot fungus *Heterobasidion insulare* on dye. [Method] Samples of *H. insulare* gathered from the wild were cultured purely to optimize the best cultivation conditions. Then the influence factors on the decolorization and degradation of *H. insulare* on dye were investigated. [Result] The results showed that the optimum culture medium was as following: glucose 10.0 g/L, ammonium tartrate 0.5 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.075 g/L, Tween-80 0.4 g/L, $V_{\text{BI}} 1 \times 10^{-4}$ g/L, pH 3.0. The optimum nitrogen source for the degradation of dye with *H. insulare* was ammonium tartrate, with concentrations of 0.5 ~ 1.0 g/L. The optimum carbon source was glucose, with concentrations of 10.0 ~ 15.0 g/L. The optimum pH was 3.0 ~ 3.5. [Conclusion] The effects of decolorization and degradation of *H. insulare* on dye had positive correlation with the carbon sources and nitrogen sources concentrations within a certain range.

Key words *Heterobasidion insulare*; Culture conditions; Dye; Decolorization and degradation

伴随着有机化学工业的不断发展, 化工染料品种和数量也在不断增加, 部分难以降解的染料废水也随之产生。我国每年约有 10% ~ 15% 的废水直接排放江河等水体中, 致使部分淡水水源重度污染^[1]。污水中含有以多环芳烃为主的化学染料, 其色度高、致癌成分含量高、难以被生物降解、具有较大毒性, 成为危害人类健康、破坏生态平衡的重要因素。

对于染料废水处理的理想方法是利用高效、环保的生物酶法降解染料废水中的有害物质^[2], 白腐真菌具有的广谱性和非特异性使得其对各种化学物质均存在降解能力^[3]。岛生异担子菌作为白腐真菌中的一种, 同样具有独特的降解酶系, 能够将各种人工合成的染料彻底降解为 CO_2 和 H_2O , 具有良好的脱色效果^[4]。根据白腐真菌的这些特性, 笔者将对岛生异担子菌染料脱色降解的因素进行试验研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种。岛生异担子菌 (*Heterobasidion insulare*) 采集自伊春市五营区, 经分离纯培养后, 以斜面菌丝体保存法保存于佳木斯大学应用微生物研究所菌种保藏中心。

1.1.2 试验试剂与仪器。ABTS (2,2-连氮-3-乙基苯并噻唑-6 磺酸) (SIGAMA 公司产品), 其余葡萄糖、可溶性淀粉等试剂均为分析纯。LDZ4-08 自动平衡微量高速离心机, 752S 紫外-可见分光光度计, THZ-82 型恒温摇床。

1.1.3 培养基。PDA 培养基配方: 马铃薯汁 20%, 葡萄糖

20.0 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L, V_{BI} (微量), 琼脂 12.0 g/L。

1.1.4 染料。偶氮染料: 酸性大红 G; 蒽醌染料: 酸性蓝 R; 金属络合染料: 中性灰 2BL。

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体制备。将斜面上 28 °C 条件下培养 5 d 的菌丝体接种到装有 100 ml PDA 液体培养基的锥形瓶中, 置于 28 °C 恒温、转速 120 r/min 条件下的摇床内通风纯培养 5 d, 备用。

1.2.2 岛生异担子菌最适培养基的筛选。将葡萄糖、酒石酸铵、pH、摇瓶转速作为影响岛生异担子菌生长的影响因子, 通过正交试验对岛生异担子菌培养基配方进行优化试验。

1.2.3 岛生异担子菌培养基中最适碳氮比探究。以酒石酸铵为氮源, 分别以 10.0 g/L 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、木质素可溶性淀粉作为碳源, 其他培养基成分同标准培养基, 在 120 r/min、28 °C 条件下培养 10 d 后, 测定岛生异担子菌生物量。

以葡萄糖为碳源, 分别以 0.5 g/L 氯化铵、酒石酸铵、玉米粉、尿素、硝酸铵和酵母浸膏作为氮源, 在 120 r/min、28 °C 条件下培养 10 d 后, 测定岛生异担子菌生物量。菌丝体生物量的测定: 抽滤后的菌丝体在 60 °C 下干燥至恒定质量, 称重。

1.2.4 染料的降解试验及影响降解脱色的因素。向盛有 90 ml 含酸性大红 G、酸性蓝和中性灰 2BL 3 种染料 (质量浓度均为 20 mg/L) 的液体培养基的 250 ml 的三角瓶中, 按照 10% 的比例分别接种岛生异担子菌菌丝体悬浮液, 在 120 r/min、28 °C 的恒温条件下培养 10 d。

