

草酸青霉 *Penicillium oxalicum* 菌体吸附活性染料的性能及微观过程

郑文钊¹, 辛宝平¹, 甘雅玲², 李长平¹

(1. 北京理工大学化工与环境学院, 北京 100081; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要: 研究了草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)在模拟染料废水中以边生长边吸附的方式对活性翠蓝 KN-G, M-GB, K-GL, 活性黑 K-BR、活性艳蓝 M-BR、活性红紫 K-3R 和活性深蓝 K-R 7种水溶性活性染料的脱色性能及吸附过程。结果显示, 生长菌体对7种活性染料具有良好的脱色性能, 染料初始浓度为200 mg/L时, 平均脱色率可达93.0%; 染料初始浓度为400 mg/L时, 活性翠蓝 KN-G 和 M-GB 的脱色率仍达到了99.7%和99.9%。上清液的紫外光谱图及染料分子中铜离子浓度的检测结果表明, 染料通过吸附方式从废水中去除。通过 SEM, TEM 观察发现, 生长菌体在吸附过程中, 菌丝发生肿胀膨大, 细胞壁发生结构重组, 厚度增加10~15倍。细胞壁的结构变化是生长菌体吸附染料的重要机制, 为染料吸附提供位点和进入细胞内部的通道。

关键词: 草酸青霉 *Penicillium oxalicum*; 活性染料; 生物吸附; 细胞结构

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)06-1077-06

1 前言

染料废水是一类主要来源于染料及其中间体生产行业的各种产品和中间体结晶的母液、生产过程中流失的物料及冲刷地面的污水等的废水。该类废水因生产工艺复杂、成分变化大, 含有大量的有机物, COD 高, 色度高, 酸碱性变化大, 直接排入水体会导致严重的环境污染^[1]。吸附法是常用的染料废水脱色技术之一, 而活性炭是对染料选择吸附效果最好的吸附剂, 但较高的价格限制了其使用^[2]。因此开发高效经济的吸附剂成为染料废水处理的主要研究方向。

染料废水微生物脱色与降解的研究已有相当长的一段时间。由于染料分子结构复杂, 含有芳香基团等, 采用生物降解会产生有毒有害的中间产物, 造成二次污染^[3]。近年来国内外许多学者尝试应用生物吸附技术脱除染料废水色度, 取得了良好结果^[4]。这些研究多以干粉菌体或静息活菌为吸附剂, 比较不同菌株吸附性能^[5], 优化染料吸附的条件(如温度、pH 等)^[6], 建立染料吸附的动力学模型^[7]。张书军等^[6]为避免染料对菌体生长的毒害, 将菌体培养及其对染料的吸附分离, 应用草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)静息菌体吸附活性艳蓝 KN-R, 发现培养的菌以直径1~3 mm 菌球的形式存在, 菌体最佳生长温度为30℃, 在pH值为3~5时沉降性能良好。黄榕德等^[8]对草酸青霉的表面性质进行了表征, 扫描电镜(SEM)观察发现菌丝球由很多菌丝交织缠绕而成, 菌丝间有很多空隙, 使染料可以进入菌丝球内部, 有利于吸附。本实验在前人工作的基础上, 研究草酸青霉在模拟

染料废水中以边生长边吸附方式对7种水溶性活性染料的吸附性能, 利用扫描电镜和透射电镜(TEM), 从菌体细胞的微观结构着手研究染料脱色过程。与干粉菌体或静息活菌相比, 生长菌体吸附过程中菌体生长与染料吸附同步进行, 无需进行菌体的单独培养、收获和加工, 操作更简便、处理更经济。

2 材料和方法

2.1 菌种和染料

草酸青霉由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

7种水溶性活性染料活性翠蓝(Reactive Turquoise Blue)KN-G, M-GB, K-GL, 活性黑 K-BR(Reactive Black K-BR)、活性艳蓝 M-BR(Reactive Brilliant Blue M-BR)、活性红紫 K-3R(Reactive Violet K-3R)和活性深蓝 K-R(Reactive Dark Blue K-R)由浙江宁波染料厂赠送。

