



活性染料脱色霉菌的筛选及其脱色特性

周明辉, 王学亚, 杨 壮, 杨代虎

(合肥师范学院生命科学学院, 安徽合肥 230061)

[摘要] 利用马丁氏培养基从印染厂废水中筛选出具有脱色能力的霉菌, 研究所筛选霉菌对 26 种不同类型活性染料的脱色效果, 选取优势脱色菌株, 研究其脱色特性; 利用紫外-可见、气相质谱对优势脱色菌株脱色前后的培养液进行检测, 分析其脱色前后波谱的变化, 确定其基本的脱色机理; 对优势脱色菌株进行基因测序, 结合形态学特征, 以确定其种属。结果显示, 从印染厂废水中分离出 3 株霉菌, 命名为 YR01、YR02、YR03, 分别对 26 种活性染料进行脱色试验, 3 株霉菌均对虎红、藏青 M-GD、曙红 B、胭脂红、绿 KE-4BD、翠兰 KN-G、艳兰 X-BR 具有明显的脱色效果, 其中霉菌 YR03 对以上 7 种染料的脱色效果最优, 菌株 YR03 对虎红脱色前后染液的光谱吸收峰变化明显, 说明染料分子结构发生了破坏, 存在着先吸附后降解的脱色机制, 其他均为吸附脱色。对菌株 YR03 进行形态观察与基因测序, 确定为 1 株黑曲霉菌。

[关键词] 霉菌; 活性染料; 脱色

[中图分类号] X703; X172 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)01-0121-05

Screening of molds for decolorization of reactive dyes and its decolorization characteristics

ZHOU Minghui, WANG Xueya, YANG Zhuang, YANG Daihu

(College of Life Sciences, Hefei Normal University, Hefei 230061, China)

Abstract: The molds with decolorizing ability were screened from the wastewater of printing and dyeing plants using Martin's medium. The decolorizing effects of the screened molds on 26 different types of reactive dyes were further studied, and the dominant decolorizing strains were selected to study their decolorizing characteristics. UV-visible and gas-phase mass spectrometry were employed to detect the culture medium and the changes of spectrum before and after the decolorization by the dominant strains so as to determine the basic decolorization mechanism. Combined with their morphological characteristics, the dominant decolorizing strains were genetically sequenced to determine their species and genera. Three molds isolated from the wastewater of printing and dyeing plants were named YR01, YR02 and YR03 and their decolorization effects on 26 types of reactive dyes were tested respectively. The results showed that the three molds had obvious decolorization effects on tiger red, navy cyan M-GD, eosin B, carmine, green KE-4BD, Cuilan KN-G and Yanlan X-BR. The strain YR03 had the best decolorization effects on the above seven dyes. The spectral absorption peak of the dye solution before and after the decolorization of tiger red by YR03 strain changed dramatically, suggesting that a destruction of the molecular structure of the dye and a decolorization mechanism of degradation-after-adsorption occurred. The decolorization mechanism of the other six dyes was only adsorption. The YR03 strain was identified as *Aspergillus Niger* through morphological observation and genetic sequencing.

Key words: mold; reactive dye; decolorization

活性染料分子结构复杂且极为稳定, 具有抗光、抗酸、抗碱等特性, 通常溶于水, 在诸多行业中应用广泛, 大部分为难降解有毒有机物, 具有致畸、致癌、致

突变等作用^[1-3]。因此, 对活性染料生产与使用中产生的废水进行处理就显得尤为重要, 目前, 活性染料废水的脱色和处理主要有物理、化学和生物方法, 其

中物理和化学的方法脱色效果较差,处理成本较高,而且应用范围狭窄,而生物法具有易操作、高效、低成本、无二次污染等特点,得到广泛应用^[4]。获取高效的染料降解菌是生物处理法的重要基础,近年来,对染料降解菌的研究主要集中在白腐真菌、酵母菌、细菌上,而对霉菌的研究还不够深入^[5-6],霉菌菌丝发达,生长迅速,形成菌丝球极易沉降,有较宽的pH耐受范围,有一定的机械强度,吸附能力强,无需载体,可直接应用于固定床或流化床等反应器通过吸附处理染料废水^[7-8],具有很多先天优势,但目前开发应用不足。因此本课题从印染废水中筛选脱色霉菌,并对多种活性染料进行脱色试验,以筛选出脱色范围较广与脱色能力较优的霉菌,并对优势脱色霉菌的脱色特性进行研究,为实际应用奠定一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