基金项目 黑龙江省自然科学基金基金项目 (C201452); 佳木斯大学大学生实践创新创业训练计划项目 (2012ZC025)。

作者简介 岳丽红 (1964-), 女, 黑龙江勃利人, 副教授, 从事应用微生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2014-06-30

对照试验:菌丝体悬浮液分别与 20 mg/L 的酸性大红 G、20 mg/L 酸性蓝 R、20 mg/L 中性灰 2BL 3 种染料进行反应。培养基影响因子含量设定为:氮源(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L)、碳源(0、5、10、15、20、25 g/L)和 pH(2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0),120 r/min、28 °C 恒温水浴摇床培养 10 d。

1.2.5 根据吸光度测定废水的脱色率。收集经过抽滤后的染料废水,在 6 000 r/min 离心分离 20 min,测定吸光度值,以蒸馏水作为空白对照组。染料浓度在低浓度时与最大吸收波长的吸光度成正比,可用染料吸光度值的变化来反映染料浓度的变化。染料脱色率(C ,%)可根据下面公式计算:

$$C = \frac{(A_0 - A_t) \times 100\%}{A_0}$$

式中, A_0 、 A_t 分别表示初始时刻和 t 时刻染料在特征波长处的吸光度。

2 结果与分析

2.1 最适培养基 通过试验结果可知,岛生异担子菌最佳培养基配方为:葡萄糖 10.0 g/L,酒石酸铵 0.5 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.075 g/L,Tween-80 0.4 g/L, V_{B_1} 1×10^{-4} g/L,pH 3.0,其他因素参照 Buswell 等^[5] 的研究配制微量元素溶液。

2.2 岛生异担子菌碳氮源选择 将葡萄糖和酒石酸铵作为碳氮源,计算方差得到数据见表 1。方差分析表明, $F_{0.99}(3,6) = 26.8$, $F_{0.95}(3,6) = 8.32$ 。可以确定碳氮源对岛生异担子菌生长影响比较显著,但影响效果极显著的是 pH。得出的岛生异担子菌最佳培养条件为:葡萄糖 10.0 g/L,酒石酸铵 0.5 g/L,pH 3.0,转速 120 r/min。

表 1 正交试验的方差分析

变差分析	s_j	自由度 f_j	F_j	显著性
碳源	72 643.1	3	21.8	*
氮源	46 432.4	3	14.4	*
pH	230 786	3	80.1	**
转速	3 569.65	3		
误差	6 959.9	6		

注:*为显著相关,**为极显著相关。

2.3 岛生异担子菌降解脱色作用的影响因素

2.3.1 氮源浓度。由图 1 可以看出,作为氮源的酒石酸铵对岛生异担子菌产生的生物量和染料脱色效果有影响。培养基中酒石酸铵浓度为 0 时,岛生异担子菌对 3 种染料酸性红、酸性蓝和中性灰脱色率分别为 25.5%、58.1% 和 45.7%;当培养基中酒石酸铵的质量浓度增加到 0.2 g/L 时,3 种染料脱色率均有不同程度地上升;当酒石酸铵质量浓度增加到 0.5 g/L 时,酸性蓝和酸性红的脱色率达到最大值;当酒石酸铵质量浓度增加到 1.0 g/L,酸性红、酸性蓝两种染料脱色率都有下降趋势,而中性灰脱色率最大为 75.4%;当酒石酸铵浓度增大到 2.0 g/L 时,3 种染料的脱色效果均呈下降趋势。

