第 32 卷第 5 期　　河 北 科 技 大 学 学 报　　Vol. 32, No. 5
2011 年 10 月　　Journal of Hebei University of Science and Technology　　Oct. 2011

文章编号:1008-1542(2011)05-0513-05

毛霉 BFL-5 菌株的分离鉴定及染料脱色特性

罗　晓,王　婷,刘瑞龙,赵　兵,李盼盼

(河北科技大学环境科学与工程学院,河北石家庄　050018)

摘　要:筛选对染料具有良好脱色能力的真菌。采集当地腐朽树木样品,以染料脱色为目标,筛选、分离真菌菌株;采用真菌 26S rDNA D1/D2 区域鉴定法对菌种的 26S rDNA 进行测序。以花生壳等为固定化培养载体,培养得到固定化真菌,用于对含酸性红 B,酸性金黄 G,直接湖蓝 5B,直接耐晒黑 G 等染料的模拟染料废水脱色实验。初步鉴定其为毛霉属的一种,暂定名为 BFL-5;经过固定化真菌 12 h 反应,以上 4 种染料的浓度均下降了 90%以上。本研究可为染料废水脱色工艺提供新的菌种。

关键词:毛霉;优势菌株;染料废水;脱色

中图分类号:X506　　**文献标志码**:A

Isolation, identification and decolorizing characteristics of strain *Mucor* sp. BFL-5

LUO Xiao, WANG Ting, LIU Rui-long, ZHAO Bing, LI Pan-pan

(College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: To isolate fungus strain with high-efficient decolorizing ability, fungus strains from locally collected rot wood were screened and separated. The fungus strains' 26S rDNA was sequenced by fungi rDNA D1 / D2 area methods. The fungi strain was immobilized by peanut hulls and other materials as carrier, and the immobilized fungi was used to treat simulated dye wastewater containing carmosine B, metanil yellow G, direct blue 5B and direct black 19 dyestuffs. The fungi strain was isolated and identified as *Mucor* sp., named as BFL-5. The strain *Mucor* sp. BFL-5 was immobilized and then used to degrade four types of dyes with degradation over 90% in 12 h. The strain *Mucor* sp., BFL-5 was potential for decolorization of dyes effluent.

Key words: *Mucor* sp.; dominant strain; dye wastewater; decolorization

工厂在生产或使用化学染料的过程中所排放的染料、染色废水有机污染物成分复杂、浓度高、色度大,属于处理难度较大的工业废水。废水中所含多种化学染料会对人体健康和生态环境造成危害,一些偶氮染料、蒽醌染料及其降解产物具有致癌性,有的染料对人类和一部分哺乳动物的皮肤和眼睛、呼吸道和肠道产生刺激。染料的色度会影响水体的透明度并毒害水中微生物、鱼类等,破坏水体生态环境[1-2]。染料、染色废水的处理方法主要包括物理处理和化学处理,常用的工艺技术有混凝沉淀、吸附、蒸馏、气提、萃取、化学氧化、电解、光催化氧化、超滤膜、好氧生物处理、厌氧生物处理等。在实际工程应用中多采用几种不同的处理技术组成系统的工艺流程以强化处理效果[3-4]。生物法处理染料、染色废水应用广泛,但是有许多染料属于难生物

收稿日期:2011-04-09;修回日期:2011-09-09;责任编辑:王海云

作者简介:罗　晓(1973-),男,广东崖县人,副教授,博士,主要从事环境生态、污染控制生物技术方面的研究。

降解的有机物[5]，为提高生物处理的效率，从20世纪80年代开始，国内外不断研究从自然界筛选、分离对降解化学染料更为高效、广谱、适应性更强的微生物，主要类型有真菌、细菌、藻类等[6-15]。笔者自主分离出一株对多种染料具有显著脱色效果的毛霉菌，以花生壳等为固定化培养载体，经接种培养得到固定化毛霉，比较了固定化毛霉对几种染料脱色的效果。