脱色霉菌:分离筛选于合肥某印染厂废水。

活性染料,工业级,甲醇,色谱级;虎红标准样品:质量分数≥98.0%;均采购于上海生物工程有限公司。

马丁氏培养基:葡萄糖 12.0 g,蛋白胨 4.5 g, KH_2PO_4 1.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6 g,琼脂 18~25 g, 1/300 孟加拉红 1 mL,蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.2 仪器与设备

Beckman Allegra 64R 高速冷冻离心机,美国贝克曼库尔特有限公司;UV-2100 双光束紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器有限公司;7890B-5977A 色相质谱色谱联用仪,美国安捷伦科技有限公司。

2 试验方法

2.1 脱色霉菌的分离筛选及形态观察

采集印染厂废水稀释 10^3 倍,吸取稀释液 0.1 mL 涂布于马丁氏固体培养基表面,28 ℃ 培养 72 h,对生长出的菌落进行多次纯化,观察纯化的霉菌菌落与孢子形态,并制作斜面,保藏备用。

2.2 筛选霉菌对活性染料的脱色效果

选取不同结构类型的活性染料 26 种,以每 100 mL 中加入 50 mg 制成马丁氏活性染料培养液。无菌水冲洗保藏菌株的斜面,制成 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 浓度的孢子悬液,分别吸取 1 mL 孢子悬液接种到不同的马丁氏活

性染料培养液中,每组做 3 个平行 1 个对照,在 28 ℃、转速 120 r/min 的条件下振荡培养 72 h,进行脱色试验,在活性染料对应的最大吸收波长下测量吸光度,计算脱色率。依据脱色率分析筛选霉菌的脱色效果与脱色范围,并进一步筛选优势脱色霉菌,以进行后续试验。

2.3 优势脱色菌株对活性染料脱色机理的研究

经过初步脱色试验,选取菌株脱色率在 50% 以上的活性染料作为研究对象,接种 1 mL 浓度为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的优势菌株的孢子悬液于 100 mL 0.05% 活性染料培养液中,28 ℃、120 r/min 连续振荡培养 120 h,每隔 24 h 进行观察,宏观判断脱色过程。分别收集脱色前(未加菌)和脱色后的培养液,在 10 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,利用紫外可见分光光度计在 200~800 nm 范围内进行扫描,分析脱色前后波谱的变化状况;取脱色前后高速离心的上清液,真空冷冻干燥制成粉末,溶解在色谱甲醇中,10 000 r/min 条件下离心 10 min,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用于 GC-MS 分析。采用 Trace GC Ultra 和 ISQ II MS 对脱色产物进行分析,GC-MS 柱为 TG-35 ms 的石英毛细管柱,柱温设定从 100 ℃ 程序升温至 300 ℃ (10 ℃/min),运行时间保持 10 min;载气(氦气)流速为 1 mL/min;注射器和检测器温度为 300 ℃,脱色产物的质谱分析在 EI 模式、70 eV 条件下进行满扫。

2.4 优势脱色菌株的分子鉴定

经脱色效果与机理的研究,选取脱色效果最优的菌株进行基因测序,明确其种属,为后续研究奠定基础。

(1)霉菌 DNA 的提取与聚合酶链反应(PCR)扩增采用真菌试剂盒提取菌株 DNA 基因组,真菌试剂盒购自上海生物工程公司。根据真菌 18S rDNA 保守区设计引物,上游引物 PA: (5'-GTAGTC-ATATGCTTGTCTC-3')和下游引物 PB: (5'-TCCG-CAGGTTACCTACGGA-3'),由上海生物工程公司合成,采用真菌常规的 PCR 反应程序进行。

(2)系统发育分析,将扩增产物送至上海生物工程公司进行序列测定,将所测序列与 NCBI GenBank 数据库进行同源性分析;选择相应参比菌株序列,采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