2.2 培养液和培养方法

固体斜面培养基组分: 葡萄糖 10 g, NH₄Cl 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·H₂O 0.5 g, 琼脂 20 g, 去离子水 1000 mL, 自然 pH 值。高温蒸汽灭菌(112.6℃, 30 min), 用于菌株保存和孢子收获。

液体培养基组分: 葡萄糖 5 g, NH₄Cl 1 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 去离子水 1000 mL, 自然 pH 值。加入不同的染料并高温蒸汽灭菌后制成各种模拟染料废水。

用无菌水冲洗在35℃培养20 d的固体斜面制成孢子悬液, 以5%(v/v)接种量接种到含有60 mL 模拟染料废

收稿日期: 2007-04-05, 修回日期: 2007-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20307002)

作者简介: 郑文钊(1983-), 女, 福建省福州市人, 硕士研究生, 环境工程专业; 辛宝平, 通讯联系人, E-mail: xinbaoping@bit.edu.cn.

水的 100 mL 三角锥形瓶中, 摇床培养(150 r/min, 30 ℃).

2.3 生长菌体对多种染料的脱色性能

生长菌体的吸附能力采用分光光度法测定. 每隔固定时段以无菌操作方式取适量上清液, 10000 r/min 离心 10 min, 调节 pH=7, 于各染料的可见光区内最大吸收波长下测定其吸光度(A_1), 吸附脱色率 R 用下式计算:

$$R=(A_0-A_1)/A_0 \times 100\%$$

其中, A_0 为初始时刻溶液中染料吸光度.

菌体干重的测量: 收集吸附后的菌体, 用蒸馏水反复冲洗至冲洗水不带颜色后, 于 90 ℃ 烘箱中烘干至衡重, 电子天平称量并记录, 用于计算单位质量干菌体的染料吸附容量 q (mg/g).

2.4 染料脱色类型

选择 2 种含铜的活性染料, 即活性翠蓝 KN-G 和活性红紫 K-3R, 研究了吸附前后染料紫外光谱的变化, 并对染料中的铜离子进行追踪. 取适量上清液, 10000 r/min 离心 10 min, 调节 pH=7, 分光光度计测定并计算

上清液中染料浓度 C_{KN-G} 和 C_{K-3R} , 用原子吸收分光光度仪测定铜离子的浓度 C_{Cu} , 对二者变化趋势进行比较.

2.5 超微结构

吸附染料后的菌体细胞和空白菌体样品先用 5% 的戊二醛固定, PBS 缓冲液洗涤数次, pH=7, 然后用 1% 锇酸再固定. 固定后的样品经过乙醇梯度脱水, 部分经乙酸异戊酯处理后, 进行临界点干燥, 喷金, 用扫描电镜(Hitachi S-2360 型, 日立)观察其细胞表面形态; 另一部分用 Epon812 包埋, 超薄切片机切片, 染色后用透射电镜(JEM100SX 型, 日立)在加速电压(80 kV)下观察.

3 结果与讨论

3.1 生长菌体对多种染料的脱色性能

实验选取 7 种水溶性活性染料考察草酸青霉菌的脱色能力, 其中包括 3 种酞菁类染料活性翠蓝 KN-G, M-GB, K-GL; 3 种偶氮类染料活性黑 K-BR、活性艳蓝 M-BR、活性红紫 K-3R 和 1 种蒽醌染料活性深蓝 K-R, 实验结果如图 1、表 1 所示.