2.3.2 碳源浓度。由图 2 可以看出,当培养基中添加葡萄糖的质量浓度为 0~10.0 g/L 时,差异显著,且在一定浓度范

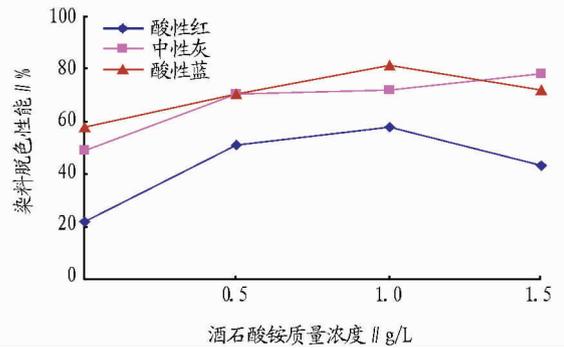


图 1 染料脱色性能与酒石酸铵质量浓度的关系

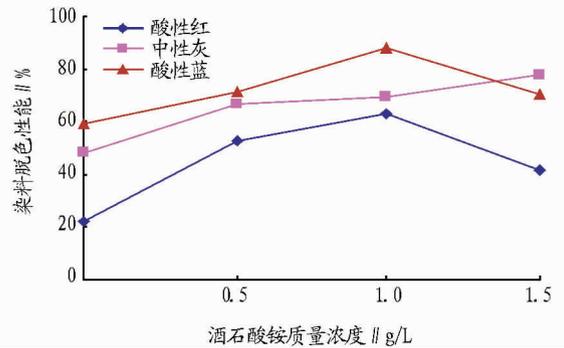


图 2 染料脱色性能与葡萄糖质量浓度的关系

围内随着葡萄糖的量的增加,脱色效果显著。添加葡萄糖的培养基中岛生异担子菌对酸性红、酸性蓝和中性灰 3 种染料的降解效果为不添加葡萄糖培养基的 1.7~2.4 倍。当培养基中的葡萄糖的量增加到 20.0 g/L 时,岛生异担子菌对酸性红 G、酸性蓝 R 两种染料的降解脱色效果略有下降,而对染料中性灰的降解脱色效果则增强。葡萄糖浓度从 0 增加到 20.0 g/L 的过程中,培养基中菌丝体生物量呈现逐渐增多的趋势。由此可见,培养基的碳浓度在一定范围内对岛生异担子菌降解染料的能力有促进作用。

2.3.3 pH。由图 3 可以看出,pH 的变化对岛生异担子菌的降解脱色作用影响显著,当 pH 在 3.0~3.5 时,岛生异担子菌菌丝体的降解脱色效果最明显。pH 为 3.0 时,岛生异担子菌对酸性红、酸性蓝、中性灰的降解脱色作用都达最大值;随着 pH 的增大,对染料的降解脱色率逐渐减小,当 pH 达到 6.0 时,岛生异担子菌的降解脱色率达最低值,这与 pH

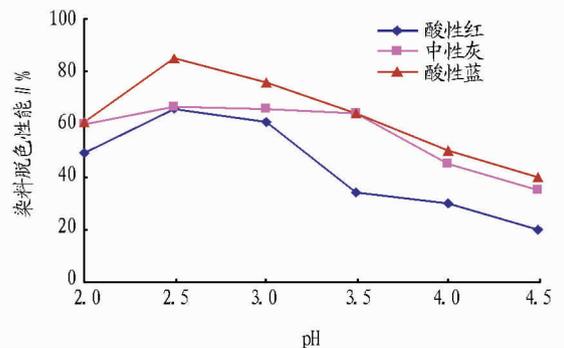


图 3 染料废水脱色性能与 pH 变化的关系

对漆酶活力的影响一致,生物酶在染料脱色中可能起着重要

的作用。由此可见,该菌的最适生长 pH 为 3.0~3.5, pH 过高或过低都不利于菌丝体的生长,适宜的 pH 范围有利于岛生异担子菌菌丝体的生长和其对染料的降解脱色作用。

3 结论与展望

通过探究岛生异担子菌的生长发现,岛生异担子菌最佳培养基配方为:葡萄糖 10.0 g/L,酒石酸铵 0.5 g/L, KH_2PO_4 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, CaCl_2 0.075 g/L, Tween-80 0.4 g/L, $V_{\text{BI}} 1 \times 10^{-4}$ g/L, pH 3.0。通过探究碳、氮源和 pH 对岛生异担子菌降解作用的影响,单因子试验证明,在一定浓度范围内碳源、氮源对岛生异担子菌的降解脱色有很强的促进作用。而碳源、氮源浓度过高或过低时,均对脱色效果影响不明显;岛生异担子菌降解染料的最适氮源为酒石酸铵,浓度范围:0.5~1.0 g/L;最适碳源为葡萄糖,浓度范围:10.0~15.0 g/L;最适 pH 为 3.0~3.5。

对于岛生异担子菌降解脱色作用的影响因素只是进行了初步的探究,其他因素对岛生异担子菌降解脱色作用的影响及其对其他染料和复合染料的降解脱色效果还有待进一步探究。白腐真菌处理染料废水这一研究,在我国研究的时间较短,仍然有很多理论研究和实际应用的问题急需解决。目前,染料脱色原理没有完全研究通透,染料脱色与菌丝体的吸附作用相关性不显著,亦与菌丝体生物量不成正相关。白腐菌对染料降解脱色效果无法调控,由于染料本身复杂的

(上接第 7566 页)