2.5 脱色率的计算

脱色率计算公式:

$$D=\frac{m_0-m_n}{m_0}\times100\%$$

式中: D ——脱色率,%;
 m_0 ——初始OD;
 m_n ——脱色后的OD;
 n ——处理批次($n=0\ 1\ 2\cdots n$)。

3 试验结果

3.1 脱色霉菌的筛选

从印染厂的废水中分离筛选出3株霉菌,经过纯化传代培养,选取生长状态稳定的菌株作为研究对象,依次命名为YR01、YR02、YR03,霉菌菌落及孢子形态见图1(菌落与孢子形态上下对应)。

由图1可知,3株菌落具有明显霉菌的特征,对菌丝进行染色显微观察,孢子形态符合青霉菌属、根霉属、曲霉属的特征。

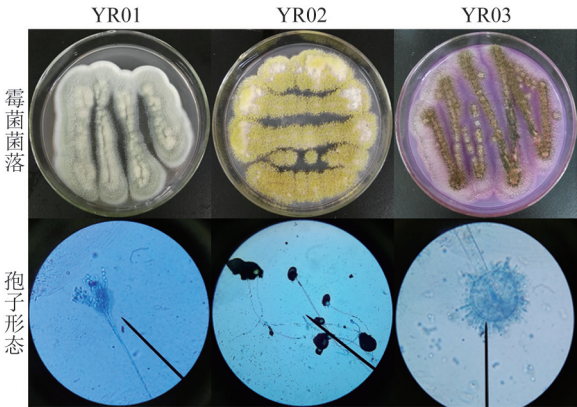


图1 3种霉菌菌落与孢子形态

Fig.1 Colony and spore morphology of three kinds of mould

3.2 筛选霉菌对活性染料的脱色效果

利用菌株YR01、YR02、YR03对26种活性染料进行单一降解试验,结果见表1。

表1 筛选霉菌对活性染料的脱色效果

Table 1 The decolorization effect of reactive dye by screening mould

染料名称	结构类型	脱色率 ^a /%	脱色率 ^b /%	脱色率 ^c /%	染料名称	结构类型	脱色率 ^a /%	脱色率 ^b /%	脱色率 ^c /%
黄 M-3RE	一氯均三嗪乙烯砒同侧单偶氮3钠盐	0.6±0.047	1.6±0.085	1.6±0.094	黑 KN-B	双乙烯砒型异侧双偶氮染料4钠盐	5.5±2.005	10.1±3.112	12.6±1.96
深兰 M-2GE	一氯均三嗪乙烯砒同侧双偶氮5钠盐	0.6±0.047	0.8±0.075	0.8±0.082	胭脂红	磺萘基单偶氮3钠盐	1.1±0.216	42.6±6.069	51.4±7.847
藏青 M-GD	一氯均三嗪乙烯砒异侧双偶氮3钠盐	0.8±0.058	15.2±1.575	52.8±2.16	甲酚红	苯偶氮奈酚2钠盐	0.3±0.216	0.5±0	0.5±0.163
绿 KE-4BD	双一氯均三嗪型异侧双偶氮6钠盐	55.8±1.575	53.2±1.987	75.2±0.589	甲基绿	氯化锌盐溴化物三苯甲烷类	0.8±0.283	1.8±0.424	1.8±0.403
红 KE-3G	双一氯均三嗪型同侧双偶氮3钠盐	1.2±0.294	1.1±0.245	1.2±0.34	丽春红 2R	苯基萘酚单偶氮2钠盐	0.5±0.082	35.8±3.625	45.5±4.124
紫 X-2R	二氯均三嗪型单偶氮2钠盐	1.5±0.216	1.5±0.374	1.8±0.163	日落黄	苯基萘酚单偶氮2钠盐	0.3±0.216	14.3±1.283	15.3±0.92
红 X-3B	二氯均三嗪型单偶氮2钠盐	0.5±0.116	0.8±0.316	0.5±0.134	孔雀绿	甲氨基三苯甲烷类	0.05±0.022	0.02±0	0.05±0.008
橙 X-GN	二氯均三嗪型单偶氮3钠盐	1.2±0.283	1.5±0	1.5±0.236	亚甲蓝	吩噻嗪-芳香杂环类	1.2±0.432	1.5±0.163	1.5±0.082
嫩黄 X-6G	双二氯均三嗪异侧单偶氮2钠盐	0.8±0.327	1.8±0.327	10.5±2.101	结晶紫	二甲氨基三苯烷类	0.6±0.163	1.6±0.283	1.6±0.283
艳兰 X-BR	二氯均三嗪型醌2钠盐	12.3±1.268	22.6±1.657	52.6±7.217	甲基橙	对二甲氨基单偶氮苯磺酸钠	0.5±0.216	0.8±0.245	0.8±0.032
紫 KN-4R	乙烯砒型单偶氮2钠盐	15.2±2.123	12.3±2.051	15.2±0.712	碱性品红	苯氨基三苯烷类	1.5±0.294	1.2±0.094	1.2±0.287
艳兰 K-NR	乙烯砒型蒽醌类2钠盐	0.5±0.245	0.6±0.17	0.8±0.082	曙红 B	二溴异苯并呋喃氧蒽2钠盐	25±1.247	70.2±3.559	75±5.099
虎红	三苯烷氧蒽类2钠盐	35.6±4.206	85.2±1.837	90.6±4.085	翠兰 KN-G	一氯均三嗪乙烯砒铜酞菁2钠盐	32±7.784	62±3.3	65±4.19