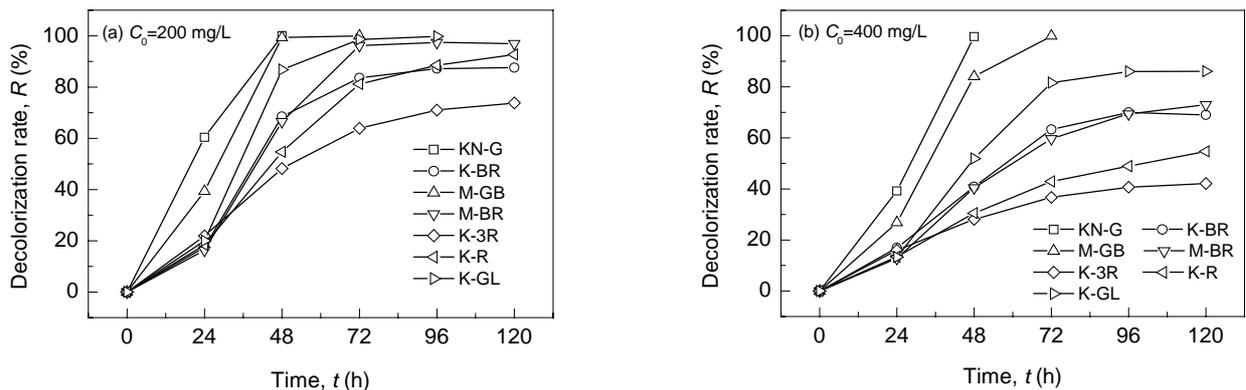


图 1 生长菌体对 7 种活性染料的脱色效率

Fig.1 Decolorization rate of seven reactive dyes in simulative waste water with time

表 1 菌体对 7 种活性染料的脱色率及吸附容量

Table 1 The final decolorization rate and adsorption capacity of seven reactive dyes by the fungus

Dye	$C_0=200$ mg/L		$C_0=400$ mg/L	
	Final decolorization rate, R (%)	Adsorption capacity, q (mg/g)	Final decolorization rate, R (%)	Adsorption capacity, q (mg/g)
Reactive Turquoise Blue KN-G	100	157.9	99.7	336.0
Reactive black K-BR	87.6	129.1	69.0	182.3
Reactive Turquoise M-GB	100.0	138.8	99.9	262.1
Reactive Brilliant Blue M-BR	97.0	139.6	73.0	247.3
Reactive Violet K-3R	73.8	98.3	42.1	95.1
Reactive Dark Blue K-R	92.7	134.2	54.7	161.9
Reactive Turquoise Blue K-GL	99.8	134.4	86.1	205.7

图 1 表明, 在染料初始浓度(C_0)较低时(200 mg/L), 草酸青霉对 7 种活性染料具有良好的脱色作用, 平均脱色率达 93.0%. 初始浓度较高时(400 mg/L), 草酸青霉对 7 种染料平均脱色率虽下降到 74.9%, 但对酞菁类染料

仍有很好的脱色作用, 其中, 对活性翠蓝 KN-G 的脱色率 48 h 即达 99.7%, 对活性翠蓝 M-GB 脱色率 72 h 达 99.9%, 而对活性红紫 K-3R 的脱色率最差, 120 h 仅有 42.1%. 96 h 后, 菌体对各种染料的吸附脱色达到平衡,

继续延长吸附时间, 脱色率无明显提高。

由表 1 可见, 染料初始浓度为 200 mg/L 时, 除活性红紫 K-3R 外, 菌体对其余 6 种染料有较高吸附容量。随着染料初始浓度提高到 400 mg/L, 脱色率有所下降, 但对活性翠蓝 KN-G、M-GB、K-GL 等 6 种染料的吸附容量明显增加, 而活性红紫 K-3R 的吸附容量基本不变, 达到饱和。3 种酞菁类染料活性翠蓝 KN-G、M-GB、K-GL 的吸附容量分别为 336.0, 262.1, 205.7 mg/g; 3 种偶氮类染料活性黑 K-BR、活性艳蓝 M-BR、活性红紫 K-3R 的吸附容量分别为 182.3, 247.3, 95.1 mg/g; 蒽醌染料活性深蓝 K-R 的吸附容量为 161.9 mg/g。菌体对酞菁染料的吸附容量总体上高于偶氮和蒽醌染料。