1 材料与方法

1.1 培养基及培养条件

1.1.1 固体培养基

固体培养基的制备方法：将新鲜的土豆洗净削去皮后切成小块，称取100 g放入烧杯中定容，得到500 mL土豆浸液；在此土豆浸液中加入10 g葡萄糖，1.5 g KH_2PO_4，0.75 g $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$，10 g琼脂，pH值调节为4.5左右，灭菌后分装备用。固体培养基用于菌种的分离、纯化及菌种保存。

1.1.2 液体培养基

液体培养基的制备方法：取500 mL土豆浸液、500 mL蒸馏水，加入10 g葡萄糖，0.2 g氯化铵，0.2 g KH_2PO_4，0.05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.01 g $CaCl_2$，搅拌使其溶解，分装于锥形瓶中灭菌后备用。液体培养基在加入染料后用于菌种的脱色实验。

1.1.3 培养条件

使用固体培养基培养菌种时放置于生化培养箱中培养，使用液体培养基做菌种的脱色实验时采用恒温摇床，培养温度均控制在(35±1)℃。

1.2 实验菌种

本实验所用的BFL-5菌株是从自行采集的腐朽树木样品中筛选、分离出的一株具有良好脱色效果的毛霉菌。

1.3 实验中所用的染料

实验选用了4种生物难降解的偶氮染料：酸性红B，直接耐晒黑G，酸性金黄G，直接湖蓝5B，考察毛霉BFL-5菌株对含偶氮染料的废水降解、脱色的效果。

1.4 废水色度分析方法

实验使用VIS-7220型分光光度计测定染料废水的色度。首先用分光光度计分别对不同的染料进行吸收光谱扫描，以确定各种染料的最大吸收波长，所得结果：酸性红B最大吸收波长为516 nm，直接耐晒黑G最大吸收波长为639 nm，酸性金黄G最大吸收波长为425 nm，直接湖蓝5B最大吸收波长为598 nm；然后分别制作每种染料的浓度-吸光度曲线；测定实验水样的吸光度，通过浓度-吸光度曲线确定废水中染料的浓度，计算脱色效率。

脱色效率计算公式如下：

$$\eta=(C_0-C_x)/C_0\times 100\% \text{ 。}$$

式中：C_0为废水处理前染料的质量浓度(mg/L)；C_x为废水处理后染料的质量浓度(mg/L)；η为脱色效率(%)。

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选及初步鉴定

菌种分离和筛选的主要步骤：从石家庄市附近采集许多个带有白色丝状物的腐朽树木样品，然后分别取1 g朽木样品加入100 mL含约50 mg/L酸性红B染料的液体培养基中，置于恒温摇床，控制温度为(35±1)℃振荡培养，观察其脱色效果；优选脱色效果好的菌种转接至固体培养基上培养，收集其孢子后再进一步分离及纯化；反复进行多次“脱色筛选—转接—分离及纯化”，即得到脱色效果显著的纯种菌株，该菌株在土豆固体培养基上充分成长后，在培养基上长满白色的气生菌丝。通过显微拍照(照相显微镜选用奥林巴斯BHB-3A)观察了营养菌丝及孢子的形态：由图1可见，营养菌丝多分支、无隔膜；由图2可见，该菌株的气生菌丝顶部生长有呈球状的孢子囊，孢子囊内为黑色孢子，暂定名为BFL-5菌株。

将BFL-5菌株委托宝生物工程(大连)有限公司采用真菌26S rDNA D1/D2区域鉴定法对菌种的26S

rDNA 进行测序，并用 BioEdit 序列分析软件分析并得到 26S rDNA 测序结果图；然后应用 Blast 算法对生物序列进行序列比对分析，将 Blast 结果与基因库中已登录的序列进行同源性比对，表明 BFL-5 菌株属于接合菌门→毛霉科→毛霉属。