注:a、b、c分别为YR01、YR02、YR03对染料的脱色率。

由表1可知,除了在孔雀绿培养液中,3株霉菌均能在所选染料中生长,但形成菌球的能力有所差异,在染液中成球度强弱顺序为:YR03>YR02>YR01;3株霉菌对大部分所选活性染料脱色效果并不显著,尤其是对偶氮染料的处理,而对具有杂环氧

蒽结构的染料降解效果较好。3株霉菌对虎红、藏青 M-GD、曙红 B、胭脂红、绿 KE-4BD、翠兰 KN-G、艳兰 X-BR的脱色效果更为显著,菌株YR03对活性染料的脱色效率最高,因此对该菌株作进一步脱色研究。

3.3 菌株 YR03 脱色特性

选取菌株 YR03 对 7 种上述脱色效果较好的活性染料作 120 h 连续脱色试验,宏观判断脱色机理,结果见图 2~图 3。

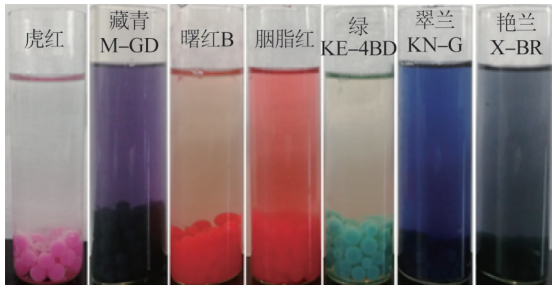


图 2 菌株 YR03 对 7 种染料的脱色效果

Fig. 2 The decolorization effect of seven kinds of dye by strain YR03

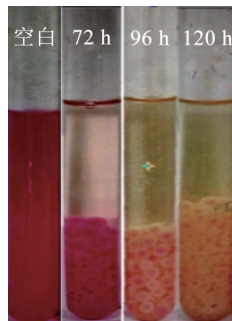


图 3 菌株 YR03 对虎红脱色过程

Fig. 3 Decolorization process of tiger red by strain YR03

由图 2~图 3 可知,菌株 YR03 经过 72 h 振荡培养,已形成形态较为完整的菌球,菌球中吸附了大量染料,其中对虎红的脱色率最高,达到 90% 以上。进一步延长菌株 YR03 对以上 7 种染料的脱色时间至 96 h,发现含有虎红染料的菌球中颜色逐渐褪去,至 120 h,菌球中染料基本上完全降解,培养液完全澄清,其他菌球中的染料颜色无明显变化。

由于菌株 YR03 对虎红染料具有完全脱色的作用,因此对其脱色前后的染液进行处理,在 200~800 nm 紫外可见与 GC-MS 进行扫描,进一步了解脱色机理,结果见图 4。

由图 4(a)可知,300 nm 前的脱色前后的图谱基本相似,250 nm 前的苯环精细结构并没有变化,而脱色后在可见光区 546 nm 处的吸收峰完全消失,且没有形成其他明显的吸收峰,在 350~450 nm 处吸收峰有所升高,可能有新的物质生成,由此说明,虎红脱色后分子结构发生了变化,母体结构被破坏,引起