李桂芳^[9]在优化污泥吸附处理染料废水工艺条件的基础上, 发现污泥对 3 种染料(中性橙、中性黑 BL、元青)在最佳工艺条件(污泥经 400 °C 焙烧, 废水 pH 值为 1, 水温 30 °C)下的脱色率均达到 98%, 其最大吸附量都在 29 mg/g 左右。Aksu 等^[10]研究了以绿藻 *Chlorella vulgaris* 干粉作为生物吸附剂对 3 种活性染料的脱色效果, 在最佳 pH 值下, 绿藻干粉对初始浓度为 400 mg/L 的活性黑 B、活性红 RR 和初始浓度为 200 mg/L 的活性

金黄 RNL 的吸附容量分别为 246.6, 173.2 和 52.8 mg/g。Sadettin 等^[11]研究了嗜温藻青菌在生长状态下对活性染料的吸附作用, 结果表明, 在最优条件下, *Synechococcus* sp. 对 78.3 mg/L 活性红 RB, 72.4 mg/L 活性蓝和 62.0 mg/L 活性黑 B 的吸附容量分别为 56.25, 80.22 和 35.33 mg/g; *Phormidium* sp. 对 78.3 mg/L 活性红 RB, 72.4 mg/L 活性蓝和 61.69 mg/L 活性黑 B 的吸附容量分别为 14.49, 16.76 和 16.95 mg/g。与此相比, 青霉菌生长菌体对染料具有很高的吸附容量, 可达到 95.05~335.99 mg/g (表 1), 是一种极具潜力的生物吸附剂。

为进行机理研究, 选择吸附效果最好的活性翠蓝 KN-G 和吸附效果最差的活性红紫 K-3R 两种染料进行染料在菌体上吸附方式的研究。

3.2 染料脱色类型

如图 2 所示, 在吸附过程中, 培养液上清液的紫外图谱表明, 培养液中的染料浓度随着脱色时间的延长不断下降, 同时谱线峰值所对应的波长不变, 即没有新的物质生成。活性翠蓝 KN-G 和活性红紫 K-3R 两种染料均为铜离子络合染料, 对培养过程中上清液中的铜离子浓度进行检测, 实验结果见图 3。

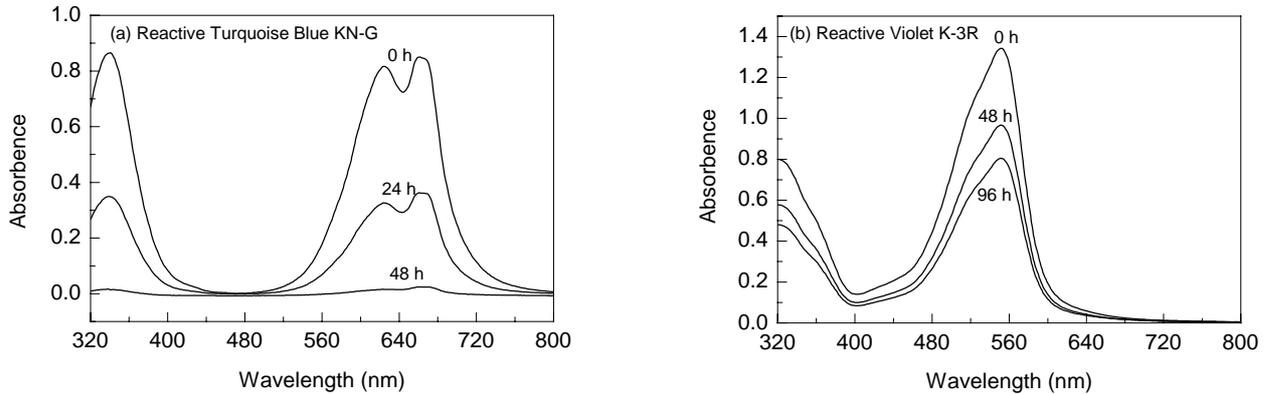


图 2 不同时间段上清液中染料紫外吸收图谱
Fig.2 UV-Visible absorption spectra of the supernatants at different times