可以看出,增加浸提次数可有效提高提取率,但经过 3 次提取,茶叶中的茶多糖大部分已溶出,1~3 次提取茶多糖提取率明显增加,第 4 次提取时提取率增加幅度很小,因此选择 3 次为最佳提取次数。

2.2 正交试验 正交试验结果见表 2。由表 2 可以得出,温度对茶多糖提取率的影响最大,其次为料液比和时间。因此推出最佳的提取茶多糖的工艺组合为 $A_3B_2C_3$, 即提取条件为:

表 2 正交试验结果分析

试验号	因素			提取率 %
	温度	料液比	时间	
1	1	1	1	76.84
2	1	2	2	89.03
3	1	3	3	93.29
4	2	1	2	81.75
5	2	2	3	89.07
6	2	3	1	93.65
7	3	1	3	83.84
8	3	2	1	90.38
9	3	3	2	94.22
K_1	80.81	86.96	86.39	
K_2	89.49	90.77	88.16	
K_3	93.72	88.73	89.48	
R	12.91	3.81	3.09	
最优条件	3	2	3	

化学组成和其整体的酶学机制还没有完全解释清楚,除黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 等几种菌株外,其他白腐菌对染料的详细降解机制及途径还未弄清楚,因此无法进一步研究根据菌株代谢调控的过程,改善其对染料废水的降解效果。但通过遗传操作技术获得高效基因工程菌,将成为应用白腐菌处理染料废水的一个重要研究趋势。在以后的探索研究中,应该通过调研广泛发掘具有染料脱色能力的其他真菌资源和基因资源,建立相应数据库,筛选具有实际应用价值的工程菌,定位具有降解能力的基因。以后应对白腐菌染料脱色降解机制进行进一步深入研究,探究白腐菌脱色降解作用效果最佳时的碳氮源浓度、温度、pH 等各项指标。

参考文献

- [1] 刘辉. 全流程生物氧化技术处理微污染原水[M]. 北京: 化学工业出版社环境科学与工程出版中心, 2003.
- [2] 金敏, 李君文. 白腐菌处理染料废水的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, 4(3): 54-58.
- [3] 张跃华, 赵永勋, 李佳琳, 等. 影响白腐真菌 J610-D 对染料苋菜红脱色降解的培养因素[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 61-63.
- [4] 丁佐龙. 接种物对黄孢原毛平革菌产木质素过氧化物酶能力的影响[J]. 安徽农业大学学报, 1997, 24(3): 240-244.
- [5] BUSWELL J A, MOLLET B, ODIER E. Lignolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency[J]. FEMS Microbiology Letters, 1984, 25(2): 295-299.

提取温度为 85 °C, 料液比为 1:10 g/ml, 提取时间为 100 min。通过验证试验得到碎茶末中茶多糖提取率为 93.82%, 与正交试验结果相差不大, 因此正交试验结果可行。

3 结论

以碎绿茶末为原料, 研究了浸提温度、时间、料液比及提取次数对茶多糖提取工艺的影响, 最佳提取工艺条件为: 提取温度为 85 °C, 料液比为 1:10 g/ml, 提取时间为 100 min, 提取次数 3 次。

参考文献

- [1] 戴群晶. 用茶末及废纸茶叶提取高纯茶多酚的研究[J]. 现代食品科技, 2006(23): 45.
- [2] 张秀红, 孙静. 响应面法优化茉莉花花茶茶多糖提取工艺[J]. 基因组学与应用生物学, 2010(3): 603-608.
- [3] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, LAXMIKUMARAN M, et al. Recent advances of tea biotechnology [J]. Recent Advances of Tea (Camellia sinensis) Biotechnology, 2004, 76(3): 195-245.
- [4] JUDITH H. Effect of tea and chlomphyllin on the mutagenicity of N-hydroxy-IQ: Studies of enzyme inhibition molecular complex formation and degradation/scavenging of the active metabolites[J]. Environ Mol Mutagen, 1997, 30(4): 468.
- [5] 罗一帆, 郭振飞, 陈剑经. 茶叶的有效成分及其抗癌作用的研究进展[J]. 中草药, 2004(10): 237.
- [6] 王妍馨, 颜仁龙, 张小荣, 等. 峨眉山粗老茶中茶多糖的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1106-1107.
- [7] 傅博强, 谢明勇, 周鹏. 茶叶多糖的提取纯化、组成及药理作用研究进展[J]. 南昌大学学报, 2001, 25(4): 358-364.
- [8] 于淑池, 周俊波, 彭忠, 等. 安吉白茶多糖的微波辅助提取及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 180-183.