实验表明该菌株也具有降解废水中土霉素的能力[16]。

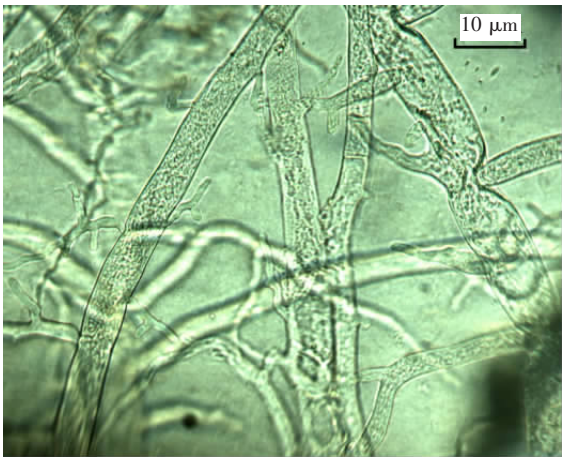

图 1　BFL-5 菌株的营养菌丝体

Fig. 1　Nutrition mycelia of BFL-5 fungal strain

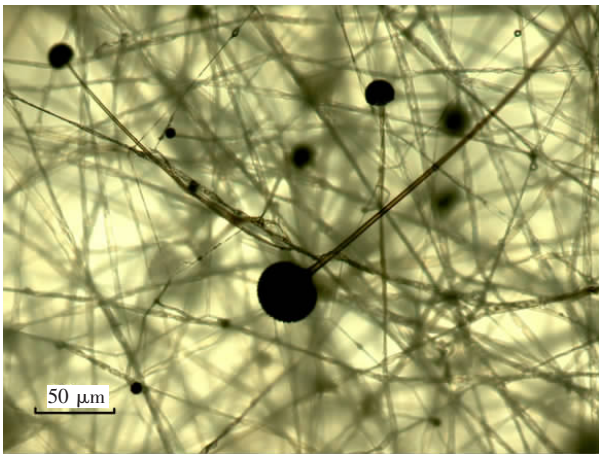

图 2　BFL-5 菌株的气生菌丝及孢子囊

Fig. 2　Aerial hyphae and sporangium of BFL-5 fungal strain

2.2　毛霉的固定化载体材料的比较

本实验以含有真菌生长和产酶所需的碳源和其他营养成分的花生壳、玉米芯、秸秆粉作为毛霉的固定化载体，使菌丝生长、固定于载体上，以达到保持生物活性又易于分离、反复使用的目的。固定化毛霉的制备方法如下：将新鲜、干燥的花生壳（或玉米芯、秸秆粉），粉碎成 1～5 mm 细末作为原料，称取 100 g 原料粉加入 120 mL 土豆浸液，1.0 g $CaSO_4$，0.2 g $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$，pH 值调节为 5.0 左右，分装于平皿后灭菌；将毛霉 BFL-5 菌株的孢子悬浮液接种到平皿载体上，于（35±1）℃生化培养箱中培养 96 h，载体上长满白色菌丝后即获得固定化毛霉，用于脱色实验。

实验分别用花生壳、玉米芯、秸秆粉作为毛霉的固定化载体制备固定化毛霉，比较其对染料酸性红 B 的脱色效率。脱色实验取用 3 个 250 mL 三角瓶进行，分别向瓶中加入 90 mL 液体培养基和 10 mL 质量浓度为 1 g/L 的酸性红 B 溶液，配制成质量浓度约为 100 mg/L 的模拟染料废水；然后分别称取 3.0 g（湿重）3 种固定化毛霉放入三角瓶内，将实验瓶置于（35±1）℃恒温摇床振摇进行脱色反应，定时取样分析。花生壳、玉米芯、秸秆粉作为载体的固定化毛霉脱色效果见图 3。

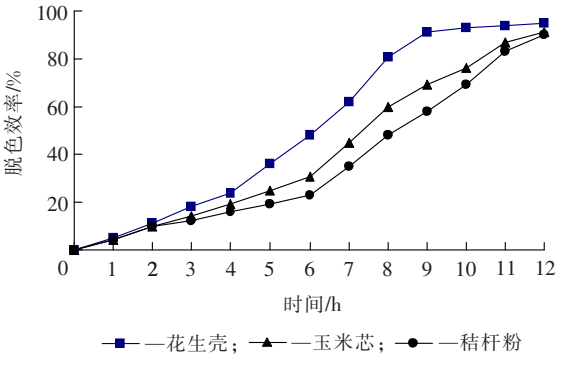

图 3　3 种载体固定化毛霉 BFL-5 的脱色效果对比图

Fig. 3　Contrast diagram of three kinds of carrier immobilized *Mucor* sp. BFL-5 decolorization.