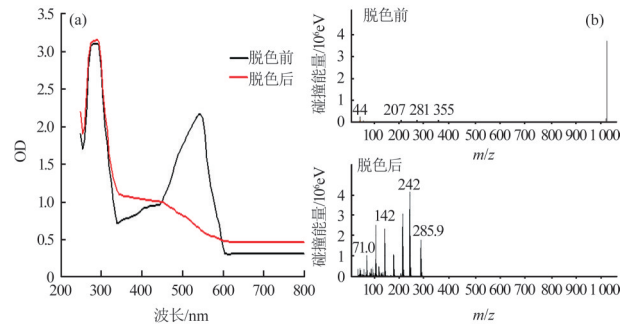


图 4 菌株 YR03 虎红脱色前后可见紫外吸收图谱(a)和 GC-MS(b)

Fig. 4 UV-vis absorption(a) and GC-MS spectrum(b) of tiger red before and after decolorization by strain YR03

虎红染料由红色变成无色,表明菌株 YR03 对虎红完全脱色是由生物降解引起的。

由图 4(b)可知,虎红脱色前主要物质为虎红分子,相对分子质量为 1 037,与虎红质谱图相仿,保留时间为 9.116 min,而降解后主要检出相对分子质量为 286,保留时间为 6.205 min,其特征离子片段分别为 36、71、107、142、177、214、242,脱色前后图谱发生明显变化,说明虎红分子被降解成相对分子更小的其他物质。

3.4 菌株 YR03 分子鉴定

由于菌株 YR03 具有脱色范围广,脱色率高的优势,且对虎红染料能进行完全脱色,具有较高的研究价值。因此对其进行分子测序并构建系统发育树,以确定其种属,为后续研究提供一定的基础,结果见图 5。

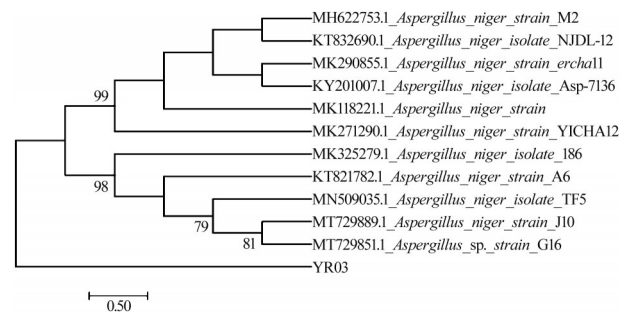


图 5 菌株 YR03 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of strain YR03

由图 5 可知,菌株 YR03 基因序列与比对序列的相似度达到 95% 以上,结合图 1 菌株 YR03 的菌落与孢子形态,确定菌株 YR03 为 1 株黑曲霉菌。

4 讨论

霉菌因其获取容易、菌丝体生长快、可形成菌丝

球、吸附脱色能力强等优点,在印染废水脱色、去除重金属污染、重金属回收等方面应用广泛^[9]。霉菌中的青霉、曲霉、根霉较多地应用在染料废水的处理中,其中青霉菌球形成能力弱,根霉对低浓度染料脱色效果好,而曲霉的成球效果好,对高浓度染料具有较好的脱色效果^[10],本试验中也发现,黑曲霉对活性染料的脱色范围与脱色效果均要优于青霉与根霉属。目前利用细菌与白腐真菌对染料的脱色研究较深入,并且对于偶氮染料的降解研究较多,也已经发现是通过他们分泌的偶氮还原酶与木质素过氧化物酶对染料进行降解的,且染料上的基团对降解起着促进与抑制的作用^[11-12]。本课题通过所筛选的霉菌对26种活性染料的脱色研究,发现对三苯胺类、偶氮类染料的脱色效果不佳,而对含有氧蒽类结构染料脱色较好,活性基团乙烯砜与侧链钠盐数量对脱色具有促进作用。染料一般经微生物吸附降解后,染料母体结构发生破坏,生成小分子物质,光谱吸收峰也发生明显改变^[13]。所筛选的脱色霉菌对大部分活性染料的脱色均为吸附,仅有黑曲霉对虎红的脱色存在着吸附后的降解,利用可见紫外扫描黑曲霉对虎红脱色前后培养液,吸收光谱发生明显变化,546 nm下氧杂蒽结构的吸收峰消失,说明氧杂蒽结构被破坏;GC-MS分析脱色前后产物显示,染料的发色基团被破坏,生成更小的小分子物质,因此虎红被完全脱色,表明存在着酶降解过程,相关降解酶的参与以及降解过程中形成的小分子物质还需进一步研究。