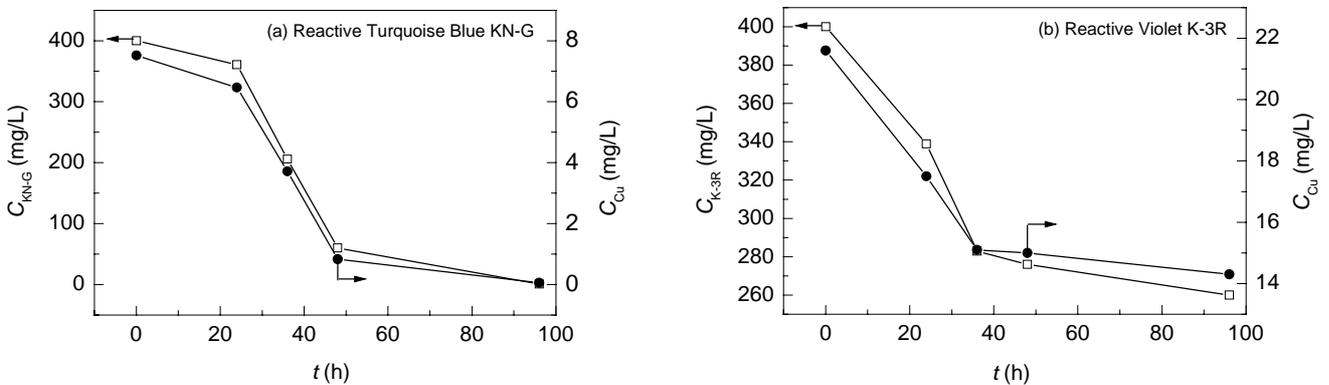


图 3 上清液中染料浓度与 Cu 离子浓度对照
Fig.3 Comparison of remaining dye and remaining copper ion concentrations in the supernatants

由图3可见,模拟废水中铜的浓度变化与染料的浓度变化规律基本一致,即铜的吸附与染料的吸附是同步的,表明染料被吸附而非分解。

3.3 吸附前后菌体的微观结构变化

为了进一步探究草酸青霉菌对染料的吸附机理,对吸附过程中菌体表面形态及特征的变化进行了超微结构的研究。图4(a),4(b)表明,菌体在培养液中呈丝状生长并缠绕成球状。图4(c)~4(f)分别为菌体在含有染料活性翠蓝 KN-G 和活性红紫 K-3R 的模拟废水中生长 24 和 96 h 后的表面形态。对比空白菌体[图4(b)]与吸附后菌体的菌丝形态发现,空白菌丝直径较小,培养 96 h 的菌丝直径约为 3 μm 。在活性翠蓝 KN-G 模拟废水中培养 24 h 后的菌丝直径也约为 3 μm ,且菌丝粗细均匀,培养 96 h 后的菌丝直径增大,菌体发生不规则的膨胀,由细长丝状变为以节点相连的纺锤状。活性红紫 K-3R 对菌丝体形态的影响则更大,在 24 h 即有明显的形态变化,大量菌丝体膨大变形,呈现中间大两头略小的纺锤形,96 h 后菌丝所有节段均发生肿胀膨大。

图5为真菌在染料模拟废水中培养一定时间后的细胞截面图。图5(a),5(b)为菌体在不含染料的培养液中培养 24, 96 h 后的状态。此时细胞外观呈规则的圆形,细胞壁外观致密且厚薄均匀。图5(c)~5(f)分别为菌体在含有染料活性翠蓝 KN-G 和活性红紫 K-3R 的模拟废水中生长 24 和 96 h 后的形态。

由图5可见,2种染料均对菌体的细胞结构产生显著影响,改变菌体细胞壁的初始结构,使细胞壁变得疏松同时厚度明显增大,但对细胞内部的细胞质和细胞器没有显著影响。培养时间越长,细胞壁变化越大。96 h 后菌体细胞壁的厚度约为正常细胞细胞壁厚度的 10~15 倍。其中,活性红紫 K-3R 对菌体细胞壁结构形态的影响大于活性翠蓝 KN-G,在 24 h 即明显地使细胞壁结构发生分散和增厚[图5(e)]。