由图 3 可见用花生壳、玉米芯、秸秆粉作为毛霉的固定化载体制备固定化毛霉对含酸性红 B 的染料废水均有显著的脱色效果，经 12 h 振摇反应对酸性红 B 的脱色效率超过 90%，其中以花生壳作为毛霉 BFL-5 菌株的固定化载体效果最佳，经过 9 h 反应脱色效率即可超过 90%。

2.3　固定化毛霉 BFL-5 菌株对不同染料脱色效率的比较

用以花生壳为载体制备的固定化毛霉 BFL-5 分别对含有酸性红 B，酸性金黄 G，直接湖蓝 5B，直接耐晒黑 G 等 4 种染料的模拟废水进行脱色实验。

实验方法：分别向 250 mL 三角瓶中加入 95 mL 液体培养基，再分别加入 5 mL 质量浓度为 1 g/L 的酸性红 B，酸性金黄 G，直接湖蓝 5B，直接耐晒黑 G 等 4 种染料溶液配制成质量浓度约为 50 mg/L 的模拟染料

废水，然后各称取3.0 g(湿重)以花生壳为载体制备的固定化毛霉放入三角瓶内，将实验瓶置于(35±1)℃恒温摇床振摇进行脱色反应，定时取样分析残留的染料质量浓度，实验结果见图4。

由图4可见：以花生壳为载体制备的固定化毛霉BFL-5对酸性红B，酸性金黄G，直接湖蓝5B，直接耐晒黑G等4种染料均有显著的降解效果，经过12 h反应，固定化毛霉对4种染料的脱色效率都超过90%。

但是固定化毛霉BFL-5对不同染料降解速率不同，对分子量较小的染料降解速度较快；反之，对分子量较大的染料降解比较慢。表1比较了染料分子量与经过8 h反应染料脱色效率的关系。

表1 染料分子量与降解速率的关系

Tab. 1 Dye molecular weight and degradation rate relationship

染料种类	相对分子量	8 h染料脱色效率/%
酸性红B	502.42	92.8
酸性金黄G	375.38	91.8
直接湖蓝5B	992.83	77.6
直接耐晒黑G	839.77	78.4

2.4 不同初始浓度的直接湖蓝5B染料的脱色效率

用以花生壳为载体制备的固定化毛霉BFL-5对初始质量浓度为50 mg/L，100 mg/L和200 mg/L直接湖蓝5B的3种不同的模拟废水分别进行脱色实验，其他实验条件同上，经过定时取样分析，得出不同的初始质量浓度下反应时间与脱色效率相关曲线见图5。

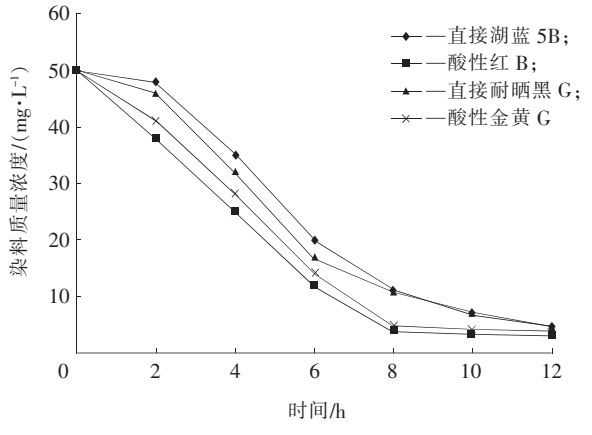

图4 固定化毛霉BFL-5对4种染料的模拟废水脱色实验染料残留浓度随时间变化曲线

Fig. 4 Dye residues concentration time curve contrast diagram of four kinds of dye wastewater decolorized by immobilized *Mucor* sp. BFL-5