参考文献

- [1] LIN S L, CHU W L, PHANG S M. Use of *Chlorrlla vulgaris* for bioremediation of textile wastewater[J]. *Bioresour. Technol.*, 2010, 101(19): 4314-4322.
- [2] 张培培, 任随周, 许政英, 等. 微生物对三苯基甲烷类染料脱色的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(9): 1410-1417.
ZHANG Peipei, RENG Suizhou, XU Meiyong, et al. Recent advice in microbiol decolorization of triphenylmethane dyes[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(9): 1410-1417.
- [3] LIERS C, BOBETH C, PECYNA M. Dyp-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricular-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85(6): 1869-1879.
- [4] YANG Xueting, ZHENG Jinzhao, LU Yongming, et al. Degradation and detoxification of the triphenylmethane dye malachite green catalyzed by crude manganese peroxidase from *Irpex lacteus* F17[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(10): 9585-9597.
- [5] EMAN H F, ABD E Z. Biodegradation of reactive dyes using soil fungal isolates and *Ganoderma resinaceum* [J]. *Ann. Microbiol.*, 2010, 60: 269-278.
- [6] CHARUMATHI D, DAS N. Packed bed column studies for the removal of synthetic dyes from textile wastewater using immobilized dead *C. tropicalis*[J]. *Desalination*, 2012, 285: 22-33.
- [7] 王国惠. 霉菌菌丝球 WY 对酸性棕染料 PR 脱色研究[J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2009, 48(4): 107-112.
WANG Guohui. Decoloring effect of acid brown dye PR by mold pellet WY [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2009, 48(4): 107-112.
- [8] 傅春堂, 张甲耀, 郑金秀. 高效染料降解真菌的分离及其在印染废水生物处理中的强化作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(5): 693-696.
FU Chuntang, ZHANG Jiayao, ZHENG Jinxiu. Isolation and enhanced action of predominant fungi in biological treatment of dyeing wastewater[J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 2006, 12(5): 693-696.
- [9] 刘桂萍, 陈晓霞, 刘长风, 等. 霉菌 TM-3 的成球条件及其对染料的吸附脱色研究[J]. *环境保护科学*, 2008, 34(2): 28-31.
LIU Guiping, CHENG Xiaoxia, LIU Changfeng, et al. Study on pelletization conditions of mould TM-3 and the bio-absorption and decolorization for dyestuffs [J]. *Environment Protection Science*, 2008, 34(2): 28-31.
- [10] 周明辉, 张绘云, 王兆敏, 等. 虎红染料脱色霉菌的筛选及其脱色条件的优化[J]. *环境科学与技术*, 2017, 40(11): 103-108.
ZHOU Minghui, ZHANG Huiyun, WANG Zhaomin, et al. Screening of decolorization fungus to Rose-Bengal and optimization of decolorization conditions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 40(11): 103-108.
- [11] 李锋, 梁念, 孙建中. 一株新型苯胺蓝降解菌 MP-13 的代谢特征[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 43-53.
LI Feng, LIANG Nian, SUN Jianzhong. Degradation characteristics of a novel aniline blue-discoloring bacterial strain MP-13 [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 43-53.
- [12] 吴茵, 陈敏, 刘洁. 刺芹侧耳对孔雀石绿的脱色降解及其产物分析[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(8): 2844-2851.
WU Ying, CHENG Min, LIU Jie. Biodecolorization and biodegradation of malachite green by *Pleurotus eryngii* and degradation products analysis [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(8): 2844-2851.
- [13] DOGAN N M, BOZBEYOGLU N, ARAR D. Investigation of reactive dye turquoise blue HFG removal with *Lysinibacillus fusiformis* B26 and detection of metabolites *Fresenius* [J]. *Environmental Bulletin*, 2013, 22(9): 2567-3575.

[作者简介] 周明辉(1982—), 硕士, 高级实验师。电话: 13615603996, E-mail: iandfake342623@126.com。

[收稿日期] 2021-11-21(修改稿)