值得注意的是,Das 等^[12]采用 SEM, TEM 研究了 *Rhizopus oryzae* 对非水溶性染料罗丹明 B 的吸附行为,发现染料在细胞壁和细胞内部均有累积,但细胞结构无明显变化。黄榕德等^[8]利用 Zeta 电位、酸碱滴定技术及红外光谱对 *Penicillium oxalicum* 菌体的表面性质进行了表征,认为菌体表面在反应中起主要作用的 4 种基团为羧基、磷酸基团、胺基及羟基。辛宝平等^[7]利用化学修饰方法研究发现,菌体表面不同官能团(氨基、羧基、磷酸根等)对染料的吸附都有一定的贡献。这表明细胞壁中的这些基团与染料分子发生反应,从而在改变细胞壁结构的同时吸附染料。Brahimi-Horn 等^[13]的研究也表明,染料不仅吸附于菌体表面,还可以进入菌体内部。因此,菌体在含水溶性染料的废水中生长的同时,改变自身细胞壁结构,使其由致密到疏松,通透性增强,使染料分子易于进入细胞内部。

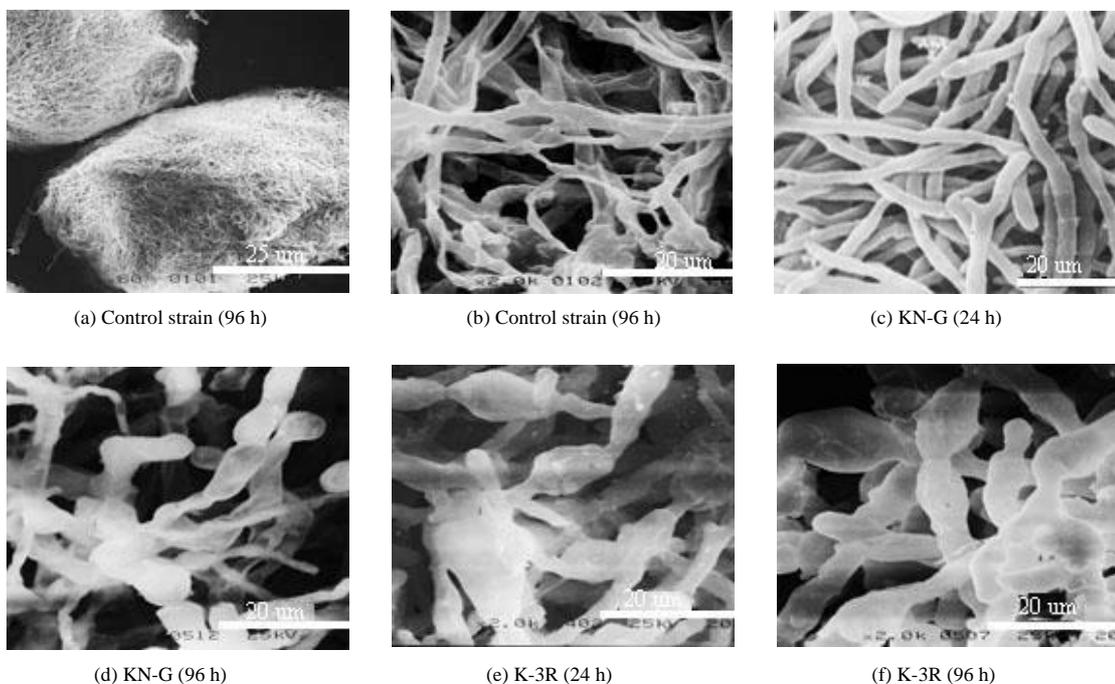


图4 染料吸附过程的生长菌体 SEM 图
Fig.4 SEM images of fungus surface

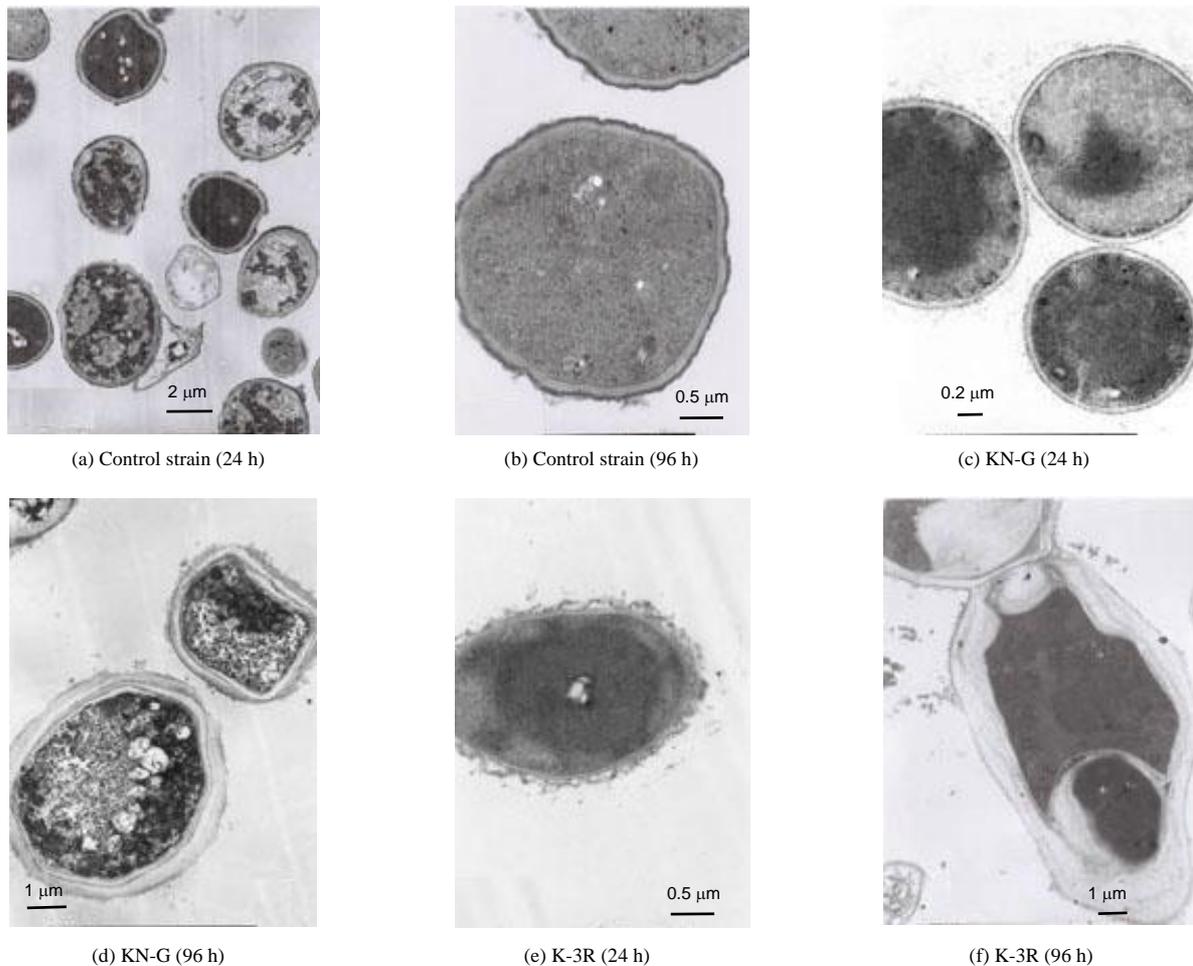


图 5 染料吸附过程生长菌体 TEM 图
Fig.5 TEM images of fungus cells

4 结论

草酸青霉 *Penicillium oxalicum* 对活性染料具有很好的吸附性能。在吸附过程中, 细胞壁起着重要的作用, 菌体在吸附染料过程中菌丝体发生变形、肿胀, 细胞壁的结构也变化; 随着培养、接触时间的延长, 菌丝细胞壁逐渐解散并重组, 由致密变为疏松, 同时其厚度增大为正常状态下的 10~15 倍; 菌丝细胞壁的微观形态和结构变化为染料分子吸附提供位点, 也为染料分子进入细胞内部提供了通道。

参考文献:

- [1] 张林生, 蒋岚岚. 染料废水的脱色方法 [J]. 化工环保, 2000, 20(1): 14-18.
- [2] 李国发, 周才鑫. 化学凝聚-半煤渣吸附法处理棉纺印染废水 [J]. 环境工程, 1992, 11(2): 7-10.
- [3] Banat I M, Nigam P, Singh D, et al. Microbial Decolorization of Textile-dye Containing Effluents: A Review [J]. Bioresour. Technol., 1996, 58: 217-227.
- [4] Fu Y, Viraraghavan T. Fungal Decolorization of Dye Wastewaters: A Review [J]. Bioresour. Technol., 2001, 79: 251-262.
- [5] Polman J K, Breckenridge C R. Biomass-mediated Binding and Recovery of Textile Dyes from Waste Effluents [J]. Textile Chemist and Colorist, 1996, 28(4): 31-35.
- [6] 张书军, 杨敏, 辛宝平, 等. 应用青霉菌 BX1 活体吸附水中活性艳蓝 KN-R [J]. 环境科学, 2004, 25(1): 87-90.
- [7] 辛宝平, 陈桂琳, 郑文钗. 黑曲霉对弱酸性艳兰 RAWL 的吸附动力学和热力学研究 [J]. 安全与环境学报, 2006, 6(5): 1-4.
- [8] 黄榕德, 豆小敏, 张书军, 等. 染料高效吸附菌 *Penicillium oxalicum* 表面特征解析 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(7): 34-37.
- [9] 李桂芳. 污水污泥对染料废水的吸附脱色性能研究 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2005, 35(1): 91-94.
- [10] Aksu Z, Tezer S. Biosorption of Reactive Dyes on the Green Alga *Chlorella vulgaris* [J]. Process Biochem., 2005, 40: 1347-1361.
- [11] Sadettin S, Donmez G. Bioaccumulation of Reactive Dyes by *Thermophilic cyanobacteria* [J]. Process Biochem., 2006, 41: 836-841.
- [12] Das S K, Bhowal J, Das A R, et al. Adsorption Behavior of Rhodamine B on *Rhizopus oryzae* Biomass [J]. Langmuir, 2006, 22: 7265-7272.
- [13] Brahimi-Horn M C, Lim K K, Liang S L, et al. Binding of Textile Azo Dyes by *Mirothecium verrucaria* [J]. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1992, 10: 31-36.

Decolorization Ability and Microcosmic Biosorption Process of Reactive Dyes with Fungus *Penicillium oxalicum*

ZHENG Wen-chai¹, XIN Bao-ping¹, GAN Ya-ling², LI Chang-ping¹

(1. School of Chemical Engineering and Environment, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The decolorization ability and adsorption process of seven water-soluble reactive dyes, namely Reactive Turquoise Blue KN-G, Reactive Black K-BR, Reactive Turquoise M-GB, Reactive Brilliant Blue M-BR, Reactive Violet K-3R, Reactive Dark Blue K-R and Reactive Turquoise Blue K-GL, with *Penicillium oxalicum* were studied when the strain was growing in the simulative dye wastewater. It was found from adsorption experiments that the growing *Penicillium oxalicum* possessed excellent adsorption ability to the reactive dyes. At lower initial dye concentration (200 mg/L), the average decolorization rate of seven dyes reached 93.0%, at higher initial dye concentration (400 mg/L), the decolorization rates of Reactive Turquoise Blue KN-G and Reactive Turquoise M-GB were 99.7% and 99.9% respectively. Spectrophotometric analysis of supernatants and tracing of Cu²⁺ (which is contained in the dye molecules) concentration in the supernatants indicated that the decolorization of dyes by *Penicillium oxalicum* biomass involved an adsorption process. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) images illustrated that the hyphae of the fungus swelled, the structure of the cell wall was reconstituted and the thickness of the cell wall increased about 10~15 folds. The cell wall played an important role in dye biosorption by growing fungus. It not only offered the major biosorption sites for the dyes, but also provided routeway for the dye molecules to enter the cells.

Key words: *Penicillium oxalicum*; reactive dyes; biosorption; cell structure