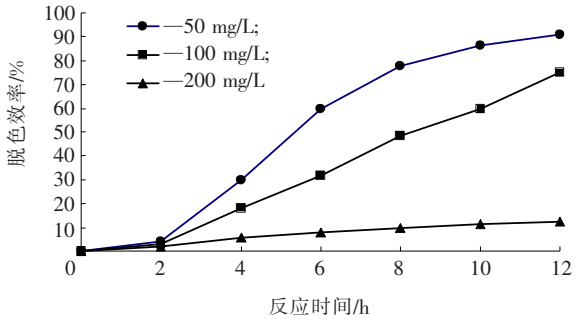

图5 固定化毛霉BFL-5对不同初始浓度的直接湖蓝5B脱色效率

Fig. 5 Immobilized Mucor sp. BFL-5's degrading direct blue 5B with different initial concentration.

由图5可见：固定化毛霉BFL-5对不同初始质量浓度的直接湖蓝5B的脱色效率有较大的差别，直接湖蓝5B质量浓度低于50 mg/L时，脱色效果较好；直接湖蓝5B质量浓度为100 mg/L时，脱色效果较差；直接湖蓝5B质量浓度达到200 mg/L时，基本没有脱色效果，显示出直接湖蓝5B对毛霉BFL-5菌株的抑制作用。

3 结 论

1)本实验采集腐朽树木上生长的真菌样品，经过筛选、分离出脱色效果显著的BFL-5的菌株；采用真菌26S rDNA D1/D2区域鉴定法进行了初步鉴定，判明该菌种属于接合菌门→毛霉科→毛霉属。

2)以花生壳、玉米芯、秸秆粉作为毛霉的固定化载体制备固定化毛霉，比较其对酸性红B染料的脱色效率，结果表明以花生壳作为毛霉BFL-5菌株的固定化载体效果最佳，经过9 h反应，对酸性红B的脱色效率超过90%。结果表明，毛霉BFL-5菌株可作为染料废水脱色的新菌种。

3)以花生壳为载体制备的固定化毛霉BFL-5对酸性红B，酸性金黄G，直接湖蓝5B，直接耐晒黑G等4种染料均有显著的脱色效率，经过12 h降解反应，4种染料的浓度均下降了90%以上。

4)固定化毛霉BFL-5菌株对分子量较小的染料降解速度较快，对分子量较大的染料降解得比较慢。分子量较大的直接湖蓝5B质量浓度达到200 mg/L时，出现抑制作用，基本没有脱色效果。

参考文献:

[1] 周　琪,赵由才. 染料对人体健康和生态环境的危害[J]. 环境与健康杂志(Journal of Environment and Health),2005,22(3):229-231.

[2] 钟金汤. 偶氮染料及其代谢产物的化学结构与毒性关系的回顾与前瞻[J]. 环境与职业医学(Journal of Environmental & Occupational Medicine),2004,21(1):58-62.

[3] 丁忠浩. 有机废水处理技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 317-338.

[4] 李家珍. 染料、染色工业废水处理[M]. 北京:化学工业出版社,1997. 1-7,342-348.

[5] 钱　易,汤鸿霄,文湘华,等. 水体颗粒物和难降解有机物的特性与控制技术原理(下卷):难降解有机物[M]. 北京:中国环境出版社,2000. 1-21.

[6] 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(Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control),2000,1(2):9-16.

[7] 王　惠,郑小伟,王宾香. 真菌对染料的脱色研究进展[J]. 应用与环境微生物学报(Chinese Journal of Applied & Environmental Biology),2009,15(1):147-151.

[8] JEFFREY K G,MICHAEL H G. Decolorization fo several polymericdyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology,1983,45:1 741-1 747.

[9] LIBRA J A,BORCHERT M,BANIT S. Competition strategies for thedecolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi trametes versicolor under non-sterile conditions[J]. Biotechnol Bioeng,2003,82(6):736-744.

[10] 李向飞,文湘华,林　刚. 白腐真菌 F1 对染料脱色特性的研究[J]. 环境污染治理技术与设备(Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control),2002,3(7):1-4.

[11] 荚　荣,谢　萍,秦　易. 固定化白腐真菌对多种染料脱色的研究[J]. 菌物系统(Mycosystema),2003,22(2):308-313.

[12] 苏　丹,李培军,许华夏. 均匀设计在固定化毛霉载体配方优化中的应用[J]. 农业环境科学学报(Journal of Agro-Environment Science),2006,25(6):1 667-1 670.

[13] 姜庆宏,崔岱宗,赵　敏,等. 一株产漆酶真菌新月弯孢霉 JQH-100 在染料脱色中的应用[J]. 菌物学报(Mycosystema),2010,29(5):678-682.

[14] 乔治杰,马　斌,陈琼华,等. 灵芝漆酶催化阳离子红 2GL 脱色的研究[J]. 菌物学报(Mycosystema),2010,29(2):261-266.

[15] 张慕明,余志晟,张洪勋,等. 东方伊萨酵母 YP-1 对染料活性艳红 K-2BP 的脱色[J]. 中国环境科学(China Environmental Science),2009,29(12):1 266-1 271.

[16] 罗　晓,王　婷. 固定化真菌处理土霉素废水的研究[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology),2011,32(1):98-102.

(上接第 454 页)

[3] 倪光正,杨仕友,钱秀英. 工程电磁场数值计算[M]. 北京:机械工业出版社,2004.

[4] AZIZI M,BOUSSOUIS M,AUBERT H,et al. A three-dimensional analysis of planar discontinuities by an iterative method[J]. Microwave and Optical Technology Letters,1996,13(6):372-376.

[5] JI W,LUO Q,YANG F. Analysis of H-shaped patch antenna by wave concept iterative procedure (WCIP)[A]. ICMMT 2010 Proceedings[C]. Chengdu:[s. n.],2010. 797-800.

[6] ZAIRI H,GHARSALLAH A,GHARBI A,et al. Modelisation of probe feed excitation using iterative method[J]. Applied Computational Electromagnetics Society Journal,2004,19 (3):198-205.

[7] GHARSALLAH A,GHARBI A,DESCLOS L,et al. Analysis of interdigital capacitor and quasi-lumped miniaturized filters using iterative method[J]. International Journal of Numerical Modelling,2002,15(2):169-179.

(上接第 506 页)

[5] LIU T C H,FAHAD M K,DAVIES J M. Experimental investigation of behavior of axially restrained steel beams in fire[J]. J of Constructional Steel Research,2002,58:1 211-1 230.

[6] ALLAM A M,BURGESS I W,PLANK R J,et al. Performance-based simplified model for a steel beam at large deflection in fire[A]. Proc 4th International Conference on Performance-Based Codes and Fire Safety Design Methods[C]. Melbourne:[s. n.],2002.

[7] 王银志. 考虑结构整体性的组合梁抗火性能研究[D]. 上海:同济大学,2008.

[8] 郭士雄. 约束钢梁在升温段和降温段的反应及梁柱节点的破坏研究[D]. 上海:同济大学,2006.

[9] 李侥婷. 平端板连接半刚性梁柱组合节点的抗火性能研究[D]. 上海:同济大学,2010.

[10] 李国强,李侥婷,楼国彪. 考虑梁轴力影响的平端板连接组合节点抗火性能试验[J]. 建筑结构学报(Journal of Building Structures),2011,32(4):125-133.

[11] 李　卫,过镇海. 高温下砼的强度和变形性能试验研究[J]. 建筑结构学报(Journal of Building Structures),1993,14(1):8-16.

[12] 楼国彪. 钢结构高强度螺栓外伸式端板连接抗火性能研究[D]. 上海:同济大学,2005.

[13] ENV 1993-1-2(Eurocode 3),Design of Steel Structures(Part 1. 2):Structural Fire Design[S].